



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

VITOR RAFAEL OLIVEIRA MAIA

**PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS POR
SDS-PAGE DA RELAÇÃO *Macrophomina pseudophaseolina* x *Cucumis melo* L.**

MOSSORÓ

2021

VITOR RAFAEL OLIVEIRA MAIA

**PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS POR
SDS-PAGE DA RELAÇÃO *Macrophomina pseudophaseolina* x *Cucumis melo* L.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda

Co-orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati

MOSSORÓ

2021

© 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 tomar-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.

O217p Oliveira Maia, Vitor Rafael.
PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO DO PERFIL DE
PROTEÍNAS POR SDS-PAGE DA RELAÇÃO *Macrophomina*
pseudophaseolina x *Cucumis melo* L. / Vitor Rafael
Oliveira Maia. - 2021.
39 f. : il.

Orientador: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientador: Emmanuel de Sousa Jereissati.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia, 2021.

1. Proteômica. 2. Fitopatógeno. 3.
Cucurbitaceae. I. Santos Araújo Holanda, Ioná ,
orient. II. de Sousa Jereissati, Emmanuel, co-
orient. III. Título.

VITOR RAFAEL OLIVEIRA MAIA

**PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS POR
SDS-PAGE DA RELAÇÃO *Macrophomina pseudophaseolina* x *Cucumis melo* L.**

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.

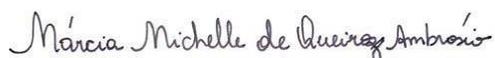
Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Defendida em: 26 de janeiro de 2021

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)
Presidente da Banca



Profa. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA)
Membro Examinador Interno ao Programa



Profa. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva (UFERSA)
Membro Examinador Externo ao Programa



Dra. Fabiane Rabelo da Costa Batista (INSA)
Membro Examinador Externo a Instituição

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis” (José de Alencar).

AGRADECIMENTOS

A Deus, que abriu as portas para mais esta etapa de formação acadêmica e iluminou meu caminho nessa jornada.

Aos meus pais e minha família, que estão sempre ao meu lado me dando suporte em todos os meus caminhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, pela oportunidade de acesso ao ensino público de qualidade.

À minha orientadora, Professora Dra. Ioná Santos Araújo Holanda, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, onde senti que fazia parte da equipe desde a primeira reunião. Agradeço os ensinamentos, conselhos e a atenção constante, que foram fundamentais no percorrer do mestrado.

Ao professor Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati, pela co-orientação e ajuda concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante meu mestrado, sem a qual não seria possível realizar este trabalho.

Aos membros da banca, Prof^a. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, Prof^a. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva e Dra. Fabiane Rabelo da Costa Batista, pela ajuda e colaboração com este trabalho de dissertação.

À Pós-Doutoranda Andreia Mitsa Paiva Negreiros, do Laboratório de Fitopatologia II da UFERSA, por se mostrar sempre muito atenciosa e me ajudar com toda a parte fitopatológica. Muita gratidão!

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFERSA e amigos: Atarissis Dias, Suzana Marjorie, Jorge Alves, Talison Costa, Rosecleide Maia, Izabelle Rodrigues, Pedro Sidarque, Gilsivan Sales, Milena Diógenes e Abner Reurisson, por toda a ajuda, companheirismo diário, apoio emocional. Agradeço demais a amizade de vocês!

À minha grande amiga, Sandezir Sena (Sandy), pelas várias vezes que foi me visitar em Mossoró, agradeço os momentos de diversão e principalmente as energias positivas que você envia para tudo que eu penso em fazer.

RESUMO

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) apresenta grande importância econômica na região do Semiárido Brasileiro, em razão das condições favoráveis ao seu cultivo. Muitos são os problemas fitossanitários encontrados na cultura, dentre eles se destacam as doenças ocasionadas por patógenos radiculares. Uma nova espécie do gênero *Macrophomina* foi identificada, a *Macrophomina pseudophaseolina*, que pode estar associada a plantas daninhas presentes nas áreas de cultivo de melão como hospedeira alternativa, causando podridão radicular e declínio das ramas do meloeiro (PRDR). O objetivo deste trabalho foi analisar a patogenicidade e a expressão de proteínas diferencialmente expressas em acessos de *Cucumis melo* L. em função da resposta a um estresse biótico ocasionado pelo fitopatógeno *Macrophomina pseudophaseolina*. Na primeira etapa, foi feita a inoculação artificial das plantas pelo método do palito e análise de patogenicidade. O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com esquema fatorial 2x2+2, utilizando-se dois acessos de melão distintos, um potencialmente resistente (Ag-15591Ghana) e outro susceptível (MR-1) a *M. phaseolina*; dois isolados contrastantes de *M. pseudophaseolina* (CMM4826 mais agressivo e CMM4807 menos agressivo), mais dois grupos controle. Estes acessos foram utilizados como parâmetro na medida em que não há informações prévias de resistência para *M. pseudophaseolina*. De acordo com a análise de patogenicidade, o presente estudo confirmou o acesso Ag-15591Ghana como moderadamente resistente (MR), para ambos os isolados testados, ao passo que o acesso MR-1 foi classificado como altamente susceptível (AS) a CMM4826 e susceptível (SU) a CMM4807. Na segunda etapa, foram coletadas amostras vegetais de caule e raiz do acesso Ag-15591Ghana, após 30 dias da inoculação com *M. pseudophaseolina* para extração das proteínas, realização de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise do perfil de bandas dos diferentes tratamentos. Foi observada a presença de bandas diferencialmente expressas após inoculação das plântulas com os dois isolados em relação ao controle, para ambos os tecidos. O número de bandas diferencialmente expressas foi menor, em caule e raiz, para o acesso Ag-15591Ghana quando inoculado com o isolado mais agressivo CMM4826. Estes resultados são importantes porque podem contribuir futuramente com programas de melhoramento da cultura e desenvolvimento de medidas de controle eficazes, a partir de cultivares resistentes.

Palavras-chave: Proteômica. Fitopatógeno. Cucurbitaceae.

ABSTRACT

Melon (*Cucumis melo* L.) culture has great economic importance in the Brazilian semiarid region, due to the favorable conditions for its cultivation. There are many phytosanitary problems found in the culture, such as the diseases caused by root pathogens. A new species of the genus *Macrophomina* has been identified, *Macrophomina pseudophaseolina*, which may be associated with weeds present in melon cultivation areas as an alternative host, causing root rot and vine decline (RRVD). The aim of this work was to analyze the pathogenicity and the expression of proteins differentially expressed in accessions of *Cucumis melo* L. as a function of the response to biotic stress caused by the phytopathogen *M. pseudophaseolina*. In the first stage, artificial inoculation of the plants was carried out using the toothpick method and pathogenicity analysis. The experiment was carried out in a completely randomized design with a 2x2 + 2 factorial scheme, using two distinct melon accessions, one potentially resistant (Ag-15591Ghana) and the other susceptible (MR-1) to *M. phaseolina*; two contrasting isolates of *M. pseudophaseolina* (CMM4826 more aggressive and CMM4807 less aggressive), plus two control groups. These accessions were used as a parameter because there is no previous resistance information for *M. pseudophaseolina*. According to the pathogenicity analysis, the present study confirmed the access Ag-15591Ghana as moderately resistant (MR), for both tested isolates, while the MR-1 access was classified as highly susceptible (HS) to CMM4826 and susceptible (SU) to CMM4807. In the second stage, the plant samples of stem and root of the access Ag-15591Ghana were collected, after 30 days of the inoculation with *M. pseudophaseolina*, for protein extraction, perform sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in addition to the analysis of the band profile of the different treatments. The presence of differentially expressed bands was observed after inoculation of the seedlings with the two isolates in relation to the control, for both tissues. The number of differentially expressed bands was lower, in stem and root, for the Ag-15591Ghana access when inoculated with the most aggressive isolate CMM4826. These results are important as they may contribute in the future to crop breeding programs and the development of effective control measures, based on resistant cultivars.

