



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

ROSECLEIDE MAIA DA SILVA

**PATOGENICIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Lasiodiplodia theobromae ASSOCIADO AO MELOEIRO**

MOSSORÓ

2022

ROSECLEIDE MAIA DA SILVA

**PATOGENICIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Lasiodiplodia theobromae ASSOCIADOS AO MELOEIRO**

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: Prof^ª. Dr^ª. Ioná Santos Araújo Holanda.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio.

Coorientador: Prof. Dr. Glauber Henrique De Sousa Nunes.

MOSSORÓ

2022

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

S586p Silva, Rosecleide Maia da.
PATOGENICIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
ISOLADOS DE *Lasiodiplodia theobromae* ASSOCIADO AO
MELOEIRO / Rosecleide Maia da Silva. - 2022.
74 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz
Ambrósio.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2022.

1. Cucumis melo L. 2. ISSR. 3. RAPD. 4.
patogenicidade.. I. Holanda, Ioná Santos Araújo,
orient. II. Ambrósio, Márcia Michelle de Queiroz,
co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

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

ROSECLEIDE MAIA DA SILVA

**PATOGENICIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Lasiodiplodia theobromae ASSOCIADOS AO MELOEIRO**

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: 31/01/2022

BANCA EXAMINADORA

Ioná Santos Araújo
Holanda

Assinado de forma digital por Ioná Santos Araújo Holanda
Dados: 2022.02.03 11:17:54 -03'00'

Profª. Dr. Ioná Santos Araújo Holanda
Presidente


MARCIA MICHELLE DE QUEIROZ
AMBROSIO:96726539487

Assinado de forma digital por MARCIA MICHELLE DE QUEIROZ AMBROSIO:96726539487
Dados: 2022.02.03 10:11:24 -03'00'

Profª. Dra Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio
Membro Interno

Ana Carolina de Assis Dantas

Profa. Dra. Ana Carolina de Assis Dantas
Membro Externo

ANDREIA MITSA PAIVA  Assinado de forma digital por ANDREIA
MITSA PAIVA NEGREIROS:08897954448
NEGREIROS:08897954448 Dados: 2022.02.03 08:29:48 -03'00'

Profa. Dra. Andreia Mitsa Paiva Negreiros
Membro Interno

Rosecleide Maia da Silva

Rosecleide Maia da Silva
(discente)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as graças derramadas em minha vida; Pelo seu cuidado e acolhimento em todos os momentos;

À Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), pela oportunidade de formação acadêmica e realização do estudo;

Ao Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade e seu núcleo de professores pela contribuição em minha formação profissional;

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

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ioná Santos Araújo Holanda, pelos longos anos de orientação, pelos ensinamentos e contribuições para minha formação profissional e pessoal. Por fazer parte do meu processo de crescimento e amadurecimento. Por todo seu carinho, acolhimento e empatia. Pelo exemplo de mulher e profissional, e por acreditar e incentivar seus alunos. A senhora, todo meu respeito, carinho e gratidão.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Marcia Michelle de Queiroz Ambrósio, pelo exemplo de pessoa e profissional, pela ética, comprometimento, cuidado e afeto aos seus. Pelos ensinamentos e pela dedicação ao que faz. Por toda disposição em ensinar e ajudar e por aceitar fazer parte do meu desenvolvimento. Por não ter soltado minha mão durante os empecilhos dessa jornada. A senhora também, todo meu respeito, carinho e gratidão.

Ao laboratório de Biotecnologia Vegetal, a qual me orgulho em fazer parte por tantos anos. Todo meu respeito e gratidão a cada um da equipe. Aos amigos e colegas que estão comigo diariamente, apoiando desde os tempos da graduação, Pedro Sidarque, Gilsivan Sales. À Deisy Rosero, Karem Souza e Eva Samara pela delicadeza e empatia, chegaram a pouco tempo, mas que já se fizeram presente.

À família Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia e todos seus integrantes. Esse que me acolheu como parte sua, pela contribuição, apoio e orientação a mim transmitidos. Que linda família vocês são!! Agradeço em especial, à Jarlan Lucas, Francisco Romário, Karol Alves e Louise Medeiros por todo suporte e gentileza para comigo.

Aos parceiros dessa pesquisa, ao meu coorientador, Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa, à Michelangelo Fernandes e aos produtores de melão, meu muito obrigada ao suporte para execução dos experimentos.

Aos meus amigos Bárbara Pinto, Talison Eugênio, Maria Bárbara, Frederico Jales e Rhut Mikaella pelo apoio nos momentos difíceis e por toda ajuda.

Ao meu amigo Jorge Alves da Silva Neto, que merece uma dedicatória exclusiva. Sou muito grata a você, que caminha comigo em qualquer terreno sem soltar a mão. Obrigada por sua amizade dentro e fora da Universidade. Por muitas vezes ser ouvidos e por não medir esforços para me ajudar até quando não lhe convém. Pelos ensinamentos e por todo apoio. Que lindo coração você possui!

À toda minha família, em especial a meus pais Francisco Erivan e Cecília Maia, minha irmã Roseleide Maia, meu sobrinho Davi Luís, minha tia Maria Edna, minha avó Cecília Neta e ao meu primo João Paulo Pereira, por acreditarem em mim, por toda a ajuda e suporte durante essa caminhada.

Ao meu marido lindo e parceiro de vida, Regis Vinicius Fagundes Dantas, à você todo meu amor, gratidão e reconhecimento ao esforço que você faz para me ver feliz e por me apoiar a fazer o que me faz feliz. Por participar de todo o processo, pelos incentivos, por ser meu suporte e por dar suporte, independente do momento. Por toda dedicação, ajuda e comprometimento para comigo. Muito obrigada por sempre acreditar em mim!

Meu muito obrigada a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista e formação profissional.

Conhece-te, aceita-te, supera-te.
Santo Agostinho.

RESUMO

SILVA, Rosecleide Maia. **Patogenicidade e diversidade genética de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* associados ao meloeiro**. 2022. 73f. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2022.

A espécie *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. causadora de resinose e podridão de cancro, foi coletada em diferentes áreas produtoras de melão do Rio Grande do Norte, durante as safras de 2019 e 2020, caracterizando risco em potencial à cultura. Diante disso, os objetivos deste estudo foram avaliar a patogenicidade de isolados de *L. theobromae* de variedades comerciais de melão Amarelo e Cantaloupe, verificando sua interação como agente casual de podridão radicular em meloeiro e avaliar sua variabilidade genética. Na análise da patogenicidade, 10 isolados foram testados por meio dos métodos de palito tipo de “dente” e infestação de arroz colonizado com estruturas fúngicas em cultivar de melão do tipo Goldex Yellow. Foram avaliadas incidência e a severidade da doença. Todos os isolados apresentaram sintomas e causaram doença, em ambos os métodos. Entretanto, houve variação entre a agressividade manifestada. O isolado LT 03 se mostrou mais agressivo pelo método do palito, e o isolado LT 10, mais agressivo, produzindo tombamento pré-emergencial pelo método do arroz. Em ambos os métodos, o isolado LT 08, foi menos agressivo. O fungo foi reisolado com sucesso das lesões de plantas com sintomas nos dois ensaios, confirmando os postulados de Robert Koch. A espécie foi identificada por meio de análise de sequenciamento do DNA. Para análise de diversidade genética, os isolados foram submetidos a técnicas moleculares utilizando 13 marcadores de DNA do tipo *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) e 13 marcadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Ambos os marcadores mostraram eficácia na avaliação da similaridade genética dos isolados, com valores da correlação cofenética de $r=0,95$ e $0,96$, respectivamente. O coeficiente de similaridade de Jaccard variou de 0,056 a 0,80 entre os isolados, indicando alta variabilidade genética intraespecífica. A análise do dendograma gerado pelo método UPGMA produziu uma distribuição em cinco grupos. As maiores distâncias genéticas foram verificadas entre os isolados LT 01 e LT 08, com 86% de distância, e 83% entre os isolados LT 08 e LT 10, respectivamente. A construção da árvore filogenética permitiu verificar que todos os isolados ficaram no clado de *L. theobromae*, pertencendo a uma única espécie. Os resultados desse estudo fornecem informações importantes aos produtores mundiais de melão, podendo auxiliar no desenvolvimento de métodos de controle ao *Lasiodiplodia theobromae*, uma vez que não se há conhecimento sobre esse fitopatógeno atuando diretamente como causador de podridão radicular em meloeiro no Brasil.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L., ISSR, RAPD, patogenicidade.

ABSTRATC

SILVA, Rosecleide Maia. Pathogenicity and genetic diversity of *Lasiodiplodia theobromae* isolates associated with melon. 2022. 73f. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2022.

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl., the causal agent of resinosis and canker rot, was collected in different melon producing areas of Rio Grande do Norte during the 2019 and 2020 crop seasons, characterizing a potential risk to the crop. Therefore, this work aimed to evaluate the pathogenicity of *L. theobromae* isolates from commercial varieties of Yellow and Cantaloupe melons, verifying their interaction as the causal agent of root rot in melon and evaluating their genetic variability. For the pathogenicity analysis, 10 isolates were tested using the toothpick and rice infestation methods colonized with fungal structures in 'Goldex' Yellow melon. Disease incidence and severity were evaluated. All the isolates caused disease symptoms by both methods. However, there was variation in the manifested aggressiveness. The isolate LT 03 was the most aggressive by the toothpick method while the isolate LT 10 was the most aggressive by the rice infestation method causing pre-emergent damping off. In contrast, LT 08 was the least aggressive. The fungus was reisolated from lesions on plants with symptoms on both tests, confirming Koch's postulate. The species was identified through DNA sequencing. For genetic diversity analysis, the isolates were subjected to molecular techniques using 13 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and 13 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Both markers were effective to evaluate the genetic similarity among the isolates, with cophenetic correlation coefficients of 0.95 and 0.96, respectively. The Jaccard similarity coefficient ranged from 0.056 to 0.80 among the isolates, indicating high intraspecific genetic variability. Also, the dendrogram generated by the UPGMA method arranged the isolates into five groups. The highest genetic distances were between the isolates LT 01 and LT 08, 86%, and between LT 08 and LT 10, 83%. The phylogenetic tree showed that all the isolates were arranged into the *L. theobromae* clade, proving as belonging to the same species. Results of this study provide important information for melon producers worldwide, aiding to develop control methods against *L. theobromae*, since little is known about this phytopathogen causing root rot in melon in Brazil.

Keywords: *Cucumis melo* L., ISSR, RAPD, pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Preparo do inóculo. Pontas de palitos de dente voltadas para cima inseridas em papel filtro na placa de Petri contendo meio BDA (a). Discos fungicos de cada isolado depositados nas placas de Petri contendo meio BDA (b). Placas totalmente colozidas com os isolados de *Lasiodiplodia* sp. após serem mantidas em estufa B.O.D (c).....34
- Figura 2** – Processo de inoculação das plantas após 15 dias de semeadura. Representação da inoculação do grupo controle com palito em meio BDA (a). Representação da inoculação dos tratamentos com palito colozinado com isolados de *Lasiodiplodia* sp.....34
- Figura 3** - Imagens de *Lasiodiplodia* sp. cultivados em meio BDA isolados de meloeiro obtidos em plantios comerciais do Rio Grande do Norte. Coloração predominante da superfície da colônia; Cinza claro: isolados 3, 4, 10 e 9. Cinza escuro: isolados 6, 7 e 8. Preto: isolados 1, 2 e 5.....38
- Figura 4** - Conidioma estromático picnidial, realizado corte transversal para observação de interação entre hifas e conídios, visualizado em microscópio eletrônico de varredura.....38
- Figura 5**- Conidioma estromático picnidial inteiro para observação de como os conídios se agrupam, visualizados em microscópio eletrônico de varredura.....39
- Figura 6** – Morfologia apresentadas pelos conídios presentes no interior dos picnídios abertos. Cilíndrica e subovóide (a) Ovóide e elipsoidal (b) visualizados em microscópio eletrônico de varredura.....39
- Figura 7** - Coloração predominante dos conídios de *Lasiodiplodia* sp. em dois estágios de desenvolvimento presentes no interior dos picnídios abertos. Hialinos, quando imaturos, e marrom escuros, quando maduros, visualizados em microscópio óptico.....40
- Figura 8** - Medição dos conídios de *Lasiodiplodia* sp. presentes no interior dos picnídios abertos para se obter a média do seu tamanho visualizados em microscópio eletrônico de varredura.....40
- Figura 9** – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Podridão e tombamento com quarto dias de inoculação.....41
- Figura 10** – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Folhas de plantas meloeiro com presença de murcha e manchas em tom branco e amarelo.....42
- Figura 11** – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Colo de plantas meloeiro com presença de exsudatos expelindo fluido vermelho (a) e fluido necrótico (b).....42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 12** – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Plantas de meloeiro com necrose, murcha e declínio.....43
- Figura 13** – Agressividade de isolados de *Lasiodiplodia* sp. em plantas de meloeiro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).....44
- Figura 14** – Gel de agarose a 2% com amplificação de sêquências da região ITS, utilizando os primers universais ITS1 e ITS4. As amostras de DNA (1 a 10) dos isolados de *Lasiodiplodia* sp. exibiram tamanho de 550 pb de acordo com o padrão de marcador de DNA (M).....45
- Figura 15** - Árvore filogenética construída através do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região do espaçador interno transcrito do rRNA (ITS) dos 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. Os números dos nós indicam os valores de confiabilidade de bootstrap com 1000 réplicas. A árvore está enraizada com *Barriopsis fusca*.....46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Preparo do inóculo. Discos fungicos de cada isolado em arroz umedecido com água, depositados frascos do tipo elermennyer (a) Fracos mantidos em estufa B.O.D para colonização (b).....55
- Figura 2** – Processo de infestação do substrato com o preparo do inóculo.....56
- Figura 3** – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Tombamento pré-emergencial (a) Tombamento pós-emergencial (b).....60
- Figura 4** - Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Murcha (a) Amarelecimento das folhas (b).....61
- Figura 5** - Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Início das lesões no colo da planta.....61
- Figura 6** - Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Planta exibindo necrose, murcha, e declínio em partes dos tecidos (a) Planta completamente murcha e necrosada (b).....62
- Figura 7** – Representação do grupo controle, mesma planta em diferentes períodos sem a presença de sintomas. Planta do grupo controle com 7 dias sem a presença de sintomas (a) Planta do grupo controle com 21 dias sem a presença de sintomas (b).....62
- Figura 8** – Agressividade de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* em plantas de meloeiro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).....63
- Figura 9**- Eletroforese de produtos de PCR ISSR de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* obtidos com o primer TriGTG.....64
- Figura 10**- Eletroforese de produtos de PCR RAPD de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* obtidos com o primer OPD 2.....64
- Figura 11**- Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os iniciadores ISSR de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae*.....66
- Figura 12**- Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os iniciadores RAPD de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae*.....66

LISTA DE FIGURAS

Figura 13 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da combinação de dados da análise com os iniciadores ISSR e RAPD de 10 isolados de *Lasiosiphonia theobramae*.....67

Figura 14 – Associações genéticas de 10 isolados de *Lasiosiphonia theobramae* de acordo com a análise das coordenadas principais dos iniciadores ISSR e RAPD.....68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Identificação do número de acesso de depósito das sequências dos 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* no Genbank.....36

CAPÍTULO III

Tabela 1 Descrição dos nomes, hospedeiro, códigos de depósito do GenBank, hospedeiros e locais de origem dos isolados de *Lasiodiplodia theobromae* utilizados neste estudo.....54

Tabela 2 – Identificação, sequência e temperatura de anelamento (TA) de iniciadores moleculares ISSR e RAPD empregados no estudo.....58

Tabela 3 - Avaliação do poder de resolução dos marcadores ISSR e RAPD. Número de fragmentos amplificados (NºFA), número de fragmentos polimórficos (NºFP), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação polimórfica (PIC), relação efetiva do multiplex (EMR) e índice do marcador (MI).....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Potato-Dextrose-Agar
BOD	Biochemical Oxygen Demand
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMR	Effective multiplex ratio
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer
PCR	Reaction Chain Polymerase
PIC	Polymorphism information content
MI	Marker index
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris Borate Edta
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
UV	Ultraviolet

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA CULTURA.....	18
2.2 IMPORTÂNCIA DO MELÃO PARA REGIÃO NORDESTE.....	19
2.3 FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO MELÃO.....	20
2.4 ASPECTOS GERAIS E PATOGENICIDADE DE <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	20
2.5 ANÁLISES MOLECULARES.....	21
2.5.1 Caracterização Filogenética Molecular.....	21
2.5.2 Diversidade Genética.....	22
3. REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO II: ANÁLISE PATOGÊNICA E DIAGNOSTICO MOLECULAR E FILOGENÉTICO FITOPATÓGENO <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ASSOCIADO À CULTURA DO MELOEIRO.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1 Amostragem e Isolamento.....	32
2.2 Análise Morfológica.....	33
2.3 Patogenicidade.....	33
2.4 Extração de DNA.....	35
2.5 Amplificação das Sequências.....	35
2.6 Sequenciamento	36
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4. CONCLUSÃO.....	47
5. REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO III: CAPÍTULO III: PATOGENICIDADE RELACIONADA A DIVERSIDADE GENÉTICA DO FITOPATÓGENO <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ASSOCIADO À CULTURA DO MELOEIRO.....	51
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
2.1 Descrição do Material fúngico.....	54
2.2 Patogenicidade.....	55
2.3 Cultivo dos isolados e Extração de DNA.....	56
2.4 Diversidade Genética.....	57
2.4.1 Análise com Marcadores ISSR.....	57
2.4.2 Análise com Marcadores RAPD.....	59
2.2 Análises de dados.....	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4. CONCLUSÃO.....	70
5. REFERÊNCIAS.....	71

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça que possui larga escala de consumo mostrando representatividade no mercado nacional, bem como, no mercado mundial. Europa, Japão e Estados Unidos se caracterizam como seus principais consumidores internacionais. O Brasil, popularmente possui apreço ao fruto, com característica cultural de consumo em todo território nacional (SALVIANO et al., 2017).

