



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE

SUZANA MARJORIE FREIRE E SILVA

**ANÁLISE GENÔMICA, PATOGÊNICA E PROTEÔMICA DO
FITOPATÓGENO *Macrophomina phaseolina* ASSOCIADO À CULTURA DA
MELANCIA**

MOSSORÓ

2019

SUZANA MARJORIE FREIRE E SILVA

**ANÁLISE GENÔMICA, PATOGÊNICA E PROTEÔMICA DO
FITOPATÓGENO *Macrophomina phaseolina* ASSOCIADO À CULTURA DA
MELANCIA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semiárido

Orientadora: Profa. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda.

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio.

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

MOSSORÓ

2019

©Todos os direitos estão reservados à 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, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação foi base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Sa Silva, Suzana Marjorie Freire.
ANÁLISE GENÔMICA, PATOGÊNICA E PROTEÔMICA DO
FITOPATÓGENO *Macrophomina phaseolina* ASSOCIADO À
CULTURA DA MELANCIA / Suzana Marjorie Freire
Silva. - 2019.
62 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientador: Emmanuel de Souza Jereissati.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2019.

1. Genes específicos. 2. SDS-PAGE. 3.
Patogenicidade. I. Holanda, Ioná Santos Araújo,
orient. II. Jereissati, Emmanuel de Souza, co-
orient. III. Título.

SUZANA MARJORIE FREIRE E SILVA

**ANÁLISE GENÔMICA, PATOGÊNICA E PROTEÔMICA DO
FITOPATÓGENO *Macrophomina phaseolina* ASSOCIADO À CULTURA DA
MELANCIA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Sustentabilidade de Organizações e Comunidades no Semi-Árido

Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semiárido

Defendida em: 07 / 02 / 2019.

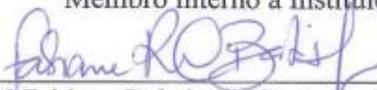
BANCA EXAMINADORA



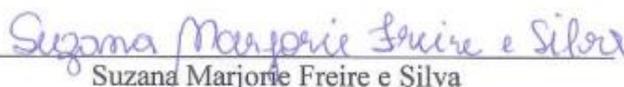
Prof.ª Dr.ª Ioná Santos Araújo Holanda – UFERSA
Presidente da banca e orientadora



Prof.ª Dr.ª Lindomar Maria da Silveira – UFERSA
Membro interno a Instituição



Dr.ª Fabiane Rabelo da Costa Batista – INSA
Membro externo à Instituição



Suzana Marjorie Freire e Silva
Discente

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tens realizado em minha vida e pelo seu cuidado e amor imensurável;

À Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) pelas oportunidades de ensino e por toda estrutura para realização de pesquisas científicas;

Ao Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade e todos os professores que compõe o programa de pós-graduação pela contribuição na minha formação profissional;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da minha pesquisa e bolsa de estudo;

A minha orientadora Prof.^a Dr. Ioná Santos, por todos os ensinamentos, disponibilidade, dedicação e profissionalismo. Obrigada por toda a paciência e capacitação não só profissional, bem como pessoal;

Ao meu Co-Orientador Prof. Dr. Emmanuel de Souza Jereissati por todo o conhecimento e auxílio no desenvolvimento do trabalho;

A minha Co-orientadora Profa. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, por todo seu conhecimento e por sempre está sempre de prontidão para ajudar de forma humilde e sutil;

A minha mãe, Maria das Graças, por todo esforço e dedicação pela minha educação e crescimento pessoal, pelo incentivo diário e amor incondicional. Amo muito a senhora!

Ao meu irmão Tchelo Pacelli e esposa Vivienny Firmino por inúmeras vezes me ajudou nessa caminhada acadêmica e por fazer parte de minha vida;

Ao meu noivo, Carlos Junior, por todo carinho, apoio, paciência e dedicação em todos momentos. A sua presença tornou essa trajetória mais leve;

As minhas tias, Vera Lúcia, Rose e Luciene pelo apoio e orações em todos os momentos da minha vida;

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia e a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica;

A Gilsivan Sales, aluno de iniciação científica, que ajudou desde o início do projeto ao fim, muito obrigada por todo apoio;

Aos meus todos amigos e companheiros de lutas diárias que foram de suma importância para a minha chegada até aqui.

O meu muito obrigada a todos vocês!

O que eu faço é uma gota no meio de um oceano.
Mas sem ela, o oceano foi menor.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

SILVA, Suzana Marjorie Freire e. **Análise genômica, patogênica e proteômica do fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* associado à cultura da melancia**. 2019. 61f. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2019.

A melancia (*Citrullus lanatus*) é uma das principais frutas em volume de produção mundial, sendo destaque o Brasil como um dos maiores produtores. No Nordeste brasileiro, o estado do Rio Grande do Norte (RN) tem colaborado expressivamente com o aumento da produção nacional. No entanto, sua produção pode ser reduzida devido a ação de fitopatógenos, como é o caso da *Macrophomina phaseolina*, que não só afeta o produtor, mas toda a cadeia atuante, como o meio ambiente e por consequência, a sociedade. Os objetivos da presente pesquisa foram analisar a nível molecular a presença do fitopatógeno *M. phaseolina* em áreas produtoras de melancia do RN, através da técnica de PCR com *primers* genes específico, avaliar a patogenicidade através da indução do estresse biótico da interação planta-patógeno, bem como avaliar o perfil eletroforético de proteínas diferencialmente expressas por meio das ferramentas da SDS-PAGE. Para o diagnóstico molecular foram coletadas amostras de raízes e folhas de sete áreas produtoras de melancia da região do RN, nos quais foram extraídos seus respectivos DNA, através do método CTAB. Após foram quantificados e ajustados para realização da PCR com *primers* genes específicos MpKF1 e MpKR1 para o fungo em estudo, revelado em eletroforese de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo. Já para o teste de patogenicidade foram avaliados a severidade da doença através da escala de notas e o comprimento da lesão utilizando uma régua milimétrica. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise de proteínas diferencialmente expressas foi avaliada através de três métodos de extração proteica e após aplicados na SDS-PAGE em géis 12,5% de acrilamida, analisados visualmente por imagem dos géis. Os resultados demonstraram que foi possível diagnosticar a presença do referido patógeno em amostras de raízes de todas as áreas coletadas, gerando *amplicons* dentro da faixa esperada de 350pb. No entanto, nenhuma das folhas revelou presença do patógeno. O teste de patogenicidade, por sua vez, demonstrou que todas as plantas de melancia apresentaram sintomas da podridão de carvão, alcançando níveis de severidade máximo em algumas plântulas, com lesões de até 5,4cm da região do caule. Por sua vez, o melhor método para extração de proteínas de melancia foi o de fenol e os perfis eletroforéticos evidenciaram seis bandas de proteínas diferencialmente expressas, onde o material proteico das raízes apresentaram maior diferenciação em relação aos de caule. Portanto, tais informações contribuem para o diagnóstico precoce de doenças em plantios, bem como subsidiar futuros programas assistidos de melhoramento genético em plantas com potencial agrícola.

Palavras-chave: Genes específicos, SDS-PAGE, Patogenicidade.

ABSTRACT

SILVA, Suzana Marjorie Freire e. **Genomic, pathogenic and proteomic analysis of phytopathogen *Macrophomina phaseolina* associated with watermelon culture.** 2019. 61f. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2019.

The watermelon (*Citrullus lanatus*) is one of the main fruit in world production volume, being highlighted Brazil as one of the largest producers. In the Brazilian Northeast, the state of Rio Grande do Norte (RN) has collaborated expressively with the increase of the national production. However, their production may be reduced due to the action of phytopathogens, as is the case of *Macrophomina phaseolina*, which affects not only the producer, but the entire chain acting as the environment and, consequently, society. The objectives of the present research were to analyze at a molecular level the presence of the phytopathogen *M. phaseolina* in areas of watermelon production of the RN, through PCR technique with primers specific genes, to evaluate the pathogenicity through the induction of biotic stress of the plant-pathogen interaction, as well as to evaluate the electrophoretic profile of differentially expressed proteins by means of SDS-PAGE tools. For the molecular diagnosis samples of roots and leaves of seven watermelon producing areas of the RN region were collected, in which their respective DNA was extracted, using the CTAB method. After PCR and quantification were performed and PCR was carried out with primers specific genes MpKF1 and MpKR1 for the fungus under study, revealed in agarose electrophoresis 1.5% stained with ethidium bromide. For the pathogenicity test, the severity of the disease was evaluated through the grading scale and the length of the lesion using a millimeter ruler. Data were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis test, at a 5% probability level and the experimental design was completely randomized. Differentially expressed protein analysis was evaluated by three protein extraction methods and after 12.5% acrylamide gels applied on SDS-PAGE, analyzed visually by image of the gels. The results demonstrated that it was possible to diagnose the presence of this pathogen in roots samples of all the collected areas, generating amplicons within the expected range of 350 bp. However, none of the leaves revealed presence of the pathogen. The pathogenicity test, on the other hand, showed that all the watermelon plants presented symptoms of coal rot, reaching maximum levels of severity in some seedlings, with lesions up to 5.4 cm from the stem region. In turn, the best method for extraction of watermelon proteins was that of phenol and the electrophoretic profiles evidenced six bands of differentially expressed proteins, where the protein material of the roots showed greater differentiation in relation to those of stem. Therefore, such information contributes to the early diagnosis of diseases in plantations, as well as to subsidize future assisted programs of genetic improvement in plants with agricultural potential.

Key words: Specific genes, SDS-PAGE, Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Área com plantio de melancia – Caraúbas/RN..... 34
- Figura 2** - Quantificação em gel de agarose 1% de amostras de DNA de raízes e folhas coletados de áreas 1,2 e 3 produtoras de melancia. Os poços de F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 - amostras de raízes da região de Baraúna-RN. 35
- Figura 3** - Quantificação em gel de agarose 1% de amostras de DNA de raízes e folhas coletado da área 7 produtora de melancia. Os poços de F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 - amostras de raízes da região de Ipanguaçu-RN 35
- Figura 4** - Perfis de amplificação do DNA genômico de folhas e raízes coletados da área 1 e 2 da região de Baraúna-RN. F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 – amostras de raízes. C+: controle positivo a partir do DNA do fungo *M. phaseolina*. M: marcador molecular de peso molecular DNA Ladder (100pb). 37
- Figura 5** - Perfis de amplificação do DNA genômico de folhas e raízes coletados da área 7 da região de Ipanguaçu-RN. F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 – amostras de raízes. C+: controle positivo a partir do DNA do fungo *M. phaseolina*. M: marcador molecular de peso molecular DNA Ladder (100pb) 36

CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Sementes de cultivares comercial Charleston Gray e Crimson Sweet. ... 43
- Figura 2** - Germinação das sementes das cultivares Crimson Sweet e Charleston Gray após três dias de semeio..... 44
- Figura 3** - Esquema ilustrativo do delineamento experimental. 44
- Figura 4** - Cultivar Crimson Sweet apresentando sintomas de podridão do colo. Seta indica o local da manifestação da doença..... 46
- Figura 5** - Cultivar Charleston Gray com sintomas de podridão do colo ocasionado por *Macrophomina phaseolina*..... 48
- Figura 6** - Dados obtidos a partir da escala de notas da severidade da doença comparando as diferentes cultivares Crimson Sweet e Charleston Gray com os isolados de *Macrophomina phaseolina* CMM-4736 e CMM-4754. 49

Figura 7	- Dados obtidos a partir da medição do comprimento de lesão comparando as diferentes cultivares Crimson Sweet e Charleston Gray com os isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> CMM-4736 e CMM-4754.....	50
Figura 8	- Análise eletroforética de extrato proteico de raízes de melancia obtido pelo método de fenol, revelados em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue.....	52
Figura 9	- Análise eletroforética de extratos protéicos de raízes de melancia em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brillhant Blue. BSA – Albumina sérica bovina; U1 a U5 –Extrato proteico obtido do método de uréia; T1 a T5 - Extrato proteico obtido do método de TCA/Acetona modificado.....	53
Figura 10	- Perfil de bandas eletroforético com extrato protéico de caule do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4736. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. A seta na amostra 4 indica uma banda com maior expressão e as demais indicam as subunidades da enzima Rubisco.....	55
Figura 11	- Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de caule do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4754. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule.....	56
Figura 12	- Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de raiz do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4736. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. As setas indicam duas bandas diferencialmente expressas na faixa de 12 e 10K.....	56
Figura 13	- Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de raiz do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4756. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. As setas indicam duas bandas diferencialmente expressas na faixa de 12 e 10K.....	57
Figura 14	- Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de raiz do tratamento Crimson Sweet com o isolado CMM-4736. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. As setas indicam banda diferencialmente expressa na faixa de 102K.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Dados de quantificação fluorimétrica de extratos protéicos totais de raízes de melancia.....	51
----------	---	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIA.....	Clorofórmio-Álcool-Isoamílico
CTAB.....	Cetyl trimethylammonium bromide
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
dNTP.....	Deoxynucleotid Thiphosphate
EDTA.....	Ethylenediamine tetraacetic acid
PCR.....	Reaction Chain Polymerase
RAPD.....	Random Amplified Polymorphic
RNA.....	Ácido ribonucleico
RNase.....	Enzima que catalisa a ação do RNA
SDS-PAGE.....	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
TBE.....	Tampão contendo Tris, Ácido Bórico e EDTA
UV.....	Ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO	14
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA CULTURA.....	16
2.2 PROBLEMAS FITOSSANITARIOS À CULTURA DE MELANCIA	18
2.3 <i>Macrophomina phaseolina</i> E SUA PATOGENICIDADE	18
2.4 ANÁLISE GENÔMICA	19
2.4.1 MARCADORES GENES ESPECÍFICOS NA DETECÇÃO <i>Macrophomina phaseolina</i>	21
2.5 ANALISE PROTEÔMICA.....	21
REFERÊNCIAS	24

CAPÍTULO 2: DIAGNOSTICO MOLECULAR DO FITOPATOGENO <i>Macrophomina phaseolina</i> ASSOCIADO À CULTURA DA MELANCIA	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
a) Local do experimento.....	31
b) Coleta do material vegetal	31
c) Extração e quantificação do DNA.....	32
d) Amplificação e análise de fragmentos específicos.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
.....	40

CAPÍTULO 3: ANÁLISE PATOGÊNICA E PROTEÔMICA DO FITOPATOGENO <i>Macrophomina phaseolina</i> ASSOCIADO À CULTURA DE MELANCIA	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
a) Material vegetal - semeadura dos cultivares de melancia	43
b) Obtenção do fungo e preparo do inóculo	45
c) Inoculação do fungo nas plantas	46
d) Análise da patogenicidade.....	46
f) Quantificação de proteínas	48
g) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	59

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] é uma hortaliça pertencente à família das Cucurbitáceas, sendo considerada umas das principais frutas em volume de produção mundial, com destaque em países como a China, Irã, Turquia e Brasil entre seus maiores produtores, correspondendo estes com mais de 76% da produção mundial. O Brasil ocupando o 4ª lugar no ranking, produz 2.314.700 milhões de toneladas de frutos, visto que seu cultivo está presente na maioria das regiões brasileiras (FAO, 2018).

