



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

ATARISSIS MORAIS DIAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Macrophomina phaseolina* E O EFEITO DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* NO SEU CRESCIMENTO *IN*  
*VITRO***

MOSSORÓ  
2020

ATARISSIS MORAIS DIAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Macrophomina phaseolina* E O EFEITO DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* NO SEU CRESCIMENTO *IN*  
*VITRO***

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

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético e  
Tecnologia em Sementes e Pós Colheita.

Orientador: Prof. Dr.(a) Ioná Santos Araújo  
Holanda

Coorientador: Prof. Dr. Rui Sales Júnior

MOSSORÓ

2020

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº. 9.610/1998. O conteúdo desta obra 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.

M541d Morais Dias, Atarissis.  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Macrophomina phaseolina* E O  
EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* NO SEU  
CRESCIMENTO IN VITRO / Atarissis Morais Dias. - 2020.  
48 f.: il.

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

1. Capim limão indiano. 2. Fungo. 3. PCR. 4. RAPD. I. Santos Araújo  
Holanda, Ioná, orient. II.  
Sales Júnior, Rui, co-orient. III. Título.

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

ATARISSIS MORAIS DIAS

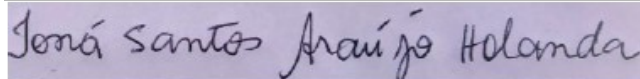
**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Macrophomina phaseolina* E O EFEITO DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* NO SEU CRESCIMENTO *IN*  
*VITRO***

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

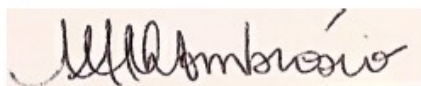
Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético e Tecnologia em Sementes e Pós Colheita.

Defendida em: 29 / 04 / 2020.

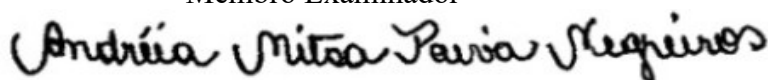
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)  
Presidente



Prof. Dra. Márcia Michelle Queiroz Ambrósio (UFERSA)  
Membro Examinador



Dra. Andréia Mitsa Paiva Negreiros  
Membro Examinador



Dr. Matheus de Freitas Souza (UFERSA)  
Membro Examinador

A minha mãe Maria Rita Morais (In Memoriam).

Ao meu pai Francisco de Assis Dias e aos  
meus irmãos Anfraserai e Samanherni Morais  
Dias

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, que sempre me guia fazendo com que eu supere cada obstáculo e me dando forças para seguir em frente.

A minha mãe, Maria Rita Morais, por todo amor, dedicação e apoio em minha vida.

Ao meu pai Francisco de Assis Dias e aos meus irmãos Anfranserai e Samanherni e ao meu primo Eduardo que eu tenho como um irmão por estarem sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.

Aos meus avós maternos Rita e Raimundo que me inspiram e me dão motivos para que possa seguir em frente.

A minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Ioná Santos Araújo Holanda pela orientação pela paciência que teve em me ensinar os procedimentos práticos na área de Biotecnologia Vegetal.

Ao professor Rui Sales Júnior por ter me coorientado e permitido a realização de uma parte dessa pesquisa no Laboratório de Fitopatologia II.

A pesquisadora Andréia Mitsa pela sua grande contribuição com os seus conhecimentos seja na área de fitopatologia, estatística e ate mesmo molecular e também pela paciência em me ensinar, em me ouvir, por toda a ajuda durante o mestrado.

A técnica do laboratório de Fitopatologia II Naama pelo apoio durante a execução dessa pesquisa e pelos inúmeros conselhos, conversas por aguentar meus choros que não foram poucos.

Aos meus amigos Felipe, Eleneide, Glacilene, Rafael, Dennis Fernando, Fernanda Emily, Júlia, Vítor Rafael, pelo apoio, conselhos e motivação durante o mestrado.

Aos meus colegas de Laboratório de Biotecnologia Vegetal Jorge, Talisson, Fernanda, Suzana, Paulo, Abner, Lara, Gilsivan, Pedro, Karen e Isabelle por me ajudarem durante a execução da parte molecular do projeto e a Allinny, Cinthya e aos outros integrantes do

Laboratório de Fitopatologia II pelo auxílio durante a execução do experimento com o óleo essencial.

Ao programa de Pos graduação em Fitotecnia e ao CNPQ por terem me proporcionado à chance de realização dessa pesquisa.

## RESUMO

O fungo *Macrophomina phaseolina* é considerado um dos principais agentes etiológicos do colapso das ramas, uma das principais doenças que afetam a cultura do melão. Esse patógeno é considerado de difícil controle e devido a esse fator tornam-se necessários estudos que auxiliem no entendimento sobre sua variação genética e alternativas de controle. Os objetivos deste estudo foram avaliar a diversidade genética dos isolados de *M. phaseolina* e verificar o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (capim limão indiano) no crescimento *in vitro* dos isolados 5 e 29. Os DNAs dos 30 isolados foram extraídos de acordo com o protocolo do kit de extração de DNA NucleoSpin Microbial. Dos 100 primers pré analisados 13 primers do marcador DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD) foram selecionados para a realização da diversidade genética. As análises para a obtenção do dendograma foram realizadas pelo programa NTSYS. Todos os isolados foram confirmados pela análise molecular a partir dos primers genes específicos que amplificaram bandas de DNA específicas de aproximadamente 350 pb. Um total de 135 bandas foram amplificadas onde 97(71,85%) foram consideradas polimórficas com uma média de 7,5 fragmentos polimórficos por iniciador. O grau de similaridade genética variou de 0,23 a 0,92 cujo valor da correlação cofenética foi  $r = 0,84$ , o que demonstra uma boa confiabilidade entre os dados da matriz e o dendograma. O dendograma gerado indicou a formação de quatro grupos principais entre os isolados os quais não foram agrupados de acordo com a origem ou local de coleta. Esse fato pode estar relacionado à evolução dos ancestrais entre os grupos. As análises com o óleo essencial (OE) de *C. flexuosus* foram conduzidas em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com dois isolados distantes geneticamente (5 e 29), seis concentrações de OE (0,02; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25%) uma testemunha negativa (meio BDA) e uma testemunha positiva (meio BDA + fungicida Maxim) com oito repetições para cada tratamento. Foram realizadas medições diárias do diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares. Os dados obtidos foram interpretados por meio de uma equação de logística de quatro parâmetros e as médias foram comparadas pelo teste de Mann Whitney, a 5% de probabilidade. No óleo essencial de *C. flexuosus* a partir da concentração 0,15% houve uma inibição total no crescimento *in vitro* nos dois isolados de *M. phaseolina* avaliados. Isso representa um resultado promissor no que tange a utilização futura do óleo essencial no controle do patógeno. Não houve diferença estatística significativa do óleo essencial de *C. flexuosus* nos isolados 5 e 29, o que demonstra a eficiência desse OE entre os dois isolados estudados. Com este trabalho pode-se concluir que o marcador RAPD foi considerado adequado para avaliar a diversidade genética dos isolados estudados e que o OE de *C. flexuosus* foi considerado eficiente na inibição do crescimento *in vitro* nos isolados de *M. phaseolina* avaliados.

