



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
MESTRADO EM FITOTECNIA

TÁLISON EUGÊNIO DA COSTA

**ANÁLISE GENÔMICA, PROTEÔMICA E DE PATOGENICIDADE DE
ISOLADOS DE *Macrophomina pseudophaseolina* ASSOCIADA AO MELOEIRO**

MOSSORÓ/RN

2020

TÁLISON EUGÊNIO DA COSTA

**ANÁLISE GENÔMICA, PROTEÔMICA E DE PATOGENICIDADE DE
ISOLADOS DE *Macrophomina pseudophaseolina* ASSOCIADA AO MELOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda

Coorientador: Prof. Dr. Rui Sales Júnior

MOSSORÓ/RN

2020

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

C837A COSTA, TALISON EUGENIO DA.
a ANÁLISE GENÔMICA, PROTEÔMICA E DE
PATOGENICIDADE
DE ISOLADOS DE *Macrophomina pseudophaseolina*
ASSOCIADA A CULTURA DO MELOEIRO / TALISON EUGENIO DA
COSTA. - 2020.
51 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientador: Rui Sales Junior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação
em Fitotecnia, 2020.

1. Cucumis melo L.. 2. ISSR. 3. RAPD. 4. SDS-
PAGE. 5. Severidade. I. Holanda, Ioná Santos Araújo,
orient. II. Sales Junior, Rui, co-orient.
III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

TÁLISON EUGÊNIO DA COSTA

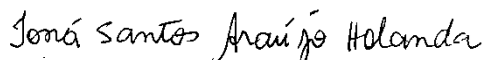
**ANÁLISE GENÔMICA, PROTEÔMICA E DE PATOGENICIDADE DE
ISOLADOS DE *Macrophomina pseudophaseolina* ASSOCIADA AO MELOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.


Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Defendida em: **30/04/2020**.


BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)
Presidente



Prof.^a Dr.^a Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA)
Membro Interno



Dr.^a. Fabiane Rabelo da Costa Batista (INSA)
Membro Externo



Dr. Matheus de Freitas Souza
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me iluminar, me dar forças e tranquilidade nos momentos difíceis quando seria mais fácil desistir. Agradeço a Ele por colocar e manter ao meu lado pessoas muito importantes na minha trajetória.

À minha família, principalmente aos meus pais e minhas irmãs, que sempre me deram apoio e motivação para continuar e entenderam as minhas faltas e meus momentos de afastamento. Agradeço aos meus pais pelo privilégio de poder me dedicar aos estudos, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado. Aos meus amigos, que, apesar dos meus momentos de ausência, sempre me deram apoio e compreensão.

À Instituição, À Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de cursar o mestrado em um ensino público de qualidade.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de apoio, que garantiu a manutenção e o desenvolvimento da presente pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda, por sua dedicação, por seus ensinamentos e conselhos que inspira todos à sua volta. Agradeço também a toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFERSA, pela ajuda e companheirismo de todos: sem a ajuda de vocês, o desenvolvimento dessa pesquisa não seria possível.

Ao Prof. Dr. Rui Sales Júnior, meu coorientador, e a toda a equipe do Laboratório de Fitopatologia II, por ceder os isolados utilizados nesse estudo e por dar todo o apoio técnico e teórico fundamental para o desenvolvimento do presente estudo.

Enfim, agradeço a todos os que de alguma maneira contribuíram para minha qualificação e desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

COSTA, Tálison Eugênio. **Análise genômica, proteômica e de patogenicidade de isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* associado ao meloeiro.** 2020. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2020.

A espécie *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye, causadora da podridão radicular e do declínio das ramas do meloeiro (PRDR), é encontrada em áreas produtoras de melão em associação com espécies de plantas daninhas, que são hospedeiras alternativas da espécie durante períodos de entressafra, o que representa um risco à produção da cultura. Diante disto, os objetivos deste estudo foram avaliar a variabilidade genética de isolados de *M. pseudophaseolina* coletados de plantas daninhas e verificar a sua interação com meloeiro, através da análise de patogenicidade e do perfil de proteínas por SDS-PAGE. Na análise de diversidade genética, os 41 isolados de *M. pseudophaseolina*, coletados das plantas daninhas *Trianthema portulacastrum* L. e *Boerhavia diffusa* L., foram submetidos à análise de similaridade genética com dez marcadores RAPD e cinco marcadores ISSR. No estudo de patogenicidade, dois isolados foram inoculados, usando o método do palito, em plântulas de melão do tipo Amarelo e Cantaloupe. Foram avaliadas incidência e a severidade da doença e a influência destes no comprimento e no peso fresco das plântulas. Na análise de expressão de proteínas, as amostras dos tecidos vegetais foram extraídas pelo método de Fenol/SDS, quantificadas pelo método de Bradford e submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida. Na análise de similaridade genética, ambos os marcadores RAPD e ISSR se mostraram eficazes na avaliação da similaridade genética dos isolados, com valores da correlação cofenética de $r=0,86$ e $0,85$, respectivamente. O coeficiente de similaridade de Jaccard variou de $0,15$ a $0,87$ entre os isolados, indicando alta variabilidade genética intraespecífica. A análise do dendograma gerado pelo método UPGMA indicou a formação de oito grupos principais. Maiores distâncias genéticas foram verificadas entre o grupo de isolados MpBr11 e MpBr23 do grupo formado pelos isolados MpBr65 e MpBr25. Para verificar a relação da variabilidade genética com a sua patogenicidade, os isolados MpBr23 e MpBr65 foram inoculados em plântulas de melão. Após 30 dias, foi verificado que todas as plântulas inoculadas apresentaram sintomas da PRDR, com incidência de 100% para ambos os isolados. O MpBr65 causou maior severidade da doença (3,40) em comparação com o MpBr23 (2,65). A inoculação com os isolados afetou significativamente o comprimento da raiz e os pesos frescos do caule e do sistema radicular das plântulas. Na análise da expressão de proteínas, foram verificadas mudanças no padrão de bandas polipeptídicas entre amostras de plântulas inoculadas e a testemunha, indicando que estresse biótico influenciou na expressão de proteínas pelo hospedeiro. Foram verificadas diferenças no padrão de bandas entre amostras plântulas inoculadas com os dois isolados, sugerindo que as características distintas de agressividade causaram respostas específicas no hospedeiro. Os dados apresentados no presente estudo podem auxiliar no desenvolvimento de métodos de controle frente *M. pseudophaseolina* em meloeiro.

Palavras chave: *Cucumis melo* L., ISSR, RAPD, SDS-PAGE, Severidade.

ABSTRACT

COSTA, Tálison Eugênio. **Genomic, proteomic and pathogenicity analysis of *Macrophomina pseudophaseolina* isolates associated with melon.** 2020. 51p. Thesis (MS Plant Breeding) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2020.

The species *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye, which causes root rot and vine decline of the melon (RRVD), is found in melon-producing areas in association with weed species, alternative hosts of the species during the off-season, which represents a risk to agricultural production. Therefore, the objective of this study was to evaluate the genetic variability of *M. pseudophaseolina* isolates collected from weeds and to verify their interaction with the melon, through the analysis of pathogenicity and protein profile by SDS-PAGE. In the analysis of genetic diversity, the 41 isolates of *M. pseudophaseolina*, collected from the weeds *Trianthema portulacastrum* L. and *Boerhavia diffusa* L., were subjected to analysis of genetic similarity, analyzed with ten RAPD markers and five ISSR markers. In the pathogenicity study, two isolates were inoculated, using the toothpick method, in golden and cantaloupe melon seedlings. The incidence and severity of the disease and its influence on seedling length and fresh weight were evaluated. In the analysis of protein expression, samples of plant tissues were extracted by the Phenol / SDS method, quantified by the Bradford method and subjected to denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel. The RAPD and ISSR markers were effective in assessing the genetic similarity of the isolates, with copenetic correlation values of $r = 0.86$ and 0.85 , respectively. Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.15 to 0.87 among the isolates, suggesting high intraspecific genetic variability. The analysis of the dendrogram generated by the UPGMA method indicated the formation of eight main groups. Greater genetic distances were observed between the group of isolates MpBr11 and MpBr23 from the group formed by isolates MpBr65 and MpBr25. Greater genetic distances were observed between the group of isolates MpBr11 and MpBr23 from the group formed by isolates MpBr65 and MpBr25. In order to verify the relationship between genetic variability and its pathogenicity, the isolates MpBr23 and MpBr65 were inoculated in melon seedlings. After 30 days, it was verified that all inoculated seedlings showed symptoms of PRDR, with incidence of 100% for both isolates. After 30 days, it was found that all inoculated seedlings showed symptoms of RRVD, with incidence of 100% for both isolates. MpBr65 caused greater disease severity (3.40) compared to MpBr23 (2.65). Inoculation with the isolates significantly affected the length of the root and the fresh weights of the stem and root system of the seedlings. In the analysis of protein expression, changes in the pattern of polypeptide bands were observed between samples of inoculated seedlings and the control, suggesting that biotic stress influenced the expression of proteins by the host. Differences were found in the band pattern between seedlings inoculated with the two isolates, suggesting that distinctive characteristics of the aggressiveness caused specific responses in the host. The data presented in the present study can help to develop control methods against *M. pseudophaseolin* in melon.

Key-words: *Cucumis melo* L., ISSR, RAPD, SDS-PAGE, severity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Produtos de PCR dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina* amplificados com os primers ISSR e submetidos à eletroforese em gel de agarose. A codificação 'M' na primeira e na última canaleta do gel representa o marcador de peso molecular de 100pb. Cada canaleta representa cada um dos 41 isolados. 244
- Figura 2** - Dendograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os marcadores ISSR dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*. 255
- Figura 3** - Dendograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os marcadores RAPD dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*. 27
- Figura 4** - Dendograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da combinação dos dados da análise com os marcadores ISSR e RAPD dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*. 288

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Plântulas de melão condição de casa de vegetação. (A) Testemunha. (B) e (C) com 10 dias antes da inoculação e após a inoculação (D), (E) e (F). 400
- Figura 2** - Perfil de proteínas submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos tecidos do caule e raiz de melão com a interação com os isolados de *M. pseudophaseolina*. C= Controle. M= Marcador de peso molecular de proteínas. Setas indicam bandas polipeptídicas que não foram detectadas no controle.... 44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Descrição dos nomes e locais de origem dos isolados utilizados neste estudo....221

Tabela 2 - Identificação (ID), Sequência, temperatura (°C) de anelamento (TA), número de fragmentos amplificados (N°FA), número de fragmentos polimórficos (N°FP), porcentagem de polimorfismo (%P), *Polymorphism information content* (PIC), *Effective multiplex ratio* (EMR) e *Marker index* (MI) dos marcadores utilizados neste estudo.... 233

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Severidade e incidência da podridão radicular de melão dos tipos amarelo e cantaloupe submetidos à inoculação de isolados de *M. pseudophaseolina*. $1c\chi^2$ = valor do qui-quadrado significativo a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis 43

Tabela 2 - Média do comprimento da parte área (CPA) (cm), comprimento da raiz (CR) (cm), peso fresco da parte área (PFPA) (g) e peso fresco da raiz (PFR) (g) das plântulas dos tipos de melão amarelo e cantaloupe inoculados com isolados de *M. pseudophaseolina*. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV%= Coeficiente de variação em %..... 43

Tabela 3 - Número de bandas proteicas detectadas (N°B) e sua presença (+) e ausência (-) nas amostras de caule de melão. C= Controle. PM= Peso molecular das bandas em kilodalton (KDa). PL= Polimorfismo: polimórfica (P); monomórfica (M). 44

Tabela 4 - Número de bandas proteicas detectadas (N°B) e sua presença (+) e ausência (-) nas amostras de raiz de melão. C= Controle. PM= Peso molecular das bandas em kilodalton (KDa). PL= Polimorfismo: polimórfica (P); monomórfica (M). 455

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO II	17
SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> ASSOCIADOS A PLANTAS DANINHAS	17
Resumo	17
Abstract	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 Descrição do material fúngico	20
2.2 Cultivo dos isolados e Extração de DNA	22
2.3 Análise com marcadores ISSR	22
2.4 Análise com marcadores RAPD	23
2.5 Análise estatística	23
3. RESULTADOS	24
3.1 Análise com marcadores ISSR	24
3.3 Análise com marcadores RAPD	25
3.4 Combinação das análises dos marcadores de ISSR e RAPD	27
3.5 Comparação das análises entre os marcadores ISSR e RAPD	28
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO III	32
PATOGENICIDADE E ANÁLISE DO PERFIL DE PROTEÍNAS DA INTERAÇÃO ENTRE <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> E CULTIVARES DE MELÃO	35
Resumo	35
Abstract	36
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 Material vegetal e semeadura	38
2.2 Patogenicidade e virulência em melão	39
2.2.1 Incidência e severidade em melão	39
2.2.2 Análise de patogenicidade	40
2.3 Análise do perfil de proteínas	40
2.3.1 Extração de proteínas	40
2.3.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
3. RESULTADOS	42
3.1 Incidência e severidade em melão	42
3.2 Análise do perfil de proteínas	43
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família Cucurbitaceae, com grande riqueza de variedades de grande importância socioeconômica devido ao seu grande volume de produção, na medida em que é apreciado em todo o mundo. Segundo dados da FAO (2020), o Brasil está entre os 15 países de maior produção da fruta em nível mundial e em 2018 produziu 581 mil toneladas em aproximadamente 23 mil hectares de área plantada.