O meloeiro se destaca como uma das frutíferas nacionais de intenso volume de exportação, concentrando seu nível máximo de produção nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (ANUÁRIO HORTIFRUT BRASIL, 2020). A atividade melinocultura exerce grande importância socioeconômica, uma vez que proporciona aos estados produtores, geração de emprego e renda (COSTA, 2020).

O sucesso de cultivo dessa oleorícola nessas regiões são disposições relacionadas a sua capacidade de adaptação ao clima predominante no Nordeste Brasileiro (SILVA; COSTA, 2020). Altas temperaturas, luminosidade adequada, e utilização de demanda tecnológica por empresas do setor, contribuem para produtividade do fruto (SILVA, 2020).

A alta demanda produtiva e o cultivo contínuo faz com que haja atualmente o aparecimento de doenças com vasta gama de origens, podendo ter causas microbianas, fisiológicas, nutricionais ou ambientais. Todavia, as primeiras atingem diretamente o produtor, visto que, ocorrem pela abundância de agentes patogênicos habitantes do solo (MEDEIROS et al., 2015).

Alguns fungos são responsáveis por causar danos a cultura, rotineiramente são observadas doenças do tipo declínio de ramas, colapso ou morte súbita, e podridão radicular, que apresenta frequência de aparições, relatos consideravelmente em todas as áreas de cultivo e quantidade de patógenos responsáveis por essa enfermidade (ARAÚJO et al., 2021; PORTO et al., 2019).

Sua sintomatologia típica possui o aparecimento de clorose e necrose em folhas basais. Em plantas acometidas, é possível observar em seu sistema radicular a inexistência de raízes secundárias e radiceais, bem como, atrofia de áreas afetadas. Uma vez que o ataque esteja em fase mais evoluída, o colo da planta pode ser acometido (TERAO et al., 2008).

Podridões radiculares podem ocorrer no início do desenvolvimento da plântula. Geralmente, se inicia a partir do solo, ocasionando podridões de raízes, tombamento de mudas e cancos no colo e caule. Além disso, pode ocorrer podridões em frutos em algumas culturas. A ocorrência e nível de severidade do ataque estão relacionadas às condições em que o solo se encontra (SILVA, 2015).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon & Maublan é um fungo particularmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, e está sendo relatado com frequência causando podridão de raiz em algumas culturas, sendo observado um aumento na quantidade de hospedeiros que ele atinge, bem como na agressividade das doenças. Em alguns relatos de estudos conduzidos em casa de vegetação, esse fungo causou morte de plantas de meloeiro (FREIRE et al., 2004) e podridão de frutos de melão na Tailândia (SUWANNARACH et al., 2019).

Sabendo da importância nacional que a cultura do melão possui, principalmente para o nordeste brasileiro, faz-se necessário, pesquisas que viabilizam a identificação do correto agente casual para utilização de controle fitossanitário de culturas. Atrelado a isso, estão às pesquisas de cunho genômico, que proporcionam compreensão dos organismos a nível molecular e estudos sobre a interação do patógeno com seu hospedeiro. Dessa maneira, é imprescindível a utilização de sequenciamento e marcadores moleculares para identificação e estudo das variações genéticas que ocorrem entre os indivíduos, como no caso de fungos. Ainda, o entendimento da sua virulência quanto ao ataque a espécie vegetal, torna-se crucial para propiciar seu controle (PEREIRA et al., 2018; TICO et al., 2019).

É de grande relevância o estudo de métodos capazes de inferir respostas de plantas, relacionadas à sua resistência, direcionando medidas de controle e melhoramento, em virtude de se reduzir os danos ocasionados. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi identificar o novo agente causador de podridão de raiz em meloeiro, bem como, avaliar sua patogenicidade e verificar sua variabilidade genética.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA CULTURA

O meloeiro é uma espécie de diversidade genética desconhecida (OLIVEIRA et al., 2017), com origem não bem definida, teorias existentes indicam que seu cultivo primário teve início na África Tropical, prosseguindo para Ásia Tropical, e estabelecendo-se como centro secundário na Índia, de onde avançou as demais regiões do mundo (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1998). Segundo Charles Naudin, botânico francês, os melões existentes são diversidades botânicas de *Cucumis melo*. Então, pertencem ao gênero *Cucumis*, com subtribo Cucumerinae e tribo Melothrieae. A subfamília caracteriza-se como Cucurbitoideae e a família Cucurbitaceae, na qual a espécie é *Cucumis melo* L. (OLIVEIRA et al., 2017).

A espécie *Cucumis melo* se caracteriza como planta anual e perene na natureza, com poucas raízes em seu sistema radicular. Seu fruto é uma baga carnuda (pepônio), podendo ser alongado e oval com variações de aspecto, tamanho e cor. Seu peso está em torno de 0,6 a 2,5 kg em média, dependendo da cultivar. É considerado botanicamente uma hortaliça, porém, sua comercialização ocorre como fruta (OLIVEIRA et al., 2017), com cultivo em inúmeras áreas, possui mundialmente importância e popularidade (KIST, et al., 2018). Sua colheita geralmente ocorre entre os meses de setembro e março, porém, há condições de produzi-lo por todo ano. Essa particularidade traz vantagens aos produtores brasileiros quando comparado aos outros países, devido ao período de entressafra (ORTH, 2014).

O cultivo do melão no Brasil, é voltado principalmente ao grupo Inodorus, que se caracteriza pelo tipo amarelo. Outros tipos de melões como Cantaloupe, Gália, Pele de Sapo e Charentais possuem capacidade para expandir a produção, principalmente no mercado europeu (SALVIANO et al., 2017). Economicamente, essa cultura é amplamente importante para o país, pois seu plantio dá-se em quase todos os estados por meio da agricultura familiar, e de grandes produtores, apresentando distintos sistemas de produção (OLIVEIRA et al., 2017). A produção para exportação acontece próximo de sua totalidade pela região Nordeste (LANDAU et al., 2020), onde o mercado Europeu é o principal destino das exportações, tendo como principais países importadores, Holanda,

Espanha e Reino Unido (ANUÁRIO HORTIFRUTI BRASIL, 2020).

2.2 IMPORTÂNCIA DO MELÃO PARA REGIÃO NORDESTE

A atividade de melinocultura no Nordeste teve início com a implantação de polos de irrigação, criados a partir de incentivos públicos e privados com o propósito de produzir frutas para exportação. Atualmente, os estados brasileiros com maior produção de melão são o Rio Grande do Norte e Ceará, responsáveis pela condição do país de grande exportador ao mercado exterior (MEDEIROS, 2021). Um dos fatores para o sucesso no monopólio de produção na região Nordeste, está atrelado a condições edafoclimáticas favoráveis à produção do fruto. Tais como, temperaturas adequadas, luminosidade e insolação, baixa umidade relativa do ar e condições de solos férteis. Isso se demonstra através de sua contribuição, com cerca de 95% de toda produção nacional nacional (FIGUEIRÊDO; GONDIM; ARAGÃO, 2017). Em virtude de possuir ciclo reduzido (60 dias), é capaz de competir com grandes países como Espanha e França, uma vez que esses possuem ciclo maior (120 dias). Assim, é possível se ter até três safras ao ano, o que se torna um fator estratégico para economia nacional (FIGUEIRÊDO; GONDIM; ARAGÃO, 2017).

Além das condições de cultivo, as exportações de melão cearense e potiguar se intensificaram devido a modernização da infraestrutura hídrica, o que aumentou a cadeia de produtividade (PENHA; ALVES, 2018). O vale Jaguaribe-Açu, se qualifica como principal polo produtor e exportador de melão do Nordeste. Este, envolve a participação do município de Mossoró, localizando-se na divisa dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, com produção de aproximadamente 467 mil toneladas por ano. O segundo maior polo, é o Vale do Submédio São Francisco, com localização entre os estados da Bahia e Pernambuco com produção próxima a 64 mil toneladas por ano (FIGUEIRÊDO; GONDIM; ARAGÃO, 2017). De acordo com os dados do sistema Agrostat do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2019), é possível identificar a relevância desses polos para a economia do país, em virtude de estarem à frente do cultivo nacional, como indica o fluxo de produção e exportação dos quatro principais estados, pois, trata-se de uma relevante fonte de movimentação financeira.

2.3 FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO MELÃO

O meloeiro possui algumas características principais como rápido crescimento, boa variabilidade genética, fácil adaptação de plantio e alto potencial produtivo. Em manejo adequado, há condições de se ultrapassar 30 toneladas por hectare. Entretanto, esse rendimento pode ser afetado por múltiplas causas, dentre elas, estão, as relacionadas a fatores edafoclimáticos, genéticos e biológicos (ANDRADE et al., 2004).

Ao longo da sua produção, é vulnerável a inúmeras doenças de ascendência fúngicas. Na região nordeste do Brasil, os principais fungos causadores de colapso são *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* Snyder e Hansen, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Grif. E Maubl. *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker, *Myrothecium roridum* Tod e *Rhizoctonia solani* (Kühn), *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (MEDEIROS et al., 2015). Essa diversidade de microrganismos causadores de doenças em espécies vegetais, são chamados de fitopatógenos e atuam na redução da produção do fruto, causando aumento de custos para o seu controle (MUCHERO et al., 2011).

Doenças fúngicas possuem um padrão sintomatológico em espécies vegetais, as que estão associadas ao melão, é comum observar podridões de sementes e raízes, tombamento de plântulas de pré e pós-emergência, infecções pós-colheita, murchas e cancrios em caules. Uma vez que esses microrganismos estão habitando o solo, dificilmente o produtor consegue elimina-los, devido a capacidade de sobrevivência em resíduos, competição saprofítica e a formação de estruturas de resistência (CORREIA; MICHEREFF, 2018). Os fungos do gênero *Lasiodiplodia* são considerados patógenos economicamente importantes em razão dos distintos tipos de patologias que podem exercer em plantas e a diversidade de hospedeiros que podem acometer. Doenças em raízes, colo, coroa, turbéculos, podridões e manchas são observadas em um grande número de diferentes culturas (TIWARI et al., 2021).

2.4 ASPECTOS GERAIS E PATOGENICIDADE DE *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae é fungo pertencente ao filo Ascomycota, de caráter cosmopolita e oportunista, com perfil polígrafo, é capaz de acometer por volta de 500

espécies vegetais (SOUZA; SANTOS; VITÓRIA, 2021). Sua morfologia dispõe de picnídios pretos e globosos que medem até 5 mm de largura, que se rompe quando maduro, mediante hospedeiro. Seus conídios são inicialmente hialino e asseptado, com variação de formas subovoides a elipsoide-ovóide, e cor marrom-escuro após seu amadurecimento. As paráfises são hialinas, com forma cilíndrica e septada, podendo ou não ser ramificada de extremidades boleadas. Em média, essas possuem comprimento de até 55 μm e largura de 3-4 μm (AMARAL, 2019).

Lasiodiplodia theobromae é um fungo com capacidade de colonização despercebida em tecidos de plantas, uma vez que ele pode não exibir sintomas de infecção. Desse modo, observou-se a disseminação de doenças em frutíferas tropicais, provocadas por ele, mediante a baixas ao sistema produtivo e pós-colheita, tornando-se uma real ameaça à fruticultura no Nordeste. Nesse sentido, houve aumento na quantidade de hospedeiro acometidos, gravidade de sintomas e severidade de ataque (LIMA et al., 2013).

Em geral, plantas com presença de sua infecção, exibem crescimento atrofiado, clorose foliar, cranco do tronco ou ramos laterais, morte de brotos, esporões em ramos laterais e cânceres, podendo ser agravado por condições que diminuem o vigor da planta (RUSIN et al., 2020). Com aptidão na infecção de frutos, esse patógeno consegue eficientemente se propagar através de sementes (SOUZA; SANTOS; VITÓRIA, 2021).

Atualmente, são encontrados em todo mundo relatos sobre a presença de espécies de *L. theobromae* associados a diferentes hospedeiros. Evidências desse tipo, confirmam sua distribuição comopolita (NA WU et al., 2021). Em um estudo realizado por Tiznado et al., (2018), *L. theobromae* foi isolado e identificado em associação a frutos de Jaca. Fischer et al., (2017) confirmou sua existência em plantas de macadamia. Suwannarach et al., (2019) observou *L. theobromae* causando podridão pós-colheita em frutos de melão.

2.5 ANÁLISES MOLECULARES

2.5.1 Caracterização Filogenética Molecular

Técnicas moleculares são empregadas com o intuito de detectar e caracterizar fungos fitopatogênicos. Para isso, é necessário a utilização de marcadores moleculares que permitam o estudo de organismos a partir de suas relações evolucionárias (SANTOS, 2017). Sequências de nucleotídeos da região espaçador transcrito interno do rDNA (ITS) apresentam dados importantes sobre a taxonomia e filogenia para as espécies pertencentes

ao *Botryosphaeria*, toda via, a associação a outros genes como por exemplo EF1- α e β – tubulina mantem maior sucesso e confiabilidade na elucidação de relações filogenéticas (MARQUES, 2013). A utilização dos *primers* ITS 1 e ITS 4 possibilita a identidade taxonomica de isolados fúngicos com a amplificação des sequências de isolados de *Lasiodiplodia* sp. (MELO, 2014).

2.5.2 Diversidade Genética

De acordo com Neto et al., (2019), denomina-se diversidade genética como presença de variabilidade no arranjo de genes entre alelos e populações, procedências ou demais grupamentos. Sua importância está relacionada na determinação de métodos que possibilitem manter o germoplasma de quaisquer espécies. Nesse contexto, diversas técnicas moleculares podem ser aplicadas na avaliação da diversidade fúngica (MAIA, 2019).

São utilizados nesse tipo de estudo essencialmente, quatro tipos de marcadores moleculares, sendo eles os morfológicos, bioquímicos, citológico e moleculares. Diferentes tipos de marcadores baseados em DNA são uteis para se estudar a variabilidade genética de organismos vivos. Dentre estes, podemos mencionar os marcadores ISSR (*Inter-simple sequence repeats*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Marcadores ISSR

O marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é uma técnica que baseia-se em PCR (ZIETKIEWICZ; RAFALKI; LABUDA, 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Sua amplificação consiste no desempenho de um único *primer*, compondo-se de várias repetições (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017). Sendo assim, o próprio microssatélite. Geralmente com 16 a 25 pb de comprimento (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002) este dispõe de 2 a 4 nucleotídeos arbitrários (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017). Sua amplificação têm início na mesma posição de nucleotídeo, em cada ciclo, devido a ancoragem de sequências de iniciadores, com sequências não repetidas (ZIETKIEWICZ; RAFALKI; LABUDA, 1994). O resultado das amplificações consiste na visualização destes, em gel de agarose e/ou poliacrilamida (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017).

Este tipo de marcador não necessita de prévio conhecimento da sequência alvo, sendo capaz de ser aplicado em espécies não-modelos. Apresenta predominantemente como vantagem, o fato de não possuir etapas longas de alto custo (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017). Além disso, deve-se destacar sua capacidade de cobrir amplamente o

genoma, bem como, realizar simultaneamente análises de um extenso número de locos por ensaio (BORNET; BRANCHARD, 2001). A utilização de marcadores ISSR proporciona aos germoplasmas realizar sua identificação e caracterização com um parecer efetivo da diversidade genética em nível inter e intrapopulacional (BORGES, 2015).

A técnica de ISSR é empregada em programas de melhoramento genético com associação de técnicas clássicas, atreladas a ferramentas biotecnológicas (SILVA, 2015). Assim, sua utilização possibilitará análise da diversidade genética para isolados *L. theobromae*, permitindo gerar um perfil polimórfico de bandas características e a dissimilaridade genética da espécie. Portanto, pode-se inferir que o uso desse marcador atrelado aos marcadores RAPD, permite a obtenção de resultados satisfatórios para uma análise eficaz de diversidade genética.

Marcadores RAPD

O marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma ferramenta bastante utilizada para análise dos mais diferentes microrganismos presentes em ambientes. A amplificação dos fragmentos não específicos do DNA, é a base para esta técnica, utilizando através da PCR um iniciador, pelo qual caracteriza-se como um oligonucleotídeo, este possui entre 10 a 15 pares de bases de sequência arbitrária e 60% de conteúdo GC (SILVA; PINHATI, SILVA, 2015). O RAPD consiste em uma técnica não radioativa e por necessitar de baixa quantidade de DNA (15-25 ng). Os polimorfismos são detectados de variação na sequência, e ocorrem em locais de anelamento do *primer*, bem como, na variação de comprimento da sequência alvo, localizada em pontos ligação do *primer* (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017). Ele apresenta alta praticidade e custo relativamente inferior em comparação a outros marcadores (SILVA; PINHATI, SILVA, 2015).