No Nordeste brasileiro, o estado do Rio Grande do Norte (RN) corrobora significativamente para a produção de melancia da região, onde maiores produtores são os municípios de Tibau, Apodi, Baraúna e Mossoró (IBGE 2018). Em virtude da relevância socioeconômica da melancia, o estado do RN tem aumentado o interesse em produzir frutos de qualidade e quantidade para atender o mercado interno e externo, por conseguinte tem fornecido maior cadeia produtiva de empregos diretos e indiretos para a região (HESPANHOL, 2016).

No entanto, a intensa exploração comercial da cultura enfrenta muitos problemas fitossanitários. Dentre esses problemas destaca-se doenças acometidas por agentes fúngicos, como é o caso do fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, no qual tem sido detectado em várias regiões do mundo e em hospedeiros de mais de 500 famílias de plantas. Este é um dos agentes causador da prodridrão do colo, que afeta caule e raízes, causando consideráveis perdas na produção agrícola devido, principalmente, a redução na produtividade e na qualidade dos frutos (KAUR, et. al., 2012).

Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas que auxiliie no manejo e controle de patógenos que acometem o cultivo de melancia. O estudo genômico torna-se uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce e preciso a nível molecular da presença de fitopatógenos, no qual visa corroborar na busca de estratégias de manejo que possam minimizar os danos ocasionados à cultura (OVERALL, 2014).

A identificação de patógenos majoritariamente acontece por aspectos morfológicos e que este requer mais tempo para o diagnóstico final, onde pode muitas vezes ser laboriosa para os micologistas/patologistas de plantas, já que muitos fungos

apresentam morfologia semelhantes e variável de acordo com as condições ambientais; tal técnica de identificação pode ser um obstáculo para escolha do método correto para o manejo no campo. Portanto, o diagnóstico molecular a nível de DNA torna-se uma técnica importante para a identificação do patógeno antes mesmo do aparecimento dos sintomas da doença de forma precisa, colaborando para definição do manejo apropriado ao controle de doenças no campo (SATO, 2014).

Dentre as tecnologias aplicadas nesta área, destaca-se a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), ferramenta que permite análises com os marcadores moleculares utilizando *primers* genes específicos, no qual têm revelado eficácia na detecção confiável de patógenos que acometem diferentes espécies de potencial agrícola. A PCR é versátil e sensível, proporcionando diversas alternativas ao uso de marcadores moleculares e a possibilidade de se comparar região do DNA genômico das sequências conservadas nos indivíduos (SARPELEH, CHERAGHALI, RAZAVI, 2012; OVERALL, 2014).

É imprescindível o conhecimento acerca das respostas que as plantas desenvolvem quando infectados por patógenos, pois envolve alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares. Alterações fisiológicas como o surgimento de doenças ocasionadas pelo fungo *M. phaseolina* tem sido alvo de inúmeras pesquisas com espécies de potencial agrícola, pois estes tem trazido grande perdas na produção. Estudos confirmaram a patogenicidade do fungo *Macrophomina phaseolina* em gerar doença de podridão do colo em inúmeras culturas, como feijão, melão, melancia, soja, entre outras (KAUR et al., 2012). Segundo Cohen e colaboradores (2014) ao realizar uma triagem de germoplasma de melancia usando solo naturalmente infestado com *M. phaseolina* no nordeste de Israel, resultou na seleção de quatro acessos com resistência promissora ao fungo em estudo.

Diante disso, a busca de conhecimentos sobre os mecanismos de resistência as interações planta-patógeno é de suma importância para obtenção de variedades mais resistentes aos ataques e mais adaptados à nova dinâmica mundial de sustentabilidade dos recursos naturais. Visto que, majoritariamente o manejo de pragas acontece por meio de agrotóxicos e estes são contestados pelos danos causados ao homem e ao meio ambiente (FERRO et al., 2007).

Pesquisas na área da Proteômica são de grande importância na compreensão de sistemas biológicos complexos e dinâmicos, pois permitem a análise de um grande número de proteínas que influenciam diretamente na bioquímica celular e fornece um

estudo apurado do estado biológico ou mudanças sistemáticas ao longo do crescimento, desenvolvimento e resposta a fatores ambientais. A técnica de eletroforese Desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), fornece a compreensão preliminar a respostas ambientais, como o estresse causado pela interação planta-patógeno, visto que inúmeras proteínas estão envolvidas no processo de defesa da planta (ALTELAAR; MUNOZ; HECK, 2013).

Desse modo, o objetivo deste trabalho é verificar a presença precocemente de *M. phaseolina* em plantios comerciais de melancia no Estado do Rio Grande do Norte através de análises moleculares, analisar a patogenicidade e a presença de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a resistência da melancia ao fitopatógeno.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA CULTURA

Melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] é uma planta membro da família das cucurbitáceas, que inclui várias espécies de grande importância econômica como o melão (*Cucumis melo* L.), abóbora (*Cucúrbita moschata*) e pepino (*Cucumis sativus*). Foi domesticada na África Central há mais de 5000 anos atrás e foi introduzida em diversas regiões do mundo, devido a sua adaptabilidade a regiões tropicais e subtropicais (NASCIMENTO et al., 2011). A espécie destaca-se pelo potencial do seu fruto, no qual é utilizado principalmente na forma *in natura*, como fonte de alimento para suprir vitaminas, proteínas e sais minerais ao consumo humano, além da produção de diversos subprodutos, como exemplo, a utilização da entrecasca para fabricação de doces (SERBAI, et al. 2015).

Sobre os aspectos botânicos, a espécie é herbácea de ciclo vegetativo anual, cujas folhas são profundamente lobadas, divididas em 3 lobos, formadas junto ao caule rastejante que possui estruturas de gavinhas, que são folhas modificadas as quais auxiliam na fixação da planta ao solo, apresentando-se bastante ramificada, podendo atingir de cinco a seis metros de comprimento. O sistema radicular é longo e desenvolve no sentido

horizontal no qual atinge as camadas do solo cerca de 30 cm de profundidade. A floração geralmente é do tipo monoica, onde a planta apresenta flores femininas e masculinas separadas, com flores de coloração amarela, pequena e solitárias que permanecem abertas durante menos de um dia e são polinizadas por insetos, sendo as abelhas os principais polinizadores (REZENDE, DIAS, COSTA, 2010).

O Fruto pode-se apresentar de forma redonda, ablonga ou alongada, podendo atingir cerca de 1 a 25 kg, dependendo do cultivar. Configura-se de característica pepônio que apresenta o mesocarpo volumoso e grande cavidade cheia de placentas com muitas sementes o qual constitui a parte comestível. Possui casca espessa (1 a 4 cm) e seu exocarpo com coloração verde, claro ou escuro, de tonalidade única, listrado ou manchado. A polpa geralmente possui coloração vermelha, no entanto pode-se encontrar amarela, laranja ou verde, com sabor geralmente adocicado. A melancia não possui cavidade, como as cucurbitáceas melão e abóbora. (ALMEIDA, 2003; FILGUEIRA, 2008).

A cultura da melancia desenvolve-se em clima quente e seco, com melhor crescimento em temperaturas do ar em torno de 18°C a 30°C, não suportando abaixo de 10°C. Dentre as cucurbitáceas, a espécie possui o menor índice de tolerância a baixas temperaturas, principalmente no processo de germinação das sementes e emergência, onde necessita de seu fotoperíodo com dias longos e boa luminosidade, propiciando a formação de frutos com excelentes qualidades organolépticas. Pode ser cultivada nos mais diversos solos, porém o de textura areno-argilosa, profundos e bem estruturados são os mais indicados, onde a espécie é levemente tolerante à acidez do solo, desenvolvendo-se bem em pH de 5,0 a 6,8 (SOUZA, 2008).

Todavia, existem alguns fatores climáticos que afetam significativamente o crescimento e a produção da melancieira, estes são a temperatura, fotoperíodo ventos e umidade relativa. Segundo Rezende et al. (2010) valores elevados de umidade relativa propicia o surgimento de patologias fúngicas, resultando na desfolha precoce das plantas, a diminuição da fotossíntese, redução da produtividade e qualidade dos frutos, no qual se tornam aguados e com baixo teor de açúcares. Além disso, a umidade é um fator primordial para o processo de floração, uma vez que, favorece a uma melhor fertilização das flores e um aumento de flores femininas.

O ciclo da melancia varia entre 60 a 120 dias, de acordo com a região e o tipo de cultivar, visto na maioria das cultivares comerciais o ciclo médio de 70 a 85 dias (SOUZA, 2008).

2.2 PROBLEMAS FITOSSANITARIOS À CULTURA DE MELANCIA

A cultura de melancia enfrenta diversos problemas fitossanitários, que podem gerar inúmeras perdas na sua produção e diminuição da qualidade do fruto. Segundo Terão et al., (2010), diversas doenças podem afetar a cultura, estimando-se mais de 30 doenças de melancia relatadas na literatura, causadas por vários patógenos como fungo, bactérias, vírus e nematóides. Dentre as principais doenças no cultivo de melancia são ocasionados por patologias dos solos, as quais interferem drasticamente na capacidade radicular em absorver água e nutrientes (SANTOS et al., 2013).

A podridão do colo, ou também conhecido como podridão de carvão, é uma das principais doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo, ocasionada pelo fungo *M. phaseolina*, esta causa lesões profundas e irregulares que se estendem em direção ao hipocótilo (parte do caule da plântula situada entre o ponto de inserção dos cotilédones e aquele em que tem início a radícula) e superfícies radiculares. À medida que as lesões se aglutinam, formam manchas maiores nos ramos ou na planta inteira, levando à senescência prematura e à morte das plantas (KAUR, et al., 2012).

Fujinaga, et al., (2002) relatou a presença de *M. phaseolina*, em plantios de melancia no Japão, com sintomas de raízes podres, gerando perdas na produção, o qual demonstrou-se como uma doença de relevância para a produção agrícola.

2.3 *Macrophomina phaseolina* E SUA PATOGENICIDADE

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. é pertencente ao filo Ascomycota, sendo possuidor de duas fases assexuadas bem definida, picnidial e esclerodial. A fase picnidial deste fungo caracteriza-se pela produção de estruturas globosas de cor acinzentada a preta, denominadas picnídios, primariamente inseridos em tecido do hospedeiro, no qual se rompem quando maduros, sendo está responsável pela fase patogênica da doença. Enquanto sua fase esclerodial caracteriza-se pela formação de escleródios por meio do

agregamento de cerca de 50 a 200 células individuais de hifas, ligadas por um material de melanina. Tais estruturas são consideradas responsáveis pela fase saprófita do fungo (KAUR et al., 2012).

M. phaseolina é um fungo primariamente de natureza do solo, com especificidade heterogênea de hospedeiro, capaz de infectar uma gama de espécies de plantas, sementes, restos de culturas e até mesmo seres humanos. Durante os estágios iniciais da patogênese, o micélio penetra na epiderme da raiz e fica restrito aos espaços intercelulares do córtex das raízes primárias. Conseqüentemente as células adjacentes entram em colapso, podendo levar à morte das plântulas infectadas. Durante o florescimento, hifas do fungo crescem intracelularmente através do xilema e formam microescleródios (estruturas de resistência) que bloqueiam os vasos e causam a ruptura das células do hospedeiro (GUPTA, SHARMA, RAMTEKE, 2012; KAUR et al., 2012)

Essas estruturas são capazes de sobreviver por longos períodos, cerca de 2 a 15 anos, dependendo das condições ambientais e da associação com resíduos do hospedeiro. Os picnídios, quando em condições de altas temperaturas e baixa umidade do solo, podem germinar repetidamente durante a estação de cultivo (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Este fungo apresenta mais de 680 espécies de plantas hospedeiras, provocando danos em várias culturas hospedeiras como feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), melão (*Cucumis melo L.*), melancia (*Citrus lanatus*), soja (*Glycine max*), bem como pode estar associado a plantas daninhas como hospedeiras facultativas (SALES, et al., 2010).

2.4 ANÁLISE GENÔMICA

As informações acerca do genoma promoveram um enorme progresso na área das ciências biológicas, devido ser relativamente estável e não variar seu código informacional de acordo com o tipo celular ou até mesmo estímulo hormonal (OVERALL, 2014). A ferramenta responsável por estudar tais informações denomina-se genômica, inicialmente aplicada ao estudo de genomas completos e parciais de diversos microrganismos, plantas e animais, e cada vez mais utilizada para a prospecção de genes em diversas espécies (ARAÚJO, 2006).

Análise Genômica é o termo atribuído a todo e qualquer estudo que envolve o genoma. Este é o material genético dos organismos, constituído pelo DNA (Ácido Desoxirribonucleico) ou RNA (Ácido ribonucleico) o qual é transmitido à sua prole. O objetivo da genômica é compreender a organização dos genes, a informação genética e como este determina a sua função. Desse modo, a genômica permite estudo de questões complexas da biologia molecular dos seres vivos como, por exemplo, a manifestação de fenótipos de acordo com diferentes ambientes (SATO, 2014).