Dentre as regiões produtoras, destaca-se a região Nordeste, em especial os estados do Rio Grande do Norte e Ceará, que correspondem a 95% da produção nacional IBGE (2018). Grande parte desta produção é destinada à exportação, que gerou em 2019 receita de aproximadamente 160 milhões de dólares, sendo a segunda fruta mais exportada pelo país ao mercado internacional (ABRAFRUTAS, 2019; ANUÁRIO, 2019). Diante do exposto, o cultivo da fruta na região tem grande importância socioeconômica no que tange à geração de empregos e renda para a população destes estados.

O meloeiro apresenta excelente adaptação as condições edafoclimáticas predominantes na região do Nordeste Brasileiro, como temperatura elevadas, insolação em grande parte do ano e solos férteis, além do alto nível tecnológico associado ao seu cultivo (MAIA; LIMA; LIMA, 2013). Entretanto, o cultivo contínuo e a expansão das áreas sem o emprego efetivo de um manejo integrado de doenças provocaram aumento da incidência e severidade de várias doenças (SALES JÚNIOR et al., 2019).

Dentre elas, podemos destacar as doenças associadas a espécies de fungos habitantes do solo. Muitas espécies fúngicas podem ser agentes de patologias, com destaque para as espécies *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc e *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (PORTO et al., 2019; SALES JÚNIOR et al., 2012). *M. phaseolina* é relatada como uma das espécies mais frequentes associadas à podridão radicular e declínio das ramas (PRDR) do melão nas regiões produtoras do RN e do CE (ANDRADE et al., 2005).

M. phaseolina é uma espécie com grande diversidade de hospedeiros, tendo sido relatada em mais de 700 espécies de plantas (FARR; ROSSMAN, 2020). *M. phaseolina* era a principal espécie do gênero *Macrophomina* até que foram relatadas duas novas espécies, *M. pseudophaseolina* (SARR et al., 2014) e *M. euphorbiicola* (MACHADO et al., 2019). Pertencente ao filo *Ascomycota*, família *Botryosphaeriaceae*, *M.*

pseudophaseolina foi relatada por Sarr et al. (2014) após análises filogenéticas baseados em regiões de genes conservados. O mesmo autor relevou que a espécie é semelhante a *M. phaseolina* em termos de distribuição e gamas de hospedeiros.

M. pseudophaseolina já foi relatada no Brasil em espécies de Amendoim (*Arachis hypogaea* L.), Algodão do México (*Gossypium hirsutum* L.), Mamona (*Ricinus communis* L.), Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (MACHADO et al., 2019), Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (BRITO et al., 2019), Bredo (*Trianthema portulacastrum* L.) e Pega-pinto (*Boerhavia diffusa* L.) (NEGREIROS et al., 2019).

Os sintomas provocados pela colonização de espécies do gênero *Macrophomina* no meloeiro incluem o amarelecimento das folhas, com manchas necróticas, seguido do completo secamento destas e do colapso do sistema radicular, causando muitas vezes a morte prematura das mudas (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2012). Após a morte das plantas, a espécie continua no ambiente colonizando restos de culturas e no solo, além de ser possível sua manutenção em espécies de ervas daninhas nos períodos de entressafra (NEGREIROS et al., 2019; SALES JÚNIOR et al., 2012).

A carência de informações sobre a variabilidade genética da espécie e sobre sua interação com a cultura dificulta o desenvolvimento de estratégias de manejo eficientes. A utilização de cultivares resistentes é relatada como um dos métodos mais eficazes para o controle de doenças causadas por espécies de fungos habitantes do solo (ALMEIDA et al., 2003), sendo necessário, para isto, desvendar a heterogeneidade genética da espécie e sua relação na interação com o hospedeiro, de modo a compreender os mecanismos de patogênese e de resposta da planta (MEHTA et al., 2008).

Nesse contexto, o estudo da diversidade genética por meio do uso de marcadores moleculares baseados em PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) se caracteriza como um método eficiente e prático para a caracterização genética de espécies de fungos fitopatogênicos (PAPLOMATAS, 2004). A variabilidade de patógenos associados ao solo foi desvendada com sucesso através de marcadores como o ISSR e RAPD (SALAHLOU; SAFAIE; SHAMS-BAKHS, 2019; GOMES-SILVA et al., 2017; MAHDIZADEH; SAFAIE; GOLTAPEH, 2011), auxiliando no entendimento das suas relações inter e intraespecíficas com hospedeiros e regiões.

A metodologia do ISSR é baseada na utilização de um único iniciador na PCR composto por regiões de microssatélites (SSR), ao passo que o RAPD é baseado na utilização de iniciador de 10 nucleotídeos COMPOSTOS por sequências aleatórias (Irshad; Idrees, 2014). Ambas as

metodologias têm como características o baixo custo, simplicidade e rapidez na obtenção de resultados (SOUZA, 2015).

Além da diversidade genética da espécie, desvendar o grau de variabilidade na patogenicidade de isolados de *M. pseudophaseolina* é de grande importância para o planejamento de medidas de controle eficientes. Espécies do gênero *Macrophomina* são relatadas por sua grande diversidade fisiológica e patogênica, fazendo o patógeno se adaptar a diversas condições agroecológicas (IQBAL; MUKHTAR, 2014). O conhecimento da patogenicidade de *M. pseudophaseolina* na região pode auxiliar no manejo de doenças, a partir do desenvolvimento de cultivares resistentes (GADE; BELKAR; INGLE, 2018).

O estudo da interação planta-patógeno, através de estudos proteômicos, pode ajudar a compreender os mecanismos desempenhados pelas proteínas em resposta ao estresse biótico provocado pela ação de patógenos (LIU et al., 2019). A técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) é baseada na separação de proteínas a partir de seu peso molecular após a submissão de um campo elétrico (BRUNELLE; GREEN, 2014). Esta é considerada um método primário da proteômica, que nos permite verificar mudanças no padrão de expressão de bandas polipeptídicas entre amostras de plantas inoculadas e o controle (ARAVIND; BRAHMBHATT, 2018; NURCAHYANI; AGUSTRINA; HANDAYANI, 2016). A posterior identificação, por métodos mais sensíveis, pode auxiliar em programas de melhoramento frente a doenças associadas à cultura.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a variabilidade genética de isolados de *M. pseudophaseolina* coletados das ervas daninhas brejo (*Trianthema portulacastrum* L.) e pega-pinto (*Boerhavia diffusa* L.), por meio de marcadores RAPD e ISSR, e analisar a patogenicidade e o perfil de proteínas da sua interação com plântulas de melão.

REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS. **ESTATÍSTICA DE EXPORTAÇÕES DE FRUTAS NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2019.** – **Abrafrutas.** Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2019/07/17/estatistica-de-exportacoes-de-frutas-no-primeiro-semester-de-2019/>>. Acesso em: 18 mar. 2020.
- ALMEIDA, Á. M. R. et al. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v. 28, n. 3, p. 279–285, 2003.
- ANDRADE, D. E. G. T. et al. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathol**, Botucatu-SP, v. 31, n. 4, p. 327–333, 2005.
- ANUÁRIO. **Anuário 2019-2020: Retrospectiva 2019 & Perspectivas 2020 dos HF's - HF Brasil.** Disponível em: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/anuario-2019-2020-retrospectiva-2019-perspectivas-2020-dos-hf-s.aspx>>. Acesso em: 18 mar. 2020.
- ARAVIND, T.; BRAHMBHATT, A. B. Protein Profiling of Okra Genotypes Resistant to Root and Collar Rot Incited by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Using SDS-PAGE. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram-TA, v. 7, n. 11, p. 2290–2293, 2018.
- BRITO, A. C. Q. et al. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Berkeley, v. 101, n. 4, p. 1245, 2019.
- BRUNELLE, J. L.; GREEN, R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In: **Methods in Enzymology**. Academic Press Inc., 2014. p. 151–159.
- FAO. **Home | Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en>>. Acesso em: 19 mar. 2020.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA.** Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 19 mar. 2020.
- GADE, R. M.; BELKAR, Y. K.; INGLE, Y. V. Morphological and Pathogenic Variability among *Rhizoctonia bataticola* Isolates Associated with Soybean (*Glycine max* L.) from India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 7, n. 1, p. 2575–2588, 2018.
- GOMES-SILVA, F. et al. Genetic Diversity of Isolates of *Macrophomina phaseolina* Associated with Cowpea from Brazil Semi-Arid Region. **Journal of Agricultural Science**, Ontario, v. 9, n. 11, p. 112-116, 2017.
- IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/abate/brasil>>. Acesso em: 19 mar. 2020.
- IQBAL, U.; MUKHTAR, T. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. **The Scientific World Journal**, Londres, v. 2014, n. 1, p. 1–9, 2014.
- IRSHAD, M.; IDREES, M. Molecular Markers in Plants for Analysis of Genetic Diversity: A Review. **EUROPEAN ACADEMIC RESEARCH**, Bucharest, v. 2, n. 1, p. 1513–1540,

2014.

LIU, Y. et al. Proteomics: A powerful tool to study plant responses to biotic stress. **Plant Methods**, Berlin, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2019.

MACHADO, A. R. et al. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 153, n. 1, p. 89–100, 2019.

MAHDIZADEH, V.; SAFAIE, N.; GOLTAPEH, E. M. Diversity of *Macrophomina phaseolina* based on morphological and genotypic characteristics in Iran. **Plant Pathology Journal**, Worcester, v. 27, n. 2, p. 128–137, 2011.

MAIA, L. K. R.; LIMA, R. E. M.; LIMA, J. S. Importância do meloeiro e aspectos relacionados à resistência a *Rhizoctonia solani*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Jandaia-GO, v. 9, n. 17, p. 1609–1622, 2013.

MEHTA, A. et al. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? **FEBS Journal**, Oxford, v. 275, n. 15, p. 3731–3746, 2008.

NEGREIROS, A. M. P. et al. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 167, n. 6, p. 326–337, 2019.

NURCAHYANI, E.; AGUSTRINA, R.; HANDAYANI, T. T. The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium oxysporum*. **Journal of Plant Sciences**, Nova Iorque, v. 4, n. 5, p. 102, 2016.

PAPLOMATAS, E. J. Molecular diagnostics for soilborne fungal pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, Florença, v. 43, n. 2, p. 213–220, 2004.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; CARVALHO, A. D. F. **Identificação e manejo das principais doenças fúngicas do meloeiro Circular Técnica (INFOTECA-E)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/hortalicas/busca-de-publicacoes/-/publicacao/941622/identificacao-e-manejo-das-principais-doencas-fungicas-do-meloeiro>>. Acesso em: 19 mar. 2020.

PORTO, M. A. F. et al. Interaction of *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* as root rot pathogens of *Cucumis melo*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 45, n. 4, p. 355–360, 2019.

SALAHLOU, R.; SAFAIE, N.; SHAMS-BAKHSI, M. Using ISSR and URP-PCR markers in detecting genetic diversity among *Macrophomina phaseolina* isolates of sesame in Iran. **Journal of Crop Protection**, Teerã, v. 8, n. 3, p. 293–309, 2019.

SALES JÚNIOR, R. et al. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza-CE, v. 43, n. 1, p. 195–198, 2012.

SALES JÚNIOR, R. et al. REACTION OF MELON GENOTYPES TO THE ROOT'S ROT CAUSED BY *Monosporascus* 1. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 1, p. 288–294, 2019.

SARR, M. P. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, Florença, v. 53, p. 250–268, 2014.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia-SP, v. 17, n. 3, p. 495–503, 2015.

CAPÍTULO II

SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Macrophomina pseudophaseolina* ASSOCIADOS A PLANTAS DANINHAS

RESUMO

O objetivo desse estudo foi analisar a diversidade genética de isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye associados a duas espécies as ervas daninhas, *Trianthema portulacastrum* L. e *Boerhavia diffusa* L., por meio dos marcadores moleculares ISSR e RAPD. Os 41 isolados de *M. pseudophaseolina* foram submetidos à amplificação com 10 iniciadores RAPD e 5 iniciadores ISSR. A similaridade genética dos isolados foi calculada por meio do coeficiente de Jaccard e do agrupamento pelo método UPGMA. O poder de discriminação dos marcadores foi analisado a partir dos valores do PIC, EMR e MI. Todos os isolados foram confirmados em nível de espécie a partir da análise com os marcadores gene-específicos, onde foi verificado um produto de 350-bp nos 41 isolados. Foi observado que ambos os métodos de análise foram considerados satisfatórios na detecção da diversidade genética dos isolados da espécie (valores da correlação cofenética foram $r=0.86$ e 0.85 , respectivamente), porém os marcadores ISSR apresentaram o maior poder de resolução em comparação com o RAPD. Com a combinação dos dados obtidos dos dois marcadores, o coeficiente de similaridade variou de 0,15 a 0,87. A análise do dendograma gerado pelo método UPGMA indicou a formação de oito grupos principais. Dentre os isolados, foi observado alto nível de variabilidade entre os fungos, havendo dissimilaridade acima de 85%. O agrupamento de acordo com a origem da espécie isolada ou local de coleta não foi observado na grande maioria dos grupos gerados. Maiores distâncias genéticas foram verificadas entre o grupo de isolados MpBr11 e MpBr23 do grupo de isolados MpBr65 e MpBr25. A maior similaridade observada foi entre os isolados MpBr27 e MpBr28 com 86% de similaridade. As informações sobre a variabilidade genética da espécie apresentadas neste estudo podem auxiliar programas de melhoramento genético contra a podridão radicular e declínio das ramas.