Algumas vantagens podem ser ressaltadas sobre a técnica, como simplicidade, uma vez que a mesma pode ser executada em poucas horas. Além disso, pode-se obter grande quantidade de marcadores dispostos ao longo do genoma (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017). Uma outra notoriedade importante que deve ser mencionada, é o fato de não necessitar previamente de conhecimento sobre a sequência alvo em estudo (SILVA; PINHATI, SILVA, 2015). Para tanto, vale ressaltar suas limitações. Em muitos casos, baixa reprodutibilidade e comportamento dominante do marcador (TURCHETTO-ZOLE et al., 2017). Porém, apesar da técnica possuir algumas deficiências sobre

reprodutibilidade, a mesma é empregada na identificação de diferenças tanto em populações como em espécies (CORDEIRO et al., 2019).

3. REFERÊNCIAS

AGROSTAT. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA**, 2019. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em 13 mai. 2020.

AMARAL, D. D. **Podridão por *Lasiodiplodia theobromae* em morango: epidemiologia e manejo alternativo**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia/ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2019. 82p.

ANDRADE, E. G. T.; MICHEREFF, S. J.; BIONDI, C. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; SALES JR. R, Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v.31, p.327-333, 2004.

ANUÁRIO HORTIFRUTI BRASIL, 2020. Anuário Hortifruti Brasil. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/melao-cepea-balanco-das-exportacoes-da-safra-2019-20-e-positivo.aspx>. Acesso em: 6 jan. 2022.

ARAÚJO, M. B. M., MOREIRA, G. M., NASCIMENTO, L. V., NOGUEIRA, G. A., NASCIMENTO, S. R. C., PFENNING, L. H., AMBRÓSIO, M.M.Q. Fusarium rot of melon is caused by several *Fusarium* species. **Plant Pathology**, v.70, p.712–721, 2021.

BORGES, ARTEMISA NAZARÉ COSTA. **Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium spp.*) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015. p.102.

BORNET, B., BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter.**, v.19, p. 209–215, 2001.

BRANDÃO FILHO, J. V. T.; VASCONCELLOS, M. A. S. A. Cultura do meloeiro. In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. (Ed.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: Fundação Editora da UESP, 1998. Cap. 6, p. 161-193.

CORDEIRO, G.; CUNHA. M. S.; SILVA, C. R.; JORGE, I. R.; DERGAM, J. A.; FERREIRA, P. S. F. Molecular identification of three species of *Oncideres* (Coleoptera: Cerambycidae) using RAPD markers. **An. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro, v.91 n.3, 2019.

CORREIA, K. M.; MICHEREFF, S. J. **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. EDUFRPE, Recife, 1 ed. 208 p.: il. ISBN 978-85-7946-321-1, 2018.

COSTA, TALISON EUGÊNIO. **Análise genômica, proteômica e de patogenicidade de isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* associada ao meloeiro**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/ Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2020. 51p.

FIGUEIRÊDO, M. C. B.; GONDIM, R. S.; ARAGÃO, F. A. S. **Produção de melão e mudanças climáticas: Sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1074500?mode=full>. Acesso em 13 mai. 2020.

FISCHER, I. H., PERDONA, M. J., CRUZ, J. C. S. & FIRMINO, A. C. First report of *Lasiodiplodia theobromae* on *Macadamia integrifolia* in Brazil. **Summa Phytopathol**, v.43, n.1, p.70-70, 2017.

FREIRE, F. C. O., VIANA, F. M. P., CARDOSO, J. E., SANTOS, A. A. (2004). Novos Hospedeiros do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. *Embrapa Agroindústria Tropical*, Comunicado Técnico, 91, 1-6. Acesso em: 26 de dezembro de 2021, em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/422570>

KIST, Benno Bernardo. **ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2018: Brazilian Horti & Fruit Yearbook**. Editora Gazeta - Santa Cruz do Sul. p. 76-77. 2018. Disponível em: http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2018/04/FRUTICULTURA_2018_dupla.pdf. Acesso em 11 mai. 2020.

LANDAU, E. C. et al. Evolução da produção de melão (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae). Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE), 2020.

LIMA, J.S.; MOREIRA, R.C.; CARDOSO, J.E.; MARTINS, M.V.V.; VIANA, F.M.P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.2, p.81-88, 2013.

MAIA, LÍVIA KARLA REMÍGIO. **Identificação de fungos associados a plantas de mangues no estado do Ceará**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia)/ Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2019. 100p.

MARQUES, Marília Wortmann. **Identificação e caracterização de espécies de Botryosphaeriaceae na cultura da mangueira no nordeste do Brasil**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Fitopatologia/ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2013. 87p.

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**, v. 41, n. 4, p. 281-268, 2015.

MEDEIROS, RAQUEL ALVES. **Otimização e simulação do processo de secagem de sementes de melão (*cucumis melo* L.) usando modelos matemáticos empíricos e difusivos**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Ciências Naturais e Biotecnologia/ Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, PB, 2021. 98p.

MELO, JOSÉ GLAUBER MOREIRA. **Análise molecular e proteômica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a fruteiras tropicais**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2014. 88p.

MUCHERO, W.; EHLERS, J.D.; CLOSE, T.J.; ROBERTS, P.A. Genic SNP markers and legume synteny reveal candidate genes underlying QTL for *Macrophomina phaseolina* resistance and maturity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **BMC Genomics**, n.12, v.8, 2011.

NA WU, DISSANAYAKE, A. J., THILINI CHETHANA, K.W., HYDE, K. D. & LIU, JIAN-KUI. Morpho-phylogenetic evidence reveals *Lasiodiplodia chiangraiensis* sp. nov. (*Botryosphaeriaceae*) associated with woody hosts in northern Thailand. **Phytotaxa**, v. 508, n.2, p.142–154, 2021.

NETO, J. X. A.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; SILVA, A. P. G. Diversidade genética entre e dentro de populações de feijão-bravo (*Capparis flexuosa* L.) usando marcadores RAPD. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 32, n. 1, p. 81–91, 2019.

ORTH, CAMILA FLORES. **Perfil Exportador de Melões Brasileiros 2014**. Brasília - DF: ApexBrasil 2014. Disponível em:<http://www.apexbrasil.com.br/Content/imagens/5f2491d6-2c2a-4901-b940-3aa594ba69e5.pdf>. Acesso em 11 mai. 2020.

OLIVEIRA, F. I. C.; NUNES, A. C.; SILVA, F. D.; SILVA, G. T. M. A.; ARAGÃO, F. A. S. **Produção de melão e mudanças climáticas: Sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1074500?mode=full>. Acesso em 11 mai. 2020.

PENHA, THALES; ALVES, HELDERLANE. O Desempenho das Exportações do Melão Potiguar e Cearense: uma análise de constant market share. **Revista de Estudos Sociais**. Cuiabá – MT. v. 20, n. 41, p. 233-256, 2018.

PEREIRA, M. N., CONCEIÇÃO, R. B., CRUZ, J. C. S., DE ANDRADE, M. C. N. Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Thielaviopsis paradoxa*. **Ambiência**, v.14, n.3, p.513-521, 2018.

PORTO, M. A. F., AMBRÓSIO, M. M. Q., NASCIMENTO, S. R. C., CRUZ, B. L. S., TORRES, T. M. Interação de *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctoniasolani* como patógenos da podridão radicular de *Cucumis melo*. **Summa Phytopathologica**, v.45 n.4, p.355-360, 2019.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR)

polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands. 128: 9-17.

RUSIN, C.; CAVALCANTI, F. R.; LIMA, P. C. G. DE; FARIA, C. M. D. R.; ALMANÇA, M. A. K.; BOTELHO, R. V. Control of the fungi *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback, in cv. syrah grapevines. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 43, n. 1, p. e44785, 2020.

SALVIANO, A. M. et al, 2017. **A cultura do melão**. 3. ed. – Brasília, DF: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/165362/1/PLANTAR-Melao-ed-03-2017.pdf>. Acesso em 18 mai. 2020.

SANTOS, PEDRO HENRIQUE. **Patogenicidade e caracterização morfomolecular de fungos botriosphaeriaceos associados ao coqueiro e filogeografia de *Lasiodiplodia theobromae***. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal/ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2017. 86p.

SILVA, R. G.; PINHATI, F. R.; SILVA, J. T. **Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial**. *Revista da Biologia*. São Paulo, v. 14, n.1, 2015.

SILVA, SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO. **Estudo de diversidade genética e efeito inibitório do látex de *Calotropis procera* em fungos fitopatogênicos**. f. Dissertação de Mestrado. , Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia/Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015. 95p.

SILVA, SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO. **Análise filogenética e reação de genótipos de meloeiro à linhagens do complexo de espécies *Fusarium solani***. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia/ Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN. 2020. 56p.

SOUZA, J. S.N., SANTOS, M. A. L. VITÓRIA, N. S. Registro de *Lasiodiplodia theobromae* Em frutos abortados de coqueiro no sertão da Bahia, Brasil. **Agrotropica**, v. 33 n.1 p.49-54, 2021.

SUWANNARACH, N., KHUNA, S., KUMLA, J., TANRUEAN K., LUMYONG, S. First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Fruit Rot on Melon (*Cucumis melo*) in Thailand. **Plant Disease**, v.4 n.1, p.280-280, 2019.

TERAO, D.; VIANA, F. M. P.; GUIMARÃES, J. A.; AZEVEDO, F. R.; AMORIM, S. G. **Manejo integrado de doenças do meloeiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; Banco do Nordeste do Brasil, 2008. cap.18, p.207-225. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/160832/manejo-integrado-de-doencas-do-meloeiro>. Acesso em 12 mai. 2020.

TICO, B. M.; SILVA, H. F.; SILVA, E. C.; SILVA, G. R; NASCIMENTO, L. C. Óleos essenciais no controle do *Fusarium* sp. da cana de açúcar *in vitro*. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v.7, n. 3. p. 70-79, 2019.

TIWARI, B., KIRAN, R., KUMAR, P., SADHNA, A. K., AKHTAR, J., DUBEY, S. C. *Lasiodiplodia theobromae*, a potential post-harvest threat to agri-horticultural crops and its morpho-molecular diversity. **Indian Journal of Plant Protection** v. 49 n.2, p.125-130, 2021.

TIZNADO, M. LA. M., ESQUIVEL, G. L., CAMPOS, O. J. C., GUERRERO, L. G. R., VELASCO, C. L. *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de la pudrición blanda de frutos de *Artocarpus heterophyllus* Lam. en Nayarit, México. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.40, n.5, p1-5, 2018.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto, 2017.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20: 176-183, 1994.

CAPÍTULO II

ANÁLISE PATOGÊNICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR E FILOGENÉTICO DO FITOPATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* ASSOCIADO À CULTURA DO MELOEIRO

RESUMO. Podridão radicular é uma doença causada por diversos patógenos e que acomete plantios de melão no Nordeste do Brasil. Devido também à semelhanças dos sintomas apresentados pela maioria dos patógenos radiculares, o manejo da doença não ocorre de modo adequado. Com isso, ocasiona conflito na remediação fitossanitária, acarretando prejuízos econômicos ao produtor e implicações à produção e exportação do fruto. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de identificar o novo agente casual de podridão de raízes em plantios comerciais de melão, no Brasil. Dez isolados de *Lasiodiplodia* sp. foram isolados de plantas sintomáticas em diferentes áreas produtoras de melão do Rio Grande do Norte, Brasil. Todos os isolados foram testados quanto à patogenicidade através do método do palito tipo de “dente” utilizando melão amarelo. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação em duplicata, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 11 tratamentos e 6 repetições, sendo uma planta por vaso. Os primeiros sintomas foram observados quatro dias após a inoculação das plantas. Todos os isolados se mostraram patogênicos em relação ao meloeiro. O isolado LT 03 se mostrou mais agressivo e o LT 08, o menos agressivo. Após a confirmação da patogenicidade, os isolados foram sequenciados e suas sequências depositadas no GenBank, onde todos os isolados apresentaram 100% de similaridade ao isolado *L. theobromae*. A construção de uma árvore filogenética permitiu verificar que todos os isolados ficaram no clado de *L. theobromae*, pertencendo a uma única espécie. Portanto, foi comprovado que *L. theobromae* é um patógeno causador de podridão radicular em plantios comerciais de *Cucumis melo* L. no Brasil.

Palavras-chave: *Cucumis melo*, patogenicidade, doenças radiculares.

CHAPTER II

PATHOGENIC ANALYSIS AND MOLECULAR AND PHYLOGENETIC DIAGNOSIS OF THE PHYTOPATHOGEN *Lasiodiplodia theobromae* ASSOCIATED WITH MELON

ABSTRACT: Root rot is a disease caused by several pathogens that affects melon producing fields in Northeastern Brazil. Because of similar symptoms caused by most root pathogens, the disease management does not occur properly. As a result, phytosanitary remediation became difficult, causing economic losses to producers, thus impairing fruit production and export. This study aimed to identify the new causal agent of root rot in melon in producing fields of Brazil. Ten *Lasiodiplodia theobromae* isolates were isolated from symptomatic plants in different melon producing fields of Rio Grande do Norte, Brazil. All the isolates were tested for pathogenicity by the toothpick infestation method in Yellow melon. The experiment was carried out in duplicate in a greenhouse, with 11 treatments and 6 replicates in a completely randomized (DIC) design, with one plant per pot. The first symptoms were observed four days after plant inoculation. All the isolates were pathogenic to melon. The isolate LT 03 was the most aggressive while LT 08 was the least aggressive. After pathogenicity was confirmed, the isolates were sequenced and their sequences were deposited in GenBank, showing 100% similarity to *L. theobromae*. The phylogenetic tree showed that all the isolates were arranged into the *L. theobromae* clade, thus belonging to the same species. Therefore, *L. theobromae* was confirmed as the causal agent of root rot in *Cucumis melo* L. in producing fields of Brazil.

Keywords: *Cucumis melo* L., pathogenicity, root disease.

1. INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma curcubitácea apreciada em todo mundo (NASCIMENTO et al., 2018) , onde o Brasil se encontra no ranking dos 15 maiores produtores mundiais do fruto (FAO, 2020). Durante o cultivo, essa cultura sofre com múltiplas questões que podem afetar diretamente seu plantio. Doenças de diversas origens limitam seu crescimento por meio de incidência microbiana (TERAO et al., 2019).

Patologias de colo e sistema radicular causam preocupação aos produtores de melão por serem frequentemente relatadas em regiões produtoras de cucurbitáceas (TERAO, et al., 2019). Desse modo, a região Nordeste se torna uma zona atrativa à proliferação de fitopatógenos, em razão de haver constante ampliação de áreas de produção a cada ano. Além disso, dispõe de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de diversos microrganismos (SALES JR. et al., 2019).

Patógenos fúngicos como *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker são relatados em áreas de intensa produção de melão (SALES JR. et al., 2019). Eles atuam danificando o sistema radicular da planta, o que pode acarretar danos em raízes de menor tamanho e com funções específicas à sua vitalidade (NASCIMENTO et al., 2018).

O manejo desses microrganismos se torna algo complexo devido a capacidade que muitos possuem de sobrevivência em solos e/ou em resíduos de colheitas, por indeterminados períodos de tempo, em virtude de exibirem estruturas de características resistentes que auxiliam em sua permanência no ambiente (NASCIMENTO et al., 2018).

Algumas práticas de controle são utilizadas para condicionar a aparição de doenças radiculares. Em áreas de tamanho pequeno, indica-se a utilização de esterilização do solo, toda via, seu uso fica limitado aos pequenos produtores. Rotações de culturas são preferíveis para áreas maiores, embora, não possuem eficácia completa, já que muitos fungos de competição saprofítica possuem um número extenso de hospedeiros (NASCIMENTO, 2015).

Um outro fator que dificulta a correta diagnose das doenças, é as semelhanças expressadas pela maioria dos fitopatógenos radiculares, causando confusão devido aos sintomas apresentados. Quando não se há um plano de manejo eficiente, essas doenças

acarretam diminuição de produtividade do plantio e frutos de baixa qualidade (SALVIANO et al., 2017).

A utilização de técnicas moleculares como o sequenciamento são opções em potencial para estudos envolvendo genômica estrutural e funcional de microrganismos e plantas, pois possibilitam a reconstrução filogenética desses indivíduos, que podem ter seus representantes em diferentes territórios geográficos (CARVALHO; SILVA, 2010; LUZINE, 2013).

Estudos filogenéticos de fungos apontam a especificidade de suas relações. A construção de árvores filogenéticas possibilita determinar com exatidão a filogenia do microrganismo. Dessa forma, é possível observar suas relações evolutivas e sua identificação a nível de espécie (LUZINE, 2013).

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a patogenicidade e confirmar através de sequenciamento de DNA e filogenia, o novo agente casual de podridão de raízes em plantios comerciais de melão, coletados de diferente áreas de produção, no estado do Rio Grande do Norte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem e isolamento

Foram coletados dez isolados de *Lasiodiplodia* sp. de plantas de meloeiro com sintomas de podridão radicular da variedade comerciais Amarelo e Cantaloupe, em diferentes áreas produtoras no estado do Rio Grande do Norte durante a safra de 2019 e 2020. As amostras vegetais foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia I da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizado no município de Mossoró-RN. Onde foram mantidos em câmara úmida para posterior isolamento.