**Palavras-chave:** Capim limão indiano; Fungo; PCR; RAPD.



## ABSTRACT

The fungus *Macrophomina phaseolina* is considered one of the main etiological agents of the collapse of the branches, one of the main diseases that affect the culture of the melon. This pathogen is considered difficult to control and due to this factor, studies are needed to help understand its genetic variation and control alternatives. The objectives of this study were to evaluate the genetic diversity of *M. phaseolina* isolates and to verify the effect of *Cymbopogon flexuosus* essential oil (Indian lemon grass) on in vitro growth of isolates 5 and 29. The DNAs of the 30 isolates were extracted according to the NucleoSpin Microbial DNA extraction kit protocol. Of the 100 primers pre-analyzed, 13 primers from the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker were selected to perform genetic diversity. The analyzes for obtaining the dendrogram were performed using the NTSYS program. All isolates were confirmed by molecular analysis from specific gene primers that amplified specific DNA bands of approximately 350 bp. A total of 135 bands were amplified where 97 (71.85%) were considered polymorphic with an average of 7.5 polymorphic fragments per primer. The degree of genetic similarity ranged from 0.23 to 0.92, whose co-phenetic correlation value was  $r = 0.84$ , which demonstrates the presence of genetic variability between the isolates and a good reliability between the matrix data and the dendrogram. The generated dendrogram indicated the formation of four main groups among the isolates which were not grouped according to the origin or place of collection. This fact may be related to the evolution of ancestors between the groups. The analyzes with the essential oil (OE) of *C. flexuosus* were conducted in a completely randomized experimental design (DIC), with two distant isolates genetically (5 and 29), six concentrations of OE (0.02; 0.05; 0.10; 0.15; 0.20 and 0.25%) a negative control (BDA medium) and a positive control (BDA medium + Maxim fungicide) with eight repetitions for each treatment. Daily measurements of the colony diameter were performed in two perpendicular directions. The data obtained were interpreted using a four-parameter logistic equation and the averages were compared using the Mann Whitney test, at 5% probability. In the essential oil of *C. flexuosus* from the concentration 0.15%, there was a total inhibition in growth in vitro in the two isolates of *M. phaseolina* evaluated. This represents a promising result regarding the future use of essential oil to control the pathogen. There was no statistically significant difference in the essential oil of *C. flexuosus* in isolates 5 and 29, which demonstrates the efficiency of this OE between the two isolates studied. With this work it can be concluded that the RAPD marker was considered adequate to assess the genetic diversity of the studied isolates and that the *C. flexuosus* OE was considered efficient in inhibiting growth in vitro in the evaluated *M. phaseolina* isolates

**Keywords:** Indian lemon grass; Fungi; PCR; RAPD.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Gel de agarose contendo os produtos da amplificações com os primers MpKFI e MpKRI nos 30 isolados (1 a 30) de <i>M. phaseolina</i> . A letra “M” na primeira e última canaleta do gel representa o Marcador de peso molecular DNA <i>Ladder</i> 1Kb.....	<b>30</b>
<b>Figura 2:</b> Produtos da amplificação de PCR dos 30 isolados (1 a 30) de <i>M. phaseolina</i> com o primer que apresentou a maior % de polimorfismo (OPH2). A letra “M” na primeira e última canaleta do gel representa o Marcador de peso molecular DNA <i>Ladder</i> de 1 Kb.....	<b>34</b>
<b>Figura 3:</b> Análise de agrupamento de 30 isolados de <i>M. phaseolina</i> obtidos a partir da matriz de distâncias genéticas calculadas com base no coeficiente de similaridade de Jaccard.....	<b>35</b>
<b>Figura 4:</b> Crescimento micelial de isolados de <i>M. phaseolina</i> submetidos a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> , T: Testemunha Negativa e F: Fungicida (400 mL L <sup>-1</sup> de Maxim). .....	<b>37</b>
<b>Figura 5:</b> Porcentagem de inibição de crescimento (PIC %) de <i>M. phaseolina</i> em função de concentrações do óleo essencial <i>C. flexuosus</i> .....	<b>38</b>
<b>Figura 6:</b> Médias da inibição do crescimento micelial submetidos a óleo de <i>C. flexuosus</i> entre os isolados de <i>M. phaseolina</i> .....	<b>40</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Descrição dos isolados de acordo com a origem geográfica e biológica e o grupo a que eles pertencem de acordo com o Dendograma obtido pelo programa Ntsys PC.....	<b>28</b>
<b>Tabela 2</b> - Iniciadores Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) selecionados para amplificação de genótipos <i>M. phaseolina</i> com as respectivas sequências, Temperatura de Anelamento, Número Total de Bandas, Número de Bandas Monomórficas, Número de Bandas Polimórficas, Porcentagem de Polimorfismo PIC.....	<b>33</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA: Batata Dextrose Agar

DNA (*desoxyribonucleic acid*): Ácido desoxirribonucléico

dNTP (*deoxynucleotide*): Deoxinucleotídeos

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Kb: Kilo base

ng: nanogramas

pb: pares de bases

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reação em cadeia da polimerase

PIC (*Polymorphism Information Content*): Conteúdo de informação polimórfica

PIC: Porcentagem de inibição de crescimento

RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*): DNA polimórfico amplificado ao acaso