Palavras-chave: variabilidade genética, RAPD, ISSR, melão.

**GENETIC SIMILARITY OF *Macrophomina pseudophaseolina* ISOLATES
ASSOCIATED WITH WEEDS**

ABSTRACT

This study aimed to investigate the genetic diversity of *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye isolates associated with two weed species, *Trianthema portulacastrum* L. and *Boerhavia diffusa* L. using ISSR and RAPD molecular markers. The 41 isolates of *M. pseudophaseolina* were submitted to amplification by PCR with 10 RAPD primers and 5 ISSR primers. The resolving power of the markers was analyzed using the PIC, EMR, and MI values. Both methods of analysis were considered satisfactory in detecting the genetic diversity of the isolates of the species (values of the co-phenetic correlation were $r = 0.86$ and 0.85 , respectively), however the ISSR markers showed the highest resolving power in comparison with RAPD markers. With the combination of data obtained from the two markers, the similarity coefficient ranged from 0.15 to 0.87. The analysis of the dendrogram generated by the UPGMA method indicated the formation of 8 main groups. Among the isolates, high level of variability was observed among the fungi isolates, where the dissimilarity was above 85%. Grouping according to the origin of the isolated species or geographic origin was not observed in most of the groups generated. Greater genetic distances were found between the group of isolates MpBr11 and MpBr23 from the group of isolates MpBr65 and MpBr25. The greatest similarity observed was between the isolates MpBr27 and MpBr28, with 86% similarity. The knowledge about the genetic variability of the species presented in this study can help plant breeding programs against root rot and vine decline.

Keywords: genetic variability, RAPD, ISSR, melon.

1. INTRODUÇÃO

A prodrisão radicular e declínio das ramas (PRDR) no meloeiro estão entre as principais doenças que limitam a produtividade da cultura nas regiões produtoras do Ceará (CE) e do Rio Grande do Norte (RN), que correspondem a 95% da produtividade de *Cucumis melo* L. no Brasil (IBGE, 2018). A doença está associada a um complexo de espécies de fungos radiculares, tais como *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, *Fusarium solani* Sacc e *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (SALES JUNIOR et al., 2012). *M. phaseolina* é relatada como a espécie isolada com maior frequência nas áreas de plantio da região (ANDRADE et al., 2005).

Em um estudo realizado por Sarr et al. (2014), foi descrita uma nova espécie do gênero *Macrophomina*, *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye, a partir de uma análise multigênica baseada em cinco regiões gênicas de 189 isolados identificados morfológicamente como *M. phaseolina*. Segundo os mesmos autores, a nova espécie era conhecida apenas no Senegal, onde foi isolada das espécies *Abelmoschus esculentus* L., *Arachis hypogaea* L., *Hibiscus sabdarifa* L. e *Vigna unguiculata* L. Em 2018, *M. pseudophaseolina* foi identificada pela primeira vez no Brasil causando a prodrisão do carvão em *A. hypogaea* L., *Gossypium hirsutum* L. e *R. communis* L. (MACHADO et al., 2019).

Recentemente, em um estudo realizado por Negreiros et al. (2019), a espécie foi isolada e identificada nas ervas daninhas Bredo (*T. portulacastrum*) e Pega-Pinto (*B. diffusa*), comumente encontradas em áreas de plantio do melão nas regiões do CE e RN. Espécies de ervas daninhas foram anteriormente relatadas como hospedeiras alternativas de espécies do gênero *Macrophomina* nos períodos de entressafra em áreas de cultivo de Feijão na Austrália (FUHLBOHM et al., 2012) e de Melão no Brasil (SALES JUNIOR et al., 2012). Somado a isso, os organismos destas espécies produzem estruturas de resistência, chamadas de microesclerócios, que podem sobreviver no solo por 2 a 15 anos, possuem alta gama de hospedeiros (KAUR et al., 2012) e a grande especialização em ambientes quentes e secos como o semiárido (IQBAL; MUKHTAR, 2014), o que torna o controle da patologia um problema para os produtores.

A utilização de cultivares resistentes é a primeira frente de estratégias que compõem o manejo integrado e sustentável de doenças (ALMEIDA et al., 2014). Para o desenvolvimento da cultivar, além do conhecimento da diversidade genética do vegetal, é necessário considerar o grau de variabilidade do agente patogênico, já que a alta diversidade intraespecífica pode

influenciar no grau de adaptação à resistência desenvolvida pelas plantas (ŽIVANOV et al., 2019).

Várias metodologias são utilizadas para determinar o grau de variabilidade entre os indivíduos de uma espécie patogênica de interesse. Análises baseadas em caracteres morfológicos e de patogenicidade geralmente são os primeiros a ser utilizados, porém estes demandam tempo e são de difícil quantificação (SALAHLOU; SAFAIE.; SHAMS-BAKHSH et al., 2019). Nesse contexto, o uso de métodos moleculares, como os baseados em PCR, é uma metodologia rápida e eficiente na detecção de variabilidade entre indivíduos da mesma espécie (SCHNEIDER et al., 2018).

A diversidade genética de populações de *M. phaseolina* foi detectada nos últimos anos com sucesso por meio de marcadores moleculares tais como AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (ALGHUTHAYMI et al., 2016), RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (PURKAYASTHA et al., 2006), SSR (*Simple Sequence Repeats*) (SANCHEZ et al., 2017; TARAKANTA; SHARMA; SINGH, 2005), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (ŽIVANOV et al., 2019) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (MAHDIZADEH et al., 2011). ISSR é um marcador dominante baseado na utilização de um único iniciador na PCR composto por regiões de microssatélites (SSR) (SINGH; SINGH; PANDEY, 2013). A técnica se destaca pela alta reprodutibilidade, boa relação de custo-benefício e a possibilidade de explorar regiões de microssatélites sem conhecimento prévio do genoma da espécie (SOUZA et al., 2015). Por sua vez, os marcadores RAPD são baseados na utilização um único primer composto pela sequência de dez nucleotídeos aleatórios. As vantagens da técnica estão no baixo custo, simplicidade e rapidez na obtenção de resultados (SINGH; SINGH; PANDEY, 2013).

Com a finalidade de entender as relações intra e interespecíficas desta nova espécie de patógeno e, assim, gerar informações valiosas aos programas de melhoramento do PRDR, o presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética de isolados *M. pseudophaseolina*, obtidos de ervas daninhas, através dos marcadores RAPD e ISSR, além de compará-los na eficiência da detecção da variabilidade genética da espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Descrição do material fúngico

Os 41 isolados de *M. pseudophaseolina* utilizados nesse estudo pertencem à Micoteca do Laboratório de Fitopatologia II, do Departamento de Ciências Agrárias e

Florestais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Os detalhes sobre os hospedeiros e os locais de origem dos isolados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos nomes e locais de origem dos isolados utilizados neste estudo.

ID	ID Isolado	Número de Acesso GenBank	Hospedeiro	Origem
MpBr11	CMM-4765	MH373511	<i>T. portulacastrum</i>	Icapuí/CE
MpBr23	CMM-4771	MH373471	<i>T. portulacastrum</i>	Assú/RN
MpBr25	CMM-4773	MH373472	<i>T. portulacastrum</i>	Assú/RN
MpBr26	CMM-4774	MH373512	<i>T. portulacastrum</i>	Assú/RN
MpBr27	CMM-4775	MH373473	<i>T. portulacastrum</i>	Assú/RN
MpBr28	CMM-4776	MH373508	<i>T. portulacastrum</i>	Assú/RN
MpBr30	CMM-4778	MH373509	<i>T. portulacastrum</i>	Assú/RN
MpBr32	CMM-4780	MH373515	<i>T. portulacastrum</i>	Mossoró/RN
MpBr33	CMM-4781	MH373476	<i>T. portulacastrum</i>	Mossoró/RN
MpBr40	CMM-4784	MH373479	<i>T. portulacastrum</i>	Mossoró/RN
MpBr43	CMM-4786	MH373481	<i>T. portulacastrum</i>	Mossoró/RN
MpBr44	CMM-4787	MH373482	<i>T. portulacastrum</i>	Mossoró/RN
MpBr46	CMM-4788	MH373483	<i>T. portulacastrum</i>	Mossoró/RN
MpBr51	CMM-4789	MH373484	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr53	CMM-4791	MH373486	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr54	CMM-4792	MH373487	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr55	CMM-4793	MH373488	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr57	CMM-4795	MH373490	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr58	CMM-4796	MH373491	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr59	CMM-4797	MH373492	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr63	CMM-4800	MH373516	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr65	CMM-4801	MH373517	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr66	CMM-4802	MH373495	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr67	CMM-4803	MH373496	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr71	CMM-4805	MH373497	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr72	CMM-4806	MH373498	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr73	CMM-4807	MH373518	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr74	CMM-4808	MH373499	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr75	CMM-4809	MH373519	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr76	CMM-4810	MH373520	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr77	CMM-4811	MH373501	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr80	CMM-4813	MH373510	<i>B. diffusa</i>	Assú/RN
MpBr81	CMM-4814	MH373500	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr83	CMM-4815	MH373522	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr89	CMM-4817	MH373524	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr92	CMM-4818	MH373504	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr94	CMM-4820	MH373526	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr95	CMM-4821	MH373502	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr97	CMM-4823	MH373505	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr99	CMM-4825	MH373528	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN
MpBr100	CMM-4826	MH373529	<i>B. diffusa</i>	Mossoró/RN

2.2 Cultivo dos isolados e Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio BDA por ± 5 dias a 28°C no escuro até o desenvolvimento de estruturas fúngicas suficientes para o isolamento de DNA. A extração do DNA foi realizada de acordo com a metodologia de Smith et al. (2001) com modificações.

O micélio foi pulverizado com nitrogênio líquido em microtubos de 2.0 mL até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração SDS [SDS 2% e 3%; Tris-HCl 100mM pH 8,0; NaCl 500 mM; EDTA 50mM, β -mercaptoetanol 0,6% e água ultrapura q.s.p] aos tubos e, em seguida, foram incubados em banho termostático a 60°C durante por 40 minutos. Finalizada esta etapa, foi realizada a extração com Clorofórmio-Álcool-Isoamílico (24:1). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado álcool isopropanol e incubados a -20°C por ± 12 horas. Os tubos foram submetidos a lavagens, com álcool 70% e 90%, respectivamente. O *pellet* obtido foi então ressuspenso em solução de *RNAse* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ludwig Biotec, Brasil). O DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) submetido à eletroforese a 110V por 30 minutos.

2.3 Análise com marcadores ISSR

O DNA genômico de todos os 41 isolados de *M. pseudophaseolina* foi amplificado via PCR com os primers ISSR listados na Tabela 2. A reação de amplificação com o volume final de 12 μL foi composta por 1X Taq Buffer MgCl_2 ; 0,16mM dNTP; 1U/ μL Taq DNA Polimerase (Cellco); 0,33 μM *primer*; BSA 0,25mg/ml⁻¹, 30ng de DNA e foi submetida à amplificação em termociclador (Amplitherm). O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento na temperatura específica de cada primer (Tabela 2) por 40 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e a extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 2,5% corados com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) submetidos à eletroforese a 110V por ± 2 horas em tampão TBE 1X. Um padrão de 1 Kb (BioLabs/ New England) foi utilizado como marcador de peso molecular.

2.4 Análise com marcadores RAPD

O DNA genômico de todos os 41 isolados de *M. pseudophaseolina* foram amplificados via PCR com os iniciadores RAPD listados na Tabela 2. Cada reação de volume final de 12 µL foi composta 1X Taq Buffer MgCl₂; 0,16mM dNTP; 1U/µL Taq DNA Polimerase (Cellco); 0,82µM primer; 30ng de DNA e foi amplificada em termociclador (Amplitherm).

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: uma etapa a 95°C por cinco minutos de desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos de amplificação, consistindo em 92°C por 1 min, 40°C por 1 min de anelamento, 72°C por 2 min de extensão, com extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) submetidos à eletroforese a 100V por ± 2 horas em tampão TBE 1X. Um padrão de 1 Kb (BioLabs/ New England) foi utilizado como marcador de peso molecular.

2.5 Análise estatística

Os fragmentos gerados de ambos os marcadores foram convertidos em matrizes de dados binários onde 1 representava a presença da banda no isolado, e 0 representava a ausência. A matriz foi utilizada para calcular o grau de similaridade entre os isolados através do coeficiente de Jaccard (J). A análise de agrupamento foi realizada através do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) no software NTSYSPc. Os atributos dos marcadores foram calculados de acordo com os valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica), EMR (Relação Efetiva do Multiplex) e MI (Índice do Marcador), utilizados para demonstrar seu grau de resolução, foram calculados de acordo com Chesnokov; Artemyeva (2015).

Tabela 2 - Identificação (ID), Sequência, temperatura (°C) de anelamento (TA), número fragmentos amplificados (N°FA), número de fragmentos polimórficos (N°FP), porcentagem de polimorfismo (%P), *Polymorphism information content* (PIC), *Effective multiplex ratio* (EMR) e *Marker index* (MI) dos marcadores utilizados neste estudo.