O isolamento fúngico foi realizado a partir do método indireto, em que fragmentos de amostras selecionadas foram inicialmente desinfestados superficialmente em álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio 0,5 % (1 min) e enxaguados em água estéril (CAROLLO; FILHO, 2016). O plaqueamento dos fragmentos foi realizado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com adição de tetraciclina (0,05g/L). As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C, durante 7 dias para o cultivo e obtenção das culturas puras. Em

Culturas de conídio único foram preparadas seguindo o método de Castellani (1939), e preservadas na Coleção Micológica do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFERSA.

2.2 Análise morfológica

Após a obtenção de culturas puras, a análise das características morfológicas foi realizada através da utilização de microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. Os picnídios foram dissolvidos em água destilada, e a solução de esporos foi posta em uma lamínula, seca em estufa durante 1 h por 30 °C. Suas estruturas foram verificadas conforme (Pat) Griff. & Maubl. e o tamanho médio de 500 conídios foram medidos conforme (YILDIZ et al., 2014).

2.3 Patogenicidade

O ensaio de patogenicidade foi conduzido em casa de vegetação, no Centro de Ciências Agrárias da UFERSA em duplicata, no período de outubro a dezembro de 2021, em que utilizou-se o método de inoculação com palito de madeira “do tipo palito de dente” (YILDIZ et al, 2014). Foram utilizadas sementes de melão da cultivar Goldex Yellow, o delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com 11 tratamentos e 6 repetições, sendo uma planta por vaso. Cada tratamento representou um isolado de *Lasiodiplodia* sp., e o grupo controle.

Para a inoculação das plantas, utilizou-se o método do palito, que consistiu no uso de pontas de palitos de dente voltadas para cima inseridas em papel filtro, e esterilizadas em placa de Petri a 121 °C, durante 30 minutos. Posteriormente, verteu-se o meio de cultura BDA em cima dos palitos. Após a solidificação do meio de cultura, seis discos fúngicos de cada isolado (0,5 cm) foram distribuídos na placa de Petri. Os isolados foram mantidos em estufa tipo D.B.O a 28 ± 2 °C, durante dez dias para a completa colonização dos palitos. Para o grupo controle, utilizou-se apenas os palitos em meio de cultura BDA (NOGUEIRA et al., 2019) (Figura 1).

A inoculação das plantas ocorreu 15 dias após a semeadura (Figura 2). A avaliação da severidade da doença se deu aos 50 dias após a inoculação, utilizando a escala de notas proposta por Ambrósio et al. (2015), em que: 0 = sem sintoma; 1 = 3 % de tecidos infectados; 2 = 10 % de tecidos infectados; 3 = 25 % de tecidos infectados; 4 = 50 % de

tecidos infectados; e 5 = planta morta. A normalidade dos dados foi testada e os valores foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias dos valores da severidade da doença foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), usando o R software estatístico v. 3.6.1 (R Core Team, 2019).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 1 - Preparo do inóculo. Pontas de palitos de dente voltadas para cima inseridas em papel filtro na placa de Petri contendo meio BDA (a). Discos fungicos de cada isolado depositados nas placas de Petri contendo meio BDA (b). Placas totalmente colozidas com os isolados de *Lasiodiplodia* sp. após serem mantidas em estufa B.O.D (c).



Figura 2 – Processo de inoculação das plantas após 15 dias de semeadura. Representação da inoculação do grupo controle com palito em meio BDA (a). Representação da inoculação dos tratamentos com palito colozinado com isolados de *Lasiodiplodia* sp.

2.4 Extração de DNA

Após a confirmação quanto a patogenicidade, o DNA genômico dos fungos isolados foi extraído seguindo o protocolo SDS (Smith et al. 2001), com modificações. Os 10 isolados de *Lasiodiplodia* sp foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) + tetraciclina (0,05g/L) em placa de Petri, mantidos em estufa tipo D.B.O a 28 ± 2 °C, por ± 7 dias até o total desenvolvimento das colônias (CASTELLANI, 1939). O micélio foi macerado com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana até a obtenção de um pó fino, sendo transferido para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração SDS [SDS 10%; Tris-HCl 1 M pH 8,0; NaCl 5 M; EDTA 0,20 M; CTAB 7%; PVP 1%; β -mercaptoetanol 2% e água ultrapura q.s.p] aos tubos nos quais foram incubados em banho termostático a 60° C por 40 minutos. Ao fim da etapa, realizou-se a separação de fases com clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado álcool isopropílico incubado a -20°C por ± 12 horas. Os tubos passaram por lavagens, em álcool 70% e 90%, respectivamente. O pellet obtido foi ressuspensão em solução de RNase (10 μ g/mL) (Ludwig Biotec, Brasil). A integridade e quantificação das amostras foi verificada em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), utilizando-se 1g de agarose para cada 100 mL de solução TBE (Tris Borate Edta), submetido à eletroforese a 120V por 30 minutos, visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV.

2.5 Amplificação das sequências

Para a amplificação das sequências, fragmentos de genes específicos para a região altamente variável espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA fúngico foram amplificados pelo método de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). A região ITS do fungo isolado foi amplificada usando os primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). A amplificação por PCR foi realizada em 20 μ l de volume final contendo Buffer 1X, 0,2 mM de dNTP, 1U de Taq DNA polimerase, 5 uM de cada iniciador (Genewiz) e 30 ng de cada DNA em termociclador de DNA (Amplitherm), consistindo em uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C

por 1 min e 72 °C por 1 min, e uma etapa final de extensão 72 °C por 10 min. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão TBE 1 X (Tris HCl, Ácido Bórico, EDTA). Um marcador de DNA de 100 pb DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) e corante de ligação ao DNA 6X DNA Loading Dye (Trans) foi utilizado para visualização, identificação e medição do tamanho dos produtos de PCR por eletroforese, visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV. Os amplicons foram purificados com o kit PCR Clean-Up Gel extraction de acordo com o protocolo do fabricante (NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, Macherey-Nagel, Brasil).

2.6 Sequenciamento

Os produtos de amplificação ITS1 / ITS4 obtidos a partir do DNA de cada fungo isolado, foram usados na reação de sequenciamento do tipo Sanger em ambas as direções realizado em sequenciador ABI 3730 DNA Analysis. As sequências obtidas foram submetidas a busca por similaridade no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) com o software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação do número de acesso de depósito das sequências dos 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* no Genbank.

Isolados	Nº Acesso no GenBank
LT 01	OM102511
LT 02	OM102512
LT 03	OM102513
LT 04	OM102514
LT 05	OM102515
LT 06	OM102516
LT 07	OM102517
LT 08	OM102518

LT 09	OM102519
LT 10	OM102520

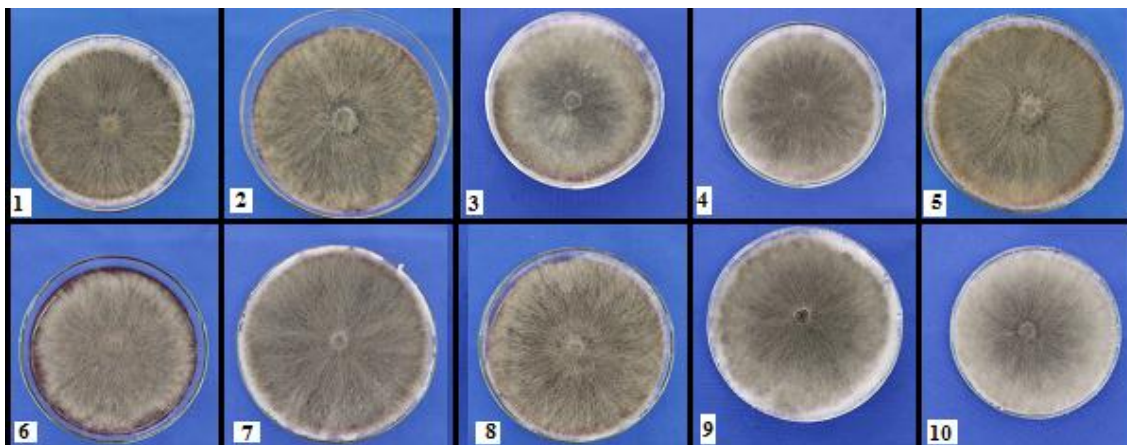
Fonte: Arquivo pessoal.

2.7 Análises Filogenéticas

As sequências depositadas no Genbank que apresentaram maior similaridade foram baixadas e alinhadas através do método de alinhamento múltiplo Muscle (EDGAR, 2004). Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o método de Neighbour-Joining (NJ) como base, com 1000 repetições de Bootstrap. O isolado de *Barriopsis fusca* (KF766149) foi utilizado como outgroup. Todas as análises foram realizadas no software MegaX versão 10.1.7 (TAMURA et al., 2013).

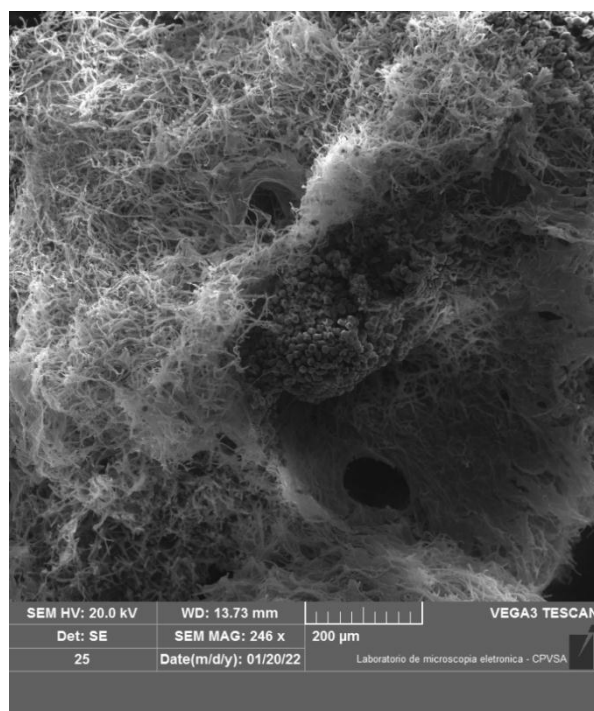
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o desenvolvimento de culturas puras, foi observado que os isolados produziam colônias de coloração cinza claro, cinza escuro e preto assim como descrito em Lima et al., (2012) (Figura 3). O gênero foi identificado inicialmente por meio de análise morfológica. Em que exibiu a presença de conídios estromáticos picnidiais negros, também relatados por Souza et al., (2021) (Figura 4 e 5). Com a abertura dos picnidídeos, foi verificado conídios em dois estágios de desenvolvimento. Suas formas diferenciavam de acordo com sua maturação, podendo ser cilíndrica, subovóide a elipsoidal, asseptados ou septados (Figura 6). Mostraram-se hialinos, quando imaturos, e marrom escuros, quando maduros (AMARAL, 2019) (Figura 7). O tamanho médio de 500 conídios variou de $21,97 \pm 2,55$ e $12,54 \pm 1,52$ μm semelhantes aos relatos de Yildiz et al., (2014) Rodríguez-Gálvez et al., (2015) e Suwannarach et al., (2019) (Figura 8).



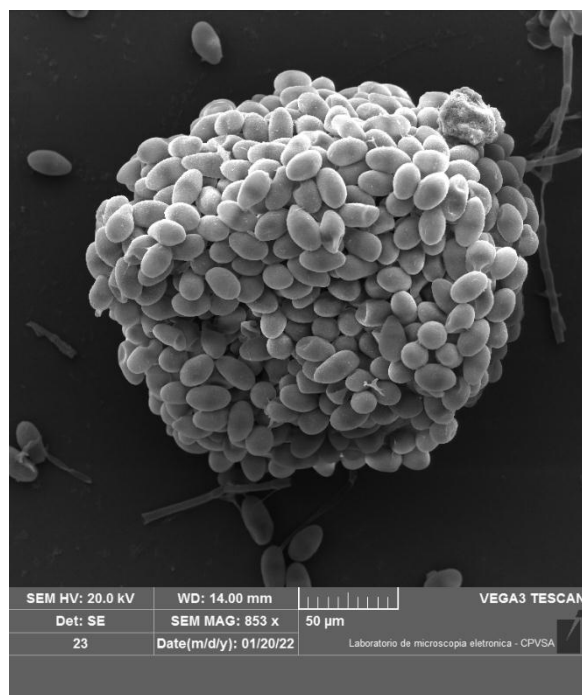
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3 - Imagens de *Lasiodiplodia* sp. cultivados em meio BDA isolados de meloeiro obtidos em plantios comerciais do Rio Grande do Norte. Coloração predominante da superfície da colônia; Cinza claro: isolados 3, 4, 10 e 9. Cinza escuro: isolados 6, 7 e 8. Preto: isolados 1, 2 e 5.



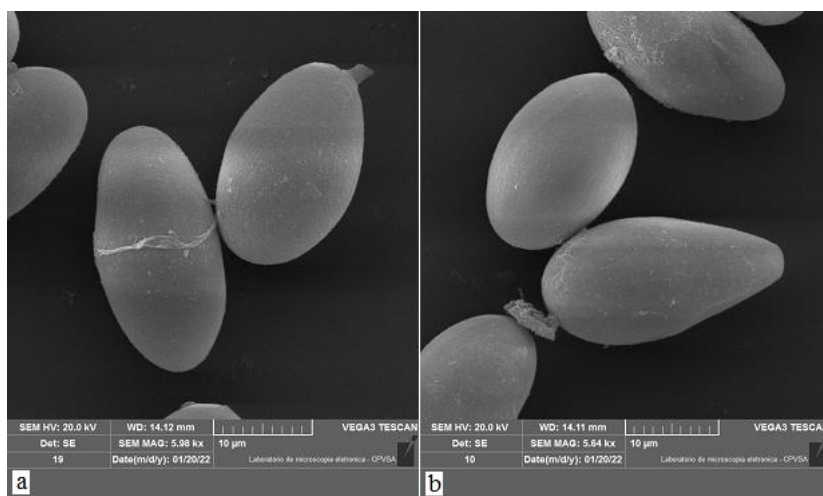
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 4 - Conidioma estromático picnidial, realizado corte transversal para observação de interação entre hifas e conídios, visualizado em microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5- Conidioma estromático picnidial inteiro para observação de como os conídios se agrupam, visualizados em microscópio eletrônico de varredura.



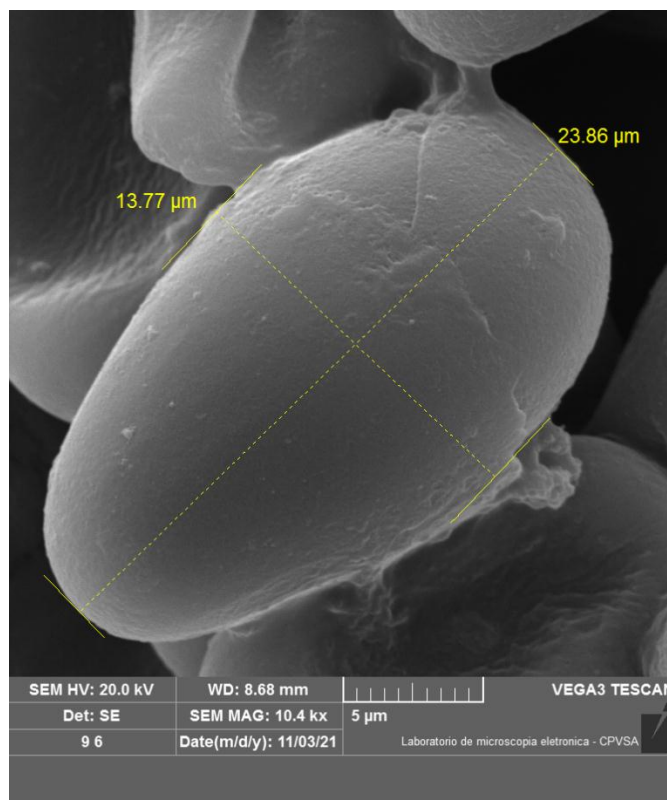
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6 – Morfologia apresentadas pelos conídios presentes no interior dos picnídios abertos. Cilíndrica e subovóide (a) Ovóide e elipsoidal (b) visualizados em microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7 - Coloração predominante dos conídios de *Lasiodiplodia* sp. em dois estágios de desenvolvimento presentes no interior dos picnídios abertos. Hialinos, quando imaturos, e marrom escuros, quando maduros, visualizados em microscópio óptico.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 - Medição dos conídios de *Lasiodiplodia* sp. presentes no interior dos picnídios abertos para se obter a média do seu tamanho visualizados em microscópio eletrônico de varredura.