Keywords: Proteomic. Phytopathogen. Cucurbitaceae.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 – Perfil de proteínas submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos tecidos do caule e raiz de *Cucumis melo* L. do acesso Ag-15591Ghana com a interação com os isolados de *Macrophomina pseudophaseolina*. M= Marcador de peso molecular de proteínas. C= Controle. R= repetições. Onde CMM4826 é o isolado mais agressivo e CMM4807 é o menos agressivo. Setas vermelhas indicam algumas das bandas diferencialmente expressas entre as amostras29

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 – Ranking da severidade e incidência da podridão radicular em *Cucumis melo* L. nos acessos Ag-15591Ghana e MR-1, submetidos à inoculação de isolados de *Macrophomina pseudophaseolina*..... 29
- Tabela 2 – Número de bandas proteicas detectadas (NºB) e sua presença (+) ou ausência (-) nas amostras de caule e raiz de *Cucumis melo* L. do acesso Ag-15591Ghana (moderadamente resistente), submetidos à inoculação de isolados de *M. pseudophaseolina*, CMM4807 menos agressivo e CMM4826 mais agressivo. C = controle. PM= Peso molecular das bandas em kilodalton (KDa). PL= Polimorfismo: polimórfica (P); monomórfica (M) 30

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO II	22
AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE DA RELAÇÃO <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> x <i>Cucumis melo</i> L.	23
RESUMO	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 Material vegetal e local de experimento	25
2.2 Incidência e severidade da doença dos isolados em meloeiro.	26
2.3 Análise do perfil de proteínas	27
2.3.1 Extração de proteínas	27
2.3.2 Quantificação de proteínas	28
2.3.3 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
3 RESULTADOS	29
3.1 Incidência e severidade em acessos de melão	29
3.2 Análise do perfil de proteínas	30
4 DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	35

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

As cucurbitáceas apresentam espécies de forte impacto no agronegócio brasileiro, sendo as principais: *Cucurbita spp.*, *Sechium edule*, *Citrullus spp* e *Cucumis spp* (QUEIRÓZ, 2011). O melão (*Cucumis melo* L.) pertence ao gênero *Cucumis*, família *Cucurbitaceae* (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997), sendo esta a espécie de maior variabilidade fenotípica no gênero (STEPANSKY et al., 1999).

O meloeiro apresenta maior parte de sua produção no Nordeste do Brasil, principalmente nos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará, estimando-se cerca de 20 mil hectares para o cultivo do melão (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018). No primeiro trimestre de 2020, o melão liderou as exportações de frutas brasileiras, com mais de 75 mil toneladas enviadas, gerando renda aproximada de US\$ 44 milhões (ABRAFRUTAS, 2020). A cadeia produtiva nestes Estados vem proporcionando desenvolvimento socioeconômico, especialmente para a região do semiárido, contribuindo com 60 mil empregos diretos e indiretos decorrentes da cadeia produtiva (OLIVEIRA et al., 2017).

A região do semiárido fornece condições ideais para o cultivo do meloeiro (SALVIANO et al. 2017), o que beneficia a planta quanto à produtividade, qualidade do fruto, teores de açúcares, consistência e durabilidade (FILGUEIRA, 2008). Sendo assim, a cultura do melão no Nordeste brasileiro é responsável por 95,7 % da produção nacional, destacando-se os municípios de Mossoró, Tibau, Apodi (RN) e Limoeiro do Norte (CE) (IGBE, 2018).

O cultivo do meloeiro mostra-se associado a uma combinação de fatores climáticos que favorecem o desenvolvimento da cultura, como temperatura alta, baixa umidade relativa e alta luminosidade (COSTA et al., 2000). Devido a esta condição, o clima semiárido da região Nordeste do Brasil propicia a maior produtividade e qualidade dos frutos, durante todo o ano (PEREIRA et al., 2012). Entretanto, apesar da adaptação da cultura às condições edafoclimáticas do Nordeste, o aparecimento de doenças tem sido um dos fatores que reduzem a produtividade e qualidade dos frutos (ANDRADE et al., 2005). De acordo com Medeiros et al. (2015), o meloeiro apresenta cultivo intensivo e sucessivo sem rotação de culturas na região, que influencia negativamente, contribuindo para a intensidade e gravidade das doenças no cultivo da espécie.

As doenças não manejadas apropriadamente afetam a qualidade dos frutos, prejudicando a produção (PEREIRA et al., 2012). Na região do semiárido ocorrem doenças causadas por bactérias, nematoides, vírus e fungos que acometem a cultura do melão (SALVIANO et al., 2017). Dentre as várias doenças que prejudicam esta cultura, enfatizam-se as causadas por patógenos habitantes do solo (NASCIMENTO, 2015).

Dentre os patógenos habitantes do solo que provocam doenças em cucurbitáceas, destacam-se *Fusarium oxysporum*, *M. phaseolina*, *Phytophthora* spp. e *Rhizoctonia solani* (PAVAN; REZENDE; KRAUSE-SAKATE, 2016), sendo os mais isolados de plantas sintomáticas com podridões radiculares no meloeiro o *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (NASCIMENTO, 2015).

Macrophomina phaseolina pertence ao filo Ascomycota e família Botryosphaeriaceae (GUPTA et al., 2012), apresentando maior importância econômica em países subtropicais e tropicais com clima semiárido, apesar de sua distribuição mundial (WRATHER et al., 2001). Este fungo tem grande abundância de hospedeiros, sendo patogênico a mais de 700 culturas, incluindo espécies não cultivadas (SARR et al. 2014; FARR; ROSSMAN, 2019). O fungo *M. phaseolina* é responsável por causar uma das principais doenças na cultura do melão, a podridão radicular, além do declínio das ramas (PRDR) isoladamente ou formando um complexo com outros patógenos de solo (ANDRADE et al., 2005).

Todavia, novas espécies do gênero *Macrophomina* foram recentemente descobertas: *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye, *Macrophomina euphorbiicola* A.R. Machado, D.J. Soares & O.L. Pereira (SARR et al. 2014; MACHADO et al. 2019) e *Macrophomina vaccinni* (ZHAO, CAI, HE e ZHANG, 2019). A utilização de análises filogenéticas multilocos garante melhor distinção das espécies deste gênero, adotando-se sequências de espaçador interno transcritos (ITS), de rDNA, actina (ACT), β -tubulina (β T), calmodelina (CAL) e fator de alongamento de tradução 1-alfa (TEF1- α), uma vez que *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* são muito semelhantes, exceto pela pouca diferença de tamanho entre os conídios (SARR et al. 2014), tornando difícil a identificação por análise morfológica (MACHADO et al. 2019).

Recentemente, Santos et al. (2020) identificaram primers específicos para detecção das espécies de forma mais precisa e rápida.

A espécie *M. pseudophaseolina* já foi relatada por Sarr et al. (2014) causando podridão cinzenta do caule em culturas como feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.), Moench) e amendoim (*Arachis hypogaea*) no Senegal. No Brasil, esta mesma espécie foi isolada nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Paraíba e Rio Grande do Norte, associada a culturas oleaginosas como amendoim, algodão (*Gossypium hirsutum*) e mamona (*Ricinus communis* L.) (MACHADO et al., 2019). Recentemente, *M. pseudophaseolina* foi relatada pela primeira vez acometendo a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) por Brito et al. (2019).

No meloeiro, a podridão cinzenta do caule é apontada como uma das doenças mais destrutivas para a cultura (CHILOSI et al., 2008), ocasionando perdas na produção e abandono de áreas produtoras (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000). Dentre as características da doença destaca-se a podridão de raiz e colo, seguida do colapso. Os primeiros sintomas surgem na região do colo da planta e parte basal dos ramos, apresentando lesões aquosas escurecidas, que contêm gotículas de exsudato marrom translúcido. Posteriormente, as áreas afetadas tornam-se secas e esbranquiçadas, com fendas cobertas com microesclerócios do fungo (SALVIANO et al., 2017).

Em função do comprometimento do sistema radicular, as plantas apresentam desenvolvimento comprometido, sintomas de amarelecimento de folhas e posterior murchamento (BEDENDO, 2018). O colapso é decorrente do desequilíbrio hídrico entre o sistema radicular e a parte aérea da planta, principalmente no estágio próximo à colheita, devido ao apodrecimento do sistema radicular (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000). A doença é favorecida em altas temperaturas (30 a 35 °C) e déficit hídrico (MEDEIROS et al., 2015).