ISSR								
ID	Sequência	TA(°C)	N°FA	N°FP	% P	PIC	EMR	MI
ISSR 03	DiCA5'CY	50°	12	7	58,3	0,25	4,08	1,03
ISSR 09	TriGTG	50°	25	21	84,0	0,24	17,64	4,16
ISSR 10	TriGTG3'YC	52°	28	20	71,4	0,22	14,29	3,12
ISSR 11	TriGTG5'CY	52°	23	17	73,9	0,21	12,57	2,60
ISSR 16	TriATG3'RC	40°	20	14	70,0	0,32	9,80	3,10

TOTAL			108	79	73,1	Média	0,25	11,67	2,80
RAPD									
OPM 3	GGGGGATGAG	40°	13	9	69,2		0,33	6,23	2,08
OPM 4	GGCGGTTGTC	40°	14	9	64,3		0,40	5,79	2,34
OPM 5	GGGAACGTGT	40°	12	10	83,3		0,40	8,33	3,32
OPM 6	CTGGGCAACT	40°	15	13	86,7		0,26	11,27	2,97
OPM 11	GTCCACTGTG	40°	10	8	80,0		0,28	6,40	1,79
OPM 12	GGGACGTTGG	40°	12	5	41,7		0,24	2,08	0,51
OPM 13	GGTGGTCAAG	40°	13	8	61,5		0,11	4,92	0,53
OPM 16	GTAACCAGCC	40°	21	12	57,1		0,26	6,86	1,77
OPM 18	CACCATCCGT	40°	19	11	57,9		0,26	6,37	1,63
OPH 18	GAATCGGCCA	40°	19	13	68,4		0,34	8,89	2,98
TOTAL			148	98	66,216	Média	0,29	6,71	1,99

3. RESULTADOS

3.1 Análise com marcadores ISSR

Cinco marcadores ISSR que apresentaram bandas reprodutíveis e polimórficas foram utilizados para acessar a similaridade genética dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*. Foram geradas 108 bandas no total, das quais 79 (73,1%) foram polimórficas (Figura 1). A média do PIC foi de 0,25, e o maior e o menor valor observados foram de 0,32 (ISSR 16) e 0,21 (ISSR 10), respectivamente (Tabela 2).

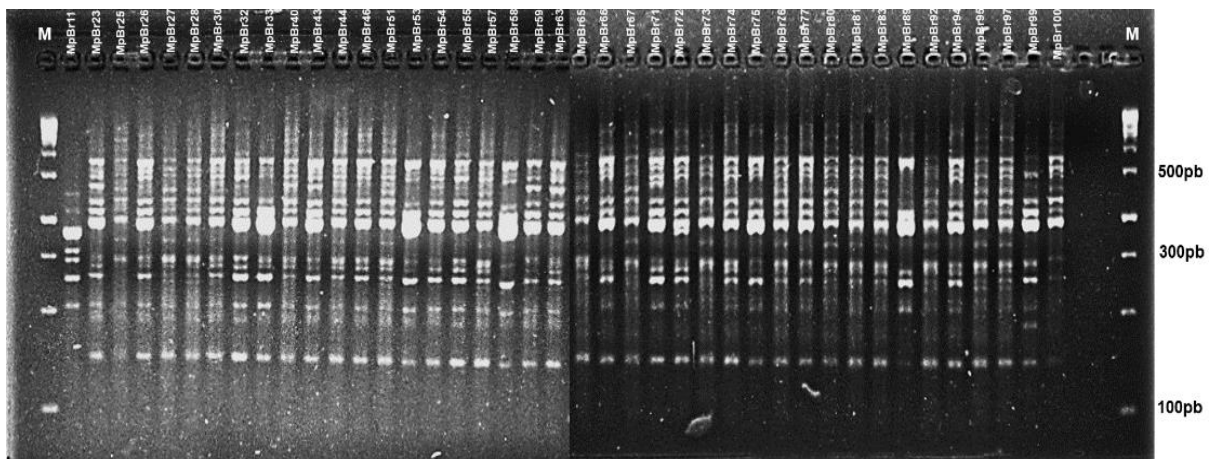


Figura 1 - Produtos de PCR dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina* amplificados com os primers ISSR e submetidos à eletroforese em gel de agarose. A codificação 'M' na primeira e na última canaleta do gel representa o marcador de peso molecular de 100pb. Cada canaleta representa cada um dos 41 isolados.

O coeficiente de similaridade genética variou de 0,13 a 0,91. Pelo método UPGMA, foi gerado o dendograma, revelando que os isolados foram distribuídos em 11 grupos principais, no nível de 58% de similaridade (Figura 2). O grupo 2 foi composto por sete isolados de *T. portulacastrum* (dos quais três são provenientes da cidade de Assú-RN e quatro da cidade de Mossoró-RN) e 17 isolados de *B. difusa* (dos quais 11 são oriundos do

município de Assú-RN e seis de Mossoró-RN) (Figura 2). O grupo 3 foi composto por dois isolados de *T. portulacastrum* provenientes de Mossoró-RN e três isolados de *B. difusa* coletados em Assú-RN e Mossoró-RN (Figura 2).

Três isolados de *B. difusa* coletados em Assú-RN estão presentes no grupo 4. No grupo 7, foram agrupados dois isolados de *T. portulacastrum* oriundos de Assú-RN. Por sua vez, os grupos 5 e 11 foram formados pelos isolados MpBr94 e MpBr99, respectivamente, provenientes de *B. difusa* da cidade de Mossoró-RN (Figura 2). Os grupos 6, 8, 9 e 10 foram compostos por um isolado cada, provenientes de *B. difusa* do município de Assú-RN, nomeados MpBr71, MpBr59, MpBr67 e MpBr65, respectivamente. O isolado MpBr11, proveniente da cidade de Icapuí-CE, de *T. portulacastrum*, constituiu o grupo 1 (Figura 2).

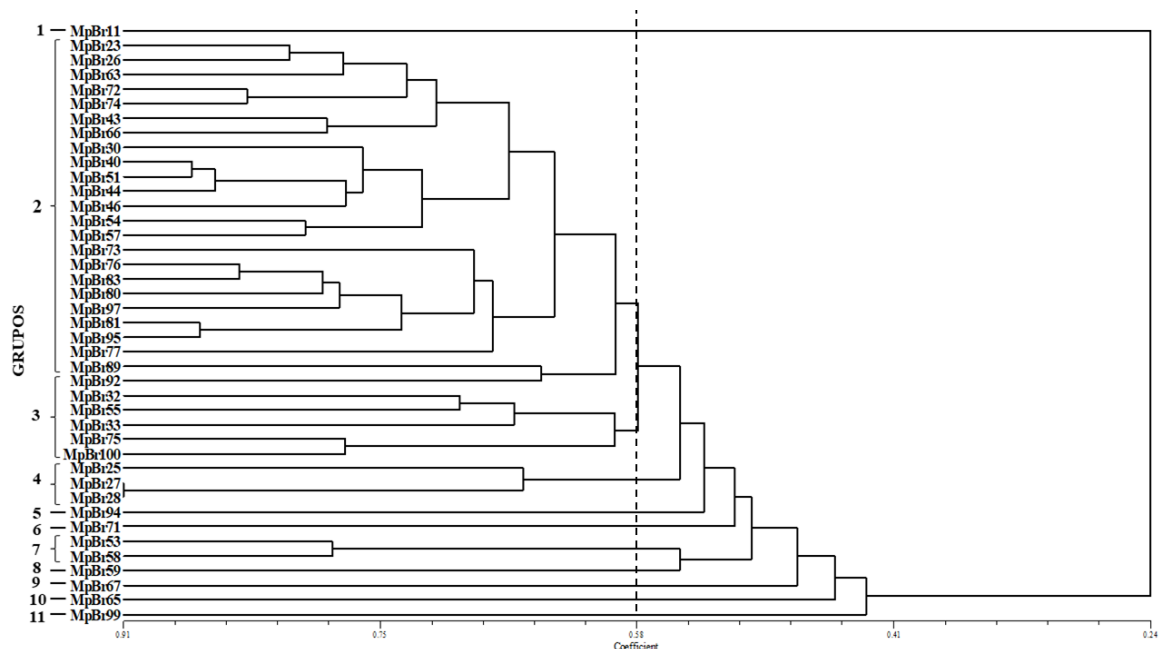


Figura 2 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os marcadores ISSR dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*.

3.3 Análise com marcadores RAPD

Na análise com a técnica RAPD, foram utilizados dez marcadores que produziram fragmentos bem definidos e polimórficos para a análise de diversidade genética dos isolados e *M. pseudophaseolina*. No total, foram produzidas 148 bandas, das quais 98 (66,2%) foram polimórficas. O número de bandas polimórficas por *primer* variou de 5 (OPM 12) a 13 (OPM 6 e OPH18) com a média de 9,8 fragmentos polimórficos por marcador (Tabela 2).

O coeficiente de similaridade genética variou de 0,07 a 0,84. O dendograma obtido através do método UPGMA com os coeficientes de similaridade de Jaccard dos 41 isolados indicou que estes estavam agrupados em nove grupos principais no nível de 55,5% de similaridade (Figura 3). O grupo 1 foi composto pelo indivíduo MpBr11 isolado de *T. portulacastrum* do município de Icapuí-CE. O grupo 2 foi composto pelo maior número de isolados com 26 indivíduos, agrupando todos os representantes isolados da cidade de Mossoró-RN (10) e nove dos isolados de Assú-RN de *B. difusa* (Figura 3). Também foram agrupados sete isolados de *T. portulacastrum*, dos municípios de Assú-RN (5) e Mossoró-RN (2) (Figura 3).

Cinco isolados de *B. difusa* do município de Assú-RN foram agrupados no grupo 7, e dois isolados no grupo 5. O grupo 6 foi composto por um representante de *T. portulacastrum* (Mossoró-RN) e um isolado de *B. difusa* (Assú-RN) (Figura 3). O grupo 4 foi composto por dois isolados de *T. portulacastrum*, um de Mossoró-RN e outro de Assú-RN. Os grupos 3 e 9 foram compostos por um isolado cada de *T. portulacastrum* oriundo de Mossoró-RN. O grupo 8 contém somente um isolado de *B. difusa* da cidade de Assú-RN (Figura 3).

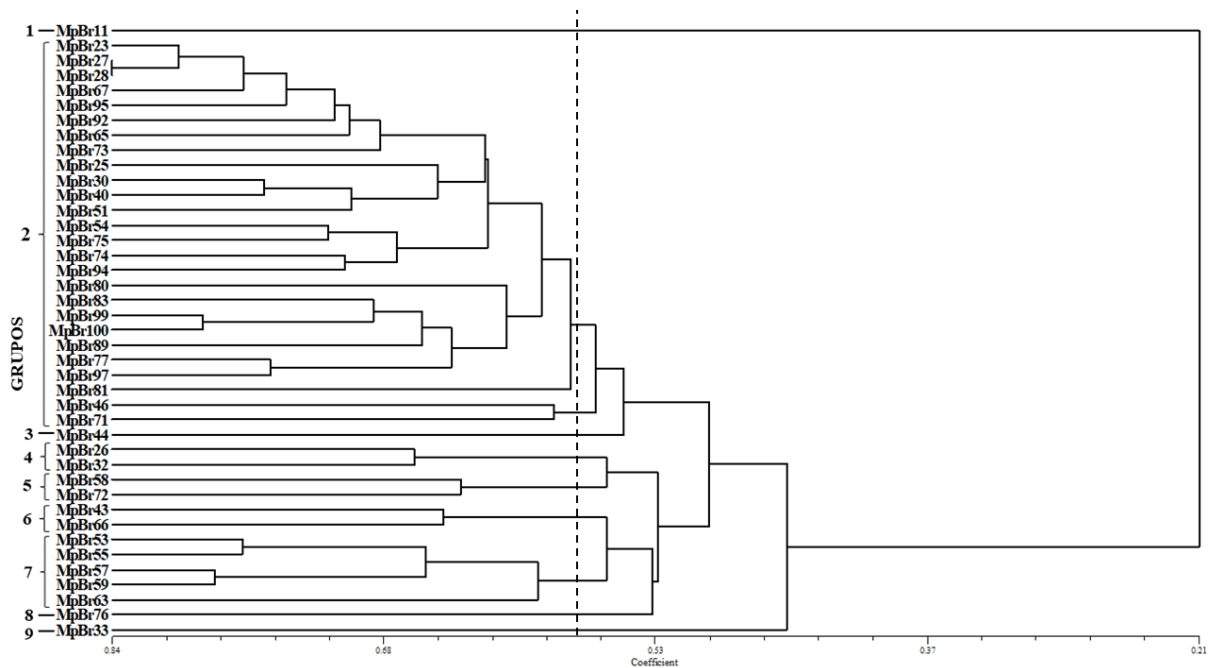


Figura 3 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os marcadores RAPD dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*.

3.4 Combinação das análises dos marcadores de ISSR e RAPD

O dendrograma gerado com a combinação das análises dos marcadores ISSR e RAPD pelo método UPGMA indicou que os 41 isolados de *M. pseudophaseolina* estavam ordenados em oito grupos principais no nível de 56,2% de similaridade (Figura 4). O coeficiente de similaridade genética variou de 0,15 a 0,87.

Dos 41 isolados, 22 foram reunidos no grupo 2, apresentando média de 60% de similaridade. Destes, sete são isolados de *T. portulacastrum* oriundos de Assú-RN (4) e de Mossoró-RN (3) e 15 isolados de *B. difusa*, dos quais oito são de origem de Mossoró-RN e sete da cidade de Assú-RN (Figura 4). O segundo maior grupo (5) foi composto por quatro isolados de *T. portulacastrum* (três de Mossoró e um de Assú) e três isolados de *B. difusa* de origem de Assú-RN (Figura 4). O grupo 6 é composto por cinco isolados *B. difusa* (Assú-RN). O grupo 3 foi composto por dois isolados de *B. difusa* de origem em Mossoró-RN e um isolado de Assú-RN. Os grupos 1, 7 e 8 foram compostos por um isolado cada; MpBr11 (*T. portulacastrum*/Icapuí-CE), MpBr25 (*T. portulacastrum*/Assú-RN) e MpBr65 (*B. difusa*/Assú-RN), respectivamente (Figura 4).