RPM: Rotações por Minuto

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C: Grau Celsius

M: Micro

Mg<sup>+2</sup>: Cátion de magnésio

mL: Mililitro

mM: Milimolar

®: Marca Registrada

%: Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Local do experimento.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Obtenção e multiplicação dos isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Análises moleculares dos isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i>.....</b>	<b>29</b>
4.3.1 Extração de DNA.....	29
4.3.2 Quantificação do DNA.....	29
4.3.3 Análise com marcadores genes específicos.....	29
4.3.4 Análise com marcadores RAPD.....	30
4.3.5 Leitura dos dados e análise estatística.....	31
<b>4.4 Análises com o óleo essencial <i>Cympogon flexuosus</i>.....</b>	<b>31</b>
4.4.1 Caracterização Experimental.....	31
4.4.2 Instalação e condução do experimento.....	32
4.4.3 Análise estatística.....	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Análise molecular.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Análise com óleo essencial <i>Cympogon flexuosus</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) é considerada uma cultura de importância econômica da família Cucurbitácea que é cultivada em todo mundo, com 32 milhões de toneladas produzidas em 2018 (FAO, 2018). O Brasil produziu 836.196 toneladas dos quais 233.000 toneladas foram destinados à exportação, ocupando a 11ª posição mundial entre os países produtores dessa fruta (FAO, 2018). Do total de melão exportado pelo Brasil, os estados do Rio Grande do Norte (RN) e Ceará (CE) foram responsáveis por 79,4% da produção destacando dessa forma a importância dessa cultura para o agronegócio o que contribui para a geração de emprego e renda, promovendo a melhoria de vida das pessoas que têm na agricultura sua forma de sustento. entre as principais culturas do país, gerando emprego e renda. (IBGE, 2018; LINHARES, 2018).

Durante o cultivo do melão diferentes problemas fitossanitários podem prejudicar o crescimento, desenvolvimento e produtividade da cultura. Um exemplo são os patógenos de solo associados ao “colapso das ramas”. Essa doença promove a podridão de raízes e caules, ocasionando um desequilíbrio hídrico entre o sistema radicular e parte aérea da planta, principalmente no estágio próximo à colheita (FITA; PICÓ; NUEZ, 2007). Muitos patógenos de solos estão associados a essa doença como os fungos pertencentes ao gênero *Macrophomina* (NEGREIROS et al., 2019).

A *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid) é um fitopatógeno que apresenta mais de 500 espécies botânicas como hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2018) e possui maior importância econômica devido à patogenicidade causada em plantas cultivadas, tais como feijão, algodão, sorgo, soja, beterraba, amendoim, melão entre outras (LINHARES, 2018). Além das plantas cultivadas também pode ser considerado como hospedeiro treze espécies de plantas daninhas, aumentando gradativamente o número de inoculo após safras sucessivas (NEGREIROS et al., 2019; SALES JUNIOR, et al., 2012).

Outra característica importante da espécie *M. phaseolina* é a grande diversidade de isolados, como reportado por NEGREIROS et al. (2019). Mesmo que a reprodução sexuada não seja frequente em *M. phaseolina*, o hospedeiro e a origem promovem uma diferenciação nos indivíduos desse patógeno. Essa diferenciação de isolados dificulta o controle do patógeno uma vez que específicos indivíduos podem adquirir resistência aos métodos de controle empregados (ALMEIDA et al., 2003). A capacidade de tolerar determinadas medidas de controle de certos isolados pode estar associada à maior similaridade genética dos

indivíduos. Nesse sentido, catalogar a variabilidade genética entre os isolados de *M. phaseolina* é uma etapa importante para programas efetivos de manejo integrado de doenças.

A importância de se estudar a identificação genética da então espécie *M. phaseolina* se deve ao fato de que o gênero *Macrophomina* compreendia somente essa espécie até 2013. Entretanto, alguns pesquisadores, seguindo uma abordagem por meio de caracteres morfológicos e análises filogenéticas, foram relatadas mais duas espécies de *Macrophomina*, *M. pseudophaseolina* (GROENEWALD; CROUS, 2014; SARR, et al. 2014) e *M. euphorbiicola* A.R. Machado, D.J. Soares & O.L. Pereira (MACHADO; PINHO; SOARES; GOMES; PEREIRA, 2018).

A diversidade genética é uma variação hereditária devido à constituição genética dos indivíduos de uma população. Ela é responsável pela manutenção do equilíbrio e a estabilidade dos ecossistemas (FALEIRO et al., 2011). Várias metodologias já foram propostas para determinar o grau de similaridade genética entre patógenos. Análises morfológicas foram descritas com sucesso para alguns fungos, porém esses demandam tempo e são subjetivas em algumas avaliações (SALAHLOU et al., 2018). Outra alternativa é a molecular através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Essa análise é rápida e eficiente na detecção de isolados geneticamente semelhantes. Por exemplo, a RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (ŽIVANOV et al., 2019) é um tipo de técnica PCR capaz de detectar semelhanças genéticas entre indivíduos com rapidez, reprodutibilidade e baixo custo. A identificação do grau de similaridade genética entre os isolados via marcadores moleculares torna mais conclusivos os estudos que buscam avaliar a eficácia de métodos de controle do patógeno. Por exemplo, variedades podem ser desenvolvidas com resistência a específicos isolados, principalmente para aqueles mais virulentos a cultura. Além disso, moléculas químicas capazes de inibir o crescimento do patógeno podem ser melhor recomendadas quando grupos de isolados altamente susceptíveis são bem descritos (SANTOS G. et al., 2015).

Apesar do uso de variedades resistentes representar um mecanismo crucial no manejo de doenças fitopatogênicas, o controle químico ainda é o mais utilizado entre os produtores (PEREIRA et al., 2012). No entanto, a adoção do controle químico para a *M. phaseolina* em cultivos brasileiros é extremamente limitada devido a pouca disponibilidade de moléculas registradas no país (apenas 2). Esse cenário é ainda mais preocupante para produtores de melão no Brasil porque não existe nenhuma molécula com registro para a cultura. O desenvolvimento de novas moléculas sintéticas e teste de fungicidas já existentes e registrados podem ser alternativas no controle da *M. phaseolina*.



Apesar da eficiência dos fungicidas sintéticos, preocupações sobre o uso indiscriminado de fungicidas sintéticos altamente tóxicos a organismos não-alvos vem aumentando no mundo. Diversos estudos já relataram a contaminação ambiental causada por fungicidas e seus efeitos a saúde de animais e humanos (FONSECA et al., 2015). Assim, estudos voltados para desenvolvimento de compostos naturais, como os óleos essenciais obtidos de plantas, podem ser um caminho mais sustentável no controle de *M. phaseolina*. Dentre os óleos essenciais já testados para o controle de doenças fúngicas, aqueles extraídos de plantas do gênero *Cymbopogon* (*Cymbopogon flexuosus*) demonstraram alta atividades antifúngicas (SILVA, 2013).