A partir dos anos 70, o isolamento das primeiras enzimas de restrição, bem como o sequenciamento inicial das moléculas de DNA, deu início da Era Genômica. O aprimoramento de técnicas de sequenciamento, o surgimento de diferentes métodos de clonagem, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), bem como o desenvolvimento de novos marcadores moleculares, possibilitou a crescente capacidade da análise de dados do genoma (ARAÚJO, 2006). Dentre estas novas técnicas, vale ressaltar os marcadores moleculares, pois tem sido empregado com sucesso na análise genética de plantas, na caracterização da variabilidade genética entre os indivíduos, no mapeamento genético e na seleção de caracteres específicos superiores, bem como a inserção de genes de resistência em cultivares comerciais, principalmente tolerante a fitopatógenos (BECKMANN et al., 2007; RESENDE&SILVA, 2001).

Os marcadores moleculares são qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene ou de um segmento específico de DNA capaz de diferenciar um ou mais indivíduos (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). Os distintos tipos de marcadores moleculares, hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, variando quanto à habilidade de detectar as diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (MILACH, 1999). Por conseguinte, tais técnicas permitem um estudo mais complexo de características de importância relacionadas aos fatores genéticos, tanto para auxiliar a programas de melhoramento genético, quanto em estudos de diversidade genética, análise de pureza genética de sementes, análises filogenéticas, bem como identificação precisa de espécies (LANZA, GUIMARÃES & SCHUSTER, 2000).

2.4.1 MARCADORES GENES ESPECÍFICOS NA DETECÇÃO *Macrophomina phaseolina*

Marcadores genes específicos consistem em sequências de *primers* oriundas de um gene específico de uma determinada espécie, os quais permitem a identificação precisa deste organismo (SARPELEH, CHERAGHALI, RAZAVI, 2012). A utilização destes marcadores moleculares são uma ferramenta de suma importância para análises genômicas, pois a versatilidade e sensibilidade da PCR proporcionam diversas alternativas de análises como, por exemplo, a capacidade de comparar-se regiões conservadas do DNA nos indivíduos (ARRIEL et al., 2009).

Várias regiões do genoma são alvos para criação de *primers* específicos, como regiões da sequência do DNA ribossomal (DNAr), que apresentam os genes 18S, 5.8S e 28S, que correspondem a sequências conservadas entre inúmeras espécies, bem como a utilização das sequências do DNA denominadas de Espaçadores internos transcritos (ITS-*Internal Transcribed Spacer*), que são importantes no desenvolvimento do RNAr funcional (PICO et al., 2008). Dessa forma, inúmeras pesquisas selecionam *primers* baseados em regiões conservadas do DNA, como o gene 5.8 S, para detecção precisa de uma determinada espécie.

Babu et al., (2007) desenvolveram *primers* genes específicos para o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, revelando a eficácia da técnica para diagnóstico molecular de forma precisa e confiável. Estudos realizados por Leyva-Mir et al. (2015), diagnosticaram por meio de análises moleculares a presença do fungo *Macrophomina phaseolina* em cultivos de cana de açúcar no México através *primers* genes específicos.

Tais pesquisa demonstram que as técnicas moleculares são ferramentas eficientes na detecção de fitopatógenos, assim como sua importância para detecção precoce e confiável de patógenos em plantios.

2.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para a compreensão sobre a função do genoma em um organismo, é essencial conhecer não só quais genes são expressos, mas também quais são os produtos (proteínas) estão sendo expressos e quais condições estas estão sendo sintetizados em determinados tecidos. As proteínas são macromoléculas formadas por uma ou mais cadeias de aminoácidos e compõe as principais funções celulares, sendo capazes de orquestrar

inúmeras processos, como a expressão de genes, transporte de moléculas, catalisar reações metabólicas e promover respostas a estímulos (BINNECK, 2004; DIAS, et. al., 2007).

Análise proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, suas funções, seus níveis de expressão, interações entre proteínas e seus mecanismos regulatórios em determinadas condições fisiológicas. Para este estudo, utiliza-se técnicas de separação e identificação, tais como eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e bioinformática (HEIN et al., 2013), tornando-se ferramentas auxiliar a novas descobertas de alvos terapêuticos e moléculas bioativas (SCHWARTZ, et al., 2017).

A proteômica apresenta maior quantidade de variáveis, devido à grande diversidade química das proteínas e interconectividade destas em complexos e redes de sinalização, as quais estão sujeitas a variações conforme o tempo e o espaço (ALTELAAR, MUNOZ, HECK, 2012). Dessa forma, mediante a diversidade e a complexidade proteica, pesquisa nessa área requer ferramentas analíticas com alta seletividade, resolução e sensibilidade (POMASTOWSKI, BUSZEWSKI, 2014).

Para análise proteômica a extração proteica é a etapa primordial para o procedimento analítico, pois afinal deste requer proteínas de excelente qualidade e sem contaminantes, para que não interfira nas etapas subsequentes de alta precisão (NEBRICH et al., 2009). Quando esse processo se dar com amostras de plantas, requer condições rigorosas de extração em virtude da robustez da parede celular, abundante quantidade de metabólitos secundários como compostos fenólicos, terpenos, pigmentos, polissacarídeos e ácidos orgânicos (HERBERT, 1999). Já a etapa de separação, pode ser realizada por diferentes técnicas, como a eletroforese bidimensional (2DE), cromatografia líquida e por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (DAHER et al., 2010).

A SDS-PAGE é uma técnica comumente utilizada para obter a separação de misturas complexas proteica. O método inicialmente desnatura as proteínas que irão submeter a eletroforese, utilizando o agente principal dodecil sulfato de sódio, este detergente aniônico se agrega em locais da proteína, transmitindo carga negativa proporcional a sua massa, assim induz a desnaturação reconstrutiva, formando uma conformação de mistura de α -hélice e espiral aleatória. Este passo é seguido por

eletroforese em gel de poliacrilamida, formado por uma solução de acrilamida e bis-acrilamida para sua polimerização, formando polímeros lineares e ligações cruzadas entre as cadeias poliacrilamida, respectivamente. Assim, formar-se uma matriz porosa que separa as proteínas com excelente resolução com base na massa molecular (NOWAKOWSKI, WOBIG, PETERING, 2014; SIMPSON, 2003).

Vale ressaltar que a quantidade de ligações cruzadas controla o tamanho dos poros do gel, determinando o intervalo da massa molecular das proteínas que serão separadas no gel. Em virtude disso, quanto maior o número de ligações cruzadas aumenta a separação de proteínas tanto com baixa e alta massa molecular. Para a visualização das proteínas no gel de poliacrilamida devem ser coradas com Nitrato de prata ou solução contendo azul de Coomassie, no qual irá permitir a detecção das proteínas na ordem de 0,1 ug (EMIDIO et al., 2015).

Silva&Souza (2009) analisaram proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*, pimenta-do-reino, através da eletroferese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e observaram padrões diferenciados de bandas em extratos proteicos de folhas e raízes. De forma semelhante, Srivastava et al., (2014), diagnosticaram a diversidade genética e proteômica de dez genótipos de espécies de cabaças (*Lagenaria siceraria*), também conhecida como abóbora-d'água, através de análises moleculares com os métodos de SDS-PAGE e marcadores RAPD.

Portanto a análise proteômica tem se tornado uma ferramenta valiosa para elucidar inúmeros processos biológicos de diferentes espécies que até o momento não foram compreendidos pela ciência, bem como auxiliar na descoberta de novas moléculas bioativas (OVERALL, 2014). Além disso, a proteômica aplicada na área vegetal é uma ferramenta eficaz para análise das respostas a fatores bióticos e abióticos, estado fisiológico da planta e inúmeros processos específicos biológicos, bem como no auxílio de desenvolvimento de cultivares melhoradas (EMIDIO et al., 2015).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. P. F. **Melancia. Portugal**. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, p. 1-9, 2003. Disponível em: <<http://dalmeida.com/hortnet/Melancia.pdf>>. Acesso em: 15 de maio 2017.
- ALTELAAR, A. F. M.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. R. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.35-48, dez, 2013.
- ARAÚJO, JEAN LUIZ SIMÕES. **Genômica e Proteômica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 37 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 213). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/629229/1/doc213.pdf>. Acesso em: 18 de Abr de 2018.
- ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M.; TREVISOLI, S. H. U.; MAURO, A. Outras aplicações dos marcadores moleculares. In: BORÉM, A; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Minas Gerais: UFV, 2009. Cap. 6, 209-274 p.
- BABU, B. K.; SAXENA, A. K.; SRIVASTAVA, A. K.; ARORA, D. K. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. **Mycologia**, v. 99, n. 6, p. 797-803, 2007
- BINNECK, Eliseu. As ômicas: Integrando a bioinformática. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p.28-37, 2004.
- COHEN R, TYUTYUNIK J, FALLIK E, OKA Y, TADMOR Y, EDELSTEIN M
Phytopathological evaluation of exotic watermelon germplasm as a basic for rootstock breeding. *Sci Hort* v.165, p. 203–210, 2014.
- DAHER, Z.; RECORBET, G.; VALOT, B.; ROBERT, F.; BALLIAU, T.; POTIN, S.; SCHOEFS, B.; DUMAS-GAUDOT. Proteomic analysis of medicado truncatula root plastids. **Proteomics**, v.10, p.2123-2137, 2010.
- DIAS, L. L.; FLOH, E. I.; CATARINA, S. C.; SILVEIRA, V. Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 2002-2008, 2007.
- EMIDIO, N. B.; CARPANEZ, A. G.; QUELLIS, L. R.; FARANI, P. S.; VASCONCELOS, E. G.; Faria-Pinto, P. (2015). Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, 2015.
- FAO - AGRICULTURAL STATISTICS DATABASE**. World Agricultural Information Center. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 06 Jan de 2019.

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN,. 1998. 220p.
- FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M. D.; DABBAS, K. M., LAIA, M. L. D., KUPPER, K. C., MORAES, V. A. D.; ZINGARETTI, S. M. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp: *xyli*. **Summa Phytopathologica**, p. 157-166, 2007.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura e agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2008. 442 p.
- FUJINAGA, M.; SHIMIZU, T.; OGISO, H.; SAITO, H.; KOBAYASHI, M.; SATO, T. Charcoal rot of watermelon newly found in Nagano and Kanagawa prefectures and pathogenicity of causal fungus *Macrophomina phaseolina*. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 68, n. 2, p. 148-152, 2002.
- 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. 167180, 2012.
- HEIN, M. Y.; SHARMA, K.; COX, J.; MANN, M. Proteomic analysis of cellular systems. In: **Handbook of Systems Biology**. 2013. p. 3-25.
- HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, n. 4-5, p. 660-663, 1999.
- HESPANHOL, A. N. Constituição e reestruturação produtiva da fruticultura irrigada no baixo-açu e no vale do apodi-mossoró-RN-brasil. **Formação**, v. 1, n. 23, 2016.
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. 2018. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76503. Acesso em: 10 de Jan de 2019.
- 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.
- LANZA, M. A., GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, maio/jun. 2000, v. 21, n. 204, p. 97-108.
- LEYVA-MIR, S. G.; VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ; G. C.; TLAPAL-BOLAÑOS, B.; TOVAR-PEDRAZA, J. M.; ROSAS-SAITO, G. H.; ALVARADO-GÓMEZ, O. G.

Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 143-147, 2015.

MILACH, Sandra Cristina Kothe. **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas**. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido, 1999.

NASCIMENTO, I. R.; SANTOS, L. B.; SANTOS, G. R.; ERASMO, E. A. L. Taxonomia e sistemática, centro de origem e morfologia da melancia. In: SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed). **Tecnologias para produção sustentável da melancia no Brasil**. Gurupi: Universidade Federal do Tocantins, 2011. p. 11-14.

NEBRICH, G.; HERRMANN, M.; HARTL, D.; DIEDRICH, M.; KREITLER, T.; WIERLING, C.; KLOSE, J.; GIAVALISCO, P.; ZABEL, C.; MAO, L. PROTEOMER: A workflow-optimized laboratory information management system for 2-D electrophoresis-centered proteomics. **Proteomics**, v.9, n.7, p. 1795-1808, 2009.

NOWAKOWSKI, A. B.; WOBIG, W. J.; PETERING, D. H. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 1068-1078, 2014.

OVERALL, Christopher M. Can proteomics fill the gap between genomics and phenotypes? **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 100, p. 1-2, 2014.

PICO, B.; ROIG, C.; FITA, A.; NUEZ, F. Quantitative detection of *Monosporascus cannonballus* in infected melon roots using real-time PCR. **European Journal of plant pathology**, v. 120, p. 147-156. 2008.

POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 167-177, 2014.

REZENDE, G.M.; DIAS, R.C.S; COSTA, N.D. Clima. **Sistema de Produção de Melancia** (Ed.) Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/melancia>. Acesso: 02 de fev de 2018.

SALES JUNIOR, R.; OLIVEIRA, O. F.; MEDEIROS, É. M.; GUIMARÃES, I. M.; CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. (2012). Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Ciência Rural**. v. 40, p. 727-734. 2010.

SANTOS, G. R.; LEÃO, E. U.; GONÇALVES, C. G.; CARDON, C. H. Manejo da adubação potássica e da irrigação no progresso de doenças fungicas e produtividade da melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 36-44, jan. 2013.

SARPELEH, Abolfazl; CHERAGHALI, Vadiéh; RAZAVI, Mohammad. Detection of *Monosporascus cannonballus* from melon plants using PCR. **Journal of Crop Protection**, v. 1, n. 4, p. 349-359, 2012.

SATOH, Noriyuki. Genomics, Transcriptomics, and Proteomics. In: **Developmental Genomics of Ascidians**, 2014, cap. 3, p. 19-30.

SCHWARTZ, S.; TIAN, Y.; FASANI, R.; DELGADO, M. D., HIERRO, C., RODON, J.; NUCIFORO, P. Quantitative proteomic analysis of FGFR by mass spectrometry may improve identification of FGFR amplified tumors sensitive to inhibitor therapy. **Cancer Research**. v.87, 2017.

SERBAI, D.; SANTOS, K. A.; DOS SANTOS, E. F.; CANDIDO, C. J.; NOVELLO, D. Adição de farinha de entrecasca de melancia em “cookies”: análise físico-química e sensorial entre crianças. **Revista Uniabeu**, v. 18, p. 223-237, 2015.

SILVA, Redinaldo dos Santos; SOUZA, Cláudia Regina Batista de. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. *Revista ACTA Amazonica* v. 39, p. 255 – 260, 2009.