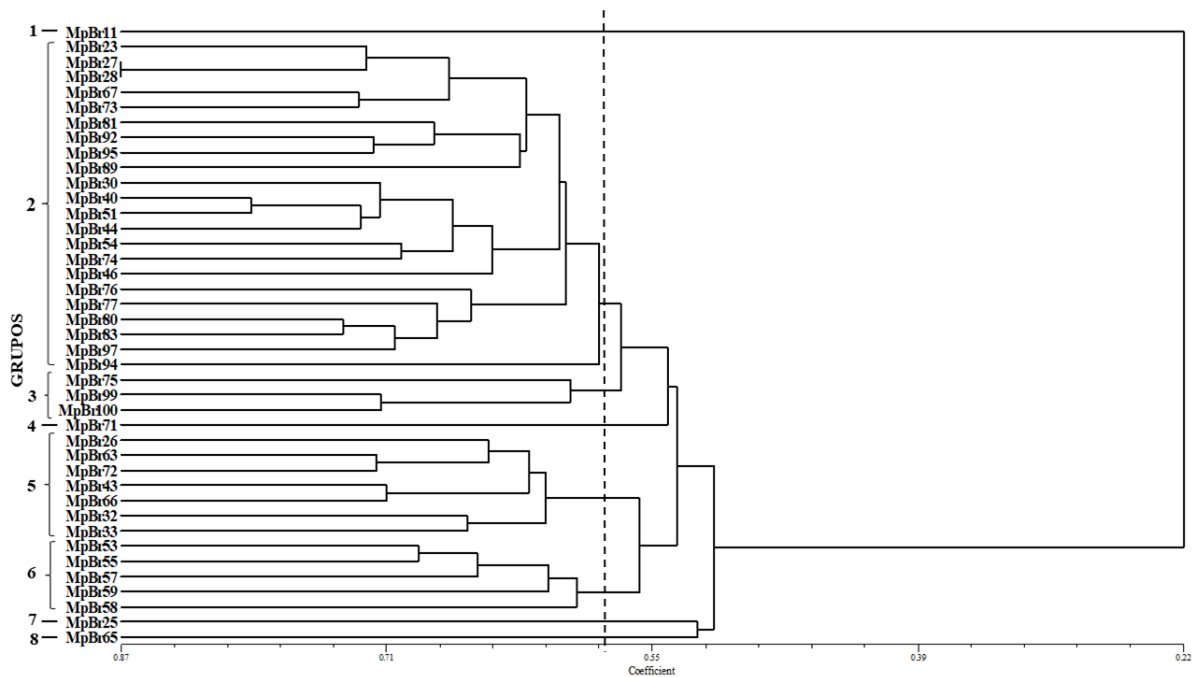


Figura 4 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da combinação dos dados da análise com os marcadores ISSR e RAPD dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*.

3.5 Comparação das análises entre os marcadores ISSR e RAPD

Para determinar a utilidade e o poder de discriminação dos marcadores ISSR e RAPD, foram utilizados como critério os valores do PIC, EMR e MI. Para os marcadores ISSR, os valores médios do PIC, EMR e MI foram 0,24, 11,67 e 2,8, respectivamente. Já para os marcadores RAPD os valores foram 0,28, 6,71 e 1,99 (Tabela 2).

Os valores da análise de correlação cofenética (CC), utilizada para avaliar a correlação dos dados da matriz de similaridade com o dendrograma, de ambas as análises foram satisfatórios. Os valores de CC (r) de ISSR e RAPD foram 0,86 e 0,85, respectivamente. Com a combinação dos dados de ISSR e RAPD, o valor de CC foi de 0,86, mostrando correlação significativa entre os dados. A correlação entre os coeficientes de similaridade das matrizes de ambas as análises, por meio do teste de Mantel (1967), sugeriu a existência de correlação positiva ($r = 0,38$, $p = 0,9$) significativa entre os dados obtidos com os marcadores utilizados no estudo.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a diversidade genética de 41 isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* isolados de duas espécies de ervas daninhas coletadas em áreas produtoras de melão do Ceará e do Rio Grande do Norte foram avaliadas usando marcadores ISSR e

RAPD. O dendograma obtido através do método UPGMA com os coeficientes de similaridade de Jaccard indicou alto grau de variabilidade genética entre os isolados.

Espécies do gênero *Macrophomina* apresentam alto grau de variabilidade na sua patogenicidade, de acordo com o hospedeiro e origem geográfica (PURKAYASTHA et al., 2006) e sua habilidade de adaptação a diferentes condições agroecológicas, relacionadas à sua grande diversidade genética. Csondes et al. (2012) correlacionaram a variabilidade genética de isolados coletados de diferentes regiões com a habilidade de crescimento e desenvolvimento em diferentes condições de temperatura e pH em uma avaliação com isolados de *M. phaseolina*.

A diversidade genética de espécies do gênero *Macrophomina* de diferentes hospedeiros vegetais e origens geográficas foram analisadas com sucesso usando diferentes métodos moleculares. Purkayastha et al. (2006), com o método RFLP-PCR, observaram, por meio da análise de agrupamento, que os isolados altamente agressivos foram separados dos menos agressivos no teste de patogenicidade em feijão. Utilizando marcadores RAPD, Živanov et al. (2019) observaram alta variabilidade entre os isolados de *M. phaseolina* coletados de diferentes países da Ásia e da Europa de diferentes hospedeiros.

Nesse trabalho, os marcadores RAPD e ISSR se mostraram ferramentas eficientes em revelar a diversidade genética dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina*. O dendograma obtido com a combinação dos dados apresentaram correlação significativa ($r= 0,86$) entre as matrizes de dados cofenéticos e a análise de agrupamento. Na comparação entre os dois sistemas, a média do valor do EMR foi de 11,67 para os marcadores ISSR e 6,71 para os marcadores RAPD. Assim, os marcadores ISSR se mostraram mais informativos e eficazes na avaliação da variabilidade genética dos isolados quando comparado aos marcadores RAPD.

De acordo com a análise de agrupamento de ambos os marcadores, os isolados não foram diferenciados de acordo com a origem geográfica ou hospedeiro vegetal, o que é condizente com a análise de Babu et al. (2010), que não observaram correlação do agrupamento dos 50 isolados de *M. phaseolina* com a distância geográfica ou hospedeiro. Apesar disso, no presente trabalho foi observada tendência de agrupamento de isolados da mesma origem geográfica e/ou do mesmo hospedeiro. Por exemplo, no dendograma gerado com os dados dos marcadores ISSR, os isolados de *T. portulacastrum* coletados em Assú (Mp25, Mp27 e Mp28) e os isolados de *B. difusa* (Mp53 e Mp58) também coletados em Assú foram agrupados em grupos específicos.

Sanchez et al. (2017) e Tarakanta et al. (2005), utilizando marcadores SSRs, relataram forte tendência dos isolados em se agrupar por origem e por hospedeiro, em contraste com o que foi observado em estudos utilizando marcadores RAPD (ŽIVANOV et al., 2019) e ISSR (MAHDIZADEH et al., 2011), onde houve baixa relação entre o agrupamento e a origem ou hospedeiro vegetal. Dessa forma, a formação de grupos específicos por origem de coleta ou por hospedeiro pode ser influenciada pelo grau de resolução dos marcadores utilizados (ARIAS et al., 2011).

A maior similaridade entre os isolados foi de 87%, entre os isolados Mp27 e Mp28 de *T. portulacastrum* coletado em Assú. Alta similaridade também foi observada entre os isolados Mp40 (*T. portulacastrum*/Mossoró) e Mp51 (*T. portulacastrum*/Assú) e entre os isolados Mp40 e Mp30 (ambos de *T. portulacastrum*/Mossoró) de 79 e 75%, respectivamente. A alta similaridade entre isolados de origens geográficas diferentes sugere que estes possuem um ancestral comum (ALMEIDA et al., 2003) ou ainda são resultados da propagação através do solo e/ou sementes contaminadas entre as áreas de plantio da cultura (AGHAKHANI; DUBEY, 2009).

De acordo com a matriz de similaridade, maiores distâncias genéticas foram verificadas entre o isolado Mp11 (*T. portulacastrum*/Icapuí) dos isolados Mp59, Mp55 (*B. difusa*/Assú) e Mp32 (*B. difusa*/Mossoró) com 85, 83 e 82% de distância, respectivamente. A alta variabilidade intraespecífica às espécies do gênero *Macrophomina* pode ser explicada pela alta taxa de mutação resultante da reprodução parassexual das espécies (PURKAYASTHA et al., 2008), e pelo alto número de elementos transponíveis (transposons) e de DNA repetitivo em seu genoma (ISLAM et al., 2012).

Devido ao alto nível de variabilidade genética das espécies do gênero *Macrophomina*, o uso de cultivares resistentes é considerado o método mais eficiente e econômico de controle da doença (ALMEIDA et al., 2014). O conhecimento da diversidade genética da população do patógeno é essencial para aprimoramento dos sistemas de manejo e para o programa de melhoramento genético contra o colapso das ramas do meloeiro, já que a variabilidade do patógeno influencia na sua adaptabilidade aos genes de resistência do hospedeiro vegetal (CASELA, 2005).

5. CONCLUSÃO

Foi possível identificar a variabilidade genética dos 41 isolados de *M. pseudophaseolina* por meio dos marcadores ISSR e RAPD, identificando-se alta variabilidade intraespecífica entre

os isolados de origem e/ou hospedeiro iguais ou diferentes. Nesse estudo, foi verificado que ambos os marcadores são satisfatórios na detecção da diversidade genética dos isolados. Os dados obtidos nesse trabalho podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo do colapso das ramas do meloeiro.

REFERÊNCIAS

- AGHAKHANI, M.; DUBEY, S. C. Determination of genetic diversity among Indian isolates of *Rhizoctonia bataticola* causing dry root rot of chickpea. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlin, v. 96, n. 4, p. 607-619, 2009.
- ALGHUTHAYMI, M. A. et al. Pathotyping and AFLP-based molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* isolates from different plant hosts. **Plant Pathology & Quarantine**, Guiyang, v. 6, n. 1, p. 31-41, 2016.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v. 28, n. 3, p. 279-285, 2003.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. *Macrophomina phaseolina* em soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.
- ANDRADE, D. E. G. T. et al. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n. 04, p. 326-331, 2005.
- ARIAS, R. S. et al. Discriminating microsatellites from *Macrophomina phaseolina* and their potential association to biological functions. **Plant Pathology**, Worcester, v. 60, n. 4, p. 709-718, 2011.
- BABU, B. K. et al. Genetic diversity of *Macrophomina phaseolina* isolates from certain agro-climatic regions of India by using RAPD markers. **Indian Journal of Microbiology**, Berlin, v. 50, n. 2, p. 199-204, 2010.
- CASELA, C. R. Variabilidade genética de patógenos e resistência de cultivares. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 8., 2005, Assis. Anais... Campinas: Instituto Agrônomo, 2005. p. 189-194.
- CHESNOKOV, Yu V.; ARTEMYEVA, A. M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. **Agricultural Biology**, Moscow, v. 50, n. 5, p. 571-578, 2015.
- CSÖNDES, I. et al. Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. **Molecular Biology Reports**, Amsterdã, v. 39, n. 3, p. 3259-3269, 2012.
- FUHLBOHM, M. J.; RYLEY, M. J.; AITKEN, E. A. B. New weed hosts of *Macrophomina phaseolina* in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, Sydney, v. 7, n. 1, p. 193-195, 2012.
- IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/abate/brasil>>. Acesso em: 19 mar. 2020.
- IQBAL, U.; MUKHTAR, T. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. **The Scientific World Journal**, Londres, v. 2014, n 1, p. 1-11, 2014.

- ISLAM, M. S. et al. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC genomics**, Berlin, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2012.
- KAUR, S. et al. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Microbiology**, Berlin, v. 38, n. 2, p. 136-151, 2012.
- MACHADO, A. R. et al. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019.
- MAHDIZADEH, V.; SAFAIE, N.; GOLTAPEH, E. M. Diversity of *Macrophomina phaseolina* based on morphological and genotypic characteristics in Iran. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 27, n. 2, p. 128-137, 2011.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, Filadélfia, v. 27, n. 2, Part 1, p. 209-220, 1967.
- NEGREIROS, A. M. P. et al. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 167, n. 6, p. 326-337, 2019.
- PURKAYASTHA, S. et al. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. **Plant Pathology**, Worcester, v. 55, n. 1, p. 106-116, 2006.
- IQBAL, U.; MUKHTAR, T. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. **The Scientific World Journal**, Londres, v. 2014, n. 1, p. 1-9, 2014. 2014.
- SALAHLOU, R.; SAFAIE, N.; SHAMS-BAKHS, M. Using ISSR and URP-PCR markers in detecting genetic diversity among *Macrophomina phaseolina* isolates of sesame in Iran. **Journal of Crop Protection**, Teerã, v. 8, n. 3, p. 293-309, 2019.
- SALES JUNIOR, R. et al. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 1, p. 195-198, 2012.
- SÁNCHEZ, S. et al. Genetic and biological characterization of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causing crown and root rot of strawberry. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 77, n. 4, p. 325-331, 2017.
- SARR, M. P. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, Florença, v.53, n. 4, p. 250-268, 2014.
- SCHNEIDER, T. et al. Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Embrapa Trigo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2018.
- SINGH, Y.; SINGH, J.; PANDEY, A. K. Molecular markers in diagnosis and management of fungal pathogens: a review. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, Nova Delhi, v. 4, n. 2, p. 180-188, 2013.