Diversas etapas são necessárias durante o desenvolvimento de uma estratégia efetiva para o manejo de doenças fúngicas. Após a identificação e detecção das similaridades genéticas entre os isolados é possível avaliar se grupos geneticamente semelhantes apresentam maior ou menor sensibilidade a compostos antifúngicos. (Os objetivos desse trabalho foram: 1 Verificar a capacidade do marcador RAPD para detectar a similaridade genética entre os isolados; 2) Avaliar a eficácia do óleo de *Cymbopogon flexuosus* em inibir o crescimento in vitro de isolados de *M. phaseolina* com alta dissimilaridade genética. Com esses resultados espera-se obter informações primordiais para o desenvolvimento de programas sustentáveis de manejo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da cultura do melão

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma planta anual, herbácea, preferencialmente alógama, de caule prostrado, sulcado, não aculeado com número de hastes ou ramificações variável e folhas alternadas simples. Possui sistema radicular ramificado, vigoroso e pouco profundo, concentrado nos primeiros 20 a 30 cm de solo. As flores masculinas são agrupadas em uma inflorescência tipo cacho enquanto as hermafroditas são solitárias e pertence à família Cucurbitaceae e apresenta muitas divergências quanto a sua origem, mas as regiões mais prováveis são o sudoeste da África e a região peninsular da Índia (RODRIGUES, 2013).

A maior parte da produção do melão brasileiro, cerca de 95% se concentra na região Nordeste tendo como os maiores polos produtores os estados do Rio Grande do Norte e Ceará (IBGE, 2018). Isso ocorre devido às condições climáticas favoráveis tais como: local, altas temperaturas (25-35°C), luminosidade (2000-3000 h/ano), baixos índices pluviométricos, baixa umidade relativa do ar (65-75%), solos férteis, de textura média e bem drenados, geralmente com irrigação por gotejamento, adubação e manejo em geral, de acordo com o recomendado para a cultura permitem a produção do melão o ano inteiro, produzindo até três safras anuais, o que contribui para que esta seja a maior região produtora do Brasil. (CELIN, 2014).

No Rio Grande do Norte o polo Agrícola Mossoró – Assú destaca-se como a maior região produtora de melão do estado onde são adotadas várias práticas culturais intensivas ligadas ao monocultivo, gerando aumento direto e indireto de empregos em virtude do aumento das áreas de produção nos últimos anos (PEREIRA et al., 2012). O desenvolvimento dessa olerícola na região foi beneficiado pelo limitado índice pluviométrico anual na região, oferta de trabalho abundante, terra disponível, capacidade empresarial e facilidade para escoar a produção para o mercado externo (RODRIGUES et al., 2013).

Praticamente toda a produção do melão do polo Agrícola Mossoró – Assú e Baixo Jaguaribe é destinado a exportação a União Europeia que absorve cerca de 90% da produção. A cultura do melão não é apenas importante do ponto de vista das exportações e do agronegócio, pelo fato de gerar divisas para o país, mas, sobretudo pelo fator socioeconômico que ela gera dentro da região em que se insere, representando, antes de tudo, geração de renda e empregos, aquecendo a economia e melhorando as condições de vida das pessoas (PEREIRA et al., 2012).

Devido à cultura do melão apresentar plantios sucessivos na mesma área ao longo do ano, muitos problemas fitossanitários tais como a presença de patógenos radiculares como a *M. phaseolina* (ANDRADE et al., 2005).

A ocorrência de *M. phaseolina* causou reduções de até 50% na produção de plantas cultivadas tais como a soja, em municípios do estado do Paraná e também em áreas de produção de melão na Espanha foram (SALES JÚNIOR, 1999).

## 2.2 *Macrophomina phaseolina*

O fungo *M. phaseolina* teve seu primeiro relato em 1890 e somente foi registrado no Brasil em 1935 no feijão comum (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Este patógeno pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaerales, família Botryosphaeriaceae (SARTORATO; RAVA, 1994). É um habitante do solo e propaga-se, principalmente, na forma de microescleródios, ou em restos de cultura como picnídios.

Os microescleródios variam bastante, podendo ser esféricos, oblongos, ovais ou elípticos, bem como em longitude (25 a 150  $\mu\text{m}$ ). As hifas jovens são hialinas e tornam-se escuras com a idade (BRUTON; WANN, 2004). São produzidos a partir do micélio, com estrutura multicelular, duras e resistentes a condições adversas, e são encontrados sob a epiderme das raízes ou na camada externado córtex e região do colo (ALMEIDA et al., 2014). Estas estruturas são capazes de sobreviver por longos períodos no solo, cerca de 2 a 15 anos, dependendo das condições ambientais e da associação com resíduos do hospedeiro (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012).

Os picnídios são estruturas negras que variam entre 100 a 200  $\mu\text{m}$ . Os conídios são unicelulares, hialinos, elipsoides ou ovoides e medem 14-30 x 5-10  $\mu\text{m}$ . Os picnídios germinam facilmente e são infecciosos (BRUTON; WANN, 2004). São produzidos em tecido vivo e, responsáveis pela fase patogênica da doença (GAUR et al., 2012).

O patógeno habitante do solo, *M. phaseolina* é bastante difundido parasitando mais de 500 espécies botânicas dentre elas a cultura do melão, e as plantas daninhas presentes em áreas de plantio desta cultura no RN/CE tais como *Boerhavia diffusa* L. e *Trianthema portulacastrum* L. (FARR; ROSSMAN, 2018; NEGREIROS et al., 2019).

O Os sintomas da podridão iniciam-se com lesões na haste da planta, sendo deprimidas e escuras tornando-se acinzentadas, podendo ocorrer clorose, podridão de raiz, murcha e morte dos ramos ou de toda planta (BIANCHINI, et al., 2005). Plantas severamente infectadas morrem prematuramente em virtude da produção de toxinas do fungo e, pelo