SIMPSON, Richard J. Proteins and proteomics: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, **Laboratory Press**, 2003.

SOUZA, F. F.; DIAS, R. C. S.; QUEIRÓZ, M. A. **Cultivo da melancia em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008. Disponível em:
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/709736/1/melancia.pdf>.
Acesso: 06 de Dez de 2017.

SRIVASTAVA, D., KHAN, N. A., SHAMIM, M. D., YADAV, P., PANDEY, P., SINGH, K. N. Assessment of the genetic diversity in bottle gourd (*Lagenaria siceraria* [Molina] Standl.) genotypes using SDS-PAGE and RAPD Markers. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2014.

TERÃO, D.; CASTRO, J. M. C.; LIMA, M. F.; BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G.; REIS, A.; DIAS, R.C. **Sistema de produção de melancia: Doenças**. Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em:
<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/doencas.htm>. Acesso em: 26 de Jan de 2018.

CAPÍTULO 2

DIAGNOSTICO MOLECULAR DO FITOPATOGENO *Macrophomina phaseolina* ASSOCIADO À CULTURA DA MELANCIA

RESUMO. A podridão de carvão, causada pelo fungo, *Macrophomina phaseolina*, é uma doença de grande importância agrícola, devido este patógeno afetar inúmeras espécies e ter ampla distribuição global, causando perdas significativas na produção agrária. O objetivo da presente pesquisa foi realizar o diagnóstico molecular do fitopatógeno em cultivos de melancia, através da técnica de PCR com *primers* genes específicos MpKF1 e MpKR1. Sete áreas produtoras do Rio Grande do Norte-RN foram coletadas amostras de folhas e raízes no final do ciclo de plantio em melancia, nos quais foram extraídos seus respectivos DNA, através do método CTAB. Após a extração as amostras foram quantificadas e ajustadas para realização da PCR com os *primers* genes específicos. Desse modo, foi possível diagnosticar a presença do referido patógeno em amostras de raízes de todas as áreas coletadas, gerando *amplicons* dentro da faixa esperada de 350pb. No entanto nenhuma das folhas revelou presença do patógeno. A detecção precoce e diagnóstico do fitopatógeno *M. phaseolina* em raízes de melancia auxiliar aos agricultores a direcionar para que se adote medidas de controle e gerenciamento de doenças.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, genes-especificos, PCR, podridão de carvão

**MOLECULAR DIAGNOSIS OF PHYTOPATOGEN *Macrophomina phaseolina*
ASSOCIATED TO CULTURE OF MELANCIA**

ABSTRACT. The charcoal rot, caused by the fungus, *Macrophomina phaseolina*, is a disease of great agricultural importance, properly this patógeno to affect countless sorts and to have spacious global distribution, causing significant losses in the agrarian production. The objective of the present inquiry carried out the molecular diagnosis of the fitopatógeno in cultivos of watermelon, through the technique of PCR with primers specific genes MpKF1 and MpKR1. Seven Rio Grande do Norte-RN producing areas were sampled from leaves and roots at the end of the planting cycle in watermelon, in which their respective DNA was extracted using the CTAB method. After extraction the samples were quantified and adjusted for PCR with primers specific genes. Thus, it was possible to diagnose the presence of this pathogen in samples of roots of all the collected areas, generating amplicons within the expected range of 350 bp. However not of the leaves revealed presence of the pathogen. Early detection and diagnosis of phytopathogen *M. phaseolina* in watermelon roots will help farmers to direct measures to control and manage diseases.

Key words: *Citrullus lanatus*, specific-genes, PCR, charcoal rot.

INTRODUÇÃO

A podridão do colo, também conhecido como podridão de carvão, é uma das principais doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo, ocasionada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Este patógeno é pertencente ao filo Ascomycota, primariamente de natureza do solo, com especificidade heterogênea de hospedeiro, capaz de infectar uma gama de espécies de plantas, sementes, restos de culturas. O fungo causa lesões profundas e irregulares que se estendem em direção aos hipocótilos (parte do caule da plântula situada entre o ponto de inserção dos cotilédones e aquele em que tem início a radícula) e superfícies radiculares, e à medida que as lesões se aglutinam, formam manchas maiores nos ramos ou na planta inteira, levando à senescência prematura e à morte das plantas (GUPTA, SHARMA, RAMTEKE, 2012; KAUR et al., 2012).

M. phaseolina apresenta mais de 680 espécies de plantas hospedeiras, provocando danos em várias culturas como feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), melão (*Cucumis melo* L.), melancia (*Citrullus lanatus*), soja (*Glycine max*), bem como pode estar associado a plantas daninhas como hospedeiras facultativas (KAUR, et al., 2012; SALES JUNIOR, et al., 2012). Fujinaga, et al., (2002) relatou a presença de *Macrophomina phaseolina*, em plantios de melancia na região do Japão, com sintomas de raízes podres, gerando perdas na produção, o qual demonstrou-se como uma doença de relevância para a produção agrícola.

Desse modo, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas que auxilie no manejo e controle de patógenos que acometem o cultivo de melancia. Assim, o estudo de identificação a nível molecular é uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce e preciso da presença de fitopatógenos, tornando-se um aspecto importante na agricultura para desenvolver e implementar diversas estratégias de gerenciamento de doenças. Visto que, a falta de precisão e sensibilidade das técnicas com base em estudos morfológicos, tem incentivado o desenvolvimento de análises moleculares, que podem auxiliar os mesmos (OVERALL, 2014; LEYVA-MIR et al. 2015).

Dentre as tecnologias aplicadas nesta área, destaca-se a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), tal ferramenta, faz uso dos marcadores moleculares utilizando *primers* genes específicos, onde têm revelado eficácia na detecção confiável de patógenos que

acometem diferentes espécies com potencial agrícola. A PCR é versátil e sensível, proporcionando a possibilidade de se comparar região do DNA genômico das sequências conservadas nos indivíduos (SARPELEH, CHERAGHALI, RAZAVI, 2012; OVERALL, 2014). Babu et al., (2007) desenvolveram sequências de *primers* específicos para o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, baseados em regiões conservadas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA, adjacente ao gene 5.8 S, da espécie, *primers* MpKFI e MpKRI, revelando a eficácia da técnica para diagnóstico molecular de forma precisa e confiável.

Considerando os problemas fitossanitários causado pelo fungo *M. phaseolina* a na cultura da melancia, e a crescente necessidade de estratégias ao controle e manejo de doenças com potencial agrícola, objetivou-se neste estudo diagnosticar a nível molecular a presença deste patógeno em cultivos comerciais de melancia no RN.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e no Laboratório de Fitopatologia II do Departamento de Ciências Agronômicas e Florestais da Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA, localizados no município de Mossoró-RN.

b) Coleta do material vegetal

Foram identificadas sete áreas no RN, sendo três áreas em Baraúna, três áreas em Caraúbas e uma área em Ipanguaçu, com plantio de melancia ao final do seu ciclo de produção nas quais coletou-se amostras de raízes e folhas. O objetivo de coletar as folhas foi para ser controle negativo, já que o fungo predomina em raiz e colo. Após isso, as amostras foram conduzidas para o laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFRSA para desinfestação e armazenamento a – 4°C até o momento de serem utilizados para extração de DNA vegetal.

c) Extração e quantificação do DNA

O DNA das raízes e folhas de melancia coletados nas áreas produtoras foram extraídos a partir do protocolo desenvolvido por Doyle; Doyle (1990), com modificações. Cerca de 150mg do material vegetal foi macerado com nitrogênio líquido e transferidos para microtubos estéreis de 2 mL. O tampão de extração foi preparado contendo 10mL (Tris-HCl 100mM pH 8, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, CTAB 2%, PVP 1%, β -mercaptoetanol 0,2%, água Miliq) e logo após pipetou-se 800 μ L desse tampão de extração, o qual colocou no microtubo. Estes foram vertidos 20 vezes e colocados em banho-maria à temperatura de 60 °C durante 40 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Em seguida foram adicionados 800 μ L de uma mistura de Cloroformio e álcool isoamílico (24:1) nos microtubos, os quais foram vertidos e centrifugados à 10.000 x g, durante 10 minutos e, em seguida, transferido a fase superior (aquosa) para novo microtubo, sendo esta etapa, repetida mais uma vez. Logo após, adicionou-se à fase aquosa 2/3 de isopropanol gelado, homogeneizando a solução até a formação do pellet. As amostras foram colocadas em congelador à -20° por 2h/over night e posteriormente foram centrifugadas à 10.000 x g durante 10 minutos e em seguida descartou o sobrenadante. Para limpeza do pellet, adicionou-se 1 mL de etanol 70% no microtubo, em seguida foram centrifugados à 10.000 x g durante 5 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 1 mL de etanol 90% aos microtubos, os quais foram centrifugados novamente à 10.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente, deixando apenas o pellet no microtubo. As amostras foram colocadas para secar a temperatura ambiente, e logo após, adiciona-se 45 μ L de água ultrapura e 5 μ L RNase (10 μ g/mL) nos microtubos, os quais foram incubados à 37 °C em banho-maria por 30 minutos.

A quantificação do DNA foi realizada em géis de agarose a 1% (p/v) corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), submerso ao tampão TBE 1X, com separação eletroforetica de 30 minutos a 110 volts e após fotografados sob luz ultravioleta para análise de sua integridade.

d) Amplificação e análise de fragmentos específicos

Sequências de *primers* específicos para *Macrophomina phaseolina*, baseados em regiões conservadas ITS do DNA, adjacente ao gene 5.8 S, da espécie, *primers* MpKFI (5'-CCGCCAGAGGACTATCAAAC3-') e MpKRI (5'-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3') desenvolvidos por BABU e colaboradores (2007), foram utilizados em reação de PCR. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20 μ L por amostra, contendo 2 μ L Buffer (10X), 2 μ L de dNTPs (2mM), 1 U Taq DNA polimerase, 1,2 μ L primer MpKFI (5pmol), 1,2 μ L primer MpKRI (5pmol), 2 μ L DNA 10ng e 11,4 μ L água Miliq. Após foram amplificadas em termociclador de acordo com o seguinte programa: 94°C por 1 min + 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 62,4°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, extensão final de 72°C por 5 min e redução a 15°C. Os produtos da PCR foram misturados com 2 μ l azul de bromofenol (corante) e analisados por eletroforese em gel 1,5% contendo 1 μ g/ml de brometo de etídio. A corrida foi realizada a 110V por 70 min. Em seguida o gel foi registrado em fotodocumentador com luz ultravioleta (UV). O tamanho dos fragmentos foi comparado com o padrão de peso molecular DNA Ladder e analisado para obtenção dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 representa área 1 com plantio de melancia na localidade de Caraúbas-RN.

Figura 2: Quantificação em gel de agarose 1% de amostras de DNA de raízes e folhas coletados de áreas 1,2 e 3 produtoras de melancia. Os poços de F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 - amostras de raízes da região de Baraúna-RN.

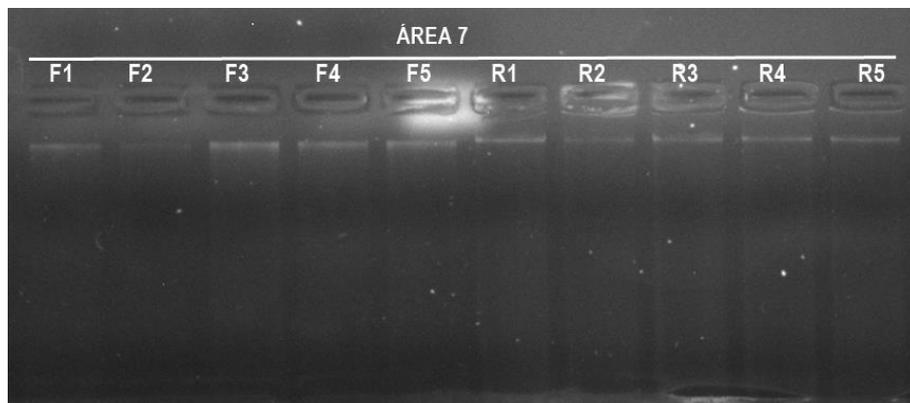


Figura 3: Quantificação em gel de agarose 1% de amostras de DNA de raízes e folhas coletado da área 7 produtora de melancia. Os poços de F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 - amostras de raízes da região de Ipanguaçu-RN.

Apartir das amostras de folhas e raízes, amplificou-se por PCR com os *primes* específicos para espécie de *M. phaseolina* apenas as amostras de raízes. A figura 4 e 5 pode-se observar perfis de amplificação do DNA genômico de folhas e raízes coletados da área 1 e 2 da região de Baraúna-RN. Desse modo, pode-se afirmar que foi diagnosticado a presença do referido patógeno na região da raiz de todas as áreas coletadas. No entanto, nenhuma das folhas tinha a presença do patógeno. Isto evidencia que o fungo predomina comumente na região da raiz e do colo da planta (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012), tornando-se estas partes com potencial para o diagnóstico molecular.

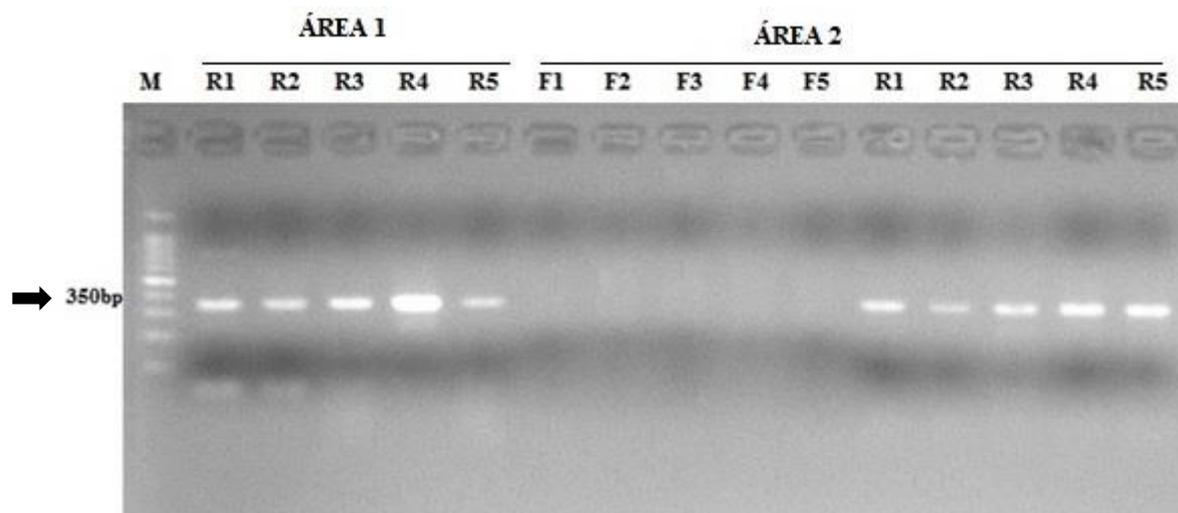


Figura 4: Perfis de amplificação do DNA genômico de folhas e raízes coletados da área 1 e 2 da região de Baraúna-RN. F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 – amostras de raízes. C+: controle positivo a partir do DNA do fungo *M. phaseolina*. M: marcador molecular de peso molecular DNA Ladder (100pb).