SMITH, S. N. et al. Soil-borne populations of *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*, a cotton wilt fungus in California fields. **Mycologia**, Madison, v. 93, n. 4, p. 737-743, 2001.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 17, n. 3, p. 495–503, set. 2015.

TARAKANTA, J. A. N. A.; SHARMA, T. R.; SINGH, N. K. SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Mycological Research**, Londres, v. 109, n. 1, p. 81-86, 2005.

ŽIVANOV, S. T. et al. Analysis of genetic diversity among *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. isolates from Euro-Asian countries. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Brunsvique, v. 126, n. 6, p. 565-573, 2019.

CAPÍTULO III

PATOGENICIDADE E ANÁLISE DO PERFIL DE PROTEÍNAS DA INTERAÇÃO ENTRE *Macrophomina pseudophaseolina* E CULTIVARES DE MELÃO

RESUMO

Nesse estudo, avaliou-se a patogenicidade de isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* em plântulas de melão e observou-se sua influência na expressão de proteínas usando a técnica de SDS-PAGE. Para isto, dois isolados de *M. pseudophaseolina* foram inoculados, através do método do palito, em plântulas de melão do tipo Amarelo e Cantaloupe. Trinta dias após a inoculação, foram avaliadas a incidência e severidade da doença, através da escala de notas, e altura e peso fresco do caule e das raízes das plântulas foram quantificadas. A extração de proteínas dos tecidos vegetais foi realizada por meio do método da precipitação por Fenol/SDS e quantificação pelo método de Bradford. As amostras foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), os géis foram fotografados e foram detectados o polimorfismo de bandas entre amostras e o seu peso molecular. Ao final do experimento, foi verificado que a espécie foi capaz de causar a podridão radicular em todas as plântulas de melão inoculadas. Foram verificadas diferenças na agressividade entre os dois isolados em plântulas. O isolado MpBr65 casou média de severidade de 3,40 ao passo que a média do isolado MpBr23 foi 2,60 em ambas as cultivares. A doença afetou de forma negativa o desenvolvimento das plântulas com a redução do tamanho das raízes e peso fresco do caule e do sistema radicular. Na análise de expressão de proteínas, foram verificadas mudanças no padrão de bandas polipeptídicas entre plântulas inoculadas e o controle, indicando mudanças de expressão de proteínas relacionadas ao estresse biótico causado pela espécie. Foram observadas mudanças de expressão entre plântulas inoculadas com os diferentes isolados, indicando correlação entre a agressividade do patógeno e a resposta do hospedeiro.

Palavras-chave: podridão radicular, declínio das ramas, SDS-PAGE, *Cucumis melo*.

**PATHOGENICITY AND ANALYSIS OF THE PROTEIN PROFILE OF THE
INTERACTION BETWEEN *Macrophomina pseudophaseolina* AND MELON
CULTIVARS**

ABSTRACT

In this study, the pathogenicity of *Macrophomina pseudophaseolina* isolates in melon seedlings was evaluated and their influence on protein expression was examined using the SDS-PAGE technique. For this, two isolates of *M. pseudophaseolina* were inoculated, using the toothpick method, in Golden and Cantaloupe melon seedlings. Thirty days after inoculation, the incidence and severity of the disease were evaluated through the scale of notes, and the height and fresh weight of the stem and roots of the seedlings were evaluated. Protein extraction from plant tissues was performed using the phenol/SDS precipitation method and quantification using the Bradford method. The samples were subjected to denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE), the gels were photographed and the band polymorphism between samples and their molecular weight were detected. At the end of the experiment, it was verified that the species was able to cause root rot in all inoculated melon seedlings. Differences in aggressiveness were observed between the two seedling isolates. The MpBr65 isolate had an average severity of 3.40 while the mean of the MpBr23 isolate was 2.60 in both cultivars. The disease negatively affected seedling development with reduced root size and fresh weight of the stem and root system. In the analysis of protein expression, changes in the pattern of polypeptide bands between inoculated seedlings and the control were observed, indicating changes in protein expression related to biotic stress caused by the species. Changes in expression were observed between seedlings inoculated with the different isolates, indicating a correlation between the aggressiveness of the pathogen and the host response.

Keywords: root rot, vine decline, SDS-PAGE, *Cucumis melo* L.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) tem grande relevância comercial mundial, com 27,3 milhões de toneladas, sendo a segunda cucurbitácea em número de produção (FAO, 2018). Atualmente é a segunda fruta mais exportada pelo Brasil ao mercado internacional, com receita de aproximadamente 130 milhões de dólares em 2019 (ABRAFRUTAS, 2019; ANUÁRIO, 2019). O país ocupa a 11ª posição mundial, com 596 mil toneladas produzidas em 2018 (FAO, 2018). A região Nordeste tem grande importância para a produtividade nacional, onde só os estados do Ceará (CE) e do Rio Grande do Norte (RN) são responsáveis por aproximadamente 80% da produção do país (IBGE, 2018).

Dentre as doenças que causam prejuízos à cultura, podemos citar a podridão radicular e declínio das ramas (PRDR), causada por espécies de fungos patogênicos habitantes do solo (VIBHA, 2016), o que é agravado pela produção intensiva e contínua da cultura, de maneira que muitas vezes não há práticas de manejo integrado de doenças (SALES JÚNIOR et al., 2019), resultando no aumento do potencial do inóculo na área que conseqüentemente elava a severidade da doença a cada ciclo da cultura (AMBRÓSIO et al., 2015). Espécies do gênero *Macrophomina* são relatadas entre as mais frequentes associadas à patologia nas regiões produtoras (ANDRADE et al., 2005).

Macrophomina pseudophaseolina Crous, Sarr & Ndiaye foi descrita como uma nova espécie do gênero *Macrophomina* após estudos filogenéticos realizados por Sarr et al. (2014), os quais relataram que a espécie compartilha características morfológicas e gama de hospedeiros com *M. phaseolina*. Espécies deste gênero são caracterizadas por seu difícil controle devido à ocorrência de estruturas de resistência, falta de controle químico efetivo, alta gama de hospedeiros (ISLAM et al., 2012) e sua permanência no ambiente por longos períodos no solo e em plantas daninhas (NEGREIROS ET AL., 2019).

Espécies do gênero *Macrophomina* são relatadas em diversas partes do mundo por grande diversidade nas suas características morfológicas, genética, fisiológicas e patogênicas (IQBAL; MUKHTAR, 2014). Essas características garantem que as espécies se adaptem a diversas condições agroecológicas (GADE et al., 2018).

Fungos fitopatogênicos habitantes do solo são relatados como responsáveis por até 50% de perdas de produção em áreas de produção de melão no mundo (PORTO et al., 2019). No Brasil não existem estimativas concretas, porém perdas econômicas são

relatadas. Em regiões de clima árido e semiárido, a incidência de doenças causadas por espécies do gênero *Macrophomina* pode chegar a 80% (LODHA; MAWAR, 2020). O patógeno obtém vantagem considerável em hospedeiros sob condições de clima seco e quente (COHEN et al., 2016). Neste cenário, estudos sobre a biologia do patógeno são essenciais para que medidas de controle eficientes sejam desenvolvidas.

Pouco se sabe sobre a agressividade de isolados de *M. pseudophaseolina* em cultivares de melão e como o hospedeiro se comporta sob estresse biótico provocado pela infecção da espécie fúngica. Estudos de patogenicidade e proteômicos permitem esclarecer os mecanismos envolvidos no processo de patogênese e as informações geradas podem ser utilizadas como alvo de melhoramento de plantas (LIU et al., 2019). A análise da expressão de proteínas, com técnicas primárias como o SDS-PAGE, pode nos ajudar a compreender como o patógeno induz respostas de patogênese no hospedeiro (KAUR; KUMAR; REDDY, 2017).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a patogenicidade de isolados geneticamente distintos de *M. pseudophaseolina* em plântulas de melão, de modo a analisar sua agressividade e sua influência no perfil de proteínas no hospedeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e semeadura

Sementes de duas cultivares comerciais de melão, do tipo Amarelo (linha Golden, Feltrin Sementes) e do tipo Cantaloupe (linha *Hale's Best Jumbo*, TOPSEED Garden) foram utilizadas nesse estudo. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 10% por um minuto e posteriormente foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada por um minuto. Após a lavagem, as sementes foram dispostas em placas de Petri com papel filtro e algodão embebidos com água destilada e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por \pm 48 horas no escuro.

Após o início da germinação, as sementes foram transferidas para vasos de 1L contendo solo e substrato (Tropstato HT, VidaVerde), previamente autoclavados, na proporção de 2:1. Os vasos foram mantidos em unidade próxima à capacidade de campo. A irrigação foi realizada por distribuição manual do volume de água necessário.

2.2 Patogenicidade e virulência em melão

2.2.1 Incidência e severidade em melão

Os isolados de *M. pseudophaseolina* MpBr23 (CMM-4771) e MpBr65 (CMM-4801), exemplares que se mostraram geneticamente distantes em estudos prévios de caracterização genética, foram utilizados nesse estudo. Estes pertencem à Micoteca do Laboratório de Fitopatologia II do Departamento de Ciências Agrônômicas e Florestais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada em Mossoró, RN, Brasil.

O procedimento de inoculação utilizado foi o método do palito, descrito por Ambrósio et al. (2015). Este método foi utilizado por facilitar a infecção e colonização do fungo nos tecidos e, conseqüentemente, a expressão de sintomas pelo hospedeiro (MEDEIROS et al., 2015). Pedacos de palitos de 12mm de ponta fina foram distribuídos em orifícios produzidos em papel filtro de 90mm de diâmetro. Os palitos foram dispostos em placas de Petri com o mesmo diâmetro do papel filtro, autoclavados a 121°C por 30 minutos por duas vezes, com o intervalo de 24 horas entre as autoclavagens. Em seguida, 20mL de meio BDA, suplementado com sulfato de estreptomicina, foram adicionados às placas contendo os palitos. Após a solidificação do meio BDA, foi realizada a transferência de cinco discos (6mm de diâmetro) provenientes de culturas puras de cada isolado de *M. pseudophaseolina*. As placas foram mantidas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa B.O.D no escuro por oito dias.

As plântulas de melão foram inoculadas dez dias após o plantio, sendo os palitos infestados pelo micélio e microescleródios foram inseridos no hipocótilo de cada muda, 1cm acima do solo. Palitos autoclavados não infestados foram utilizados nas plântulas testemunha (Figura 1A). As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias sob condições de luz natural a uma temperatura média de 33°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 2 + 2$, sendo duas cultivares de melão, dois isolados de *M. pseudophaseolina* e duas testemunhas com seis tratamentos e cinco repetições. O experimento foi realizado em duas épocas distintas.

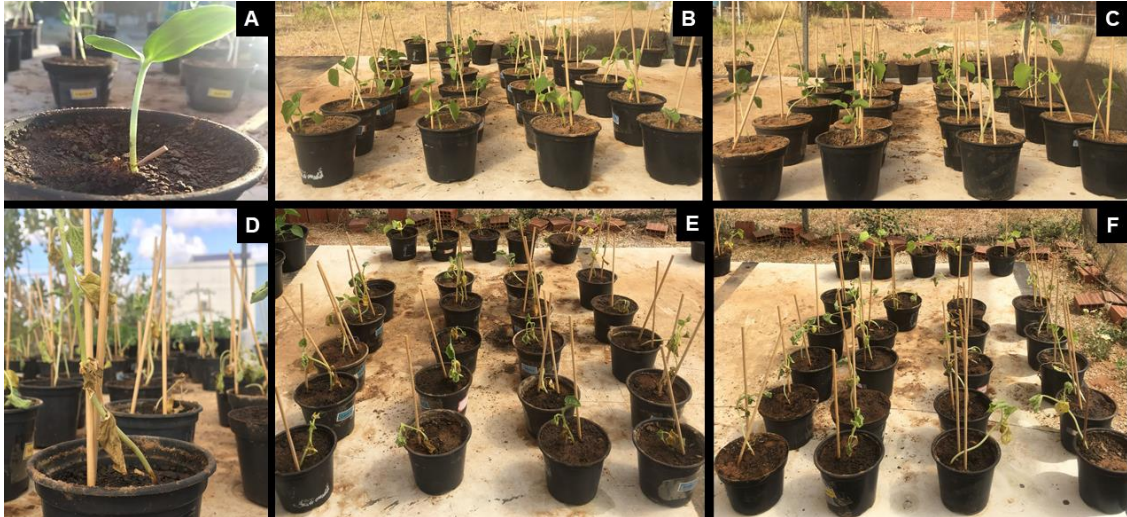


Figura 1 - Plântulas de melão condição de casa de vegetação. (A) Testemunha. (B) e (C) com 10 dias antes da inoculação e após a inoculação (D), (E) e (F).

2.2.2 Análise de patogenicidade

Após os trinta dias da inoculação dos isolados, sua severidade foi analisada como severidade da doença através da escala de notas descrita por Ambrósio et al. (2015). Nessa escala, 0 representa ausência de sintomas, 1= menos de 3% dos tecidos da parte aérea infectados, 2= 3-10% dos tecidos da parte aérea infectados, 3=11-25% dos tecidos da parte aérea infectados, 4= 26-50% dos tecidos da parte aérea infectados e 5= mais de 50% dos tecidos da parte aérea infectados. Incidência da doença foi determinada a partir da porcentagem do número de plantas infectadas em relação ao total de plantas no experimento. O peso fresco foi quantificado em balança analítica e altura da parte aérea e da raiz das plantas foi mensurada com paquímetro.