bloqueio dos vasos do xilema (ISLAM et al.,2012). Os prejuízos causados por doenças a cultura do meloeiro são inúmeros, indo desde a queda da produtividade e qualidade dos frutos até danos irreversíveis como perda total de área plantada, já que não há tempo suficiente para recuperação da planta, por se tratar de uma cultura de ciclo curto. Tem-se atribuído ao monocultivo, a causa da ocorrência de doenças em áreas com meloeiro. Reduções de até 50% nas principais áreas de produção de melão na Espanha foram verificadas devido à ocorrência do colapso do meloeiro (SALES JÚNIOR, 1999), doença em que diversos patógenos atuam em associação, causando podridão radicular. Yang e Navi (2005) verificaram reduções de 30 a 50% nas lavouras de soja, em alguns estados dos Estados Unidos, ocasionadas por *M. phaseolina* fungo *M. phaseolina* é considerado um dos principais o agentes causais do “colapso das ramas” na cultura do melão que ocorre devido ao desequilíbrio hídrico entre o sistema radicular e a parte aérea da planta, principalmente no estágio próximo à colheita o que ocasiona podridões de raízes e caules cujo primeiros sintomas aparecem na zona do colo. (FITA; PICÓ; NUEZ, 2007). Os sintomas da podridão iniciam-se com lesões na haste da planta, sendo deprimidas e escuras tornando-se acinzentadas, podendo ocorrer clorose, podridão de raiz, murcha e morte dos ramos ou de toda planta (BIANCHINI, et al., 2005). Plantas severamente infectadas morrem prematuramente em virtude da produção de toxinas do fungo e, pelo bloqueio dos vasos do xilema (ISLAM et al.,2012). Os prejuízos causados por doenças a cultura do meloeiro são inúmeros, indo desde a queda da produtividade e qualidade dos frutos até danos irreversíveis como perda total de área plantada, já que não há tempo suficiente para recuperação da planta, por se tratar de uma cultura de ciclo curto.

### **2.3 Plantas daninhas como hospedeiras alternativas de *Macrophomina phaseolina***

A presença de plantas daninhas em áreas de plantio de melão é considerado um dos fatores que interferem no crescimento e desenvolvimento dessa cultura, devido à competição dessas plantas com a cultura do melão por luz, água, e nutrientes reduzindo assim a qualidade na produção do melão. Além dos danos causados pela competição, as plantas daninhas podem atuar como hospedeiras alternativas de fitopatógenos (RODRIGUES, 2013).

Sales Júnior et al. (2012) relataram à ocorrência de *M. phaseolina*, agente causal do “declínio” das ramas, em plantas daninhas prevalentes em áreas de cultivo de melão no Nordeste Brasileiro. O levantamento detectou 13 espécies daninhas hospedeiras de *M. phaseolina* dentre elas as espécies *B. diffusa* L. e *T. portulacastrum* L. que apresentaram um

ótimo desenvolvimento, tornando-se plantas de fácil e rápida disseminação na região semiárida.

A *B. diffusa* pertence à família Nyctaginaceae é encontrada em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, é conhecida popularmente como pega-pinto ou erva-tostão e se encontra presente em biomas como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Trata-se de uma erva perene, podendo atingir até 1 m de altura. Quando jovem apresenta-se prostrada, erguendo-se quando florida (LIMA, 2018).

A *T. portulacastrum* pertence à família Aizoaceae é conhecida popularmente como brejo e nativa de vários continentes, incluindo África e América do Norte e do Sul, no Brasil uma planta glabra, suculenta, herbácea e anual. O caule tem em geral uma coloração purpúrea. Cresce em uma ampla variedade de tipos de habitat e pode facilmente se instalar em áreas perturbadas e em terras cultivadas como uma erva daninha. As folhas têm pequenas lâminas redondas ou ovais de até quatro centímetros de comprimento, com pecíolos curtos. Flores solitárias ocorrem nas axilas das folhas. A flor carece de pétalas, mas possui sépalas roxas e semelhantes a pétalas. A fruta é uma cápsula cilíndrica curva que emerge do caule (MOREIRA, 2011).

## 2.4 Diversidade genética

A diversidade genética é a porção hereditária de uma variação possível de ser observada e mensurada, ela é responsável pela manutenção do equilíbrio dos ecossistemas. O estudo de diversidade genética é realizado a partir de informações de medidas de dissimilaridade obtidas de variáveis quantitativas discretas ou contínuas, de variáveis qualitativas binárias e de variáveis qualitativas multicategóricas. Com o estudo da diversidade genética é possível agrupar genótipos similares a partir de técnicas multivariadas e identificam genitores geneticamente diferentes (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

As análises de diversidade são realizadas por diferentes tipos de marcadores tais como o RAPD que tem a capacidade de analisar de forma ampla genomas de interesse sem a influência do ambiente (FALEIRO et al., 2011). A importância de se conhecer a diversidade genética de fungos como *M. phaseolina* através de marcadores como RAPD é a possibilidade de poder auxiliar na compreensão do nível de patogenicidade entre os fungos avaliados e consequentemente atuar no seu controle (ALMEIDA et al., 2003).

Alguns estudos publicados avaliaram a utilização do marcador RAPD com o intuito de auxiliarem os pesquisadores a entender um pouco mais sobre a diversidade genética em *M.*

*phaseolina* (ALMEIDA et al, 2003; GAUTAM; SINGH; SHARMA, 2013; ZIVANOV et al, 2019).

## 2.5 Marcadores moleculares

A utilização das técnicas de biologia molecular permitiu o surgimento de diferentes métodos para análise e comparação de material genético entre espécies diretamente a nível de DNA. O grande avanço ocorreu com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica descrita por Saiki et al. (1988) permite ampliar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA. Através da técnica de PCR é possível fazer uma identificação molecular precisa através de marcadores moleculares (OLIVEIRA; FERREIRA; SANTOS, 2007).

Marcadores moleculares são ferramentas importantes na caracterização e avaliação da diversidade genética dentro e entre espécies e populações, eles possuem a capacidade de acessar informações diretamente do genoma sem sofrer influência do efeito ambiental, o que o torna uma ferramenta rápida e eficaz em estudos genéticos (MARTINS et al., 2011; BORBA et al., 2005).

Diferente de outros métodos de detecção de polimorfismo, a utilização de marcadores moleculares não sofre influência de fatores ambientais, o que o torna uma ferramenta rápida e eficaz em estudos genéticos (FALEIRO et al., 2011).

Os diferentes tipos de marcadores moleculares se distinguem pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade a nível de DNA, e conseqüentemente sua capacidade de detectar diferenças entre os indivíduos, consistência e repetitividade dentre estes se destacam - se o Marcador Genes específicos e o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (SCHNEIDER, 2018; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

### 2.5.1 Marcadores genes específicos

O uso de marcadores genes específicos na identificação de *M. phaseolina* que causam enfermidades em plantas dão uma alta confiabilidade aos estudos, já que esses marcadores se baseiam em regiões específicas do DNA da espécie e não sofrem influência ambiental, ao contrário de alguns marcadores moleculares que detectam diferenças entre indivíduos com base no DNA de modo aleatório (PAVÓN et al., 2012).