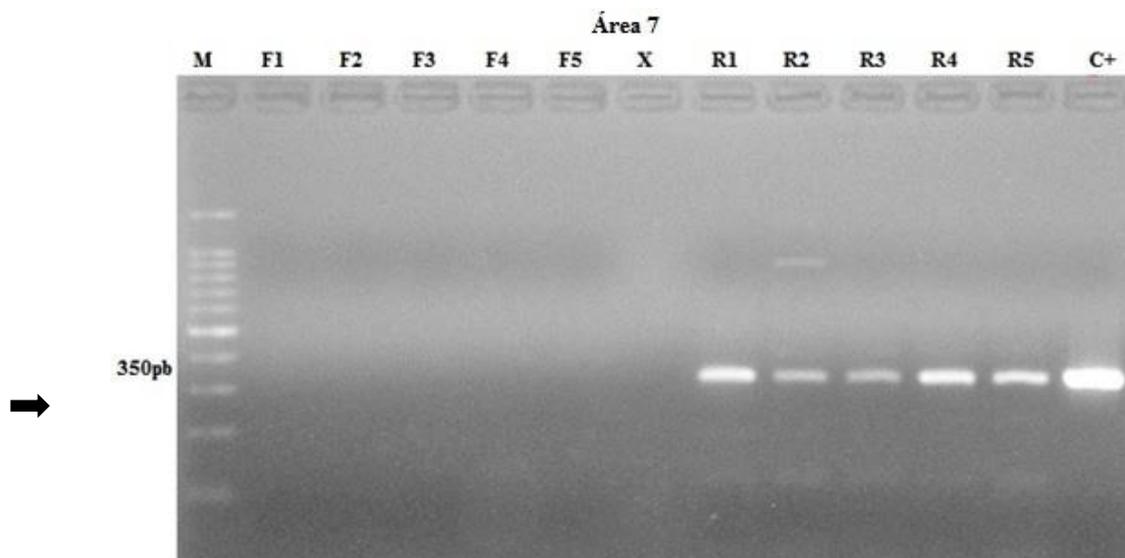


Figura 5: Perfis de amplificação do DNA genômico de folhas e raízes coletados da área 7 da região de Ipangaçu-RN. F1 a F5 – amostras de folhas e R1 a R5 – amostras de raízes. C+: controle positivo a partir do DNA do fungo *M. phaseolina*. M: marcador melucar de peso molecular DNA Ladder (100pb).

Os *amplicons* foram gerados dentro da faixa esperada de 350pb, visto que os iniciadores foram projetados a partir de sequências conservadas da região ITS e podem ser usados para a identificação da espécie supracitada mesmo nas concentrações baixa de DNA. Dessa forma, o resultado exposto acima é um forte indício de confirmação da presença do fungo na amostra avaliada, evidenciando assim a eficácia da técnica de diagnostico molecular, e as suas vantagens de ser um método mais rápido, específico e confiável (KAUR et al., 2012; BABU, et al., 2007)

Estudos realizados por Leyva-Mir et al. (2015), diagnosticaram por meio de análises moleculares a presença do fungo *M. phaseolina* em cultivos de cana de açúcar da região do México através *primers* genes específicos. Também Khan et al., (2017) identificaram a nível molecular e caracterizaram geneticamente linhagens de *M. phaseolina* em espécies de girassol e grão de bico, confirmando a presença deste patógeno e também a variação genética entre os isolados. Biswas et al., (2013) desenvolveram um protocolo de extração de DNA e PCR *primers* genes específico padronizado capaz de detectar o patógeno *M. phaseolina* em sementes de junta (*Corchorus olitorius*). Já Petkar e Ji (2017) identificaram em sementes de melancia a presença do fungo *Fusarium oxysporum* através de ferramentas moleculares.

É importante destacar a necessidade da identificação adequada de *M. phaseolina*, uma vez que esta espécie fitopatogênica apresenta ampla distribuição global e causa perdas em culturas de grande importância agrícola, particularmente em ambientes semiáridos. Ademais, a detecção precoce e diagnóstico adequado de patógenos é um aspecto fundamental na agricultura, para desenvolver e implementar várias estratégias de gerenciamento de doenças. A falta de precisão e sensibilidade das técnicas com base em estudos morfológicos tem incentivado o desenvolvimento de técnicas moleculares, que podem auxiliar os mesmos (LEYVA-MIR et al. 2015).

Portanto, os métodos baseados em PCR aqui desenvolvidos podem simplificar o diagnóstico de doenças de plantas e o monitoramento de patógenos, bem como orientar o manejo de doenças de plantas.

CONCLUSÃO

Há a presença de *M. phaseolina* em plantios comerciais de melancia localizadas no RN, confirmadas a partir do uso de análises moleculares.

REFERÊNCIAS

- BABU, B. K.; SAXENA, A. K.; SRIVASTAVA, A. K.; ARORA, D. K. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. **Mycologia**, v. 99, n. 6, p. 797-803, 2007
- BISWAS, C.; DEY, P.; SATPATHY, S.; SARKAR, S. K.; BERA, A.; MAHAPATRA, B. S. A simple method of DNA isolation from jute (*Corchorus olitorius*) seed suitable for PCR-based detection of the pathogen *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Letters in applied microbiology**, v. 56, n. 2, p. 105-110, 2013.
- BURKHARDT, A.; RAMON, M. L.; SMITH, B.; KOIKE, S. T.; MARTIN, F. Development of Molecular Methods to Detect *Macrophomina phaseolina* from Strawberry Plants and Soil. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1386-1394, 2018.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15. 1990.
- FUJINAGA, M.; SHIMIZU, T.; OGISO, H.; SAITO, H.; KOBAYASHI, M.; SATO, T. Charcoal rot of watermelon newly found in Nagano and Kanagawa prefectures and pathogenicity of causal fungus *Macrophomina phaseolina*. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 68, n. 2, p. 148-152, 2002.
- 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. 167180, 2012
- 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.
- KHAN, A. N.; SHAIR, F.; MALIK, K.; HAYAT, Z.; KHAN, M. A.; HAFEEZ, F. Y.; HASSAN, M. N. Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolina* strains causing pathogenicity on sunflower and chickpea. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1309, 2017.
- KONSTANTINOVA, P.; BONANTS, P. J.; VANGENT-PELZER, M. P.; VANDER-ZOUWEN, P. Development of specific primers for detection and identification of *alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research**, [s.l.], v. 106, n. 1, p.23-33, jan. 2002.
- LEYVA-MIR, S. G.; VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ; G. C.; TLAPAL-BOLAÑOS, B.; TOVAR-PEDRAZA, J. M.; ROSAS-SAITO, G. H.; ALVARADO-GÓMEZ, O. G. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 143-147, 2015.

OVERALL, C. M. Can proteomics fill the gap between genomics and phenotypes? **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 100, p. 1-2, 2014.

PETKAR, Aparna; JI, Pingsheng. Infection Courts in Watermelon Plants Leading to Seed Infestation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Phytopathology**, [s.l.], v. 107, n. 7, p.828-833, jul. 2017. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-12-16-0429-r>.

SALES JUNIOR, R.; OLIVEIRA, O. F.; MEDEIROS, É. M.; GUIMARÃES, I. M.; CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. (2012). Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Ciência Rural**. v. 40, p. 727-734. 2010.

SARPELEH, Abolfazl; CHERAGHALI, Vadiéh; RAZAVI, Mohammad. Detection of *Monosporascus cannonballus* from melon plants using PCR. **Journal of Crop Protection**, v. 1, n. 4, p. 349-359, 2012.

CAPÍTULO 3

ANALISE PATOGÊNICA E PROTEÔMICA DO FITOPATOGENO *Macrophomina phaseolina* ASSOCIADO À CULTURA DE MELANCIA

RESUMO. A melancia (*Citrullus lanatus*) apresenta grande expressão econômica nacional e mundial, e se destaca entre as demais cucurbitáceas. O Brasil ocupa o 4º lugar no ranking dos países maiores produtores de melancia, e esta é uma das principais olerícolas mais cultivada no país. No entanto, sua produção pode ser reduzida devido a ação de fitopatógenos, como é o caso de *Macrophomina phaseolina*, responsável pela doença podridão de carvão. Os objetivos deste trabalho foram simular o estresse biótico da interação planta-patógeno e avaliar a sua patogenicidade, bem como avaliar o perfil eletroforético de proteínas diferencialmente expressas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 + 2, sendo dois genótipos, dois isolados do patógeno e duas testemunhas, adotando-se seis plantas por tratamento e a repetição representa por 6 plantas. Para o teste de patogenicidade foram avaliados a severidade da doença através de escala de notas e o comprimento da lesão utilizando uma régua milimétrica. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade. O perfil eletroforético de proteínas foi avaliado através da SDS-PAGE em géis 12,5% de acrilamida e após analisados visualmente por imagem dos géis. A partir dos dados obtidos foi possível observar que todas as plantas apresentaram sintomas de podridão de carvão. Já os perfis eletroforéticos evidenciaram seis bandas de proteínas diferencialmente expressas, onde o material proteico das raízes apresentaram maior diferenciação, em relação aos de caule. A compreensão dos mecanismos resistência da interação planta-patógeno, como cultivares de melancia associado ao patógeno *M. phaseolina*, faz-se relevante para o desenvolvimento futuro de cultivares resistentes a fitopatógenos para a produção agrícola.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, SDS-PAGE, podridão de carvão.

**PROTEOMIC AND PATHOGENIC ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF
PHYTOPATHOGEN *Macrophomina phaseolina* THE WATERMELON
CULTURE**

ABSTRACT. The watermelon (*Citrullus lanatus*) presents great national and world economic expression, and stands out among the other cucurbitaceae. Brazil occupies the 4th place in the ranking of the major countries producing watermelon, and this is one of the most widely cultivated olive groves in the country. However, their production may be reduced due to the action of phytopathogens, as is the case of *Macrophomina phaseolina*, responsible for the disease of coal rot. The objectives of this work were to simulate the biotic stress of the plant-pathogen interaction and to evaluate its pathogenicity, as well as to evaluate the electrophoretic profile of differentially expressed proteins. The experimental design was completely randomized in a 2 x 2 + 2 factorial scheme, with two genotypes, two isolates of the pathogen and two controls, six plants per treatment and the replicate represented by 6 plants. For the pathogenicity test, the severity of the disease was evaluated through a scale of notes and the length of the lesion using a millimeter ruler. Data were analyzed by Kruskal-Wallis non-parametric test, at a 5% probability level. The electrophoretic profile of proteins was evaluated by SDS-PAGE on 12.5% acrylamide gels and after visual analysis of the gels. From the data obtained it was possible to observe that all the plants showed symptoms of coal rot. On the other hand, the electrophoretic profiles showed six bands of differentially expressed proteins, where the protein material of the roots showed greater differentiation than those of the stem. The understanding of resistance mechanisms of plant-pathogen interaction, such as watermelon cultivars associated with the *M. phaseolina* pathogen, is relevant for the future development of phytopathogen resistant cultivars for agricultural production.

Key words: *Citrullus lanatus*, SDS-PAGE, charcoal rot.

INTRODUÇÃO

A Melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] é membro da família das Cucurbitáceas, que inclui várias espécies de grande importância econômica como o melão (*Cucumis melo* L.), abóbora (*Cucurbita moschata*) e pepino (*Cucumis sativus*) (NASCIMENTO et al., 2011). É considerada umas das principais frutas em volume de produção mundial, sendo destaque os países como a China, Irã, Turquia e Brasil como seus maiores produtores. O Brasil ocupando o 4^a lugar no ranking, produz 2.314,700 milhões de toneladas colhidas de frutos, visto que seu cultivo está presente na maioria das regiões brasileiras (FAO, 2018).

No Nordeste brasileiro, o estado do Rio Grande do Norte (RN) corrobora significativamente para a produção regional de melancia da região, onde seus maiores produtores são os municípios de Tibau, Apodi, Baraúna e Mossoró (IBGE, 2018). No entanto, a intensa exploração comercial da cultura enfrenta muitos problemas fitossanitários. Dentre esses problemas destaca-se doenças acometidas por agentes fúngicos, como é o caso do fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

Este patógeno afeta inúmeras espécies e tem ampla distribuição global, causando perdas significativas na produção agrícola devido, principalmente, a redução na produtividade e na qualidade dos frutos. *M. phaseolina* é um dos agentes causadores da podridão do colo, também chamado de podridão de carvão, é primariamente de natureza do solo, com especificidade heterogênea de hospedeiro, causando lesões profundas e irregulares que se estendem em direção aos hipocótilos e superfícies radiculares, levando pôr fim à senescência prematura e à morte das plantas (KAUR, et. al., 2012).

Durante os estágios iniciais da patogênese, o micélio penetra na epiderme da raiz e fica restrito aos espaços intercelulares do córtex das raízes primárias. Conseqüentemente as células adjacentes entram em colapso, podendo levar à morte das plântulas infectadas. Durante o florescimento, hifas do fungo crescem intracelularmente através do xilema e formam microescleródios (estruturas de resistência) que bloqueiam os vasos e causam a ruptura das células do hospedeiro (GUPTA, SHARMA, RAMTEKE, 2012; KAUR et al., 2012).