Os dados da severidade da doença foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com a probabilidade no nível de 5% ($p < 0.05$); por sua vez, os dados de peso fresco e altura da parte aérea e da raiz foram analisados com o teste de Tukey também ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o *Software* Assistat versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

2.3 Análise do perfil de proteínas

2.3.1 Extração de proteínas

Após a análise da patogenicidade, as raízes e caule das plântulas foram coletados e submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido para evitar a ação de proteases.

Posteriormente, o material vegetal foi mantido em freezer -80°C . A extração das proteínas foi realizada através do método descrito por Wang et al. (2006), com modificações. Cerca de 350mg de material vegetal foram pulverizados com N_2 com o auxílio de cadinho e pistilo e adicionado a tubos de 2mL. Em seguida, foi adicionado aos tubos 1ml da solução de TCA 10% em acetona, vortexado, centrifugado a $6.000\times g$ por 10 minutos a 4°C ; em seguida, foi descartado o sobrenadante. O mesmo procedimento foi repetido com as soluções de 0,1 M acetato de amônio metanólico, acetona 80% e etanol 80%. O *pellet* formado foi seco à temperatura ambiente até evaporar toda a acetona/etanol/metanol.

Em seguida, foram adicionados aos tubos 800 μL do tampão SDS denso (SDS 2%, sacarose 0,9M, Tris-HCl pH 8,0 0,1M, β -mercaptoetanol 5%, EDTA 10mM, PVP 5% e água ultrapura q.s.p) e homogeneizados no vortex. Posteriormente, foram adicionados 800 μL de Fenol tamponado pH 8,0 e homogeneizados no vortex. Os tubos foram submetidos à centrifugação $6.000\times g$ por 10 minutos a 4°C . A fase superior (aquosa) foi transferida para um novo tubo, adicionado 1mL da solução de 0,1M de acetato de amônia em metanol e incubado a -20°C por 12 horas. Os tubos foram submetidos à centrifugação $6.000\times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e em seguida foram realizadas lavagens com as soluções de 0,1M de acetato de amônia metanólico e acetona 80%. O *pellet* formado foi seco à temperatura ambiente até evaporar toda a acetona/metanol. As amostras de proteína foram solubilizadas em 50 μL de tampão de solubilização (Ureia 7M, Tiourea 2M) e sonicadas (10% de potência de 5 a 10 segundos) até a completa homogeneização. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C .

As proteínas foram quantificadas através do método de Bradford (1976) descrito por Kruger (2009), onde 1 μL de amostra foi diluído em 99 μL de água ultrapura e foram adicionados 900 μL do reagente de Bradford. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220) na absorvância de 595nm. As absorvâncias obtidas foram plotadas em uma curva de calibração previamente construída com concentrações conhecidas de BSA, determinando, assim, a concentração total das amostras de proteínas.

2.3.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

As amostras de proteínas foram separadas por meio da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com o protocolo descrito por Brunelle; Green (2014), com modificações. Cerca de 15 $\mu\text{g/ml}$ de cada amostra proteica foram

adicionados ao tampão de amostra (120mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glicerol, 750mM β -mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol) na proporção de 2:1 e foram desnaturadas por aquecimento a 94°C por três minutos. As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida 12% e submetidas à eletroforese em tampão Tris-Glicina nas seguintes condições: 80V por 30 minutos e 150V por 1h40. Posteriormente, o gel foi fixado em solução de etanol (40%) e ácido acético (10%) por \pm 12 horas. Em seguida, o gel foi corado em solução de azul de comassie brilhante por \pm 48 horas e posteriormente descorado em solução de ácido acético (10%) e metanol (30%) por \pm 4 horas. As imagens do gel foram capturadas em fotodocumentador sob luz branca e as bandas das proteínas foram analisadas pelo *software* CLIQS 1D (Versão 1.1, TotalLab), de modo a estimar o peso molecular de cada banda e detectar a presença (+) e/ou ausência (-) de cada banda entre as amostras (RAMASWAMY; WU; MACEVILLY, 2010).

3. RESULTADOS

3.1 Incidência e severidade em melão

Na análise de patogenicidade dos isolados de *M. pseudophaseolina*, foi constatado que ambos os isolados MpBr25 e MpBr65 (incidência=100%) causaram a podridão radicular e o declínio das ramas (Tabela 1). A aparência de ‘carvão’ no caule e murcha e amarelamento das folhas foram sintomas apresentados pelas plântulas inoculadas (Figura 1E e F). Nenhuma das testemunhas apresentou sintomas da doença (Figura 1D). O isolado MpBr65 causou maior severidade (3,40) em ambos os tipos de melões (Tabela 1). Para o isolado MpBr23, a severidade foi de 2,60 (Amarelo) e 2,70 (Cantaloupe) (Tabela 1). As cultivares não demonstraram tolerância ou resistência aos isolados testados nesse estudo.

Em ambos os tipos de melão testados, foram observadas diferenças significativas entre os valores do CPA, CR, PFPA e PFR entre as plântulas inoculadas com os e as testemunhas (Tabela 2). Nas melão do tipo amarelo, os valores de CR das plântulas inoculadas foram inferiores à testemunha (20,5cm), com 13,9cm (MpBr23) e 12,6cm (MpBr65) (Tabela 2). Para os valores de PFPA, foi 0,9g (MpBr23) e 1,0g (MpBr65) contra 1,5g (testemunha) (Tabela 2). Para PFR, a testemunha apresentou valor médio de 0,21g contra 0,09g (MpBr23) e 0,11g (MpBr65) (Tabela 2).

Nas plântulas do melão do tipo cantaloupe, o valor do PFPA para as plântulas inoculadas com o isolado MpBr23 foi 0,75g e com MpBr65 foi 0,87g contra 1,28g da testemunha (Tabela 2). No PFR, 0,12g (MpBr23) e 0,20g (MpBr65) contra 1,28g da

testemunha (Tabela 2). O valor do CR para plantas inoculadas com MpBr23 foi de 14,2cm, para MpBr65 foi 13,8cm e para a testemunha foi de 18,9cm (Tabela 2).

Em contrapartida, os valores do CPA das plântulas inoculadas apresentaram valores médios superiores ao da testemunha em ambos os tipos de melão. Para o amarelo, 16cm (MpBr23) e 15,1cm (MpBr65) contra 11,8cm da testemunha, e para o cantaloupe 11,8cm (MpBr23) e 11,5cm (MpBr65) contra 8,4cm da testemunha (Tabela 2).

Tabela 1 - Severidade e incidência da podridão radicular de melão dos tipos amarelo e cantaloupe submetidos à inoculação de isolados de *M. pseudophaseolina*. $1\chi^2$ = valor do qui-quadrado significativo a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Isolados de <i>M.pseudophaseolina</i>	Severidade				Incidência			
	Amarelo		Cantaloupe		Amarelo		Cantaloupe	
	Rank	Média	Rank	Média	Rank	Média	Rank	Média
MpBr23	187,5	2,60	189,5	2,70	205,0	100	205,0	100
MpBr65	222,5	3,40	220,5	3,40	205,0	100	205,0	100
Testemunha	55,0	0,00	55,0	0,00	55,0	0	55,0	0
<i>cy</i> ²¹	21,3		21,3		29,0			

Tabela 2 - Média do comprimento da parte área (CPA) (cm), comprimento da raiz (CR) (cm), peso fresco da parte área (PFPA) (g) e peso fresco da raiz (PFR) (g) das plântulas dos tipos de melão amarelo e cantaloupe inoculados com isolados de *M. pseudophaseolina*. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV% = Coeficiente de variação em %.

<i>M. pseudophaseolina</i>	Cultivar Amarelo				Cultivar Cantaloupe			
	CPA	CR	PFPA	PFR	CPA	CR	PFPA	PFR
MpBr23	16,015 a	13,905 b	0,940 b	0,09851 b	11,865 a	14,26 b	0,75729 b	0,12571 b
MpBr65	15,140 a	12,640 b	1,000b	0,11731 b	11,548 a	13,89 b	0,87506 b	0,20513 b
Testemunha	11,800 b	20,560 a	1,586 a	0,21570 a	8,424 b	18,98 a	1,28645 a	0,47045 a
CV%	18,03	31,78	21,74	56,95	19,92	25,28	18,83	76,40

3.2 Análise do perfil de proteínas

No tecido do caule, foi identificado um total de 17 bandas no melão tipo Amarelo e 18 no tipo Cantaloupe no total (Tabela 3). As principais bandas estavam localizadas na faixa de 88 a 19 kilodaltons (Figura 2). Das 17 bandas detectadas nas amostras de melão tipo Amarelo, sete bandas foram diferenciais entre as plantas inoculadas e o controle. Plântulas inoculadas com o isolado MpBr65 apresentaram seis bandas diferenciais em relação ao controle; com o isolado MpBr23, apenas uma estava na faixa de 24 KDa (Tabela 3). A redução de bandas em relação ao controle ocorreu para 7 MpBr23, com 7 bandas, ao passo que foram observadas cinco com o MpBr65 (Tabela 3).

No melão do tipo Cantaloupe, nove das 18 bandas totais foram diferentes do controle. As plântulas inoculadas com o MpBr23 apresentaram seis bandas diferentes do controle; com o MpBr65, foram observadas cinco bandas (Tabela 3). A redução de bandas polipeptídicas em relação ao controle para o isolado MpBr23 foi de cinco e para o Mp65 foi de três bandas (Tabela 3).

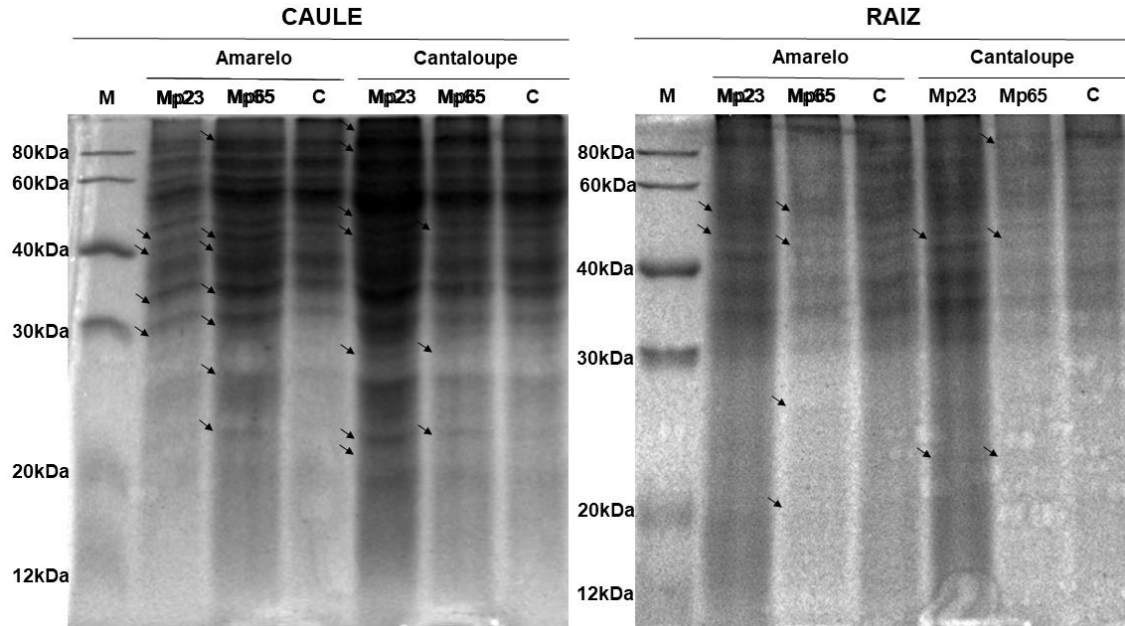


Figura 2 - Perfil de proteínas submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos tecidos do caule e raiz de melão com a interação com os isolados de *M. pseudophaseolina*. C=Controle. M= Marcador de peso molecular de proteínas. Setas indicam bandas polipeptídicas que não foram detectadas no controle.

Tabela 3 - Número de bandas proteicas detectadas (N°B) e sua presença (+) e ausência (-) nas amostras de caule de melão. C= Controle. PM= Peso molecular das bandas em kilodalton (KDa). PL= Polimorfismo: polimórfica (P); monomórfica (M).