A ocorrência de *M. phaseolina* foi relatada em melão como agente causal da PRDR e também em raízes de plantas daninhas hospedeiras que permanecem em áreas de cultivo de melão no Nordeste do Brasil, por Sales Júnior et al. (2012) e Rodrigues (2013). Entretanto, Negreiros et al. (2019) confirmaram a hipótese de que mais de uma espécie poderia estar associada às plantas daninhas na região do semiárido. Sendo assim, dos 94 isolados obtidos de raízes de pega-pinto (*Boerhavia diffusa* L.) e bredo (*Trianthema portulacastrum* L.), 62 corresponderam a *M. pseudophaseolina*.

O controle de patógenos habitantes do solo, como a *Macrophomina*, torna-se difícil por não existir controle químico específico para a podridão cinzenta do caule em meloeiro (SALVIANO et al., 2017). Outra dificuldade no controle está relacionada à produção de estruturas de resistência e ampla gama de hospedeiros (KAUR et al., 2012), uma vez que os microesclerócios são uma das principais formas de sobrevivência do fungo, que podem permanecer de 2 até 15 anos no solo (MUNGUÍA, 2017).

Sendo assim, diversas técnicas de controle alternativas têm sido utilizadas, embora com algumas limitações, tais como a rotação de cultura, solarização do solo, incorporação de material vegetal no solo e uso de produtos de biocontrole (NASCIMENTO et al., 2018). Entretanto, o método mais eficiente para controle é por meio de variedades resistentes, as quais, além de não serem prejudiciais ao meio ambiente, podem ser associadas com outros métodos de controle. Dessa forma, é necessário buscar fontes de resistência em coleções de germoplasma (AMBROSIO et al., 2015).

Os trabalhos visando a identificar fontes de resistência em melão contra *M. phaseolina* são poucos (LINHARES, 2018) e para *M. pseudophaseolina* ainda menos por ser um patógeno descoberto mais recentemente. Salari et al. (2012) identificaram duas variedades crioulas de melão no Irã, “Sfidak bekhat” e “Sfidak khatdar”, como moderadamente resistentes (MR) a *M. phaseolina*. Em estudo realizado em Valência-Espanha, Ambrósio et al. (2015) relataram sete acessos altamente resistentes a *M. phaseolina* (Ag-15591Ghana, DudCUM296Georg, Ag-C38Nig, Can-NYIsr, Con- Pat81Ko, Dud-QPMAfg e AcTGR1551Zimb). Entretanto, Linhares (2018) verificou que apenas um destes acessos avaliados por Ambrósio et al. (2015) se mostrou moderadamente resistente nas condições do Nordeste do Brasil (Ag-15591Ghana).

Em relação a *M. pseudophaseolina*, Negreiros et al. (2019) relataram em estudo de patogenicidade que, dentre isolados de *M. pseudophaseolina* avaliados, três foram capazes de infectar mudas de melão cultivar ‘Gladial’. Em estudo similar, Negreiros et al. (2020) verificaram que os isolados de plantas daninhas de *M. pseudophaseolina* avaliados se mostraram mais agressivos na cultura do melão do que em melancia. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias para melhor entendimento da relação deste patógeno emergente na cultura do melão.

Uma abordagem que pode auxiliar também na identificação de acessos com características de resistência a patógenos é a proteômica, que se torna uma ferramenta auxiliar no desenvolvimento de cultivares superiores (FRITSCHENETO e BORÉM, 2013), aliado ao melhoramento genético de plantas,

fornecendo informação sobre a variabilidade genética efetivamente expressa a partir do genoma (PENNINGTON e DUNN, 2001). O estudo do proteoma compreende todo o conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um indivíduo. Entretanto, pode ser direcionado somente às proteínas expressas em condições específicas (MEIRELES, 2007), como no caso de estudos das proteínas para compreender respostas de plantas submetidas a estresses bióticos (KOSOVÁ et al., 2011).

Uma fase importante no estudo de proteínas é a extração de proteínas de qualidade, a fim de obter melhores resultados e amostras com maior pureza (REGIANI et al., 2013). Isto permite tanto um maior rendimento quantitativo quanto aumento na variabilidade de bandas e proteínas nas amostras (SILVA et al., 2011). Com relação à fase de separação das amostras proteicas, podem ser empregadas técnicas como a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (REGIANI et al., 2013).

A técnica SDS-PAGE é utilizada com a função de desnaturar as proteínas, conferindo-lhes cargas negativas que permitem estimar seus pesos moleculares e assim, separar as moléculas. A mobilidade das proteínas ocorre em géis com diferentes concentrações de poliacrilamida e pH (gel de empilhamento e gel de resolução) (BRUNELLE e GREEN, 2014).

De acordo com a concentração de poliacrilamida, maior ou menor porosidade é formada após a polimerização do gel, afetando a velocidade de migração das proteínas de tamanhos distintos no gel. Depois de exposto à alta voltagem, o complexo formado por proteínas-SDS migra pelo gel, e sua localização neste depende da capacidade de permear os poros. Após o término da eletroforese, o gel é tratado com solução fixadora para que não ocorra dispersão das proteínas. Por fim, o gel é corado com solução específica para visualização dos perfis e obtenção das imagens (REGIANI et al., 2013).

Diante do que foi exposto, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a patogenicidade de dois isolados de *M. pseudophaseolina*, contrastantes em agressividade, em dois acessos de melão descritos como contrastantes em resistência e susceptibilidade a *M. Phaseolina*, e analisar a expressão de proteínas resultantes desta relação planta-patógeno por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).

REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS. Melão: exportação mostra potencial do agronegócio do ceará. 2020. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2020/09/18/melao-exportacao-mostra-potencial-do-agronegocio-do-ceara/>> Acesso: 09 de Dezembro de 2020.
- AMBRÓSIO, M. M. Q.; DANTAS, A. C. A.; MARTÍNEZ-PEREZ, E.; MEDEIROS, A. C.; NUNES, G. H. S.; PICÓ, M. B. Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Euphytica**, Wageningen, v. 203, n. 2, p. 287-300, 2015.
- ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J.; BIONDI, C. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; SALES JUNIOR., R. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n. 4, p.327-333, 2005.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2018. Benno Bernardo Kist et al. Santa Cruz do Sul: EditoraGazeta Santa Cruz, 2018. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2018/04/FRUTICULTURA_2018_dupla.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (org.). **Manual de Fitopatologia**. 5ª ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 573.
- BRITO, A. C. Q.; MELLO, J. F.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MACHADO, A. R. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 4, p. 1245, 2019.
- BRUNULLE, J. L.; GREEN, R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). **Methods in Enzymology**, v. 541, p. 151–159, 2014.

- CHILOSI, R. et al. Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy. **EPPO Bulletin**, França, v. 38, n. 1, p. 147-154, 2008.
- COSTA, N. D. et al. **Cultivo do melão**. Petrolina: Embrapa Semi Árido, 2000. 67p. (Circular Técnica, 59).
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Internet Resource. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>>. Acesso em: 19 ago. 2019.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura e agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2008.
- FRITSCHÉ-NETO, R., BORÉM, A. Ômicas: abrindo a “caixa preta” do fenótipo. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (org.): **Ômicas 360: Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas**. Editora UFV, 2013. p. 9-22.289p.
- GARCIA-JIMENEZ, J.; ARMENGOL, J.; SALES JR., R.; JORDA, C.; BRUTON, B.D. Fungal pathogens associated with melon plants collapse in Spain. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 30, n. 2, p. 169-173, 2000.
- GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K. ; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 167–180, 2012.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VALLAD, G. E.; CHAND, R.; CHAUHAN, V. B. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 136-151, 2012.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, L. Plant proteome changes under abiotic stress – Contribution of proteomics studies to understanding plant stress abiotic response. **Review Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1301-1322, 2011.