A análise proteômica aplicada na área vegetal tem se tornado uma ferramenta valiosa para elucidar inúmeros processos biológicos, como respostas a fatores bióticos e abióticos, estado fisiológico da planta, bem como no auxílio de desenvolvimento de cultivares melhoradas (EMIDIO et al., 2015). A técnica de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), fornece a compreensão preliminar dos sistemas biológicos a respostas de fatores ambientais, como o estresse causado pela interação planta-patógeno, visto que inúmeras proteínas estão envolvidas no processo de defesa da planta, o qual pode subsidiar o desenvolvimento de futuros programas de melhoramento genéticos de cultivares (ALTELAAR; MUNOZ; HECK, 2013).

Desse modo, os objetivos deste trabalho foram simular o estresse biótico da interação planta-patógeno e avaliar a sua patogenicidade, bem como avaliar o perfil eletroforético de proteínas diferencialmente expressas.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Material vegetal - semeadura dos cultivares de melancia

Inicialmente 20 sementes de cada cultivar comercial de melancia, Crimson Sweet e Charleston Gray (figura 1), foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% e duas lavagens sucessivas com água destilada.



Figura 1: Sementes de cultivares comercial Charleston Gray e Crimson Sweet.

Estas foram colocadas em placas de Petri e incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as sementes ficaram dispostas em bancadas por 7 dias com incidência a luminosidade (figura 2).



Figura 2: Germinação das sementes das cultivares Crimson Sweet e Charleston Gray após três dias de semeio.

Após esse período, as sementes germinadas foram semeadas em vasos plásticos de 2L contendo uma proporção de 2:1 de areia e substrato Tropstrato. Os vasos foram colocados em casa de vegetação e regadas uma vez ao dia durante 45 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 2 + 2$, sendo dois genótipos, dois isolados do patógeno e duas testemunhas, adotando-se seis plantas por tratamento e a repetição representada por 6 plantas (figura 3).

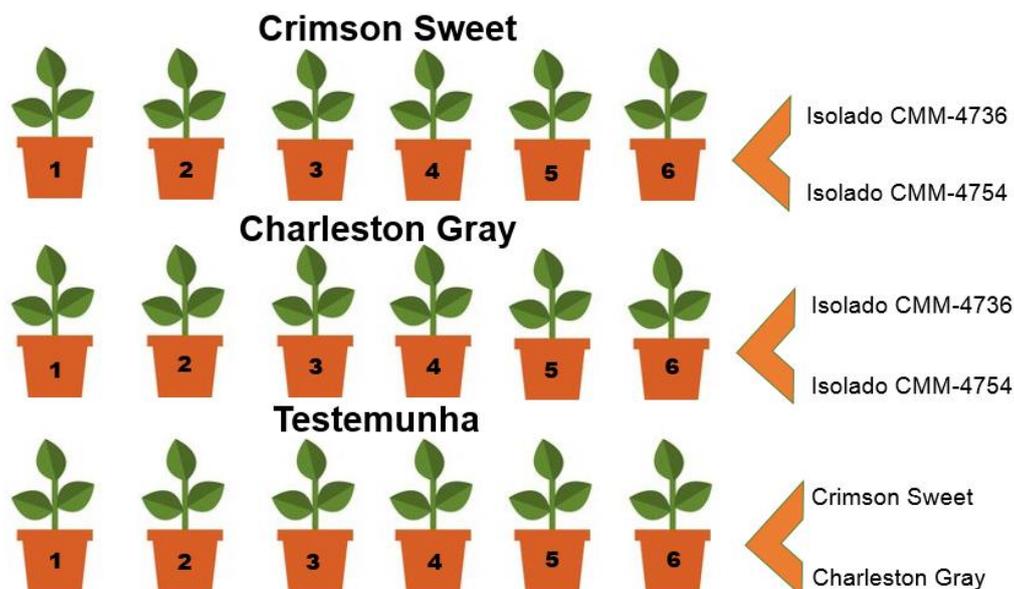


Figura 3: Esquema ilustrativo do delineamento experimental.

b) Obtenção do fungo e preparo do inóculo

Os isolados de *Macrophomina phaseolina* oriundo de cultivos de melancia, CMM-4736 (isolado mais virulento) e CMM-4754 (isolado menos virulento), foram cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia II da UFERSA-Campus Mossoró/RN, oriundos da coleção Prof. Maria Menezes. O método empregado para inoculação foi o do palito de dente infestado com o fungo de acordo com MEDEIROS et al., (2015), com modificações. Para esta técnica, os dois isolados foram previamente repicados, separadamente, para o meio de cultura contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) + tetraciclina (0,05 g/L) e mantidos em estufa tipo D.B.O. (demanda biológica de oxigênio) a 28 °C por sete dias. Pontas de palitos de dentes com cerca de 1,5cm foram inseridas verticalmente em um disco de papel filtro com o mesmo diâmetro da placa de Petri, no qual foram esterilizados a 121°C, por 30 minutos duas vezes, com um intervalo de 24h entre cada processo. Posteriormente, verteu-se meio de cultura BDA, deixando expostos cerca de 2 mm da extremidade dos palitos. Após a solidificação do meio, foram repicados quatro discos de 0,5 mm de diâmetro e incubados por sete dias em estufa B.O.D a 28°C para a completa colonização dos palitos. Os palitos sem o inóculo foram utilizados como testemunha.

c) Inoculação do fungo nas plantas

Após 30 dias, tempo suficiente para obtenção da quantidade mínima da amostra vegetal para as análises proteômica, da semeadura na casa de vegetação foi realizado a inoculação artificial dos fungos nas cultivares comerciais de melancia. Os palitos colonizados com o fungo foram inseridos no colo da planta, na altura de aproximadamente 0,5 cm do solo e ficou por 15 dias na casa de vegetação para avaliação dos sintomas (figura 4).



Figura 4: Cultivar Crimson Sweet apresentando sintomas de podridão do colo. Seta indica o local da manifestação da doença.

d) Análise da patogenicidade

Retirou-se as plantas da casa de vegetação após 15 dias da inoculação, e avaliou-se a severidade da doença e comprimento da lesão. Para a avaliação da severidade da doença, utilizou-se a escala de notas descrita por Ravf e Ahmad (1998), onde: 0 – não assintomático; 1: menos que 3% dos tecidos infectados; 2: 3 a 10% dos tecidos infectados; 3: 11 a 25% dos tecidos infectados; 4: 26 a 50% dos tecidos infectados e 5: mais de 50% dos tecidos infectados. O comprimento da lesão foi avaliado com régua milimétrica. Os dados obtidos foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade por meio do programa PAST versão 2.17b.

e) Extração das proteínas

Foram testados três diferentes métodos de extração de proteínas para as amostras em estudo. Cada procedimento de extração de proteínas foi realizado em quatro replicatas biológicas.

Método 1 - TCA/acetona modificado

O método foi baseado na metodologia descrita por Shen et al. (2002) com modificações. O material pulverizado foi ressuspenso em 1,5 mL de tampão de extração contendo Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), Polivinil polipirrolidona (PVPP) 0,2% (m/v), sacarose 250 mM, EDTA 10mM, triton X-100 1% (v/v), PMSF 1 mM e β -mercaptoetanol 2% (v/v). A amostra foi mantida sob agitação constante em gelo por 2 horas seguido de centrifugação a 12.000 g a 4 °C por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo e acrescentando-se mais 1,5 mL do tampão de extração. Centrifugou-se novamente a 12.000 g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi novamente transferido a um novo tubo ao qual foram acrescentados 1,5 mL de solução 10% de ácido tricloroacético (TCA) em acetona. O material foi incubado a -20 °C por 12 horas. Em seguida, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima e lavado por três vezes com solução de 10% de TCA/acetona e uma vez em etanol 80%. O precipitado foi seco, após solubilizado em tampão de 7M ureia, 2M tiureia e armazenado a -20 °C.

Método 2 - Ureia

O método foi descrito por Vasconcelos et al., (2005) e Silva & Souza (2009), com modificações. Cerca de 250mg do tecido foi adicionado 1mL de tampão uréia (5M Ureia, 4% Triton X-100, 1 M β -mercaptoetanol, 50mM K_2HPO_4) e colocado no agitador 7°C por 4 horas; centrifugado por 10.000 g por 40 minutos. Após foi coletado o sobrenadante e acrescentado solução de 10% de TCA/Acetona na proporção 1 volume da amostra para 4 amostras de acetona/ TCA 10% e foi incubado no congelador por 8 horas (over-nigth) para precipitação. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos, descartado o sobrenadante e realizado a lavagem do pellet com acetona gelada, após agitado vigorosamente e centrifugado a 10.000 g 5 minutos. Foi repetido mais uma vez o

passo da lavagem e foi seco a vácuo no dessecador. Por fim, foi dissolvido as proteínas em solução de ureia 7M mais tiureia 2M e estocado a frio.

Método 3 - Fenol

O método foi baseado na metodologia descrita por Rodrigues et al., (2012). Amostras pulverizadas (250 mg) foram ressuspendido em 0,8 mL de Tris-fenol saturado pH 8,0 e com 0,8 mL de tampão SDS [Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 2% de SDS, 5% de β -mercaptoetanol, 30% de sacarose, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF)]. As amostras foram vigorosamente submetidas a vórtice 10 min e centrifugado a 16.000 g por 5 min a 4 °C, e a camada superior (0,5 mL) foi transferida para um novo tubo. As proteínas foram precipitadas por 2 h a -20 °C com três volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado e depois foi centrifugado a 16.000 g para 5 min a 4°C. O pellet foi lavado uma vez com Acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado e uma vez com acetona 80% v / v gelado, seguido por secagem a vácuo. Os pellets de proteína foram solubilizados em tampão de 7M ureia, 2M tiureia e armazenado a -20 °C.

f) Quantificação de proteínas

A concentração dos extratos proteicos foi determinada pela metodologia segundo Bradford, (1976). Foi adicionado 10 μ l do extrato bruto, 90 μ l de água destilada, e 1 mL doreagente de Bradford. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro de luz visível (Biospectro SP-220) a 595 nm. A solução padrão utilizada para o branco foi a água destilada. Os resultados obtidos de absorvância para cada amostra, foram plotados em uma curva de calibração obtida com leituras de diferentes concentrações da albumina bovina. Os dados de absorvância inseridos nessa curva são correlacionados com os dados das soluções padrões dealbumina, determinando assim a concentração das amostras.

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

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo o protocolo descrito Brunelle & Green (2014), com modificações. Onde 20 μ g do extrato proteico de cada amostra foi desnaturada separadamente em tampão de amostra (120mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glicerol, 750mM β -mercaptoetanol, 0,05% azul bromofenol) na proporção 1/2. A solução foi aquecida por 3 minutos em termociclador a

94°C e aplicadas no gel de acrilamida, composto pelo stacking gel (gel de empilhamento) a 4% e pelo main gel (gel principal ou gel de separação) a 12,5% e espessura de 1mm. Para a corrida no gel, foi aplicada uma voltagem de 100V por 1h e 120V por 1h30min, ao final as amostras foram coradas com azul de comassie brilhante (CBB) para visualização. As imagens dos géis foram obtidas usando o fotodocumentador com luz branca. A detecção dos spots foi feita por comparação visual dos géis um a um, analisando bandas reprodutivas diferencialmente encontradas entre os grupos controle e inoculado. A massa molecular das proteínas foi estimada por comparação com os padrões do marcador de peso molecular Amershan ECL Rainbow Marker, que contém uma mistura de proteínas individualmente coloridas de tamanho definido, variando de 225kDa a 12 kDa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de patogenicidade todas as plantas desenvolveram sintomas de podridão do colo a após a inoculação artificial. A figura 5 mostra a Cultivar Charleston Gray com sintomas de podridão do colo ocasionado por *Macrophomina phaseolina* após 15 dias. As maiores incidências de podridão radicular foram observadas nos tratamentos inoculadas com o isolado CMM-4736 para as duas cultivares, Crimson Sweet e Charleston Gray. Nas testemunhas não foram observados sintomas da podridão do colo.



Figura 5: Cultivar Charleston Gray com sintomas de podridão do colo ocasionado por *Macrophomina phaseolina* após 15 dias. Destaque para área com lesão no caule e apodrecimento das folhas.

A severidade da doença alcançou os maiores níveis 4 e 5 de acordo com a escala de notas, para as cultivares Crimson Sweet e Charleston Gray, respectivamente. Dessa forma, a cultivar mais afetada pelo patógeno foi a Charleston Gray, demonstrando a maior mediana dos dados em relação a severidade (Figura 6), e os demais tratamentos variou a partir de 1, o qual corresponde a menos que 3% dos tecidos infectados.

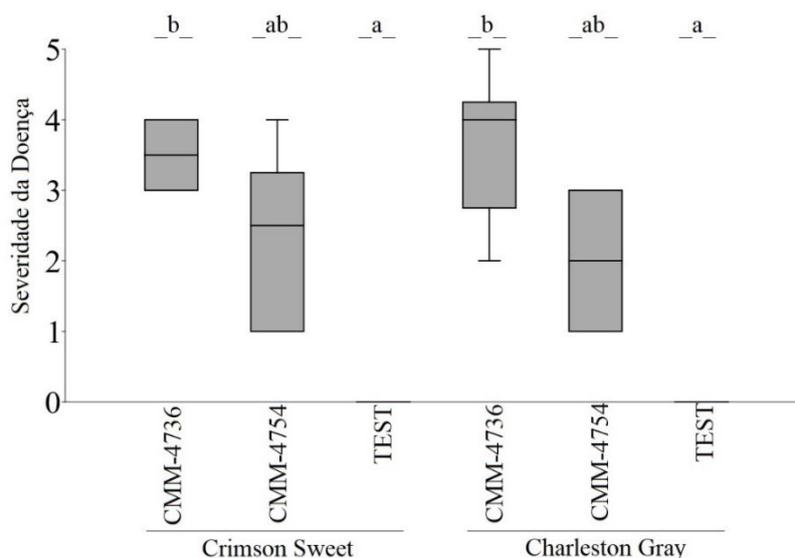


Figura 6: Dados obtidos a partir da escala de notas da severidade da doença comparando as diferentes cultivares Crimson Sweet e Charleston Gray com os isolados de *Macrophomina phaseolina* CMM-4736 e CMM-4754.