A patogenicidade dos isolados foi comprovada com a observação de sintomas. Nas plantas inoculadas foi constatado podridão e tombamento a partir do quarto dia de inoculação (Figura 9). As folhas exibiam em suas bordas a origem de pequenas manchas em tom branco, que dispersaram-se continuamente por toda a região do limbo, tornando-se amarela, e murcha (Figura 10). No ponto da inoculação ocorreu pequenas lesões logo nos primeiros dias após a inoculação. Em seguida, elas desenvolveram-se severamente por todo o colo, com presença de exsudatos de tamanho mediano, que expeliam inicialmente um fluido transparente, tornando-se vermelho e necrótico com o tempo (Figura 11). Os ramos distantes manifestaram rachaduras e conglomerados de pequenos picnídios. Nas plantas que mais sofreram com ataque do fungo, havia necrose, murcha, e declínio (Figura 12). As plantas que representavam o tratamento controle não desenvolveram nenhum tipo de lesão. A descrição desses sintomas possui semelhanças ao relato descrito por Rodríguez-Gálvez (2015) em seu ensaio de patogenicidade de *Lasiodiplodia theobromae* em uvas.



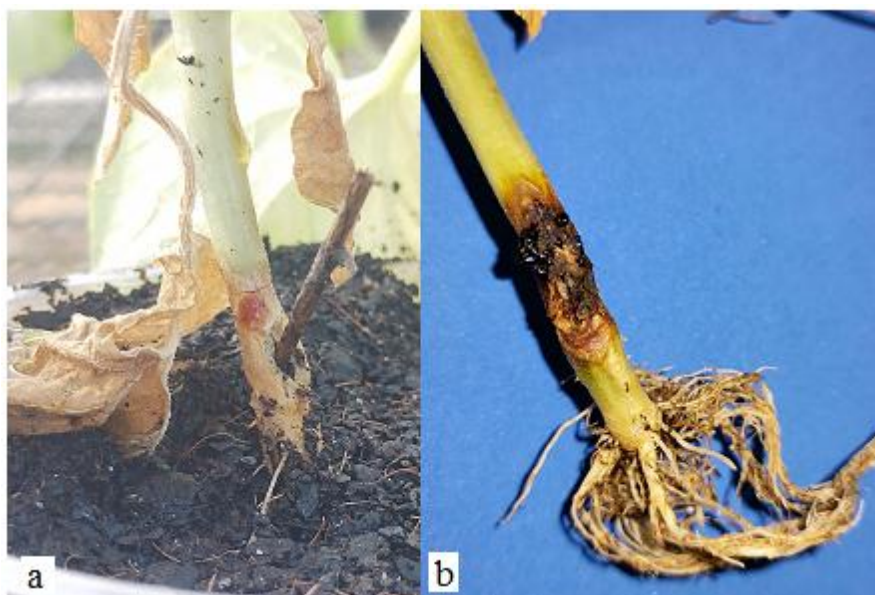
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 9 – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Podridão e tombamento com quatro dias de inoculação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10 – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Folhas de plantas meloeiro com presença de murcha e manchas em tom branco e amarelo.



Fonte: Arquivo pessoal.

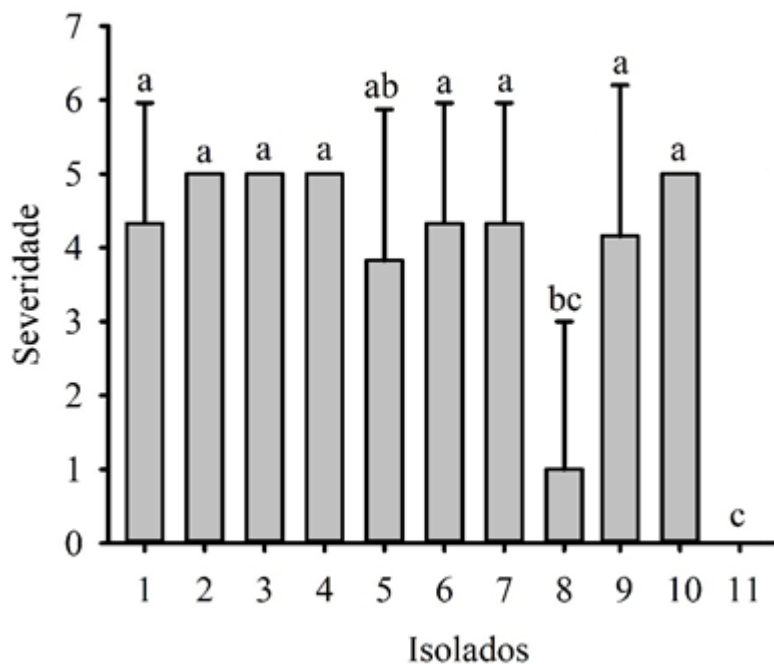
Figura 11 – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Colo de plantas meloeiro com presença de exsudatos expelindo fluido vermelho (a) e fluido necrótico (b).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 12 – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Plantas de meloeiro com necrose, murcha e declínio.

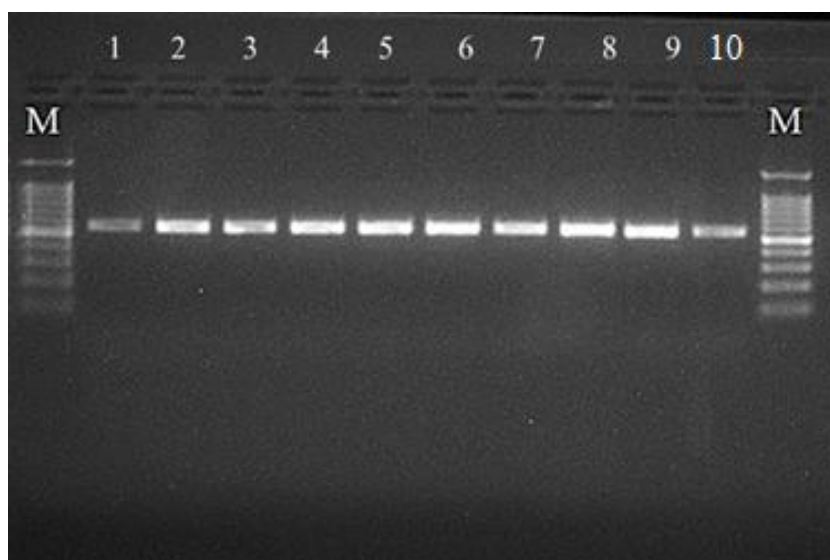
Todos os isolados apresentaram sintomas e causaram doença, entretanto, houve variação entre a agressividade manifestada. Visualmente o isolado LT 03 foi o mais agressivo, porém, na análise da severidade não houve diferença significativa entre ele e os isolados 2, 4 e 10. O isolado LT 08, se mostrou menos agressivo visualmente, bem como, na análise da severidade (Figura 13). O fungo foi reisolado com sucesso das lesões de plantas com sintomas, confirmando os postulados de Robert Koch.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 13 – Agressividade de isolados de *Lasiodiplodia* sp. em plantas de meloeiro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

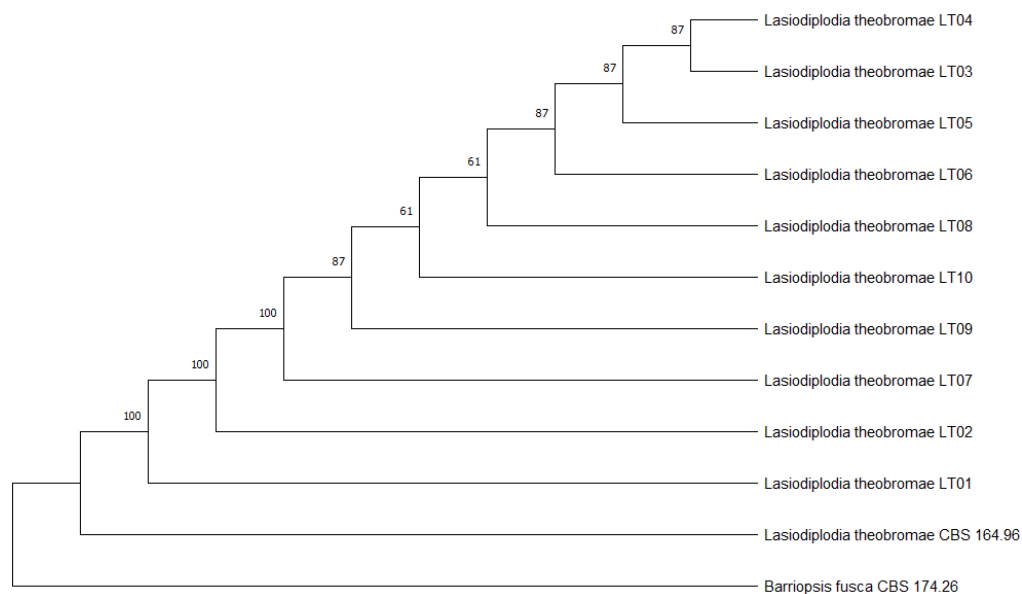
Ensaio de PCR utilizando os primers ITS1/ITS4 resultaram na amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 550 pb para os 10 isolados de *Lasiodiplodia* spp. (Figura 14), resultado esse semelhante ao obtido por Valle-de la Paz et al., (2019), com *L. theobromae* isolado de lima da Pérsia. As sequências depositadas no GenBank, receberam seus respectivos números de acesso e todos os isolados apresentaram 100% de similaridade ao isolado *Lasiodiplodia theobromae*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 – Gel de agarose a 2% com amplificação de sêquências da região ITS, utilizando os primers universais ITS1 e ITS4. As amostras de DNA (1 a 10) dos isolados de *Lasiodiplodia* sp. exibiram tamanho de 550 pb de acordo com o padrão de marcador de DNA (M).

A construção da árvore para análise filogenética serviu para classificar a espécie. Desse modo, todos os isolados ficaram no clado de *L. theobromae* (NR_111174) com suporte de bootstrap de 100%. A sequência modelo foi retirada do GenBank, sendo esse isolado utilizado como referência para identificação de *L. theobromae*, confirmando uma única espécie para ambos os isolados. Foi possível observar que os isolados LT 01, LT 02 e LT 07 são os que possuem maior similaridade à sequência referência. O outgroup (*Barriopsis fusca*), teve sua sequência utilizada para rotear a árvore, mostrando que esse grupo apresenta distância evolutiva a *L. theobromae* (Figura 15).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 15 - Árvore filogenética construída através do método Neighbor-joining obtida através das sequências da região do espaçador interno transcrito do rRNA (ITS) dos 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. Os números dos nós indicam os valores de confiabilidade de bootstrap com 1000 réplicas. A árvore está enraizada com *Barriopsis fusca*.

Evidências de aumento no número de hospedeiros de *L. theobromae* vem sendo relatadas ao longo dos anos. Em março de 2019, foi observado podridões de frutos de melões (*Cucumis melo* L.) em 25% da produção, sendo historiado por Suwannarach et al., (2019), o primeiro relato de *L. theobromae* causando podridão melão pós-colheita na Tailândia. Nam et al., (2016) descreveu em seu estudo, o primeiro relato de morte em plantas de morango causada por *Lasiodiplodia theobromae* na Coreia. Nesse sentido, Yildiz et al., (2014), verificou que plantios comerciais de morango, exibiam murcha e colapsos das plantas, onde foi constatado em seguida, que o fungo *L. theobromae* era o agente causal da doença. Tornando-se, o primeiro relato de *L. theobromae* causando morte em plantas de morango na Turquia.

Rodríguez-Gálvez et al., (2015), declarou o primeiro relato de *L. theobromae* como agente causal da morte de uvas de mesa no Peru. Em Guangxi, uma província chinesa, a podridão de raiz de amoreira era relatada equivocadamente, como *Fusarium sp.* seu agente casual. Porém, de acordo com estudos realizados por Xie et al., (2014), foi descoberto, que o verdadeiro patógeno causador da doença era de fato, *L. theobromae* sendo esse, o primeiro relato na China, acometendo plantas de amora. Latha et al., (2009),

constatou o primeiro relato de *L. theobromae* causando podridão radicular e podridão do colo do pinhão-manso, na Índia.

Para explicar a difusão do ataque desse microrganismo a um elevado número de hospedeiros, até recentemente considerado um patógeno limitado (PEREIRA et al., 2006), Tavares (2002), sugere como possibilidade, uma eventual evolução em relação a sua patogenicidade. A interferência humana por meio de atividades antrópicas vem resultando em uma série de danos ao meio ambiente, onde o desmatamento pode contribuir para essa questão (OLIVEIRA et al., 2013).

A mudança no modo de agir de *L. theobromae* pode também estar relacionado a outras demandas, como por exemplo, substituição da vegetação natural de grandes áreas por um sistema de monocultivo, o que propociona um estreitamento das interações biológicas. Mudanças climáticas e a utilização sem precedentes de defensivos químicos, também são consideradas, isso porque o ambiente interfere no desempenho do patógeno. Ademais, esse fungo é comumente encontrado no mundo em regiões tropicais e subtropicais, por meio de propagação (SULAIMAN et al., 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações importantes aos produtores mundiais de melão em razão de não haver conhecimento sobre esse fitopatógeno atuando diretamente como causador de podridão radicular em meloeiro, sendo apenas historiadas manifestações de sua presença em associação a outros fungos ou atuando em pós-colheita no meloeiro. Portanto, é relevante para a busca de medidas de controle fitossanitário efetivos, uma vez que o conhecimento do agente casual é imprescindível que haja o manejo adequado da cultura e êxito na produção.

4. CONCLUSÃO

- Todos os isolados utilizados no estudo são patogênicos variando em níveis de agressividade.
- Todos os isolados utilizados no estudo foram sequenciados e suas sequências apresentaram 100% de similaridade para *L. theobromae*, quando depositadas no GenBank.
- Foi comprovado que *L. theobromae* é um patógeno causador de podridão radicular em *Cucumis melo* L.
- Este é o primeiro relato da presença de *L. theobromae* causando podridão radicular em plantios comerciais de melão no Brasil.

5. REFERÊNCIAS

- AMARAL, D. D. **Podridão por *Lasiodiplodia theobromae* em morango: epidemiologia e manejo alternativo.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia/ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2019. 82p.
- AMBRÓSIO, M. M. Q., DANTAS, A. C. A., MARTINEZ-PEREZ, E., MEDEIROS, A. C., NUNES, G. H. S., PICÓ, M. B. Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Euphytica*, v.206, p.287-300, 2015.
- CAROLLO, E. M., FILHO, H. P. S. **Manual básico de técnicas fitopatológicas.** Embrapa Mandioca e Fruticultura – Manuais - Bases de Dados da Pesquisa Agropecuária, 2016.
- CARVALHO, M. C. C. G., SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, v.40, n.3, p.735-744, 2010.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42, 225-226, 1939.
- CUNHA, F. S., COSTA, A. E. S., CAPUCHO, A. S., DIAS, R. C. S., ISHIKAWA, F. H. Escala descritiva para avaliação de *Rhizoctonia solani* em melancia em fase de plântula. In: **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, 8, 2015. Disponível em: <http://www.sbmp.org.br/8congresso/anais/indiceautor.htm#F>. Acesso em 26 Dez. 2021.
- EDGAR, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, 5(1), 1-19.
- FAO. Home | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en>>. Acesso em: 19 mar. 2020.
- LATHA, P., V. PRAKASAM, V. KAMALAKANNAN, A, GOPALAKRISHNAN, C., RAGUCHANDER, T., PARAMATHMA, SAMIYAPPAN, R. First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*, v.4, p.19–20, 2009.
- LIMA, JOILSON SILVA., CARDOSO, JOSÉ EMILSON., MOREIRA, RENATO CESAR., ALVES, EDSON SOUZA., MELO, JOSÉ GLAUBER MOREIRA. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. *Revista Trópica*, v.6, n.1, p. 10-10, 2012.
- LUZINI, A. P. **Relações filogenéticas entre fungos de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. F., *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) e *Rhizoctonia* spp. fitopatogênica ao arroz e ao feijão.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas/ Universidade Federal de Goiás,

GOIÂNIA, GO. 2013. 65f.

NAM, M. M., PARK, M. S., KIM, H. S., KIM, T. LEE, E. M., PARK, J. D., KIM, H. G. First Report of Dieback Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Strawberry Plants in Korea, **Mycobiology**, v.44, n.4, p. 319-324, 2016.

NASCIMENTO, P. G. M. L., AMBRÓSIO, M.M., FREITAS, F. C. L., CRUZ, B. L. S., DANTAS, A. M. M., SALES JÚNIOR, R., SILVA, W. L. Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. **European Journal of Plant Pathology**, v.152, p.433-446, 2018.

NASCIMENTO, PAULA GRACIELLY MORAIS DE LIMA. **Comunidade microbiana do solo e podridão radicular em meloeiro em diferentes sistemas de manejo**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/ Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, 2015, p.79.

NOGUEIRA, G. A., SILVA, S. G. A., LINHARES, C. M. S., AMBRÓSIO, M. M.Q., NUNES, G. H. S. Methods for inoculation of *Fusarium solani* and *Sclerotium rolfsii* in melon plants. **Summa Phytopathologica**, v.45 n.1, p. 59-63. 2019.

OLIVEIRA, M. Z. A. de; PRATES JÚNIOR, P.; BARBOSA, C. de J.; ASSMAR, C. C. Fungo *Lasiodiplodia theobromae* um problema para a agricultura baiana. **Bahia Agrícola**, v. 9, n.2, p. 24-29, 2013.

PEREIRA, A. L., SILVA, G. S., RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.6, p. 572-578, 2006.

R Core Team, 2019. **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 20 Dez. 2021.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E., MALDONADO, E., ALVES, A. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, p.477-489, 2015.