A utilização dos marcadores genes específicos em conjunto com a técnica da PCR permite confirmar a presença ou não de microorganismos em plantas mesmo na ausência de sintomas de infecção. A utilização desses marcadores oferece a possibilidade de uma identificação correta e precoce de contaminação por *M. phaseolina*, podendo ser capaz de evitar perdas econômicas a partir de um diagnóstico precoce (SANTOS, G. et al, 2015).

Os marcadores gene específicos utilizados para a identificação e detecção do fungo *M. phaseolina*, tais como os MpKF1 e MpKR1, são projetados a partir de sequências conservadas da região ITS, considerada altamente específica que produz bandas específicos de 350 pb (BABU et al., 2007; SANTOS, G. et al, 2015).

### 2.5.2 Marcador RAPD

A técnica denominada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é relativamente simples, rápida e de baixo custo. Os marcadores RAPD foram os primeiros marcadores desenvolvidos baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em Cadeia), a qual envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima polimerase (WILLIAMS et al., 1990).

Diferentemente das demais técnicas de PCR, o marcador RAPD utiliza um único primer composto por 10 pares de bases de sequências arbitrárias com, 60% ou mais de conteúdo de Guanina e Citosina (GC). É considerado um marcador não radioativo que requer uma pequena quantidade de DNA e apresenta natureza binária, havendo apenas dois fenótipos moleculares, presença ou ausência de bandas (CRUZ; MILACH, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Apesar das limitações, tais como ser considerado um marcador dominante, apresentarem baixa repetibilidade das bandas, os marcadores RAPD também apresentam boa aceitação para: construção de mapas genéticos; seleção indireta de outros caracteres, isto é, seleciona-se com base na presença do alelo em população segregante e, com isso, traz-se o

fenótipo de interesse; análises genéticas dos mais diferentes organismos tais como os microrganismos; DNA fingerprinting entre outras (XAVIER et al., 2005).

## 2.6 Óleos essenciais

Devido aos problemas ocasionados pelo uso indevido de produtos químicos muitas pesquisas vem sendo realizadas para testar novos métodos de controle para combater os fitopatógenos dentre as técnicas, o uso de produtos naturais tais como os óleos essenciais vem se tornando uma realidade no controle de doenças de plantas (FONSECA et al., 2015).

Os óleos essenciais são considerados misturas complexas de substâncias voláteis, com baixa massa molecular, líquidas, lipofílicas e odoríferas em sua maior parte. São extraídos de várias partes vegetais, através de arraste a vapor d'água e hidrodestilação. Possuem característica volátil e aspecto oleoso em temperatura ambiente (MORAIS, 2009).

Os principais constituintes de óleos essenciais são mono e sesquiterpenos, incluindo hidratos de carbono, fenóis, álcoois, éteres, aldeídos e cetonas, responsáveis pela atividade biológica e por sua fragrância. Compostos fenólicos presentes em óleos essenciais também têm sido reconhecidos como componentes bioativos antimicrobianos (NUZHAT; VIDYASAGAR, 2013).

Em geral, os óleos essenciais são considerados compostos não-fitotóxicos, potencialmente eficazes contra vários microrganismos, incluindo os fungos fitopatogênicos. O potencial de controle destes fitopatógenos por estas substâncias se deve a sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005), ou através da indução de fitoalexinas, que contêm propriedades elicitoras (ROZWALKA et al., 2008).

Diversos estudos indicam que extratos e óleos essenciais extraídos de plantas podem apresentar efeito direto sobre o patógeno, alterando a germinação ou produção de esporos, a formação de apressório, o crescimento de hifas, ou ainda apresentar efeito sobre a planta, através da indução de mecanismos de resistência que ocorre devido a mudanças na composição da parede celular, destruição na membrana plasmática e desorganização na estrutura mitocondrial entre outros (MOTOYAMA et al, 2003; BONALDO et al, 2004; MOREIRA et al, 2005; DIAS-ARIEIRA et al., 2010).

O *C. flexuosus* tem origem no leste da Índia, Malabar e Grama pertence à família Poaceae. É encontrado em regiões de clima tropical e subtropical tais como os continentes da



Ásia, África e América, especificamente em regiões de solo montanhoso, arenosos e em pastagens (SILVA, 2013).

O óleo essencial extraído das folhas do *C. flexuosus* é constituído de substâncias como o citral (83,9%), substância relatada como a responsável em grande parte pelos efeitos antifúngicos e antibacterianos. Este óleo é altamente rico em aldeído, devido grande presença do citral em sua composição, sendo este originado a partir da conversão do geraniol (SILVA, 2013). A atividade antimicótica de óleo essencial de *C. flexuosus* foi observada em estudos realizados por Pandey (2003), para alguns fungos filamentosos como o *Trichophyton mentagrophytes* e *Fusarium oxysporum*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Os objetivos desse trabalho foram: 1. (Verificar a diversidade genética dos isolados de *M. phaseolina*) e 2. (Avaliar a eficácia in vitro do óleo essencial *C. flexuosus* nos isolados de avaliados de *M. phaseolina*).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade do marcador RAPD para detectar a similaridade genética entre os isolados de *M. phaseolina*;
- Avaliar a eficácia do óleo de *Cymbopogon flexuosus* nas concentrações 0,02; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25% em inibir o crescimento in vitro de isolados de *M. phaseolina* com baixa similaridade genética.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do experimento

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Biotecnologia Vegetal e Fitopatologia II do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) – Mossoró/RN.

### 4.2 Obtenção e multiplicação dos isolados de *Macrophomina phaseolina*

Trinta isolados de *M. phaseolina* foram obtidos de plantas daninhas (*B. diffusa* e *T. portulacastrum*) presentes em áreas produtoras de melão localizadas no RN/Ce, Brasil. Os isolados estão preservados na coleção de culturas de fungos do Laboratório de Fitopatologia II, do Centro de Ciências Agrárias da UFERSA. Na Tabela 1 estão descritos os isolados de acordo com a origem geográfica e hospedeiro.