Já para análise do comprimento da lesão, pode-se observar que o tratamento que maior apresentou lesão do patógeno foi Charleston Gray com o isolado CMM-4736 (Figura 8), com 5,4cm da região do caule lesionado. Os demais tratamentos variou a partir de 0,6 cm do comprimento da lesão. De acordo análises não houve diferença estatística entre os tratamentos inoculados artificialmente, porém, comparando com os tratamentos controle houve diferenças estatística, conforme esperado.

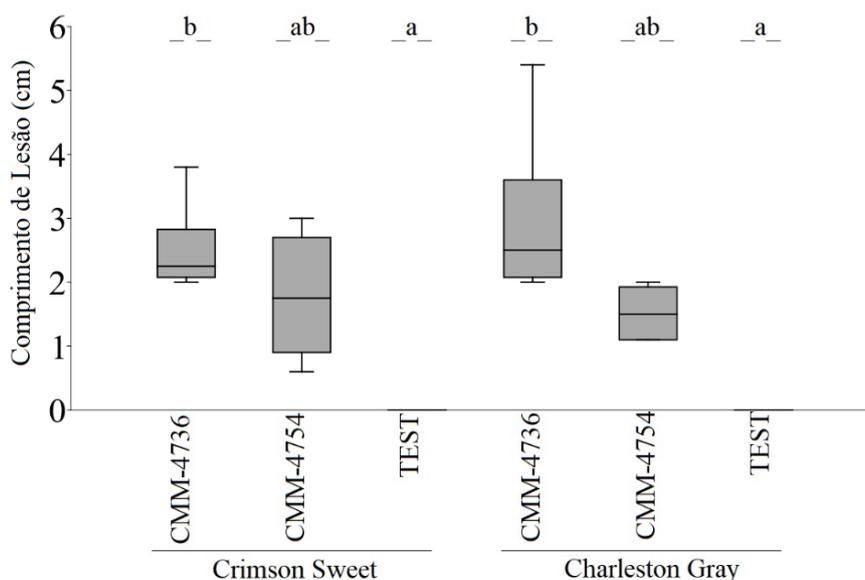


Figura 7: Dados obtidos a partir da medição do comprimento de lesão comparando as diferentes cultivares Crimson Sweet e Charleston Gray com os isolados de *Macrophomina phaseolina* CMM-4736 e CMM-4754.

M. phaseolina tem sido um dos principais fungos isolados de raízes de plantas de melancia e melão em várias regiões da América, Europa e Ásia, como Texas e Califórnia (Bruton et al. 1987; Aegerter e cols. 2000), Honduras e Chile (Bruton e Miller, 1997; Jacob et al., 2013), Espanha (García-Jimenez et al., 1993), Israel (Cohen et al., 2012) e Irã (Salari et al. 2012), sendo a principal causa da redução drástica no cultivo de cucurbitáceas em alguns desses países (KRIKUN et al., 1982).

Além disso, vários estudos confirmaram a patogenicidade do fungo *Macrophomina phaseolina* ao gerar podridão do colo em inúmeras culturas, como feijão, melão, melancia, soja, entre outras (KAUR et al., 2012). Porto e colaboradores (2018) avaliando a patogenicidade em melão com diversos fungos, incluindo *M. phaseolina*, observaram que todos os patógenos desenvolveram sintomas de podridão radicular com alta severidade, afirmando que a ocorrência de doenças radiculares representa uma das principais causas de perda de rendimento na cultura do melão, com destaque para patógenos causadores das podridões de raízes e colos.

Segundo Cohen e colaboradores (2014) ao realizar uma triagem de germoplasma de melancia usando solo naturalmente infestado com *M. phaseolina* no nordeste de Israel, identificou quatro acessos com resistência promissora. Diante desse pressuposto, podemos inferir que algumas espécies de melancia são menos suscetíveis ao fungo,

tornando-se relevante estudos que viabilizem a compressão dos mecanismos moleculares de resistência.

Para análise proteômica, na Tabela 1 tem-se os dados da quantificação fluorimétrica dos extratos protéicos totais de raízes de plantas de melancia obtidos utilizando-se três diferentes tampões de extração previamente descritos.

Tabela 1: Dados de quantificação fluorimétrica de extratos protéicos totais de raízes de melancia através do método de Bradford.

Material Vegetal	Protocolo	Quantidade da amostra (mg)	Absorbância (nm)	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Vol. final da amostra (μL)	Proteínas totais extraídas (μg)
Raiz melancia	TCA/acetona modificado	250	0,231	1,93	50	96,5
	Ureia	250	0,160	0,89	50	44,5
	Fenol	250	0,264	2,41	50	120,5

A comparação dos métodos de extração revelou valores de rendimento bastante distintos. De acordo com os resultados obtidos, o tampão de fenol foi o que proporcionou maior rendimento na extração de proteínas totais de raízes (120,5 μg), quando comparados com os demais tampões. Um rendimento menor foi o observado nos extratos de raízes com os tampões de TCA/acetona modificado e ureia, 96,5 μg e 44,5 μg , respectivamente (Tabela 1).

Desta forma, podemos concluir que em termos quantitativos o tampão de fenol foi mais eficiente para extração de proteínas totais de raízes, visto que apresentaram maior rendimento. A capacidade desses tampões em extrair mais eficientemente as proteínas está relacionada com as propriedades dos reagentes em favorecer a ruptura de membranas celulares, a eliminação de compostos metabólicos secundários como compostos fenólicos, pigmentos, polissacarídeos, terpenos e ácidos orgânicos, atuar em tecidos recalcitrantes e a solubilização de diferentes classes de proteínas (Silva&Souza, 2009).

Tais contaminantes interferem na separação e análise das proteínas na técnica de eletroforese SDS-PAGE, resultando distorções, manchas e um menor número de proteínas no gel. Além disso, os tecidos vegetais, inclusive a região da raiz, têm baixo

teor de proteínas em comparação com fontes animais e bacterianas, portanto a extração eficaz de proteínas é primordial para obter resultados de boa qualidade (RODRIGUES et al., 2012).

Comparando-se os padrões de bandas, pode-se observar que os tampões de ureia e TCA/acetona modificado apresentaram bandas distorcidas, com migração irregular e um baixo número de bandas (Figura 8).

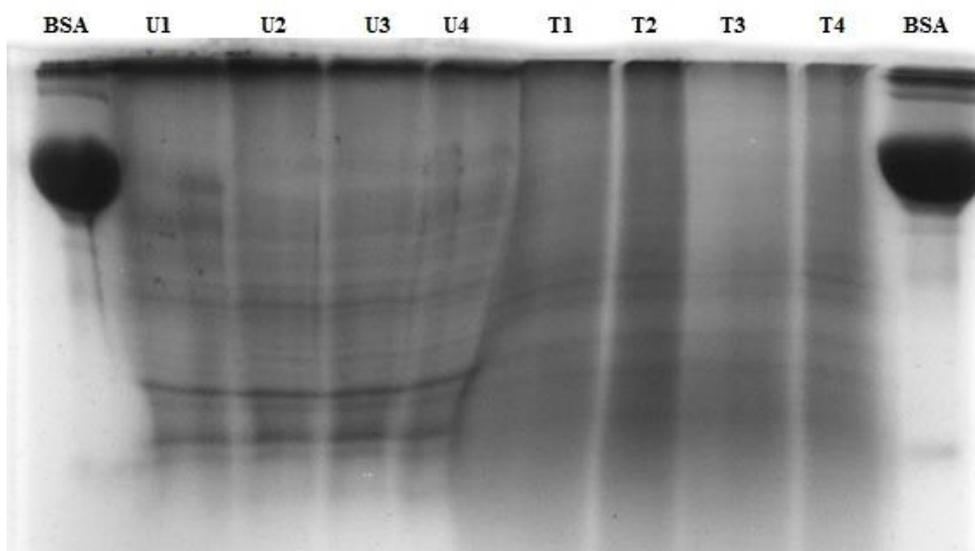


Figura 9: Análise eletroforética de extratos protéicos de raízes de melancia em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue. BSA – Albumina sérica bovina; U1 a U5 – Extrato proteico obtido do método de uréia; T1 a T5 - Extrato proteico obtido do método de TCA/Acetona modificado.

Já análises com o extrato protéico a partir do tampão de fenol apresentou melhor revelação no gel e maior número de bandas (figura 9). Dessa forma, o método de fenol foi selecionado para extração dos quatro tratamentos de raiz e caule, pelo fato de apresentar melhor desempenho para análises do padrão de bandas.

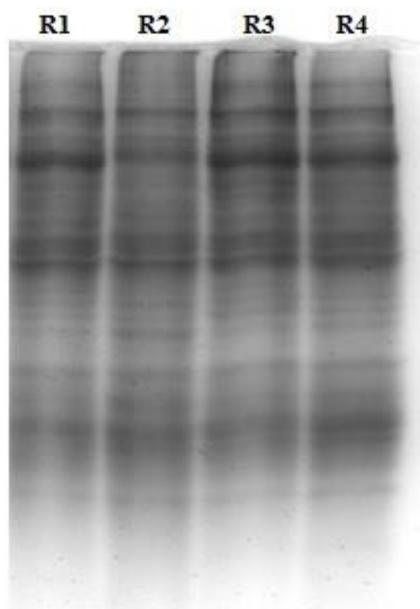


Figura 8: Análise eletroforética de extrato proteico de raízes de melancia obtido pelo método de fenol, revelados em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue.

Estudos em proteômica têm sido reportados em culturas economicamente importantes, como algodão, café e soja. No entanto, a expressão de proteínas no tecido radicular tem sido pouco estudada, havendo, portanto, a necessidade da padronização do método de extração proteica para cada espécie. Visto que, para uma análise de sucesso depende primariamente de uma eficiente etapa de extração proteica (Rodrigues et al., 2012; RIFEEL, et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos das análises dos perfis eletroforéticos em gel SDS-PAGE dos tratamentos (figura 10), pode-se observar duas bandas correspondentes à enzima Ribulose bi-fosfato carboxilase (Rubisco), esta quando analisada em condições desnaturantes (SDS-PAGE) é visualizada na forma de subunidades maior e menor, com o peso molecular de 52 kDa e 13 kDa, respectivamente (Rodrigues et al., 2012).

A figura 10 exibe os padrões de bandas da extração de proteínas do caule para o tratamento com a variedade Charleston Gray inoculadas com isolado de *M. phaseolina* (CMM-4736). Pode-se observar maior expressão de uma banda, em torno de 20kDa, na amostra inoculada, em comparação a ausência na amostra controle. Em correlação, este tratamento foi o que apresentou maior severidade da doença no teste de patogenicidade.

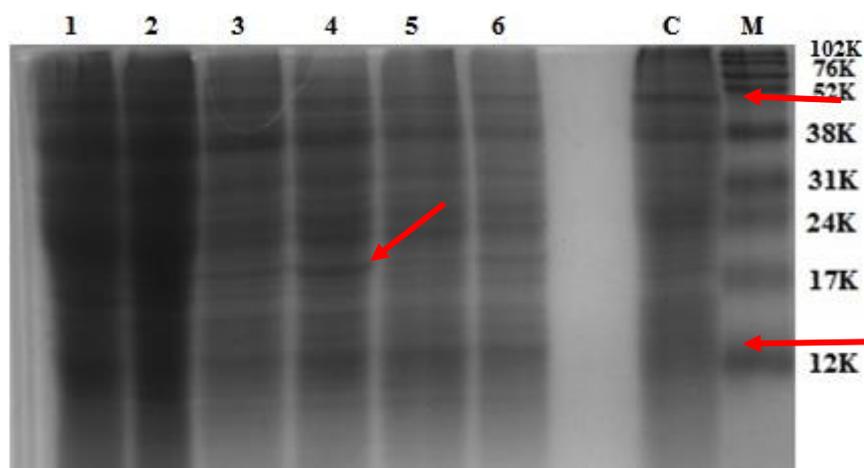


Figura 10: Perfil de bandas eletroforético com extrato protéico de caule do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4736. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. A seta na amostra 4 indica uma banda com maior expressão e as demais indicam as subunidades da enzima Rubisco.

Tais informações corroboram com os estudos de Nascimento et al., (2014), onde as condições de estresse biótico, como patógenos ou insetos herbívoros, impostas às plantas induzem a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo causar inúmeros danos às estruturas celulares da planta. Estas EROs acionam moléculas para a indução de genes de defesa e a polimerização de proteínas que compõe a parede celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza como a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, peroxirredoxinas, polifenol oxidase, dentre outras (Barbosa et al., 2014).

Entretanto, nos demais tratamentos (Charleston Gray com o isolado CMM- 4754 e Crimson Sweet com os isolados CMM-4736 e CMM-4754) de caule não foi possível diagnosticar bandas diferencialmente expressas (Figura 11) em relação a testemunha. O que podemos sugerir que não houve expressão diferencial de proteínas nessas condições. Em relação aos dados de patogenicidade, não houve correlação com esses tratamentos.

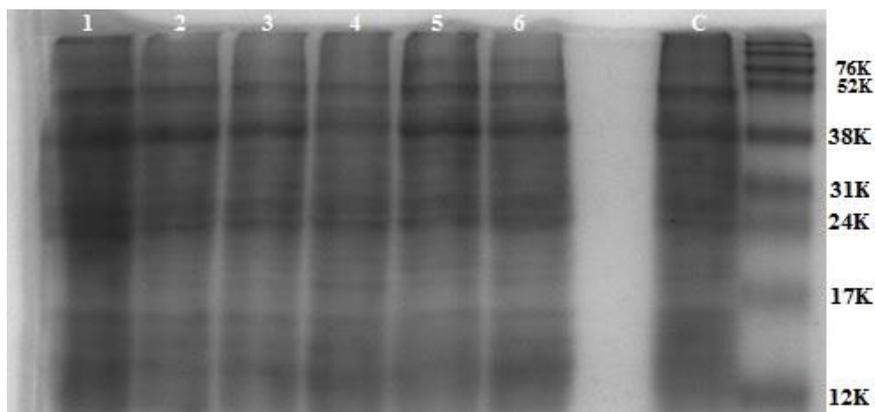


Figura 11: Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de caule do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4754. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule.