LINHARES, C. M. D. S. **Reação de acessos e herança da resistência *Macrophomina phaseolina* e efeito da temperatura na podridão cinzenta em meloeiro**. 2018. 65f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró – RN, 2018.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; SOARES, D. J.; GOMES, A. A. M.; PEREIRA, O. L. 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**, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019.

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.

MEIRELES, K. G. X. **Aplicações da Proteômica na Pesquisa Vegetal**. Embrapa. Documentos 165. 2007.

MUNGUÍA, M. E. G. **Seleção de acessos de feijão-fava resistentes a *Macrophomina phaseolina***. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

NASCIMENTO, P. M. L. et al. Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. **European Journal of Plant Pathology**, Holanda, v. 152, n. 2, p. 433-446, 2018.

NASCIMENTO, Paula Gracielly Morais Lima do. **Comunidade microbiana do solo e podridão radicular em meloeiro em diferentes sistemas de manejo**. 2015. 76f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, 2015.

NEGREIROS, A. M. P., MELO, N. J. D. A., MEDEIROS, H. L. D. S., SILVA, F. H. A., ARMENGOL, J., SALES JÚNIOR, R. Characterization of adaptability components of Brazilian isolates of *Macrophomina pseudophaseolina*. **Journal of Phytopathology**, v. 168, p. 490-499, 2020.

NEGREIROS, A. M. P.; SALES JÚNIOR, R.; LEÓN, M.; DE ASSIS MELO, N. J.; MICHEREFF, S. J.; DE QUEIROZ AMBRÓSIO, M. M. et al. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of phytopathology**, v. 167, n. 6, p. 326-337, 2019.

OLIVEIRA, F. I. C. et al. A cultura do melão. In: FIGUEIRÊDO, M. C. B.; GONDIM, R. S.; ARAGÃO, F. A. S. (org.). **Produção de melão e mudanças climáticas**: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 17-32.

PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das cucurbitáceas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (org.). **Manual de fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas, São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. p. 8-10.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. **Proteomics**: from protein sequence to function. Springer- Verlag e BIOS scientific Publishers, New York 1v. 2001.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; CARVALHO, A. D. F. **Identificação e manejo das principais doenças fúngicas de meloeiro**. Brasília: EMBRAPA, 2012.

QUEIRÓZ, M. A. **Germoplasma de Cucurbitáceas no Brasil**. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 51. Horticultura Brasileira, v. 29, p. 1-9, 2011 (Suplemento - CD ROM).

REGIANI, T. et al. Eletroforese, Cromatografia e Espectrometria de Massas. In: BORÉM, A. & FRITSCHÉ-NETO, R. (org.). **Ômicas 360: Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas**. Editora UFV, 2013. p. 123-152.

ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTERS, D. S. **Cucurbits**. CAB International, Oxon. 1997.

SALARI, M.; PANJEHKEH, N.; NASIRPOOR, Z.; ABKHOO, J. Reaction of melon

(*Cucumis melo* L.) cultivars to soil-borne plant pathogenic fungi in Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 87, p. 15324-15329, 2012.

SALES JR, R.; OLIVEIRA, O. F.; MEDEIROS, E. V.; GUIMARÃES, I. M.; CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012.

SALVIANO, A. M. et al. A cultura do melão. 3ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017. (Coleção Plantar, 76)

SANTOS, K. M., LIMA, G. S., BARROS, A. P. O. et al. Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species. **Eur. J. Plant. Pathol.**, v. 156, p. 1213-1228, 2020.

SARR, M. P. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia mediterranea**, Itália, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.

SILVA, C. R. C. et al. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (sds- page) de proteínas totais de folhas de algodão. In: Embrapa Algodão-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 11., 2011, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2011.

STEPANSKY, A.; KOVALSKI, I.; PERL-TREVES, R. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, n. 3-4, p. 313-332, 1999.

WRATHER, J. A., ANDERSON, T. R., ARSYAD, D. M., TAN, Y. et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, p. 115-121, 2001.

ZHAO, L., CAI, J., HE, W., ZHANG, Y. *Macrophomina vaccinii* sp. nov. causing blueberry stem blight in China. **MycoKeys**, v. 55, p. 1-14, 2019.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE DA RELAÇÃO *Macrophomina pseudophaseolina* x *Cucumis melo* L.

Resumo

O melão é a principal cultura produzida na região semiárida brasileira. Diversos patógenos habitantes do solo podem ser capazes de causar podridão radicular e declínio das ramas em áreas produtoras. Nesse estudo, avaliou-se a patogenicidade e a expressão de proteínas pela técnica de SDS-PAGE, após estresse biótico causado por inoculação de acessos de *Cucumis melo* L. com isolados de *Macrophomina pseudophaseolina*. Para tanto, dois isolados contrastantes em agressividade (CMM4826 mais agressivo e CMM4807 menos agressivo) foram inoculados, por meio do método do palito, no acesso Ag-15591Ghana, potencialmente resistente e no acesso MR-1, suscetível a *M. phaseolina*. Estes acessos foram utilizados como parâmetro na medida em que não há informações prévias de resistência para *M. pseudophaseolina*. Trinta dias após a inoculação, foram avaliadas a incidência e a severidade da doença, usando escala de notas. A extração de proteínas dos tecidos vegetais de caule e raiz foi realizada por meio do método da precipitação por Fenol/SDS e a quantificação se deu pelo método de Bradford. As amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida, foram avaliados a presença de polimorfismo e o peso molecular das bandas detectadas na corrida eletroforética das amostras. Como resultado, foi verificado que os dois isolados de *M. pseudophaseolina* foram capazes de causar sintomas de podridão radicular em todas as plântulas de melão inoculadas. O acesso Ag-15591Ghana foi moderadamente resistente (MR) à nova espécie *M. pseudophaseolina*, sendo uma fonte promissora para programas de melhoramento genético de melão. Na análise de expressão de proteínas, foram verificadas mudanças no padrão de bandas entre plântulas inoculadas e o controle, indicando possíveis mecanismos de defesa existentes. O número de bandas diferencialmente expressas foi menor, em caule e raiz, para o acesso Ag-15591Ghana quando inoculado com o isolado mais agressivo CMM4826. Estudos posteriores são fundamentais para identificação destas proteínas diferencialmente expressas e das funções desempenhadas por elas nesta relação planta-patógeno.

Palavras-chave: Proteômica. Fitopatógeno. Cucurbitaceae.

1. INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) apresenta maior intensidade de produção na região Nordeste do Brasil. Nos Estados da Bahia e Pernambuco, concentra-se na região do Vale do São Francisco; nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte, destaca-se o Polo Jaguaribe-Assu (CELIN, 2014), responsável por mais de 90 % da produção no Brasil (SALVIANO et al., 2017). As condições de clima seco, baixa precipitação e alta luminosidade favorecem o desenvolvimento da cultura nestas regiões (SALES JUNIOR et al., 2019). Entretanto, espécies de fungo do gênero *Macrophomina* são responsáveis por causar doenças como a podridão radicular e declínio das ramas (PRDR) no meloeiro (PORTO et al., 2019) e podem se tornar hospedeiras em plantas daninhas sem manejo em áreas de produção da cultura (SALES JÚNIOR et al., 2012).

Uma nova espécie foi descoberta por Sarr et al. (2014), denominada de *Macrophomina pseudophaseolina*. No Brasil, esta espécie já foi relatada acometendo diversas culturas, como a mandioca (BRITO et al., 2019), plantas oleaginosas (MACHADO et al., 2019) e feijão caupi (SALES JUNIOR et al., 2020). Em um estudo para caracterização de uma coleção de isolados de *Macrophomina* provenientes de raízes de plantas daninhas presentes em áreas produtoras de melão, *Trianthema portulacastrum* e *Boerhavia diffusa*, Negreiros et al. (2019) identificaram que, dos 94 isolados obtidos, 62 pertenciam à espécie *M. pseudophaseolina*, havendo um patógeno potencial para a cultura do melão. Resultados de severidade já apontam que *M. pseudophaseolina* é mais agressivo ao melão do que à melancia (NEGREIROS et al., 2020).