**Tabela 1:** Descrição dos isolados de acordo com a origem geográfica e biológica.

Isolados	Identificação no Genbank	Origem Geográfica	Hospedeiro
1	CMM – 4742	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
2	CMM – 4747	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
3	CMM – 4737	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
4	CMM – 4738	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
5	CMM – 4739	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
6	CMM – 4740	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
7	CMM – 4733	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
8	CMM – 4734	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
9	CMM – 4735	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
10	CMM – 4736	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
11	CMM – 4741	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
12	CMM – 4743	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
13	CMM – 4744	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
14	CMM – 4745	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
15	CMM – 4746	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
16	CMM – 4748	Icapuí, Ceará, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
17	CMM – 4749	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
18	CMM – 4750	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
19	CMM – 4752	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
20	CMM – 4754	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
21	CMM – 4751	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
22	CMM – 4753	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
23	CMM – 4756	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
24	CMM – 4758	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
25	CMM – 4759	Assú, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>B. diffusa</i>
26	CMM – 4760	Assú, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>B. diffusa</i>
27	CMM – 4763	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>B. diffusa</i>
28	CMM – 4755	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>T. portulacastrum</i>
29	CMM – 4762	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>B. diffusa</i>
30	CMM – 4764	Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.	<i>B. diffusa</i>

Para a multiplicação dos isolados de *M. phaseolina*, os mesmos foram mantidos em meio BDA (Batata Dextrose Agar) à temperatura de 30 °C em estufa incubadora na ausência de luz, durante 5 a 7 dias, até ocorrer o preenchimento da placa pelo micélio fúngico.

### 4.3 Análises moleculares

#### 4.3.1 Extração de DNA

Após sete dias de crescimento fúngico a 30°C em estufa incubadora, estruturas fúngicas (micélio + microesclerócio) foram colhidas da superfície do ágar, através da raspagem dessas estruturas com o auxílio de um bisturi e depois transferidas para um microtubo de 2,0 mL. As extrações de DNA genômico dos 30 isolados de *M. phaseolina* foi realizada de acordo com o

descrito pelo fabricante do kit de extração NucleoSpin<sup>®</sup> Microbial DNA de (Macherey-Nagel) com pequenas modificações relacionadas ao tempo de centrifugação que invés de 30s passou para 1 min e 30s, já que a centrifuga levava um minuto para atingir a rotação utilizada pelo fabricante do kit.

#### 4.3.2 Quantificação do DNA

Amostras de DNA dos 30 isolados de *M. phaseolina* foram quantificadas em gel de agarose 1,5% coradas com brometo de etídio e submetidas à eletroforese com a voltagem de 100 V por 30 minutos e visualizadas em fotodocumentador de luz UV (Ultravioleta) AlphaImager<sup>®</sup> Mini. As amostras de DNA foram posteriormente diluídas em água ultrapura e padronizadas a concentração de 10 ng/ $\mu$ L.

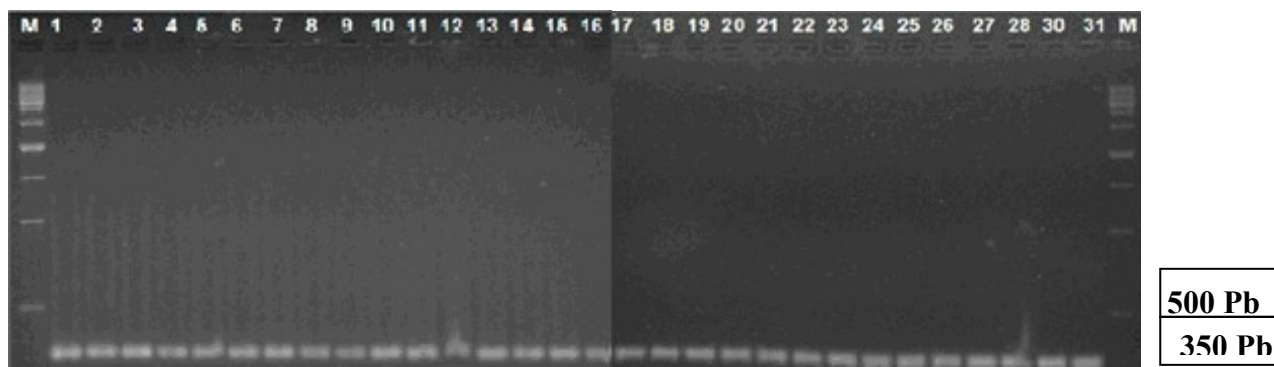
#### 4.3.3 Análise com marcadores genes específicos

Foram utilizados primers genes específicos para a confirmação que os DNAs extraídos eram da espécie *M. phaseolina*, MpKFI (5'- CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3') e MpKRI (5'-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3') (BABU et al. 2007).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 12  $\mu$ L constituído por tampão de PCR (10X), 2mM dNTPs, 5pmol primer MpKFI, 5pmol primer MpKRI, 1U/LTaq DNA polimerase e 10 ng de DNA e, por fim, adicionados 10  $\mu$ l de óleo mineral para evitar a evaporação durante o processo de PCR.

As amplificações foram realizadas em termociclador automático Amplitherm modelo TX96 PLUS consistindo nas seguintes etapas: uma desnaturação inicial do DNA de 94°C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de amplificações com desnaturação de 94 °C por 30 s, seguidos por uma temperatura de anelamento de 62,4°C por 1 min, uma extensão de 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 5 min, para a completa extensão dos produtos amplificados.

Os produtos de amplificações da PCR mais o acréscimo de 2  $\mu$ l de azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio (10  $\mu$ g/ml), e submetidos a uma voltagem de 120 v por 120 minutos em uma solução de tampão TBE 1X. Posteriormente, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado em equipamento fotodocumentador AlphaImager<sup>®</sup> Mini (Figura 1) e foi utilizado como padrão de peso molecular o 1Kb ladder (BioLabs/ New England).



**Figura 1:** Gel de agarose contendo os produtos das ampliações com os primers MpKFI e MpKRI nos 30 isolados (1 a 30) de *M. phaseolina*. A letra “M” na primeira e última canaleta do gel representa o Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb

#### 4.3.4 Análise com marcadores RAPD

Uma triagem a partir de 100 primers decâmeros RAPD das séries OPA, OPAA, OPD, OPH e OPM foram realizadas utilizando DNA de dois isolados de *M. phaseolina*, 4 e 5 ambos escolhidos de forma aleatória. Dos 100 primers avaliados, 13 apresentaram bom padrão de ampliações e polimorfismos foram selecionados para realizar a análise dos 30 isolados.

As reações de amplificação para esse marcador foram feitas num volume total de 13  $\mu$ L composta por 10 ng de DNA genômico, 1X de tampão de reação, 0,25 g/mL BSA purificada, 0,33  $\mu$ M *primer* RAPD, 0,16 mM de dNTPs, 1 U/ $\mu$ l Taq DNA polimerase e, por fim, adicionados 10  $\mu$ l de óleo mineral para evitar a evaporação durante o processo de PCR.