Tecido: Caule											
N° B	PM(KDa)	Amarelo				N° B	PM(KDa)	Cantaloupe			
		Mp23	Mp65	C	PL			Mp23	Mp65	C	PL
1	88	+	-	+	P	1	91	-	+	+	P
2	85	-	+	-	P	2	88	+	-	-	P
3	75	+	-	+	P	3	75	-	+	+	P
4	73	-	+	+	P	4	72	+	-	-	P
5	60	-	+	+	P	5	60	+	+	+	M
6	53	-	+	+	P	6	52	-	+	+	P
7	45	-	-	+	P	7	50	+	-	-	P
8	44	+	+	-	P	8	44	+	+	+	M
9	41	+	+	+	M	9	41	+	+	-	P
10	38	+	+	-	P	10	38	+	+	+	M
11	36	-	-	+	P	11	34	+	+	+	M
12	34	+	+	-	P	12	30	+	+	+	M
13	32	-	-	+	P	13	27	+	+	-	P

14	31	+	+	-	P	14	25	+	+	+	M
15	25	-	+	+	P	15	23	-	+	-	P
16	24	+	-	-	P	16	22	-	+	-	P
17	22	-	+	-	P	17	21	+	-	-	P
						18	19	+	+	-	P
Número total de bandas		8	11	10				13	14	9	
Taxa de polimorfismo (%)					94						66

O perfil de proteínas pela técnica de SDS-PAGE do tecido da raiz das plântulas de melão revelou a presença de 20 bandas polipeptídicas para o tipo Amarelo e 21 para o tipo Cantaloupe (Tabela 4). As bandas estavam localizadas na faixa de 88 a 13 kilodaltons (Figura 2). No melão Amarelo, das 20 bandas detectadas, sete foram diferenças nas amostras com as plântulas inoculadas em comparação com o controle (Tabela 4). Plântulas inoculadas com o isolado MpBr65 apresentaram seis bandas diferentes do controle, ao passo que com o MpBr23 apresentou apenas três bandas (Tabela 4). Redução de bandas polipeptídicas entre plântulas inoculadas em relação ao controle foi de cinco para ambos os isolados (Tabela 4). Para o tipo Cantaloupe, três das 21 bandas apresentaram perfil diferente entre as plântulas inoculadas e o controle. As plântulas inoculadas com o MpBr65 apresentaram três bandas diferentes do controle, ao passo que com o MpBr65 apresentou duas (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de bandas proteicas detectadas (N°B) e sua presença (+) e ausência (-) nas amostras de raiz de melão. C= Controle. PM= Peso molecular das bandas em kilodalton (KDa). PL= Polimorfismo: polimórfica (P); monomórfica (M).

Tecido: Raiz											
N° B	PM(KDa)	Amarelo				N° B	PM(KDa)	Cantaloupe			
		Mp23	Mp65	C	PL			Mp23	Mp65	C	PL
1	86	+	-	+	P	1	88	+	+	+	M
2	70	-	+	+	P	2	78	-	+	-	P
3	59	-	-	+	P	3	73	+	-	+	P
4	54	+	+	-	P	4	65	-	-	+	P
5	51	-	-	+	P	5	56	+	+	+	M
6	48	+	-	-	P	6	54	-	+	+	P
7	46	-	+	-	P	7	46	-	+	+	P
8	44	+	-	+	P	8	43	+	+	-	P
9	40	+	+	+	M	9	38	+	+	+	M
10	37	+	+	+	M	10	35	+	+	+	M
11	34	+	+	+	M	11	31	+	+	+	M
12	32	-	-	+	P	12	28	+	-	+	P
13	30	-	+	+	P	13	26	+	+	+	M
14	27	-	+	-	P	14	25	-	-	+	P
15	25	+	+	+	M	15	23	+	+	-	P
16	22	+	+	+	M	16	22	+	+	+	M

17	20	-	+	-	P	17	21	-	+	+	P
18	18	+	+	+	M	18	19	+	+	+	M
19	15	-	+	-	P	19	17	-	+	+	P
20	14	-	+	-	P	20	15	-	+	+	P
						21	13	+	-	+	P
Número total de bandas		10	14	13				13	16	18	
Taxa de polimorfismo (%)					65						61

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, analisamos a patogenicidade de isolados geneticamente distantes de *M. pseudophaseolina*. A alta incidência da doença causada pelos isolados da espécie observado neste estudo diverge de resultados reportados em trabalhos anteriores. Por exemplo, Negreiros et al. (2019) reportaram baixa incidência de PRDR em plantas de melão quando comparado com os isolados de *M. phaseolina*. Em variedades de feijão-caupi e amendoim, Ndiaye et al. (2015) reportaram incidência média de 22 e 64% em diferentes temperaturas testadas utilizando o método de infestação do solo.

A diferença na agressividade dos isolados de *M. pseudophaseolina* para os tipos de melão pode ser explicada pela sua variabilidade genética. Comportamento semelhante foi observado por Purkayastha et al. (2006), onde alguns isolados geneticamente diferentes de *M. phaseolina* foram mais agressivos a cultivares de feijão. A alta diversidade genética das espécies do gênero *Macrophomina* pode se refletir no seu nível de patogenicidade, já que alterações nas suas características fisiológicas lhe garantem adaptabilidade a diferentes condições agroecológicas (RAFIEI et al., 2013; SÁNCHEZ et al., 2017).

A infecção causada por espécies do gênero *Macrophomina* afeta principalmente o sistema radicular da planta, prejudicando principalmente a absorção de água e nutrientes, consequentemente prejudicando seu desenvolvimento (SÁNCHEZ et al., 2019). Esse comportamento foi observado nos tipos de melão testados nesse trabalho, com intensa redução no comprimento e peso fresco desses órgãos. Para outras espécies desse gênero, estudos já mostraram grande redução no crescimento de raízes para outras espécies cultivadas. Por exemplo, Sharma et al. (2018) relataram que comprimento da raiz e do caule e o peso fresco da raiz de plântulas de feijão mungu foram significativamente afetados pela inoculação com *M. phaseolina*. Jite et al. (2012) também reportaram em plântulas de amendoim redução intensa do peso fresco e do comprimento das raízes.

A análise do perfil de proteínas através da eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) apontou que a inoculação com os isolados de *M.*

pseudophaseolina causou alterações na expressão de proteínas nas plântulas de melão. Nos dois tecidos do caule e da raiz, foram detectadas bandas diferenciais entre as plântulas inoculadas e a testemunha, indicando resposta do hospedeiro ao estresse causado pela infecção do fungo. Durante o processo de patogênese, a planta expressa diversos mecanismos de defesa contra o patógeno, tais como a lignificação da parede celular e a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR), como de enzimas oxidativas (KAUR; KUMAR; REDDY, 2017). Esses mecanismos alteram a síntese de algumas proteínas. Apesar da mudança na expressão de proteínas, ambos os tipos de melões testados foram altamente susceptíveis aos isolados (Mp23 e Mp65), sugerindo que essas proteínas não funcionaram como um sistema de defesa contra o patógeno.

Para outras culturas, o perfil de expressão de proteínas foi parâmetro para identificar cultivares susceptíveis. Aravind; Brahmabhatt (2018) relataram que com a infecção por *M. phaseolina* as cultivares resistentes expressaram três bandas polipeptídicas que não estavam presentes na cultivar susceptível. Da mesma maneira, Aboshosha et al. (2008) observaram a expressão de bandas polipeptídicas em cultivares resistentes de girassol que não foram observadas nas cultivares susceptíveis. A expressão exagerada de algumas proteínas em cultivares resistentes a patógenos pode ser reflexo do aumento da peroxidase, enzima relacionada à resposta à patogênese, que pode causar reação de hipersensibilidade nos tecidos da planta (NURCAHYANI; AGUSTRINA; HANDAYANI, 2016).

A diminuição da expressão de proteínas observada pela redução de bandas entre a testemunha e as plântulas inoculadas, principalmente no tecido da raiz, pode ter relação com o dano que a espécie fúngica causa no sistema radicular, como foi observado pela diminuição do peso fresco do tecido em relação ao controle.

As diferenças no padrão de bandas entre plântulas inoculadas como os isolados MpBr23 e MpBr65 indicam interação diferenciada com o hospedeiro. A interação planta-patógeno depende da capacidade de patogenicidade e virulência, bem como da existência de mecanismos de defesa da planta. A associação entre essas interações resulta na susceptibilidade ou resistência da planta (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010). Para as cultivares de melão amarelo e cantaloupe e para os isolados Mp23 e Mp65, as diferentes interações observadas através da expressão proteica não resultaram em mudança na susceptibilidade das plantas.

Os dados apresentados nesse estudo reforçam que *M. pseudophaseolina* é uma espécie que, tal como *M. phaseolina*, apresenta variação intraespecífica de severidade

relacionada ao seu alto grau de heterogeneidade genética. Estes fatores devem ser considerados por pesquisadores que buscam fontes de resistência para uso em programas de melhoramento e/ou em testes *in vitro* e *in vivo* de métodos de controle contra *M. pseudophaseolina*.

5. CONCLUSÃO

Com a análise da patogenicidade dos isolados de *M. pseudophaseolina*, ficou claro que a diferença genética existente entre indivíduos da mesma espécie pode se refletir no seu nível de agressividade. Esta influência também foi observada nas mudanças de expressão de proteínas em plântulas infectadas pelos isolados. A elucidação destes mecanismos de resposta ao patógeno podem ser a peça-chave no desenvolvimento de medidas de controle eficientes.

REFERÊNCIAS

ABOSHOSHA, S. S. et al. Protein analysis and peroxidase isozymes as molecular markers for resistance and susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseolina*. **International Journal of Agriculture and Biology**, cidade, v. 10, n. 1, p. 28-34, 2008.

ABRAFRUTAS. **ESTATÍSTICA DE EXPORTAÇÕES DE FRUTAS NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2019.** – **Abrafrutas.** Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2019/07/17/estatistica-de-exportacoes-de-frutas-no-primeiro-semester-de-2019/>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

AMBRÓSIO, M. M. Q. et al. Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Euphytica**, Londres, v. 206, n. 2, p. 287-300, 2015.

ANDRADE, D. E. G. T. et al. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa phytopatologica**, Botucatu, v. 31, n. 4, p. 327-333, 2005.

ARAVIND, T.; BRAHMBHATT, A. B. Protein Profiling of Okra Genotypes Resistant to Root and Collar Rot Incited by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Using SDS-PAGE. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 7, n. 11, p. 2290-2293, 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

COHEN, R; ELKABETZ, M; EDELSTEIN, M. Variation in the responses of melon and watermelon to *Macrophomina phaseolina*. **Crop Protection**, Oxford, v. 85, p. 46-51, 2016.

FAO. **Home | Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en>>. Acesso em: 19 mar. 2020.

GADE, R. M.; BELKAR, Y. K.; INGLE, Y. V. Morphological and Pathogenic Variability among *Rhizoctonia bataticola* Isolates Associated with Soybean (*Glycine max* L.) from India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, Tamilnadu, v. 7, n. 1, p. 2575-2588, 2018.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; PRATS, E.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **BioMed Research International**, Londres, v.2010, n.1, p. 1-36, 2010.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/abate/brasil>>. Acesso em: 19 mar. 2020.

IQBAL, U.; MUKHTAR, T. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. **The Scientific World Journal**, Londres, v. 2014, n. 1, p. 1-9, 2014.

ISLAM, M. S. et al. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC genomics**, Londres, v. 13, n. 1, p. 493, 2012.

JITE, P. K. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth of groundnut and disease caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Experimental Sciences**, Nápoles, v. 4 n. 1, p. 11-55, 2012.

KAUR, A.; KUMAR, A.; REDDY, M. Sudhakara. Plant–pathogen interactions: a proteomic approach. In: SINGH, Ravindra Pal; KOTHARI, R.; KORINGA, P. G.; SINGH, S. P. (org.). **Understanding Host-Microbiome Interactions-An Omics Approach**, Singapore, 2017. p. 207-225.

KRUGER, Nicholas J. The Bradford method for protein quantitation. In: WALKER, J. M. (org.). **The protein protocols handbook**. Humana Press, Totowa, NJ, 2009. p. 17-24.

LIU, Y. et al. Proteomics: a powerful tool to study plant responses to biotic stress. **Plant Methods**, Berlin, v. 15, n. 1, p. 135, 2019.

LODHA, S.; MAWAR, R. Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: A review. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 168, n. 1, p. 1-17, 2020.

MEDEIROS, A. C. et al. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.

NDIAYE, M. et al. Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*? **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 9, n. 45, p. 2232-2238, 2015.

NEGREIROS, A. M. P. et al. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 167, n. 6, p. 326-337, 2019.

NURCAHYANI, E; AGUSTRINA, R; HANDAYANI, T. T. The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium oxysporum*. **Journal of Plant Sciences**, Nova Iorque, v. 4, n. 5, p. 102-105, 2016.

PORTO, M. A. F. et al. Interaction of *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* as root rot pathogens of *Cucumis melo*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 45, n. 4, p. 355-360, 2019.

PURKAYASTHA, S. et al. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. **Plant Pathology**, Berkeley, v. 55, n. 1, p. 106-116, 2006.

RAFIEI, M. et al. Study on reaction of sunflower lines and hybrids to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causal agent of Charcoalrot disease. **World Applied Sciences Journal**, Abu Dhabi, v. 21, n. 1, p. 129-133, 2013.

RAMASWAMY, G.; WU, B.; MACEVILLY, U. Knowledge Management of 1D SDS PAGE Gel Protein Image Information. **Journal of Digital Information Management**, Riade, v. 8, n. 4, p. 223-232, 2010.

SÁNCHEZ, S. et al. Physiological response and susceptibility of strawberry cultivars to the charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* under drought stress conditions. **Journal of Berry Research**, Amsterdã, v. 9, n. 2, p. 165-177, 2019.

SARR, M. P. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, Florença, v. 53, p. 250–268, 2014

SHARMA, C. K. et al. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. **Rhizosphere**, Amsterdã, v. 5, p. 71-75, 2018.

SILVA, F A S; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, Lagos, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

VIBHA. *Macrophomina phaseolina*: The Most Destructive Soybean Fungal Pathogen of Global Concern. **Curr. Trends Plant Dis. Diagnostics Manag. Pract.** Springer, Cham, 2016. p. 193–205.

WANG, W et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 27, n. 13, p. 2782-2786, 2006.