Sabendo que não existe um método de controle químico eficiente registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nem cultivares resistentes (AMBRÓSIO et al. 2015), além de ser registrada diversidade de hospedeiros e a presença de estruturas de resistência produzidas pelos patógenos que sobrevivem no solo por muito tempo (KAUR et al., 2012), a identificação de cultivares resistentes é a forma de controle mais eficaz (SALARI et al., 2012), havendo a necessidade de estratégias de melhoramento genético que abordem essa questão (CRISOSTOMO; ARAGÃO, 2014).

Com relação aos estudos em espécies vegetais, a proteômica contribui com os programas de melhoramento de plantas, distinguindo as proteínas relacionadas com a proteção e resposta das plantas sob estresse biótico ou abiótico (KOSOVÁ

et al., 2011). Alguns estudos abordando técnicas da proteômica, como a eletroforese desnaturante em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), obtiveram resultados positivos nas análises dos perfis de bandas diferencialmente expressas, revelando proteínas e enzimas relacionadas à defesa da planta submetida a estresse biótico por patógenos como *Fusarium oxysporum* (NURCAHYANI et al. 2016; RAI et al., 2011) e *Macrophomina phaseolina* (ABOSHOSHA et al., 2008; ARAVIND e BRAHMBHATT, 2018). Nesse sentido, a proteômica aliada ao melhoramento genético de plantas fornece informação sobre a variabilidade genética realmente expressa a partir do genoma (PENNINGTON; DUNN, 2001).

Diante do que foi exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade de isolados da nova espécie *M. pseudophaseolina* em acessos de melão e realizar um estudo proteômico por meio da técnica de SDS-PAGE, a fim de verificar a influência desta interação planta-patógeno na expressão de proteínas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e local do experimento

Sementes de dois acessos de melão pertencentes ao Banco de Sementes do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais da UFERSA, o acesso Ag-15591Ghana (*Cucumis melo* L. subsp. *agrestis*), originado de Gana, e o acesso MR-1 (*Cucumis melo* L. subsp. *momordica*), originado da Índia, foram utilizados nesse estudo. O primeiro é moderadamente resistente e o segundo é suscetível a *M. phaseolina* (LINHARES, 2018). Estes acessos foram utilizados como parâmetro na medida em que não há informações prévias de fontes de resistência para *M. pseudophaseolina*.

As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 10 % por um minuto e posteriormente 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 48 horas.

Após o início da germinação, as plântulas foram transferidas para vasos de 1 L, contendo solo e substrato (Tropstato HT), na proporção de 2:1, previamente autoclavados duas vezes a 121 °C por uma hora com intervalo de 24 h. As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 45 dias. A irrigação foi realizada por distribuição manual do volume de água. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Casa de vegetação e no Laboratório de

Fitopatologia II do Departamento de Ciências Agronômicas e Florestais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada em Mossoró, RN, Brasil.

2.2 Incidência e severidade da doença dos isolados em meloeiro

Os isolados de *M. pseudophaseolina* foram coletados de *Boerhavia difusa* e pertencem à Coleção de Culturas de fungos fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM), localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Os isolados utilizados neste estudo são contrastantes entre si, em termos de agressividade e local de coleta. O isolado CMM4807 é menos agressivo e coletado na região produtora de Assu-RN, e o isolado CMM4826 é mais agressivo e coletado na região de Mossoró- RN.

O procedimento de inoculação utilizado foi o método do palito, descrito por Ambrósio et al. (2015). Este método foi utilizado porque é o mais eficiente em discriminar os acessos em classes distintas de resistência, dependendo do isolado (MEDEIROS et al., 2015). Pedacos de palitos de 12 mm, de ponta fina, foram distribuídos em orifícios produzidos em papel filtro de 90 mm 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, 20 mL de meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), suplementado com sulfato de estreptomicina, foram adicionados às placas contendo os palitos. Após a polimerização do meio BDA, foi realizada a transferência de cinco discos (6 mm de diâmetro) provenientes de culturas puras de cada isolado de *M. pseudophaseolina*. As placas foram mantidas a 28 ± 2 °C em estufa B.O.D, no escuro, por oito dias. As mudas de melão foram inoculadas 15 dias após o plantio, com os palitos infestados pelo micélio e inseridos na região do colo das mudas, aproximadamente a 0,5 cm acima do solo. Palitos autoclavados não infestados foram utilizados nas plântulas testemunhas (controle). As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 45 dias, sob condição de luz natural, a uma temperatura média de 33 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial $2 \times 2 + 2$, sendo dois acessos de melão, dois isolados de *M. pseudophaseolina* e duas testemunhas, com seis tratamentos e quinze repetições, com 90 plantas no total.

Após trinta dias da inoculação dos isolados, a severidade da doença foi analisada por meio de uma escala de notas descrita por Rayf e Ahmad (1998). Nessa escala, 0= 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. A severidade média da doença foi calculada para cada acesso e utilizada para classificá-los em cinco classes de reação, onde 0 = imune (I); 0,1-1,0 = altamente resistente (AR); 1,1–2,0 = moderadamente resistente (MR); 2,1–4,0 = suscetível (SU) e 4,1–5,0 = altamente suscetível (AS) (SALARI et al., 2012).

A incidência da doença foi determinada a partir da porcentagem do número de plantas infectadas em relação ao total de plantas no experimento. Fragmentos de tecidos de plantas que apresentaram sintomas foram colocados em placas Petri com BDA para o reisolamento dos fungos inoculados e para completar os postulados de Koch.

Os dados da severidade da doença foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com a probabilidade no nível de 5 % ($p < 0.05$). 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 de incidência e severidade, as raízes e caule das mudas do acesso Ag-15591Ghana foram coletadas e submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido para evitar a ação de proteases. Posteriormente, o material vegetal foi mantido em ultrafreezer -80 °C. A extração das proteínas foi realizada por meio do método descrito por Rodrigues et al. (2012), com modificações.

As amostras de raízes e caule foram pulverizadas com nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. Cerca de 250 mg de cada amostra de tecido vegetal foram adicionados a tubos de 2 mL. Em seguida, a cada amostra foram adicionados 0,8 mL de Tris fenol saturado pH 8,0 e 0,8 mL de tampão de SDS [0,1M Tris-HCl pH 8,0, SDS a 2 %, β -mercaptoetanol a 5 %, sacarose a 30 %; 1 mM PMSF]. Na sequência, as amostras foram misturadas sob agitação em vortex por 1 minuto e depois centrifugadas por 12 minutos a 12.000 rpm a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2 mL contendo 0,5 mL de

amostra. Após esse processo, as amostras foram levadas para precipitação por 24 horas a -20°C , adicionadas com três volumes de acetato de amônio a 0,1 M em metanol gelado.

Na segunda etapa do processo de extração, as amostras foram novamente centrifugadas por 12 minutos a 12.000 rpm a 4°C . O precipitado foi lavado uma vez com 1 mL de acetato de amônio 0,1 M, em metanol gelado, sob agitação no vortex por 30 segundos e centrifugado nas mesmas condições descritas. Depois, o precipitado foi lavado mais uma vez, com 1 mL de acetona a 80 % gelada, sob agitação no vortex e novamente centrifugado.

Por fim, o pellet formado foi seco à temperatura ambiente em capela até evaporar toda a acetona. Após a extração, as proteínas peletizadas foram solubilizadas com 50 μL de ureia 7 M e Tiureia 2 M. Depois de solubilizadas, as amostras de proteínas foram sonicadas duas vezes por 30 segundos em sonicador, com banho maria a 15°C e então foram armazenadas em freezer a -20°C .

2.3.2 Quantificação de proteínas

As amostras tiveram o teor proteico quantificado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se 10 μL de amostra, 90 μL de água deionizada e 900 μL do reagente de Bradford. As amostras foram lidas em espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220), na absorvância de 595 nm. As absorvâncias obtidas foram plotadas em uma curva de calibração previamente construída, com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA), a fim de determinar a concentração total de proteínas das amostras.

2.3.3 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), com modificações. Cerca de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada amostra proteica foram adicionados ao tampão de amostra (Tris HCL 1 M pH 6,8, glicerol 2 %, azul de bromofenol 0,05 %, SDS 10 %, β -mercaptoetanol 750 mM) na proporção de 2:1, e foram desnaturados por aquecimento a 94°C por três minutos.