SALES JÚNIOR, R., RODRIGUES, A. P. M. S., NEGREIROS, A. M. P., AMBRÓSIO, M. M. Q., BARBOZA, H. S., BELTRÁN, R. Weeds as potential hosts for fungal root pathogens of watermelon¹. **Revista Caatinga**, v.32, n.1, p.1-6, 2019.

SALVIANO, A. M. et al., 2017. A cultura do melão. 3. ed. – Brasília, DF: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/165362/1/PLANTAR-Melao-ed-03-2017.pdf>. Acesso em 11 jan. 2022.

SMITH, S. N., DE VAY, J. E., HSIEH, WH., LEE, HJ. Soil-borne populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, a cotton wilt fungus in California fields. **Mycologia**, v.93 p.737-743, 2001.

SOUZA, J. S. N., DOS SANTOS, M. A. L2, VITÓRIA, N. S. Registro de *Lasiodiplodia theobromae* em frutos abortados de coqueiro no sertão da Bahia, Brasil. **Agrotrópica**, v.

333, n.1, p.49-54, 2021.

SUILAMAN, R., THANARAJOO, SS., KADIR, J., VADAMALAI, G. First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Stem Canker of *Jatropha curcas* in Malaysia. *Plant Disease*, v.96, n.5, 2012.

SUWANNARACH, N., KHUNA, S., KUMLA, J., TANRUEAN K. & LUMYONG, S. First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Fruit Rot on Melon (*Cucumis melo*) in Thailand. **Plant Disease**, v.4 n.1, p.280-280, 2019.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

TAVARES, S. C. C. de H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* – situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.46-52, 2002.

TERAO, D.; NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; DIAS, R. C S. Identificação e manejo de doenças fúngicas da melancia. *Comunicado Técnico 58*. Jaguariúna – SP: Embrapa. 2019. p.1-15. Disponível em: <https://www.embrapa.br/meio-ambiente/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1109678/identificacao-e-manejo-de-doencas-fungicas-da-melancia>. Acesso em 12 mai. 2020.

VALLE-DE LA PAZ, MAIREL et al . Distribution, incidence and severity of the dieback (*Lasiodiplodia* spp.) in persa lime in Morelos, Mexico. **Rev. mex. fitopatol**, Texcoco, v. 37, n. 3, p. 464-478, 2019.

XIE, H. H., WEI, J. G., LIU, F., FRIGIDEIRA, X. H., YANG, X. B. FIRST REPORT OF MULberry Root Rot Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in China, **Plant Disease**. v.98, n.14, 2014.

YILDIZ, A., BENLIOGLU, K., BENLIOGLU, HS. First Report of Strawberry Dieback Caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Plant Disease**, v.98, n.11, p.1579-1579, 2014.

CAPÍTULO III

PATOGENICIDADE RELACIONADA A DIVERSIDADE GENÉTICA DO FITOPATÓGENO *Lasiodiplodia theobromae* ASSOCIADO À CULTURA DO MELOEIRO

RESUMO: *Lasiodiplodia theobromae* é um fungo que vem sendo observado em um vasto número de hospedeiros, favorecendo o desenvolvimento de doenças em importantes culturas de cunho econômico. O conhecimento da variabilidade genética e filogenética da espécie é fundamental para que haja medidas eficientes que auxiliem no controle fitossanitário desse patógeno. Em virtude disso, o trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade relacionada a diversidade genética de isolados de *L. theobromae*. Para isso, 10 isolados foram testados quanto à patogenicidade através do método de arroz colonizado com estruturas fúngicas, utilizando melão amarelo. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação em duplicata, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 11 tratamentos e 6 repetições, sendo uma planta por vaso. Os primeiros sintomas foram observados cinco dias após a infestação do substrato. Todos os isolados se mostraram patogênicos em relação ao meloeiro. O isolado LT 10 se mostrou mais agressivo como causador de tombamento pré-emergencial e o LT 08, o menos agressivo. Os 10 isolados do fungo foram amplificados com 13 iniciadores ISSR e 13 iniciadores RAPD. A similaridade entre as amostras foi estimada através do coeficiente de Jaccard e o agrupamento realizado pelo método UPGMA, resultando numa variação entre 0,056 e 0,80. O polimorfismo produzido com a técnica ISSR foi de 84,67%, e 82,35% para técnica RAPD. A combinação de dados entre os dois marcadores permitiu agrupar os isolados em cinco grupos, onde não foi totalmente correlacionado a sua origem geográfica. No entanto, foi possível observar que as maiores distâncias genéticas apresentadas estão relacionadas entre os isolados LT 08 e LT 10, sendo eles, identificados como menos agressivo e mais agressivo, respectivamente. Portanto, pelos resultados obtidos, pode-se concluir que existe diversidade genética em *L. theobromae* relacionada com sua patogenicidade. As informações conseguidas no estudo, podem ser empregadas no auxílio de métodos de controle eficazes ao combate do fitopatógeno.

Palavras-chave: variabilidade genética, RAPD, ISSR.

CHAPTER III

PATHOGENICITY RELATED TO THE GENETIC DIVERSITY OF THE PHYTOPATHOGEN *Lasiodiplodia theobromae* ASSOCIATED WITH MELON

ABSTRACT: The fungus *Lasiodiplodia theobromae* has been observed in a large number of hosts, favoring the development of diseases in important economic crops. Knowing the genetic diversity and phylogeny of the species is essential to develop effective control methods against the pathogen. In this sense, this work aimed to evaluate the pathogenicity related to the genetic diversity of *L. theobromae* isolates. For this purpose, 10 isolates were tested for pathogenicity through the rice infestation method colonized with fungal structures in Yellow melon. The experiment was carried out in duplicate in a greenhouse, with 11 treatments and 6 replicates in a completely randomized (DIC) design, with one plant per pot. The first symptoms were observed five days after the substrate infestation. All the isolates were pathogenic to melon. The isolate LT 10 was the most aggressive causing pre-emergent damping-off, while LT 08 was the least aggressive. The 10 isolates of the fungus were amplified using 13 ISSR and 13 RAPD primers. The similarity between the samples was estimated through the Jaccard coefficient and clustering was performed by the UPGMA method, resulting in a variation between 0.056 and 0.80. The polymorphism with the ISSR technique was 84.67%, and 82.35% with RAPD. Results with both markers allowed to arrange the isolates into five groups, which were not correlated with their geographic origin. Furthermore, the highest genetic distances were observed between the isolates LT 08 and LT 10, being identified as the least and most aggressive, respectively. In conclusion, there is genetic diversity in *L. theobromae* related to its pathogenicity. Results in our study can aid in the development of effective control methods against the phytopathogen.

Keywords: genetic variability, RAPD, ISSR.

1. INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma cultura importante no grupo das Cucurbitáceas (PORTO et al., 2019). Caracterizado como fruta fresca, é muito relevante no que diz respeito ao consumo do mercado internacional. Somente no ano de 2020, o Brasil exportou cerca de 236.259.222 kg de melão (ARAÚJO et al., 2021).

Em função de uma intensa demanda de atividade, percebe-se como consequência, o aparecimento de numerosas patologias e pragas já estabelecidas em solos do Nordeste brasileiro (SILVA et al., 2020). Dentre as múltiplas causas que atingem diretamente o meloeiro, ele é vulnerável a inúmeras doenças de ascendência fúngicas, principalmente as transmitidas pelo solo (PORTO et al., 2019) (ANDRADE et al., 2005).

Entre os microrganismos que podem acometer o meloeiro, está o *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (PORTO et al., 2019). Um fungo cosmopolita pertencente ao filo Ascomycota (SOUZA et al., 2021), que possui como particularidade a capacidade de colonização de modo endófito quanto patógeno em muitas plantas (SALVATORE et al., 2020).

Doenças radiculares são geralmente ocasionadas por uma diversidade de patógenos, que atua isoladamente ou em associação. Muito frequentemente é observado analogia entre as manifestações de doenças apresentadas e seu agente casual, tornando-se imprevisível uma correta identificação (SOUZA et al., 2021).

Outras estratégias moleculares que podem auxiliar no estudo, são os marcadores baseados em PCR (Reação da Polimerase em Cadeia). Um mecanismo eficaz e funcional para analisar a diversidade genética de espécies de fungos fitopatogênicos (COSTA, 2020). Compreender a variação genética dentro e entre espécies é um instrumento significativo, uma vez, que se pode diferenciar inúmeros isolados de um mesmo fitopatógeno (NETO, 2020).

Por conseguinte, marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) são adequados para detecção de variabilidade genética. Além do mais, dispõe de algumas vantagens em sua utilização, como custo relativamente baixo e agilidade na aquisição de resultados (COSTA et al., 2020). São bastante reprodutíveis e não necessitam de prévio conhecimento do genoma do organismo estudado (MARTINS et al., 2021).

O presente estudo teve como objetivo analisar a patogenicidade de isolados de *L.*

theobromae associados à cultura do meloeiro relacionando sua variabilidade genética através da utilização de marcadores ISSR e RAPD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição do material fúngico

Dez isolados de *Lasiodiplodia theobromae* utilizados nesse estudo a pertencem a Micoteca do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia I do Departamento de Ciências Agrárias e Florestais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Os detalhes sobre os hospedeiros e os locais de origem dos isolados são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Descrição dos nomes, hospedeiro, códigos de depósito do GenBank, hospedeiros e locais de origem dos isolados de *Lasiodiplodia theobromae* utilizados neste estudo.

ID do Isolado	Hospedeiro	Nº de acesso GenBank	Origem	Localização Geográfica
LT 1	Melão	OM102511	Baraúna-RN	4°55'28.62" S 37°30'27.27" O
LT 2	Melão	OM102512	Baraúna-RN	4°55'28.62" S 37°30'27.27" O
LT 3	Melão	OM102513	Baraúna-RN	4°57'10.24" S 37°31'37.02" O
LT 4	Melão	OM102514	Baraúna-RN	4°57'10.24" S 37°31'37.02" O
LT 5	Melão	OM102515	Baraúna-RN	4°57'10.24" S 37°31'37.02" O
LT 6	Melão	OM102516	Baraúna-RN	4°55'28.62" S 37°30'27.27" O
LT 7	Melão	OM102517	Apodi-RN	5°38'17.27" S 37°56'28.49" O
LT 8	Melão	OM102518	Mossoró-RN	4°59'08.33" S 37°24'17.56" O

LT 9	Melão	OM102519	Mossoró-RN	4°59'08.33"S 37°24'17.56"O
LT 10	Melão	OM102520	Mossoró-RN	4°59'08.33"S 37°24'17.56"O

2.2 Patogenicidade

O ensaio de patogenicidade foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da UFERSA em duplicata, no período de abril de 2021 a junho de 2021, em que utilizou-se o método de infestação do solo com arroz colonizado com estruturas fúngicas (NOGUEIRA et al., 2019). Foram utilizadas sementes de melão da cultivar Goldex Yellow, o delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com 11 tratamentos e 6 repetições, sendo uma planta por vaso.

Para infestação do substrato, utilizou-se método do arroz colonizado, que consistiu no uso de arroz estéril a 120 °C por 30 minutos com repetição da esterilização após 24 horas. Posteriormente, seis discos fúngicos de cada isolado foram transferidos para frascos do tipo elermennyer contendo arroz umedecido em água destilada e estéril, previamente cultivados em meio de cultura BDA + tetraciclina (0,05g). Os frascos permaneceram em estufa D.B.O a 28 ± 2 °C, durante 15 dias, para total colonização dos substratos (Figura 1). Para o grupo controle, utilizou-se apenas arroz umedecido em água destilada e esterilizada (NOGUEIRA et al., 2019).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 1 - Preparo do inóculo. Discos fúngicos de cada isolado em arroz umedecido com

água, depositados frascos do tipo elermennyer (a) Fracos mantidos em estufa B.O.D para colonização (b).

Foram utilizados 9 gramas do preparo do inóculo na superfície de cada vaso e após 24 horas de infestação do substrato, foi realizado a semeadura (Figura 2). A avaliação da severidade da doença se deu aos 60 dias após a inoculação, utilizando a escala de notas proposta por Cunha et al. (2015), em que: 0 = plantas sem sintomas; 1 = pequenas lesões nas raízes e/ou no hipocótilo; 2 = lesões circundando o hipocótilo, sem ocorrência de constrição; 3 = início da constrição, destruição parcial dos tecidos sem damping-off; 4 = tecidos necrosados com damping-off pós-emergente; 5 = Damping-off pré-emergente. Os valores foram submetidos a análise conjunta dos dados, devido o experimento ser realizado em duplicata e as médias das lesões foram comparadas com o teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) usando o R software estatístico v. 3.6.1 (R Core Team, 2019).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2 – Processo de infestação do substrato com o preparo do inóculo.

2.3 Cultivo dos isolados e Extração de DNA

O DNA genômico dos fungos isolados foi extraído seguindo o protocolo SDS (Smith et al. 2001), com modificações. Os 10 isolados de *Lasiodiplodia* sp foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) + tetraciclina (0,05g/L) em placa de Petri, mantidos em estufa tipo D.B.O a 28 ± 2 °C, por ± 7 dias até o total desenvolvimento das colônias (CASTELLANI, 1939). O micélio foi macerado com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana até a obtenção de um pó fino, sendo transferido para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração SDS [SDS 10%; Tris-HCl 1 M

pH 8,0; NaCl 5 M; EDTA 0,20 M; CTAB 7%; PVP 1%; β -mercaptoetanol 2% e água ultrapura q.s.p] aos tubos nos quais foram incubados em banho termostático a 60° C por 40 minutos. Ao fim da etapa, realizou-se a separação de fases com clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado álcool isopropílico incubado a -20°C por \pm 12 horas. Os tubos passaram por lavagens, em álcool 70% e 90%, respectivamente. O pellet obtido foi ressuspenso em solução de RNase (10 μ g/mL) (Ludwig Biotec, Brasil). A integridade e quantificação das amostras foi verificada em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), utilizando-se 1g de agarose para cada 100 mL de solução TBE (Tris Borate Edta), submetido à eletroforese a 120V por 30 minutos, visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV.

2.4 Diversidade Genética

A análise da diversidade genética de 10 isolados de *L. theobromae* foi realizada utilizando os marcadores moleculares do tipo ISSR e RAPD.

2.4.1 Análise com marcadores ISSR

Para a amplificação do DNA dos isolados de *L. theobromae*, foram utilizados 13 *primers* ISSR listados na Tabela 2. A reação de amplificação com volume final de 12 μ L, foi composta por 1X tampão MgCl₂; 0,16 mM dNTP; 1U Taq DNA Polimerase (Trans); 0,33 μ M de cada um dos *primers*; BSA 0,25 mg/ml-1 e 30 ng de DNA. A amplificação ocorreu em termociclador automático (Amplitherm), em programa de amplificação ISSR, composto de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento em temperatura de 50°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e a extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese a 150V por \pm 2 horas em tampão TBE 1X (Tris-base 0.89 M, Ácido Bórico 0.02 M, EDTA 0.89 M). Sendo aplicados em gel de agarose a 2,5% corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). Um marcador de DNA de 100 pb (Sinapse Biotecnologia) foi utilizado como padrão de comparação das bandas geradas. Visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV.

Tabela 2 – Identificação, sequência e temperatura de anelamento (TA) de iniciadores moleculares ISSR e RAPD empregados no estudo.

Marcador: N° do iniciador	Código do iniciador	Sequência do iniciador (5'→3')	Temperatura de Anelamento (°C)
ISSR			
3	DiCA5'CY	GTGGTGGTGGTGGTG	50°
4	DiGA3'C	GTGGTGGTGGTGGTGyC	50°
5	DiGA3'RC	CyGTGGTGGTGGTGGTG	50°
8	TriCAC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	50°
9	TriGTG	CGACGACGACGACGARC	50°
10	TriGTG3'YC	GTGGTGGTGGTGGTGGTYC	50°
11	TriGTG5'CY	CYGTGGTGGTGGTGGTG	50°
13	TriTGT5'CY	CYTGTGTGTGTGTGT	50°
16	TriATG3'RC	ATGATGATGATGATGRC	50°
18	TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRC	50°
21	TriTCC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	50°
22	TriTGA3'RC	TGATGATGATGATGARC	50°
24	TriCGA3'RC	CGACGACGACGACGARC	50°
RAPD			
1	OPM 01	GTTGGTGGCT	40°
2	OPM 02	ACAACGCCTC	40°
3	OPM 05	GGGAACGTGT	40°
4	OPM 12	GGGACGTTGG	40°
5	OPM 13	GGTGGTCAAG	40°
RAPD			
6	OPD 02	GGACCCAACC	40°
7	OPD 03	GTCGCCGTCA	40°
8	OPD 05	TGAGCGGACA	40°
9	OPD 08	GTGTGCCCCA	40°
10	OPD 11	AGCGCCATTG	40°
11	OPD 13	GGGGTGACGA	40°
12	OPD 17	TTTCCCACGG	40°
13	OPD 20	ACCCGGTCAC	40°

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.2 Análise com marcadores RAPD

As análises de RAPD foram realizadas utilizando 13 *primers* listados na Tabela 2. As reações de amplificação continham volume de 25µl, as reações foram preparadas em condições semelhantes descritas para os marcadores ISSR, com concentração de 0,82 µM de cada um dos primers.