Já nos tratamentos com relação as proteínas extraídas da raiz, verificou-se uma maior diferenciação proteica em relação aos tratamentos de caule, no qual gerou bandas entre 12 a 150KDa. No tratamento com a cultivar Charleston Gray e inoculada com isolado CMM-4736 foi possível detectar duas bandas diferencialmente expressas na faixa de 12 e 10KDa, em comparação com ausência dessas bandas no controle (Figura 12). De forma semelhante, o tratamento da mesma cultivar com o isolado CMM-4754, apresentou duas bandas diferencialmente expressas com a mesma faixa de peso molecular (Figura 14).

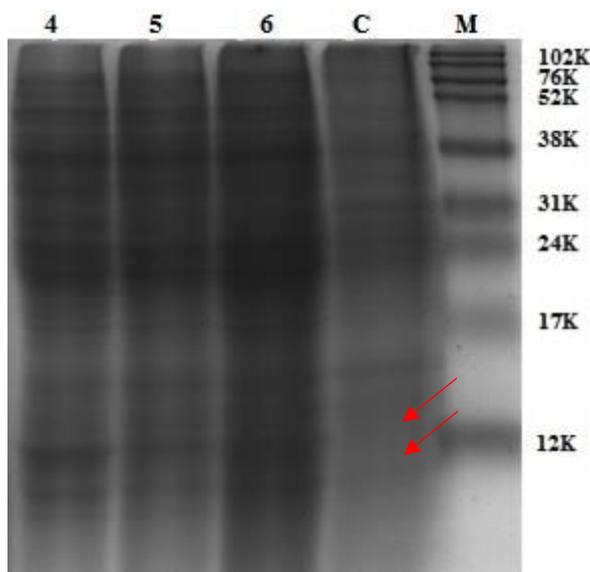


Figura 12: Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de raiz do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4736. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. As setas indicam duas bandas diferencialmente expressas na faixa de 12 e 10K.

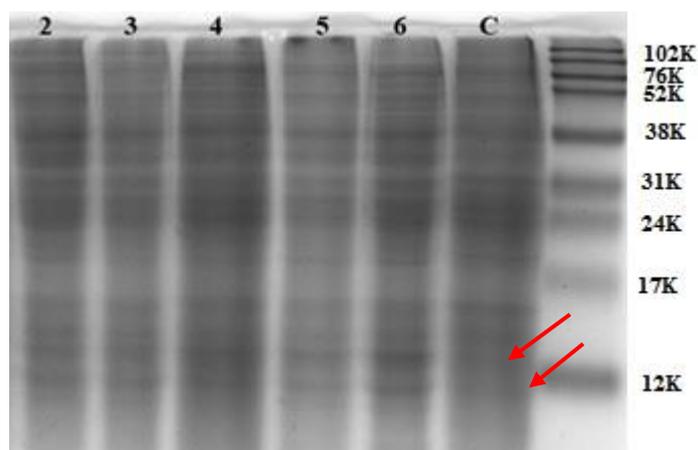


Figura 13: Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de raiz do tratamento Charleston Gray com o isolado CMM-4756. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. As setas indicam duas bandas diferencialmente expressas na faixa de 12 e 10K.

O tratamento com a cultivar Crimson Sweet e isolado de *M. phaseolina* CMM-4736 verificou-se a presença de uma banda de proteínas diferencialmente expressa na faixa de 102KDa, em relação a testemunha. No entanto, a mesma cultivar com o isolado CMM-4754 não apresentou padrão de bandas diferenciados.

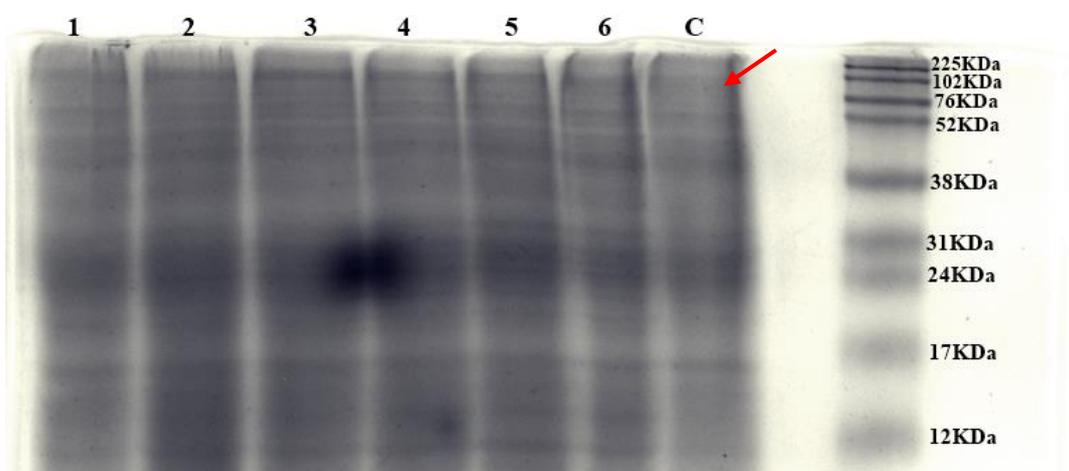


Figura 14: Perfil de bandas eletroforético de extrato protéico de raiz do tratamento Crimson Sweet com o isolado CMM-4736. M - Marcador molecular (K); C – Controle negativo; 1 a 6 – Amostras de caule. As setas indicam banda diferencialmente expressa na faixa de 102K.

As análises dos perfis eletroforéticos em gel SDS-PAGE sob o estresse do fitopatógeno na planta, revelou em total de seis bandas proteínas diferencialmente expressas, onde o material proteico de raízes apresentou maior diferenciação, em relação aos de caule. Já os dados obtidos de patogenicidade e o padrão de bandas expressos, não correlacionou positivamente com o grau de severidade da doença e comprimento da lesão

em todos os tratamentos. O que se faz necessário mais pesquisas para elucidação dos mecanismos de interação planta-patógeno.

Coelho et al., (2010) constatou que é possível que haja variações na atividade enzimática de algumas enzimas vegetais quando a planta é submetida a diversos estresses, sugerindo que não há um padrão universal de resposta, respaldando assim os diferentes perfis eletroforéticos.

Silva & Souza (2009) analisaram proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum* (pimenta-do-reino) através da eletroferese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e observaram padrões diferenciados de bandas em extratos proteicos de folhas e raízes. De forma semelhante, Srivastava et al., (2014) analisando a diversidade genética e proteômica de espécies de abóbora (*Lagenaria siceraria*), através da técnica de SDS-PAGE, detectou padrão de bandas diferenciados entre as espécies. Aiello e colaboradores (2016), caracterizaram a nível proteico sementes de cânhamo (*Cannabis sativa*L.) por meio das ferramentas da SDS-PAGE aliado a espectrometria de massas, identificando mais de 181 proteínas expressas.

O método mais prático e econômico para controlar a podridão causada por *M. phaseolina* seria através do uso de cultivares resistentes. Mas, para isso se faz necessário a compreensão dos mecanismos de estresses bióticos, como a interação planta patógeno, que pode ser elucidada através das ferramentas da proteômica, visto que muitas proteínas podem revelar funções consistentes com a resposta ao estresse. Assim, tais informações da presente pesquisa podem contribuir para futuro programas assistidos de melhoramento genético em plantas (SALVATO & CARVALHO, 2010; MELO et al., 2016).

A presente pesquisa busca auxiliar o manejo e o controle de fitopatógenos na produção agrícola, pois a utilização de agrotóxicos é a cada dia mais contestada pelos danos causados ao homem e ao ambiente, além de poder promover a resistência de fitopatógenos a fungicidas.

CONCLUSÃO

- Todas as cultivares inoculadas artificialmente com o patógeno *Macrophomina phaseolina* apresentaram sintomas da doença podridão do colo.
- As análises dos perfis eletroforéticos em gel SDS-PAGE revelou seis bandas proteínicas diferencialmente expressas, onde o material proteico de raízes apresentou maior diferenciação, em relação aos de caule.

REFERÊNCIAS

- AEGERTER, B. J.; GORDON, T. R.; DAVIS, R. M. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. **Plant Disease**, v. 84, n. 3, p. 224-230, 2000.
- AGRICULTURAL STATISTICS DATABASE - **FAO**. World Agricultural Information Center. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 06 Jan de 2019.
- ALTELAAR, A. F. M.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. R. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.35-48, dez, 2012.
- BARBOSA, M. R., MEDEIROS, M. A. S.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL, C.T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.
- BRADFORD, Marion 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.
- BRUNELLE, Julie L.; GREEN, Rachel. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2014. p. 151-159.
- BRUTON, B. D.; JEGER, M. J. *Macrophomina phaseolina* infection and vine decline in cantaloupe in relation to planting date, soil environment, and plant maturation. **Plant Disease**, 1987.
- BRUTON, B. D.; MILLER, M. E. Occurrence of vine decline diseases of melons in Honduras. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 696-696, 1997.
- COELHO, D. L. M.; AGOSTINI, E. A. T.; GUABERTO, L. M.; NETO, N. B. M.; CUSTÓDIO, C. C. Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e

expressão diferencial de proteínas durante a germinação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 491-499, 2010.

COHEN, R.; OMARI, N.; PORAT, A.; EDELSTEIN, M. Management of *Macrophomina* wilt in melons using grafting or fungicide soil application: pathological, horticultural and economical aspects. **Crop Protection**, v. 35, p. 58-63, 2012.

COHEN, R. P. S.; CROSBY K.M.; MARTYN R.D. Advances in the biology and management of *Monosporascus* vine decline and wilt of melons and other cucurbits. **Horticultural Reviews**, v.39. p. 77-120, 2012.

COHEN, R.; PIVONIA, S.; BURGER, Y.; EDELSTEIN, M.; GAMLIEL, A.; Katan, J. Toward integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. **Plant Disease** v.84, p. 496-505, 2000.

EMIDIO, N. B.; CARPANEZ, A. G.; QUELLIS, L. R.; FARANI, P. S., VASCONCELOS, E. G.; FARIA, P. P. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**. v. 41, p. 3-4, 2015.

GARCIA-JIMENEZ, J.; MARTÍNEZ-FERRER, G.; ARMENGOL, J, VELAZQUEZ M.T., ORTS, M.; JUAREZ M.; ORTEGA A.; JORDA, M.C.; ALFARO, A. Agentes asociados al colapso del melon en distintas zonas espanolas. **Bol San Veg Plagas**, v. 19, p. 401-423, 1993.

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. 167180, 2012.

Instituto brasileiro de Geografia e Estatística - **IBGE**. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. 2018. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76503. Acesso em: 10 de Jan de 2019.

JACOB, C. J.; KRARUP, C.; DÍAZ, G. A.; LATORRE, B. A. A severe outbreak of charcoal rot in cantaloupe melon caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. **Plant disease**, v. 97, n. 1, p. 141-141, 2013.

JÚNIOR, R. Q. B.; MARTINS, G. R.; BARROSO, I. C.; MARINHO, R. C.; AGUIAR, T. D. Á. F.; Teixeira, M. F. S. Eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa como ferramenta proteômica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 100-112, 2013.

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.

- KRIKUN, J.; ORION, D.; NACHMIAS, A.; Reuveni, R. The role of soilborne pathogens under conditions of intensive agriculture. **Phytoparasitica**, v. 10, n. 4, p. 247-258, 1982.
- MEDEIROS, A. C.; MELO, D. R. M.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; NUNES, G. H. S.; COSTA, J. M. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.
- MELO, L. G. L.; CANDIDO, E. K.; NETO, J. R. M. C.; LINS, S. R. O.; RODRIGUES, A. A. C.; Oliveira, S. M. A. Indutores de resistência abióticos no controle da fusariose do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 10, p. 1703-1709, 2016.
- NASCIMENTO, I. R.; SANTOS, L. B.; SANTOS, G. R.; ERASMO, E. A. L. Taxonomia e sistemática, centro de origem e morfologia da melancia. In: SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed). **Tecnologias para produção sustentável da melancia no Brasil**. Gurupi: Universidade Federal do Tocantins, 2011. p. 11-14.
- NASCIMENTO, J.B.; BARRIGOSI, J.A.F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v.1, p. 234-250, 2014. DOI: 10.18677/Agrarian_Academy_2014_021.
- PORTO, M. A. F.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; FREITAS, F. C. L.; NASCIMENTO, S. R. C.; CRUZ, B. L. S.; GUIMARÃES, L. M. S. Feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) no controle da podridão radicular do meloeiro causada por associação de patógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 4, p. 327-332, 2018.
- RAVF, B. A.; AHMAD, I. Studies on correlation of seed infection to field incidence of *Alternaria alternata* and *Macrophomina phaseolina* in Sunflower. In: **13th Iranian Plant Protection Congress-Karaj, Iran**. 1998. p. 113.
- RIFFEL, A.; VIANA, L. D. S.; da COSTA, J. G.; SANTANA, A. Avaliação de métodos de extração de proteínas de tecido foliar e radicular de cana-de-açúcar para estudos de proteômica. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2012, 20 p.
- RODRIGUES, A. A. C.; Oliveira, S. M. A. Indutores de resistência abióticos no controle da fusariose do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 10, p. 1703-1709, 2016.
- 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.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. D. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, p. 727-734, 2010.

SHEN, S., MATSUBAE, M. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, Tokio, JP, v. 132, p.613-620, 2002

SILVA, Redinaldo dos Santos; SOUZA, Cláudia Regina Batista de. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Revista ACTA Amazonica**, v. 39, p. 255 – 260, 2009.

SRIVASTAVA, D.; KHAN, N. A.; SHAMIM, M. D.; YADAV, P.; PANDEY, P.; SINGH, K. N. Assessment of the genetic diversity in bottle gourd (*Lagenaria siceraria* [Molina] Standl.) genotypes using SDS-PAGE and RAPD Markers. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2014.

VASCONCELOS, É. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; ABREU, E. F. M.; GONÇALVES, E. F.; SOUZA, P. A. S.; CAMPOS, F. A. P. Protein extraction from cowpea tissues for 2-D gel electrophoresis and MS analysis. **Chromatographia**, v. 62, n. 7-8, p. 447-450, 2005.