As corridas em SDS-PAGE foram realizadas em cuba de eletroforese vertical para minigel (Loccus Vert-i10) de 10 x 10 cm, adequada para identificação e separação de proteínas de diferentes pesos moleculares.

O gel de separação foi preparado a uma concentração de 12,5 % (1,5 M de

Tris- HCl pH 8,8, 12,5 % (v/v) de acrilamida-Bis, SDS 10 % pH 7,2, persulfato de amônio a 10 %, 0,1 % de TEMED e água deionizada), sendo este gel adicionado primeiro. Para o gel de empilhamento, foi utilizada uma concentração de 4 % (0,6 M de Tris-HCl pH 6,8, 4 % (v/v) de acrilamida-Bis, SDS 10 % pH 7,2, persulfato de amônio a 10 %, 0,1 % de TEMED e água deionizada), sendo este gel adicionado por último.

As amostras foram submetidas à eletroforese em tampão Tris-glicina (Tris- HCl 20 mM, glicina 0,192 mM e SDS 0,1 %), nas seguintes condições: 80 V por 30 minutos e 150 V por 1 hora e 40 minutos. Posteriormente, o gel foi fixado em solução de etanol (40 %) e ácido acético (10 %) por \pm 12 h. 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(+) ou ausência (-) de cada banda entre as amostras.

3. RESULTADOS

3.1 Incidência e severidade em acessos de melão

Na análise de patogenicidade dos isolados de *M. pseudophaseolina*, foi verificado que ambos os isolados, CMM4807 e CMM4826, foram capazes de infectar ambos os acessos de melão, causando podridão radicular e do colo das plantas, resultando em incidência de 100 %, com exceção das testemunhas. Foi possível observar também sintomas de amarelecimento das folhas, murcha e tombamento das plantas mais suscetíveis. Com relação à severidade, o acesso Ag-15591Ghana apresentou menores médias (1,40 e 1,53) para ambos os isolados, indicando maior resistência à infecção e menor porcentagem da área de tecidos doentes e sintomas visíveis nas plantas.

Já para o acesso MR-1, o isolado menos agressivo, CMM4807, apresentou média de 2,88 e o isolado mais agressivo, CMM4826, de 4,33, resultando em diferença na classificação de resistência para este acesso. O acesso Ag-15591Ghana apresentou resistência moderada a ambos os isolados de *M. pseudophaseolina* testados nesse estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Ranking da severidade e incidência da podridão radicular em *Cucumis*

melo L. nos acessos Ag-15591Ghana e MR-1, submetidos à inoculação de isolados de *Macrophomina pseudophaseolina*.

Acessos	Isolados <i>M. pseudophaseolina</i>	Severidade		Incidência
		Rank	CR	Rank
Ag-15591Ghana	CMM4807	45.93 (1,40 b)	MR	60.50 (100 b)
	CMM4826	48.60 (1,53 b)	MR	60.50 (100 b)
MR-1	Testemunha	15.50 (0,00 a)	I	15.50 (0 a)
	CMM4807	66.46 (2,88 c)	SU	60.50 (100 b)
	CMM4826	81.00 (4,33 c)	AS	60.50 (100 b)
χ^2		81.66		89.00

χ^2 = valor do qui-quadrado significativo a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre médias. CR = Classes de reação, onde I: imune, SU: suscetível, AS: altamente suscetível, MR: moderadamente resistente. O valor entre parênteses corresponde às médias.

3.2 Análise do perfil de proteínas

O perfil eletroforético de proteínas pela técnica de SDS-PAGE em ambos os tecidos revelaram bandas diferencialmente expressas entre as amostras do acesso Ag-15591Ghana (Figura 1). As principais bandas estavam localizadas no intervalo de 99 a 18 kilodaltons (kDa) conforme indicado pela análise do programa CLIQS 1D (Tabela 2).

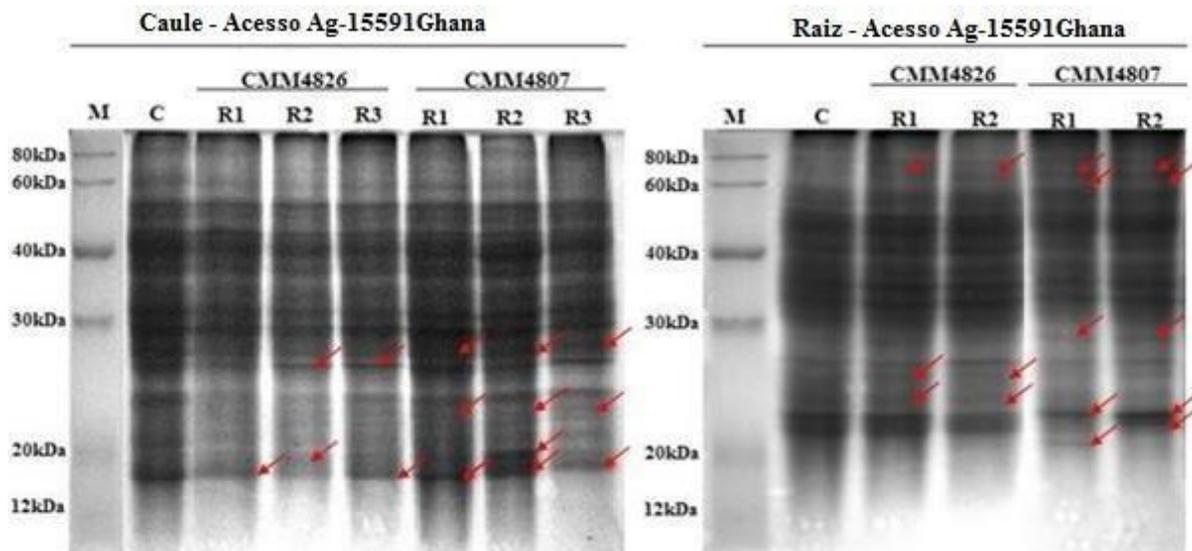


Figura 1 - Perfil de proteínas submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida (SDS-PAGE) dos tecidos do caule e raiz de *Cucumis melo* L. do acesso Ag-15591Ghana com a interação com os isolados de *Macrophomina pseudophaseolina*. M= Marcador de peso molecular de proteínas. C= Controle. R= repetições. CMM4826 é o isolado mais agressivo e CMM4807 é o menos agressivo. Setas vermelhas indicam algumas das bandas diferencialmente expressas entre as amostras.

Nos tecidos do caule e raiz, foi identificado um total de 26 e 22 bandas, respectivamente, no acesso Ag-15591Ghana. Das 26 bandas identificadas nas amostras de caule, 11 bandas foram diferenciais entre as plantas inoculadas, considerando ambos os isolados juntos em comparação com o controle. Plântulas inoculadas apenas com o isolado CMM4826 apresentaram seis bandas diferenciais; ao passo que para apenas o isolado CMM4807, dez bandas diferenciais, sempre na comparação com o controle. Nas raízes, doze das 22 bandas totais foram diferentes do controle, considerando ambos os isolados juntos em comparação ao controle. As plântulas inoculadas apenas com o CMM4826 obtiveram seis bandas diferentes do controle, e com o CMM4807 foram observadas oito bandas (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de bandas proteicas detectadas (NºB) e sua presença (+) ou ausência (-) nas amostras de caule e raiz de *Cucumis melo* L. do acesso Ag-15591Ghana (moderadamente resistente), submetidos à inoculação de isolados de *M. pseudophaseolina*, CMM4807 menos agressivo e CMM4826 mais agressivo. C = controle. PM= Peso molecular das bandas em kilodalton (kDa). PL= Polimorfismo: polimórfica (P); monomórfica (M).