As amplificações foram efetuadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C para 1 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação em 92 °C por 1 min, anelamento a 32 °C por 1 min, e extensão a 72 °C por 2 min, seguida por uma extensão a 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados foram separados gel de agarose em 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) submetidos a eletroforese em 120 V por ± 2 h em tampão TBE 1X. Visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV. Um marcador de DNA de 100 bp (Sinapse Biotecnologia) foi usado como um padrão de peso molecular.

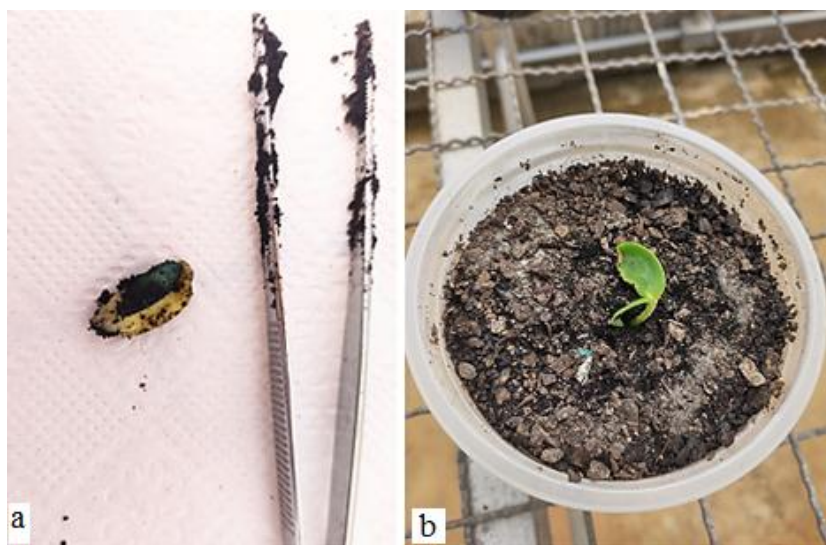
2.5 Análise de dados

Para analisar os dados moleculares, fragmentos obtidos por ambos marcadores foram convertidos em matrizes de dados binários. Bandas polimórficas e monomórficas foram codificadas como presente (1), ou ausente (0), respectivamente. As matrizes foram utilizadas para calcular o grau de similaridade entre os isolados por meio do coeficiente de Jaccard (J).

A elaboração de agrupamento utilizou o método de média aritmética UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) com o software NTSYSPc (versão 2.02). Para o ponto de corte, a média de similaridade genética foi empregada em sua determinação seguindo a metodologia de Jamshidi e Jamshidi (2011). Os valores de PIC (*Polymorphism information content*), EMR (*Effective multiplex ratio*) e MI (*Marker index*), foram determinados e calculados mediante Chesnokov e Artemyeva (2015). Em relação a análise das coordenadas principais (PoCA), o software NTSYSPc (versão 2.02) foi utilizado no módulo Eigen, e para produção do gráfico, módulo Mod3D.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A patogenicidade dos isolados foi comprovada com a observação de sintomas. Nas plantas infestadas foi constatado tombamento pré-emergencial e tombamento pós-emergencial com o decorrer dos dias (Figura 3). Sintomas típicos de murcha e amarelecimento de folhas e ramos foram visíveis (Figura 4). No ponto do colo, região mais próxima do local da infestação, ocorreu pequenas lesões logo nos primeiros dias. (Figura 5). Alguns ramos distantes do colo manifestaram lesões do tipo rachaduras com presença ou não, de conglomerados de pequenos picnídios em coloração preta. Algumas plantas desenvolveram lesões severas em torno do colo exibindo exsudatos que expeliam fluido necrótico. Nas plantas que mais sofreram com ataque do fungo, havia necrose, murcha, e declínio (Figura 6). As plantas que representavam o tratamento controle não desenvolveram nenhum tipo de lesão (Figura 7).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 3 – Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Tombamento pré-emergencial (a) Tombamento pós-emergencial (b).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 4 - Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Murcha (a) Amarelecimento das folhas (b).



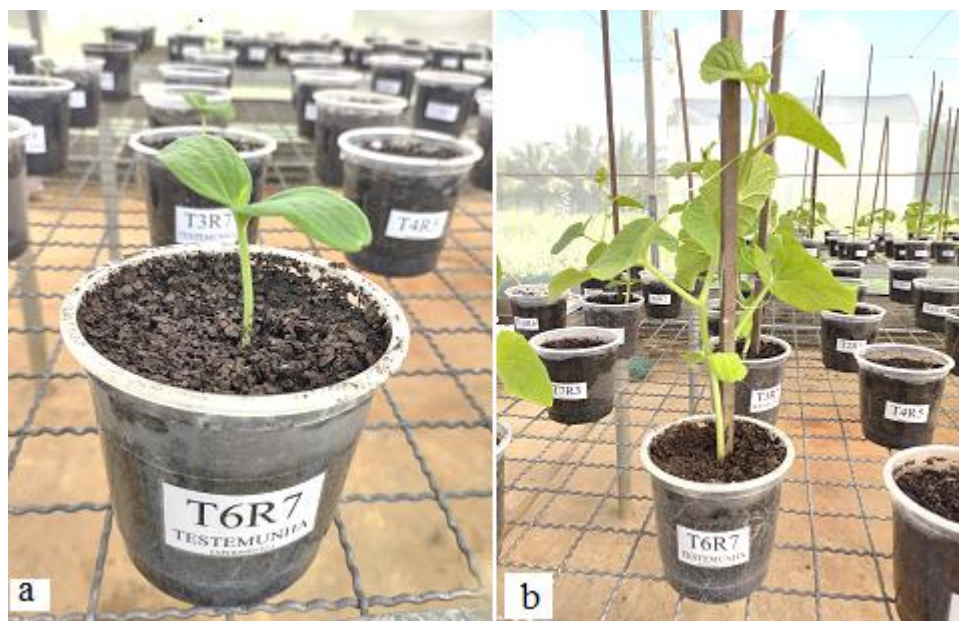
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5 - Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Início das lesões no colo da planta.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6 - Sintomatologia apresentada em ensaio de patogenicidade. Planta exibindo necrose, murcha, e declínio em partes dos tecidos (a) Planta completamente murcha e necrosada (b).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7 – Representação do grupo controle, mesma planta em diferentes períodos sem a presença de sintomas. Planta do grupo controle com 7 dias sem a presença de sintomas (a) Planta do grupo controle com 21 dias sem a presença de sintomas (b).

Todos os isolados apresentaram sintomas e causaram doença, entretanto, houve variação entre a agressividade manifestada. O isolado LT 10 foi o que mais causou tombamento pré-emergencial, e o LT 08, o menos agressivo. Porém, na análise da severidade não houve diferença significativa entre os isolados 2, 3, 4, 5, e 10 (Figura 8). O fungo foi reisolado com sucesso das lesões de plantas com sintomas, confirmando os postulados de Robert Koch.

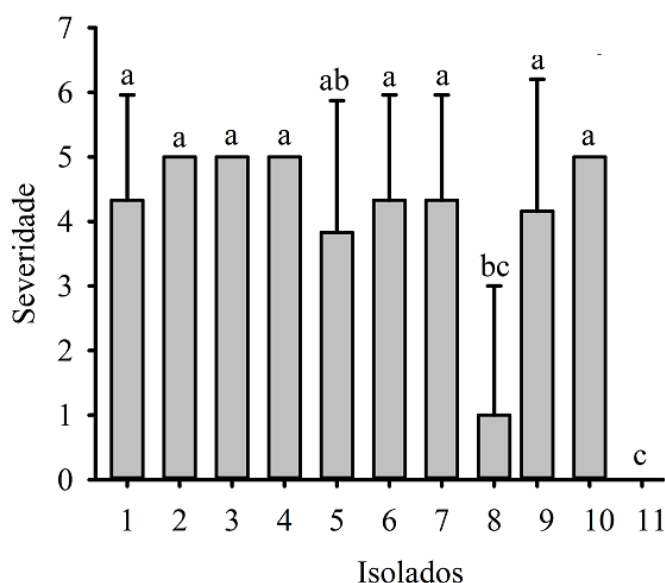
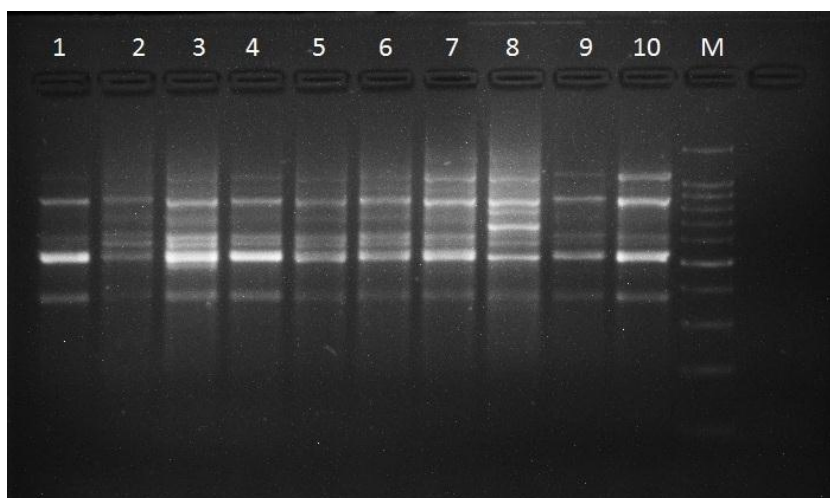


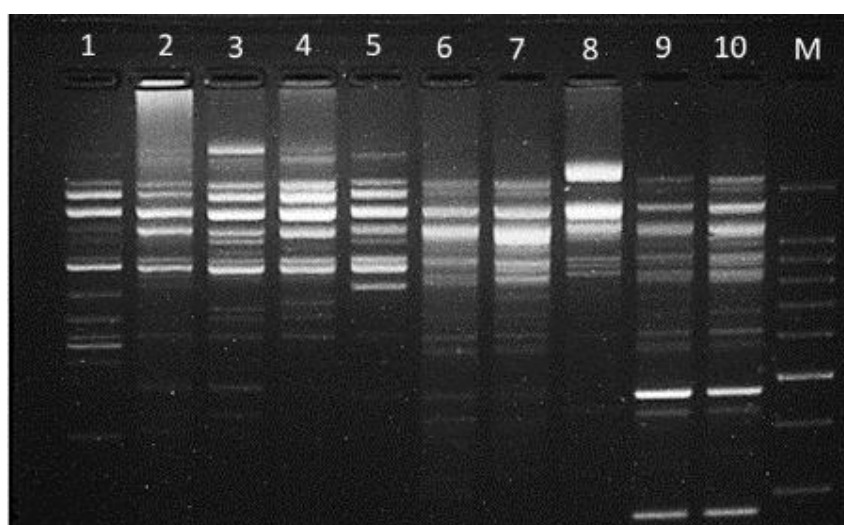
Figura 8 – Agressividade de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* em plantas de meloeiro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

A diversidade genética dos isolados foi avaliada mediante utilização de técnicas derivadas de PCR, através dos iniciadores ISSR e RAPD. Para a análise dessas técnicas, 13 iniciadores para cada marcador foram empregados com um padrão de bandas reprodutíveis e polimórficas (Figura 9) (Figura 10). A utilização da técnica ISSR, produziu um total de 137 loci, desses, 116 (84,67%) se mostraram polimórficos (Tabela 3). Sua similaridade genética, possuiu o coeficiente variando entre 0,056 a 0,80. Para a análise com a técnica RAPD, foi produzido um total de 136 loci, desses, 112 (82,35 %) se mostraram polimórficos (Tabela 3). A similaridade genética, gerou um coeficiente variando entre 0,15 a 0,65. Em ambos os marcadores, foi possível observar a distribuição dos isolados em cinco grupos, apresentando 49% de nível de similaridade em dois dendrogramas produzido pelo método UPGMA (Figura 11) (Figura 12).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9- Eletroforese de produtos de PCR ISSR de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobramae* obtidos com o primer TriGTG.



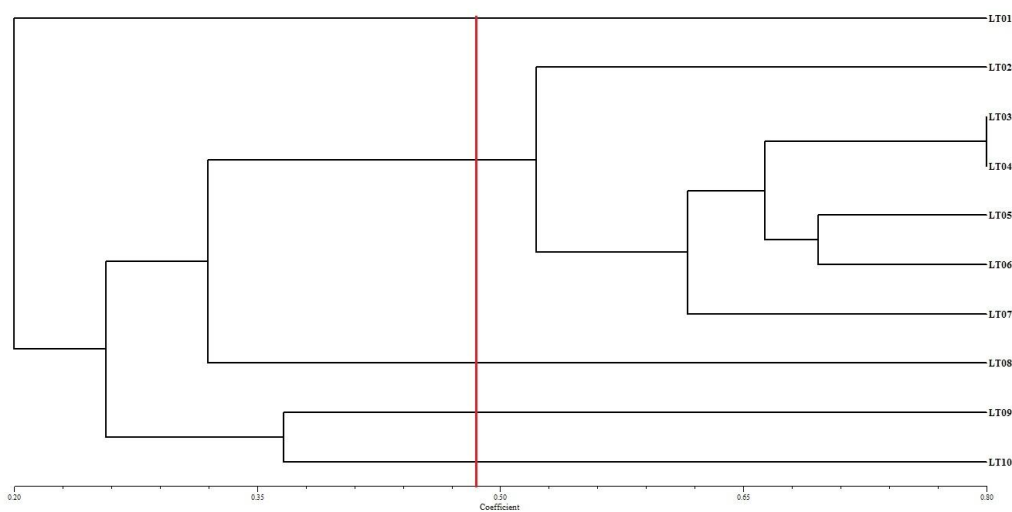
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10- Eletroforese de produtos de PCR RAPD de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobramae* obtidos com o primer OPD 2.

Tabela 3 - Avaliação do poder de resolução dos marcadores ISSR e RAPD. Número de fragmentos amplificados (NºFA), número de fragmentos polimórficos (NºFP), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação polimórfica (PIC), relação efetiva do multiplex (EMR) e índice do marcador (MI).

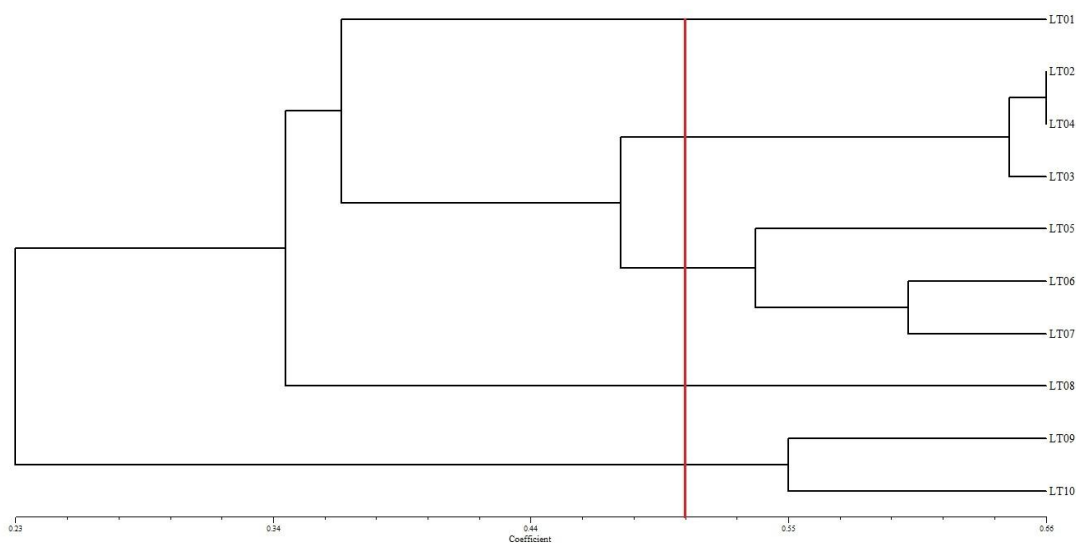
Nº do iniciador ISSR	NºF	NºFP	%P	PIC	EMR	MI
3	12	10	83%	0,31	8,3	2,6
4	8	7	88%	0,214286	6,1	1,3
5	11	10	91%	0,322	9,1	2,9
8	9	8	89%	0,37	7,1	2,6
9	12	8	67%	0,3375	5,3	1,8
10	11	7	64%	0,36	4,5	1,6
11	7	5	71%	0,284	3,6	1,0
13	6	6	100%	0,383333	6,0	2,3
16	10	9	90%	0,397778	8,1	3,2
18	21	19	90%	0,352632	17,2	6,1
21	12	11	92%	0,363636	10,1	3,7
22	10	9	90%	0,373333	8,1	3,0
24	8	7	88%	0,371429	6,1	2,3
TOTAL	137	116	85%	0,341533	7,7	2,6
		MÉDIA				
OPM						
1	14	11	78,57%	0,3745	8,6	3,2
2	10	8	80,00%	0,3325	6,4	2,1
5	6	6	100,00%	0,4367	6,0	2,6
12	12	8	66,67%	0,3475	5,3	1,9
13	15	11	73,33%	0,2727	8,1	2,2
OPD						
2	33	28	84,85%	0,3071	23,8	7,3
3	8	6	75,00%	0,3167	4,5	1,4
5	7	6	85,71%	0,3067	5,1	1,6
8	5	3	60,00%	0,3667	1,8	0,7
11	7	5	71,43%	0,3920	3,6	1,4
13	11	11	100,00%	0,3473	11,0	3,8
20	10	9	90,00%	0,3022	8,1	2,4
TOTAL	138	112	80,46%	0,3419	7,7	2,6
		MÉDIA				

Fonte: Arquivo pessoal.