Acesso Ag-15591Ghana											
Nº B	PM(kDa)	CAULE				Nº B	PM(kDa)	RAIZ			
		C	CMM4826	CMM4807	PL			C	CMM4826	CMM4807	PL
1	99	+	+	+	M	1	98	+	+	+	M
2	87	+	+	+	M	2	68	-	+	+	P
3	67	-	-	+	P	3	55	-	-	+	P
4	62	+	-	-	P	4	52	+	+	-	P
5	60	-	+	+	P	5	48	-	+	-	P
6	50	+	+	+	M	6	45	+	-	+	P
7	47	-	-	+	P	7	44	-	+	-	P
8	43	+	+	+	M	8	42	-	-	+	P
9	41	+	+	+	M	9	41	+	+	-	P
10	40	-	-	+	P	10	36	-	-	+	P
11	38	+	+	+	M	11	35	+	+	+	M
12	37	-	+	+	P	12	34	-	-	+	P
13	34	+	+	+	M	13	33	+	+	-	P
14	33	-	+	-	P	14	29	-	-	+	P
15	32	+	+	+	M	15	27	+	+	+	M
16	31	-	+	+	P	16	26	-	+	-	P
17	30	+	+	+	M	17	25	-	+	-	P
18	28	+	-	+	P	18	24	+	-	+	P
19	26	+	+	+	M	19	23,5	-	+	+	P
20	23	+	+	+	M	20	23	+	+	+	M
21	22	-	-	+	P	21	22	+	-	-	P
22	21,7	-	+	+	P	22	21	-	-	+	P

23	21	+	-	+	P				
24	20	-	+	+	P				
25	19	-	-	+	P				
26	18	+	+	+	M				
Número total de bandas	15	18	24			Número total de bandas	10	13	14
Taxa de polimorfismo (%)	53				Taxa de polimorfismo (%)	81			

4. DISCUSSÃO

A descoberta de uma nova espécie *Macrophomina*, *M. pseudophaseolina*, resultou em questionamentos sobre seu grau de patogenicidade em relação a *M. phaseolina* (NDIAYE et al., 2015). Em estudo recente, Negreiros et al. (2019) descobriram que dos 94 isolados de *Macrophomina* obtidos de plantas daninhas em áreas produtoras de melão no semiárido, 62 pertenciam à espécie *M. pseudophaseolina*, sendo uma potencial ameaça à cultura.

O presente estudo confirma que o acesso Ag-15591Ghana avaliado é moderadamente resistente à nova espécie *M. pseudophaseolina*, inclusive ao isolado mais agressivo, CMM4826, com média igual a 1,53. Resultado similar foi verificado por Linhares (2018) para *M. phaseolina*, tendo o mesmo acesso sido classificado como moderadamente resistente ao isolado mais agressivo, com média similar (1,1) de severidade, em Mossoró-RN. O acesso MR-1 mostrou-se altamente suscetível ao isolado CMM4826 de *M. pseudophaseolina*, assim como também apresentou a mesma classe de reação a *M. phaseolina* com o isolado mais agressivo, verificado por Ambrósio et al. (2015). Sales Júnior et al. (2020) relataram que os isolados de *M. pseudophaseolina* foram igualmente patogênicos, quando comparados a *M. phaseolina* em feijão-caupi.

A incidência da doença em 100 % das plantas de ambos os acessos, causada pelos isolados da espécie *M. pseudophaseolina*, indica que todas as plantas apresentaram sintomas da doença, exceto as testemunhas. As plantas do acesso Ag-15591Ghana apresentaram pouca lesão no caule e leve amarelecimento das folhas, ao passo que no acesso MR-1 os sintomas se mostraram mais graves, com aparecimento de podridão no caule (coloração marrom), murcha nas folhas, declínio das ramas e até morte das plantas.

Alguns trabalhos anteriores revelaram resultados divergentes com a relação à incidência da doença. Ndiaye et al. (2015) verificaram, para *M. pseudophaseolina*, uma incidência de 64 % em uma cultivar suscetível em feijão caupi, na faixa de temperatura de 26-36 °C. Negreiros et al. (2019) reportaram três

isolados, dentre eles o CMM4807, capazes de infectar plantas de melão da cultivar Gladial, embora com baixa incidência para *M. pseudophaseolina*, de apenas 10 %. Entretanto, Sales Júnior et al. (2020) reportaram o isolado CMM4826 em feijão caupi com a mesma incidência de 100 %.

Com relação à severidade da doença, não houve diferença estatística entre os isolados quando inoculados no acesso Ag-15591Ghana. Em relação ao acesso MR-1, o isolado CMM4826 casou maior de severidade (4,33), ao passo que o isolado CMM4807 causou menor severidade (2,88). Resultado com médias menores foi encontrado por Negreiros et al. (2020), utilizando a cultivar Gladial, na qual a média mais alta de severidade da doença (1,8) em melão foi causada pelo isolado CMM4826 e a mais baixa (0,2) foi causada pelo isolado CMM4807. Entretanto, os autores relataram que os isolados de *M. pseudophaseolina* são mais agressivos em termos de severidade em melão do que em melancia.

A alta incidência e severidade da doença nos acessos de melão avaliados pode estar relacionada à capacidade de tolerância a altas temperaturas e ambientes sob estresse hídrico pelas espécies de *Macrophomina* (COHEN, 2016; SALES JUNIOR et al., 2020), favorecendo a virulência do patógeno e ocorrência da podridão cinzenta do caule, principalmente nas condições do semiárido (LINHARES, 2018).

Poucos estudos visando a avaliar a resistência de melão a *Macrophomina* têm sido relatados. Salari et al. (2012) reportaram dois cultivares de melão moderadamente resistentes a *M. phaseolina* nas condições climáticas do Irã. Nas condições climáticas do semiárido brasileiro, apenas um acesso de melão, Ag-15591Ghana, foi moderadamente resistente a *M. phaseolina*, ressaltando a necessidade de fontes com maior nível de resistência (LINHARES, 2018).

O resultado deste presente trabalho é importante porque mostra o mesmo padrão de resistência do acesso Ag-15591Ghana verificadas por Linhares (2018), dessa vez para a nova espécie de *M. pseudophaseolina*. De acordo com Negreiros et al. (2020), este resultado é considerado importante, visando também à inclusão de *M. pseudophaseolina* nos programas de melhoramento genético do melão.

A partir da análise do perfil de proteínas por meio da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), observou-se que a inoculação com os isolados de *M. pseudophaseolina* causou alterações na expressão de proteínas nas plântulas do acesso de melão Ag-15591Ghana. Para ambos os tecidos avaliados, foram identificadas bandas diferencialmente expressas entre as plantas inoculadas e o controle. Essa mudança na expressão de proteínas reforça

os resultados obtidos pelo teste de patogenicidade do acesso Ag-15591Ghana, moderadamente resistente, sugerindo que essas proteínas diferencialmente expressas podem estar relacionadas com um sistema de defesa contra o patógeno.

Durante o processo de infecção do fungo, as plantas hospedeiras respondem contra o patógeno de forma a alterar a síntese de algumas proteínas e ativar sinais, produzindo metabólitos secundários, compostos fenólicos, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e enzimas (SHARMA et al. 2014).

Em outras culturas estes resultados foram observados. Aboshosha et al. (2008) reportaram maior expressão de bandas diferencialmente expressas em cultivar resistente de girassol inoculado com *M. phaseolina* e detectaram maior atividade da enzima peroxidase, caracterizada como uma das primeiras respostas de defesa das plantas. Kumari et al. (2015) avaliaram genótipos de sorgo e relataram menores danos oxidativos em genótipo mais resistente a *M. phaseolina*, devido a expressão de altas concentrações de fenóis, ácido salicílico, peroxidases e flavonoides. Aravind and Brahmhatt (2018) observaram que os genótipos resistentes e moderadamente resistentes de quiabo apresentaram nove e sete bandas diferenciais, respectivamente, em relação aos genótipos suscetíveis.

O acesso Ag-15591Ghana apresentou resistência moderada apesar das bandas diferencialmente expressas em relação ao controle. O processo de infecção pelo patógeno também faz com que sejam produzidas enzimas, metabólitos tóxicos e indução de produção de etileno no hospedeiro, aumentando a sua predisposição à infecção (LINHARES, 2018) o que pode justificar a presença de sintomas da doença no acesso.

A diferença na expressão de bandas no acesso Ag-15591Ghana, quando inoculado com os isolados CMM4826 e CMM4807, sugere interação diferenciada com o hospedeiro, pois o número de bandas diferenciais em relação ao controle foi menor quando o acesso foi inoculado com o isolado mais agressivo, tendo sido observadas seis bandas diferenciais para cada tecido avaliado.

Este resultado pode estar relacionado à supressão de mecanismos de defesa da planta pelo patógeno. De acordo com El-bebany et al. (2010), existe uma maior expressão de fatores ligados à patogenicidade, dentre eles proteínas, apenas em isolado mais agressivo de patógeno de solo *Verticillium dahliae*, ao passo que em isolado menos agressivo a maioria das proteínas diferenciais estava ligada apenas às funções do metabolismo básico do patógeno. Resultado similar foi

reportado por Wang et al. (2008), no qual um isolado mais agressivo de *Phytophthora infestans* apresentou mecanismos de supressão de defesa mais eficazes em cultivar de batata do que o isolado menos agressivo, embora ambos tenham sido virulentos às cultivares.

Com relação à interação planta-patógeno, a resistência ou susceptibilidade da planta dependem da existência de mecanismos de defesa, em resposta à expressão de fatores de virulência expressos pelo patógeno (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2010). Dessa forma, é necessário um estudo mais detalhado, a fim de caracterizar estas proteínas diferencialmente expressas e identificar sua função na resistência à doença (ARAVIND; BRAHMBHATT, 2018).

5. CONCLUSÃO

Com a análise de patogenicidade, confirma-se que o acesso Ag-15591Ghana é moderadamente resistente a *M. pseudophaseolina*, nova espécie associada à podridão radicular e declínio das ramas em melão. O estudo do perfil de proteínas revelou bandas diferencialmente expressas no acesso após inoculação com os dois isolados do patógeno. A diferença de agressividade entre os isolados influenciou no número de bandas diferenciais expressas, mesmo que ambos tenham sido patogênicos, o que pode estar relacionado à interação patógeno-hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ABOSHOSHA, S. S.; ATTA ALLA, S. I.; EL-KORANY, A. E.; EL-ARGAWY, E. Protein analysis and peroxidase isozymes as molecular markers for resistance and susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseolina*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 10, n. 1, p. 28–34, 2008.

AMBRÓSIO, M. M. Q.; DANTAS, A. C. A.; MARTÍNEZ-PEREZ, E.; MEDEIROS, A. C.; NUNES, G. H. S.; PICÓ, M. B. Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Euphytica**, Wageningen, v. 203, n. 2, p. 287-300, 2015.

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**, 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**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRITO, A. C. Q.; MELLO, J. F.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MACHADO, A. R. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 4, p. 12–45, 2019.

CELIN, E. F.; PASTORI, P. L.; NUNES, G. H. S.; ARAGÃO, F. A. S. Agronegócio brasileiro do melão na última década. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. **Horticultura brasileira.**, v. 31, n. 2, p. S0246–S0253 (Suplemento-CD Rom), 2014.

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

CRISÓSTOMO, J. R.; ARAGÃO, F. A. S. Melhoramento genético do meloeiro. In: VIDAL NETO, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. (org.). O melhoramento genético de plantas no Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2014. p. 209-245.

EL-BEBANY, A. F.; RAMPITSCH, C.; DAAYF, F. Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness. **Proteomics**, v. 10, n. 2, p. 289-303, 2010

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; PRATS, E.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 3-16, 2010.

KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VALLAD, G. E.; CHAND, R.; CHAUHAN, V. B.; Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 136-151, 2012.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, L. Plant proteome changes under abiotic stress – Contribution of proteomics studies to understanding plant stress abiotic response. **Review Journal of proteomics**, v. 74, p. 1301-1322, 2011.

KUMARI, N.; SHARMA, I.; ALAM, A.; SHARMA, V. Screening of sorghum genotypes and biochemical changes for resistance to damage caused by *Macrophomina phaseolina*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 48, n. 9-12, p. 760- 775, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LINHARES, C. M. D. S. **Reação de acessos e herança da resistência *Macrophomina phaseolina* e efeito da temperatura na podridão cinzenta em meloeiro**. 2018. 65f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró – RN, 2018.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; SOARES, D. J.; GOMES, A. A. M.; PEREIRA, O. L. 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**, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019.

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.; SARR, M. P.; CISSE, N.; NDOYE, I. Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*? **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 45, p. 2232-2238, 2015.

NEGREIROS, A. M. P.; MELO, N. J. D. A.; MEDEIROS, H. L. D. S.; SILVA, F. H. A. ; ARMENGOL, J.; SALES JÚNIOR, R. Characterization of adaptability components of Brazilian isolates of *Macrophomina pseudophaseolina*. **Journal of**

Phytopathology, v. 168, p. 490-499, 2020.

NEGREIROS, A. M. P.; SALES JÚNIOR, R.; LEÓN, M.; DE ASSIS MELO, N. J.; MICHEREFF, S. J.; DE QUEIROZ AMBRÓSIO, M. M. et al. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of phytopathology**, 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**, v. 4, n. 5, p. 102-105, 2016.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. Proteomics: from protein sequence to function. **Springer- Verlag e BIOS scientific Plubishers**, New York 1v. 2001.

PORTO, M. A. F., AMBRÓSIO, M. M. Q., NASCIMENTO, S. R. C., CRUZ, B. L. S., TORRES, T. M., PORTO, M. A. F. et al. Interaction of *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* as root rot pathogens of *Cucumis melo*. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 4, p. 355–360, 2019.

RAI, G. K.; KUMAR, R.; SINGH, J.; RAI, P. K.; RAI, S. K. Peroxidase, polyphenol oxidase activity, protein profile and phenolic content in tomato cultivars tolerant and susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Pak. J. Bot**, v. 43, n. 6, p. 2987- 2990, 2011.

RAVF, B. A.; AHMAD, I. Studies on correlation of seed infection to field incidence of *Alternaria alternate* and *Macrophomina phaseolina* in Sunflower. In 13th Iranian Plant Protection Congress-Karaj. Iran, p. 113, 1998.

RODRIGUES, E. P.; TORRES, A. R.; BATISTA, J. S. D. S.; HUERGO, L.; HUNGRIA, M. A simple, economical and reproducible protein extraction protocol for proteomics studies of soybean roots. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 348-352, 2012.

SALARI, M.; PANJEHKEH, N.; NASIRPOOR, Z.; ABKHOO, J. Reaction of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars to soil-borne plant pathogenic fungi in Iran. **African**

Journal of Biotechnology, v. 11, n. 87, p. 15324-15329, 2012.

SALES JR, R.; OLIVEIRA, O. F.; MEDEIROS, E. V.; GUIMARÃES, I. M.; CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012.

SALES JÚNIOR, R.; RODRIGUES, A. P. M. D. S.; NEGREIROS, A. M. P.; AMBRÓSIO, M. M. D. Q.; BARBOZA, H. D. S.; BELTRÁN, R. Weeds as potential hosts for fungal root pathogens of watermelon. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 1, p. 1–6, 2019.

SALES JÚNIOR, R.; SILVA NETO, A. N.; NEGREIROS, A. M. P.; GOMES, T. R. R.; AMBRÓSIO, M. M. D. Q.; ARMENGOL, J. Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in cowpea. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 2, p. 396, 2020.

SALVIANO, A.M., et al. A cultura do melão. 3. ed. Brasília,DF: Embrapa: 202p, 2017.(Coleção Plantar, 76)

SARR, M. P. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia mediterranea**, Itália, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.

SHARMA, S.; SHARMA, V.; ALAM, A. Alteration in β -1, 3-glucanases enzyme in *Sesamum indicum* L. infected with *Macrophomina phaseolina*. **Mycopath**, v. 12, n. 2, [p. xx-yy](#), 2015.

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

WANG, X., EL HADRAMI, A., ADAM, L. R., & DAAYF, F. Differential activation and suppression of potato defence responses by *Phytophthora infestans* isolates representing US-1 and US-8 genotypes. **Plant Pathology**, v. 57, n. 6, p. 1026-1037, 2008.