Fonte: Arquivo pessoal.

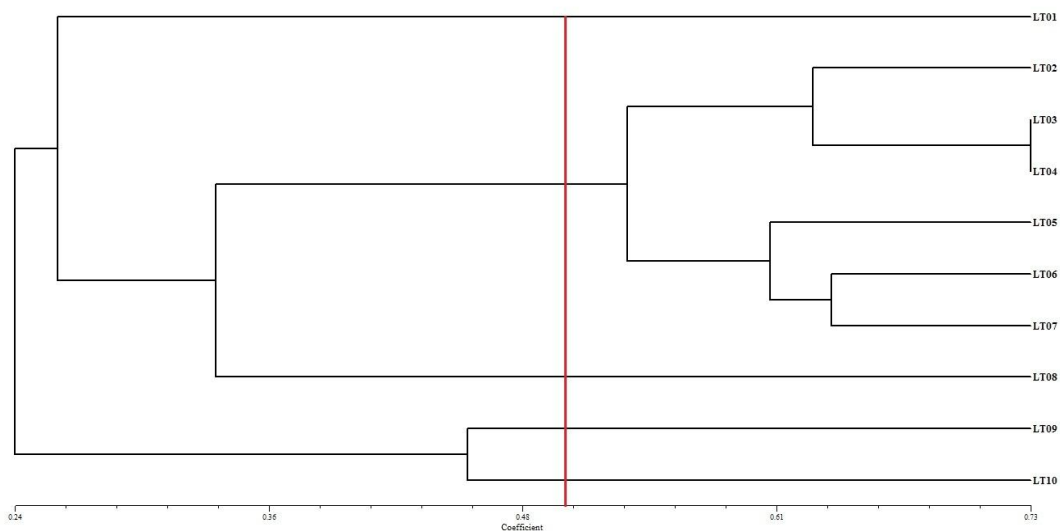
Figura 11- Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os iniciadores ISSR de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 12- Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da análise com os iniciadores RAPD de 10 isolados de *Lasiodiplodia theobromae*.

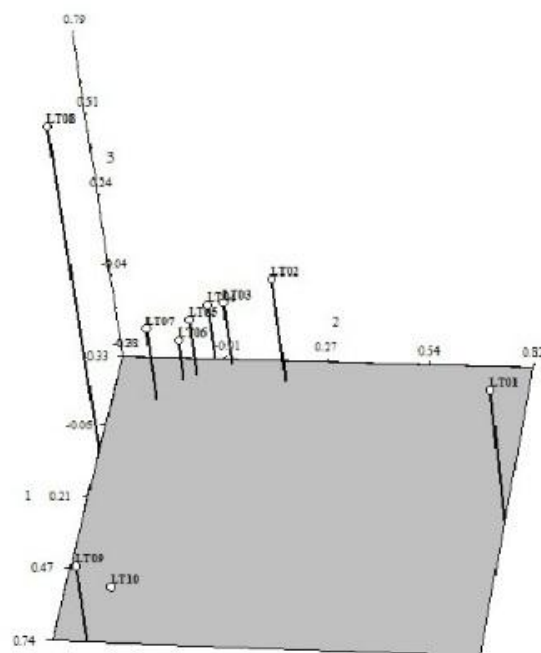
A confecção de um dendrograma com a combinação dos iniciadores ISSR e RAPD pelo método UPGMA indicou a presença de cinco grupos em que os 10 isolados de *L. theobromae* estavam dispostos. O nível de similaridade indicado é de 49% (Figura 13), com o coeficiente variando entre 0,72 a 0,13.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 13 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando os coeficientes de Jaccard derivado da combinação de dados da análise com os iniciadores ISSR e RAPD de 10 isolados de *Lasiosiphonia theobramae*.

Os 10 isolados utilizados no estudo distribuíram-se em cinco grupos. O grupo 2, contendo seis isolados, provenientes de Baraúna-RN (cinco) e Apodi-RN (um) apresentou média de 57 % de similaridade, sendo o maior grupo formado. Os demais grupos (1, 3, 4 e 5) contendo isolados provenientes de Baraúna-RN (um) e Mossoró-RN (três), foram estruturados unicamente com um isolado. Através da análise das coordenadas principais (Figura 14), é possível observar com nitidez a divergência expressada pelo isolado LT1, confirmando o resultado obtido com a formação do dendrograma em que se constata sua diferença genética.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 – Associações genéticas de 10 isolados de *Lasiosiphonia theobromae* de acordo com a análise das coordenadas principais dos iniciadores ISSR e RAPD.

Embora os 10 isolados de *L. theobromae* tenham sido examinados em relação a sua localização geográfica, o agrupamento do dendrograma conjunto com dados dos iniciadores ISSR e RAPD, não foi totalmente associado a seu local de origem de obtenção, uma vez que, alguns isolados da mesma região ficaram em grupos distintos. Estudos relatados por Tiwari et al., (2021) e Sathya et al., (2017), com *L. theobromae* em ensaios com RAPD, obtiveram resultados semelhantes aos desse estudo, inferindo a ocorrência de significativa diversidade intra-específica entre os isolados de *L. theobromae*.

No entanto, em conformidade com Hong-hui et al., (2016), por meio dos marcadores ISSR e RAPD, seis isolados foram agrupados de maneira independente, indicando relação com a localização geográfica de onde foram coletados. Destes isolados, cinco pertenciam à mesma localidade exceto um, sugerindo a ocorrência de um baixo nível de diferenciação entre essas populações (REGO, 2018).

A dissimilaridade apontada entre os isolados de *L. theobromae* pode estar associada a alguns mecanismos apontados por Al-Sadi et al., (2013), em que sugere a

ação de determinadas práticas agrícolas como movimentadoras de espécies de *L. theobromae*, possibilitando o deslocamento frequente do patógeno, o que caracteriza isolados da mesma região estarem agrupados em configuração não conjunta. Mehl et al., (2017) relata que espécies pertencentes a Botryosphaeriaceae, incluindo *L. theobromae*, possuem ampla dispersão em todo o mundo.

A diversidade genética entre os isolados de *L. theobromae* também foi estudada por Santos et al., (2017). Em sua análise filogenética e estrutural de *L. theobromae*, foi constatado que isolados oriundos das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, apresentam maior variabilidade, devido às populações estarem localizadas mais próximas ao centro da zona tropical. Essa distribuição generalizada coincide a longas distâncias de dispersão, em razão da comercialização de produtos vegetais e plantas.

Estudos moleculares sobre o gênero *Lasiodiplodia*, mostraram também alta diversidade genética associado às localidades geográficas, como em Hong-hui et al., (2019) através do marcador ISSR, e Sangeetha et al., (2012), por meio do marcador RAPD.

Os marcadores ISSR e RAPD exibiram eficiência ao revelar a diversidade genética dos 10 isolados de *L. theobromae* para esse estudo. O dendograma obtido com a combinação dos dados, apresentou correlação significativa ($r= 0,95$) entre as matrizes de dados cofenéticos e a análise de agrupamento, mostrando-se positiva. Na comparação entre sistemas, a média do valor do EMR foi de 7,7 para ambos os marcadores ISSR e RAPD. Assim, os marcadores apresentaram iguadade de informação para avaliação da variabilidade genética quando comparados entre si.

O percentual de maior similaridade constatada entre os isolados foi de 72%, entre os isolados LT 03 e LT 04, podendo também ser observada entre os isolados LT 02 e LT 03, com 64%, seguido por 63%, entre os isolados LT 06 e LT 07, sendo esses isolados representantes do maior grupo formado em todos os dendrogramas, indicando uma curta distância genética entre as populações, de acordo com os resultados obtidos por Hong-Hui et al., (2016), em seu estudo de diversidade genética de *L. theobromae* baseado em marcadores moleculares ISSR e RAPD.

Conforme a matriz de similaridade, as maiores distâncias genéticas foram verificadas entre os isolados LT 01 e LT 08, com 86% de distância, e 83% entre os isolados LT 08 e LT 10, respectivamente. Relacionando esse dado a patogenicidade, nota-se que o isolado menos agressivo (LT 08) faz parte das duas maiores distâncias genéticas apresentadas entre todos os isolados. Dessa forma, este se mostra geneticamente distante

do isolado mais agressivo (LT 10). Esse resultado, provavelmente é relativo a regiões genômicas associadas à patogenicidade, em que foi feita a cobertura pelos marcadores moleculares.

Contudo, Gordon e Martyn (1997) propõe que populações de isolados patogênicos podem vir a perder sua patogenicidade total ou parcialmente através de mutações, e/ou populações de isolados patogênicos são originárias de populações não patogênicas antecedentes que passaram por adaptações ao longo dos anos.

As populações de isolados com maior similaridade apresentaram valores muito próximos no ranking de severidade do experimento de patogenicidade. Desta maneira, a respectiva variabilidade genética apresentada por espécies do gênero *Lasiodiplodia* possui provável relação a condições ambientais e susceptibilidade do hospedeiro, o que permite maior dispersão e sucesso de algumas espécies que outras (RODRÍGUEZ-GÁLVEZ et al., 2020).

Em conclusão as informações obtidas no estudo, é imprevisível que se obtenha o conhecimento da diversidade genética do patógeno, possibilitando dessa forma, a introdução de manejos adequados perante as doenças radiculares que atingem o meloeiro (COSTA, 2020).

4. CONCLUSÃO

- Todos os isolados utilizados no estudo são patogênicos variando em níveis de agressividade.
- Foi possível detectar a variabilidade genética de 10 isolados de *L. theobromae* com uso de marcadores ISSR e RAPD.
- A detecção da diversidade genética foi satisfatória perante a utilização das técnicas ISSR e RAPD.
- Foi possível relacionar a patogenicidade e variabilidade genética de acordo com as distâncias genéticas apresentadas entre os 10 isolados de *L. theobromae*.

- Os resultados obtidos com esse estudo podem auxiliar na busca de estratégias efetivas para o manejo de podridão radicular.

5. REFERÊNCIAS

AL-SADI, A. M., AL-WEHAIBI, A. N., AL-SHARIQI, R. M., AL-HAMMADI, M. S., AL-HOSNI, I. A., AL-MAHMOOLI, I. H., AL-GHAITHI, A. G. Population Genetic Analysis Reveals Diversity in *Lasiodiplodia* Species Infecting Date Palm, *Citrus*, and Mango in Oman and the UAE. **Plant Disease**, v.7 n.10, p.1363-1369, 2013.

ANDRADE, D. E. G. T., MICHERE, S. J., BIONDI, C. M., NASCIMENTO, C. W.A., SALES JR, R. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação das características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa phytopathologica**, v.31 n.4, p.327-333, 2005.

ARAÚJO, M. B. M., MOREIRA, G. M., NASCIMENTO, L. V., NOGUEIRA, G. A., NASCIMENTO, S. R. C., PFENNING, L. H., AMBRÓSIO, M.M.Q. Fusarium rot of melon is caused by several *Fusarium* species. **Plant Pathology**, 70,712–721, 2021.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.** 42, 225-226, 1939.

CHESNOKOV, Y. V., ARTEMYEVA, A. M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. **Agricultural Biology**, v.5 n.5, p.571-578, 2015.

COSTA, TALISON EUGÊNIO. **Análise genômica, proteômica e de patogenicidade de isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* associada ao meloeiro.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/ Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2020. 51p.

COSTA, T. E., NEGREIROS, A. M. P, SOUZA, M. F., SALES JR, R. & HOLANA, I. S. A. Genetic similarity of *Macrophomina pseudophaseolina* isolates associated with weeds in the brazilian semiarid region. **Caatinga**, v.33 n.44, p.908-917, 2020.

CUNHA, F, S., COSTA, A. E. S., CAPUCHO, A. S., DIAS, R. C. S., ISHIKAWA, F. H. Escala descritiva para avaliação de *Rhizoctonia solani* em melancia em fase de plântula. In: **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, 8, 2015. Disponível em: <http://www.sbmp.org.br/8congresso/anais/indiceautor.htm#F>. Acesso em 26 Dez. 2021.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Reviews Phytopathology**, California, USA, v. 35, p. 111-28, 1997.

HONG-HUI, X., LI-PING, W., XIAN-YA, H., JU-XIN, L. ISSR analysis of genetic diversity for mulberry *Lasiodiplodia* root rot pathogen. **Journal of Southern Agriculture**, v.5 n.7, p.1505-1512, 2019.

HONG-HUI, WEI, JG., HUANG, RS., YANG, XB. Genetic diversity analyses of *Lasiodiplodia theobromae* on *Morus alba* and *Agave sisalana* based on RAPD and ISSR molecular markers. **Mycology**, v.7 n4, p.155-164, 2016.

JAMSHIDI, S., JAMSHIDI, S. NTSYSpc 2.02 e implementation in molecular biodata analysis (clustering, screening, and individual selection). In: Proceedings of 4th International Conference on Environmental and Computer Science *IPCBE*, v.19, 2011.

MARTINS, L. A. R., LORENZONI, R. M., JÚNIOR, R. M. P., MIRANDA, F. D., FONTES, M. M. P., CARRIJO, T. T., SOARES, T. C. B. Genetic diversity and structure of *Dorstenia elata* (Moraceae) in an Atlantic Forest remnant. **Rodriguésia**, 72,e00862020, 2021.

MEHL J., WINGFIELD M. J., ROUX, J., SLIPPERS, B. Invasive everywhere? Phylogeographic analysis of the globally distributed tree pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. **Forests**, v.8 n.5, p.145, 2017.

NETO, J. A. S. **Caracterização morfológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. de mangueira e a atividade inibitória de óleos essenciais sobre este patógeno.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/ Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte. 2020. 58p.

NOGUEIRA, G. A., SILVA, S. G. A., LINHARES, C. M. S., AMBRÓSIO, M. M.Q., NUNES, G. H. S. Methods for inoculation of *Fusarium solani* and *Sclerotium rolfsii* in melon plants. **Summa Phytopathologica**, v.45 n.1, p. 59-63. 2019.

PORTO, M. A. F., AMBRÓSIO, M. M. Q., NASCIMENTO, S. R. C., CRUZ, B. L. S., TORRES, T. M. Interação de *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* como patógenos da podridão radicular de *Cucumis melo*. **Summa Phytopathologica**, v.45 n.4, p.355-360, 2019.

RÊGO, TAMIRIS JOANA DOS SANTOS. **Espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente da videira no Nordeste do Brasil e diversidade genética de *Lasiodiplodia theobromae*.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia/ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2018, p. 95.

R Core Team, 2019. **R: A language and environment for statistical computing.** Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 20 Dez. 2021.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E., HILÁRIO, S., LOPES, A., ALVES, A. Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. **Eur J Plant Pathol**, v.157 n.89, p.102, 2020.

SALVATORE, M. M., ANDOLFI A., NICOLETTI, R. The Thin Line between Pathogenicity and Endophytism: The Case of *Lasiodiplodia theobromae*. **Agriculture**, v.10, p.488, 2020.

SANTOS, P.H.D., CARVALHO, B.M., AGUIAR, K.P., AREDES, F.A.S., POLTRONIERI, T.P.S., VIVAS, J.M.S., MUSSI DIAS, V., BEZERRA, G.A., PINHO, D.B., PEREIRA, M.G., SILVEIRA, S. F. Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. **Genetics and Molecular Research**, v.16 n.2, gmr16029681, 2017.

SATHYA, K., PARTHASARATHY, S., THIRIBHUVANAMALA, G., PRABAKAR, K. Morphological and molecular variability of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem end rot of mango in Tamil Nadu, India. **Int. J. Pure App. Biosci**, v.5 n.6, p. 1024-1031, 2017.

SANGEETHA, G., ANANDAN, A., RANI, S. U. Morphological and molecular characterisation of *Lasiodiplodia theobromae* from various banana cultivars causing crown rot disease in fruits. **Phytopathology and Plant Protection**, v.45, p.475-486, 2012.

SILVA, G. T. M. A., F. I. C., CARVALHO, A. V. F., ANDRÉ, T. P. P., SILVA, C. F. B., ARAGÃO, F. A. S. Method for evaluating rhizoctonia resistance in melon germplasm. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51 n.4, e20197090, 2020.

SMITH, S. N., DE VAY, J. E., HSIEH, WH., LEE, HJ. Soil-borne populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, a cotton wilt fungus in California fields. **Mycologia**, v.93 p.737-743, 2001.

SOUZA, J. S. N., DOS SANTOS, M. A. L, VITÓRIA, N. S. Registro de *Lasiodiplodia theobromae* em frutos abortados de coqueiro no sertão da Bahia, brasil. **Agrotrópica**, v.33 n.1, p.49-54, 2021.

TIWARI, B., KIRAN, R., KUMAR, P., KUMAR, A., SADHNA, AKHTAR, J., DUBEY, S. C. *Lasiodiplodia theobromae*, a potential post-harvest threat to agri-horticultural crops and its morpho-molecular diversity. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 49 n. 2, p. 125-130, 2021.