As ampliações foram realizadas num termociclador de DNA Amplitherm modelo TX96 PLUS, consistindo nas seguintes etapas: uma desnaturação inicial do DNA 94 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de ampliações, uma desnaturação de 92 °C por 1 min, seguidos por uma temperatura de anelamento de 40 °C por 1 min, uma extensão de 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos, para a completa extensão dos produtos amplificados.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio (10  $\mu$ g/ml), acrescido de 2  $\mu$ l de azul de bromofenol e submetidos à eletroforese horizontal a 120 V por 120 minutos em uma solução de tampão TBE 1X. Posteriormente, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado em equipamento fotodocumentador AlphaImager® Mini. Foi utilizado como padrão de peso molecular o 1 Kb ladder (BioLabs/ New England).

#### 4.3.5 Leitura dos dados e análise estatística

A análise dos dados de diversidade genética foi feita através da análise do padrão de bandas produzido por cada iniciador. Foi realizada a montagem das matrizes binárias para os fragmentos polimórficos, onde foi conferido o valor 1 para a presença e 0 para a ausência de bandas polimórficas. A partir dos dados foi construída uma matriz de similaridade genética, utilizando-se o Coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento através do método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*). Baseado na média das distâncias foi possível verificar o grau de similaridade entre os indivíduos ou grupos semelhantes e foi realizado o cálculo de correlação cofenética ( $r$ ) (SOKAL; ROHLF, 1962).

Os procedimentos estatísticos foram realizados através do software NTSYS-pc 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (ROHLF, 2000).

### 4.4 Análises com o óleo essencial *Cymbopogon flexuosus*

#### 4.4.1 Caracterização experimental

Para a realização desse experimento foram utilizados os isolados de *M. phaseolina*, 5 e 29, que foram considerados os mais distantes geneticamente de acordo com as análises de diversidade genética com o marcador RAPD. O óleo essencial utilizado foi o *Cymbopogon flexuosus*, Terraflor®.

O experimento foi conduzido no delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com dois isolados (5, 29), seis concentrações de óleo (0,02; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25%), uma testemunha negativa (meio BDA) e uma testemunha positiva (meio BDA + fungicida Maxim), com oito repetições para cada tratamento totalizando 112 placas. As concentrações estabelecidas para o óleo essencial foram baseadas em testes preliminares.

#### 4.4.2 Instalação e condução do experimento

Os meios de cultura tipo BDA foram autoclavados a temperatura de 121 °C e 1 ATM por 15 min e após esse processo quando os meios de cultura atingiram uma temperatura de  $\pm$  45 °C os tratamentos) foram adicionados ao meio. Sob condições assépticas os meios contendo os tratamentos foram vertidos em placas de Petri de dimensões 90 x 90mm. Após a polimerização do meio de cultura contendo os tratamentos, foram inseridos no centro das placas discos de 8 mm retirados de outro meio de cultura onde o isolado fúngico foi cultivado por

sete dias. Estas placas foram mantidas em incubadora tipo B.O.D. (biochemical oxygen demand) a  $30 \pm 2$  °C para proporcionar o crescimento fúngico.

O crescimento das colônias foram mensurados diariamente até que a colônia tomasse toda a superfície do meio de cultura das placas do tratamento testemunha (controle negativo), em torno de três dias. O crescimento micelial foi obtido pela medição radial da colônia na placa em duas direções perpendiculares, sendo posteriormente calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), que é expressa pela fórmula:  $P.I.C. = (\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}) \div \text{crescimento da testemunha} \times 100$  (EDGINTON et al., 1971).

#### 4.4.3 Análise estatística

Para avaliar os dados qualitativos, o efeito dos tratamentos com relação aos valores de PIC (%), estes dados foram interpretados por meio de uma equação de logística de quatro parâmetros obtida pelo programa tablecurve com o intuito de verificar as concentrações do óleo essencial no crescimento micelial da *M. phaseolina*. Já os dados quantitativos os quais se referem às médias dos tratamentos entre os isolados foram comparadas pelo teste de média Mann Whitney, a 5% de probabilidade de erro realizado no programa ASSISTAT.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise molecular

Dos 100 primers RAPD pré analisados os 13 considerados mais polimórficos foram selecionados para avaliar a diversidade genética (Tabela 2).

**Tabela 2:** Iniciadores (RAPD) selecionados para amplificação dos genótipos *M. phaseolina* com as respectivas sequências, TA, NTB, NBM, NBP, % Polimorfismo e PIC.

Iniciador	Seqüência	TA (°C)	NTB	NBM	NBP	% Polimorfismo	PIC
OPAA 4	5'- AGGACTGCTC - 3'	40 °C	8	2	6	75,00%	0,295556
OPAA 6	5'- GTGGGTGCCA - 3'	40 °C	4	1	3	75,00%	0,356296
OPA A 10	5'- TGGTCGGGTG - 3'	40 °C	13	4	9	69,23%	0,338025
OPAA 14	5'- AACGGGCCAA - 3'	40 °C	13	3	10	76,92%	0,265556
OPAA 15	5'- ACGGAAGCCC - 3'	40 °C	14	4	10	71,43%	0,335333
OPAA 17	5'- GAGCCCGACT - 3'	40 °C	12	6	6	50,00%	0,462963
OPAA 18	5'- TGGTCCAGCC - 3'	40 °C	7	1	6	85,71%	0,390741
OPH 2	5'- TCGGACGTGA - 3'	40 °C	11	1	10	90,91%	0,417111
OPH 4	5'- GGAAGTCGCC - 3'	40 °C	9	4	5	55,56%	0,390667
OPM 2	5'- ACAACGCCTC - 3'	40 °C	12	3	9	75,00%	0,321975
OPM 3	5'- GGGGGATGAG - 3'	40 °C	12	4	8	66,67%	0,283056
OPM 5	5'- GGAACGTGT - 3'	40 °C	7	1	6	85,71%	0,337778
OPM 13	5'- GGTGGTCAAG - 3'	40 °C	13	4	9	69,23%	0,235000
<b>TOTAL</b>	-	-	135	38	97	-	4,430057
<b>PORCEN</b>	-	-	-	28,15%	71,85%	-	-
<b>TAGEM</b>							
<b>MÉDIA</b>	-	-	10,4	2,9	7,5	-	0,340773

\*TA: Temperatura de Anelamento

NTB: Número Total de Bandas

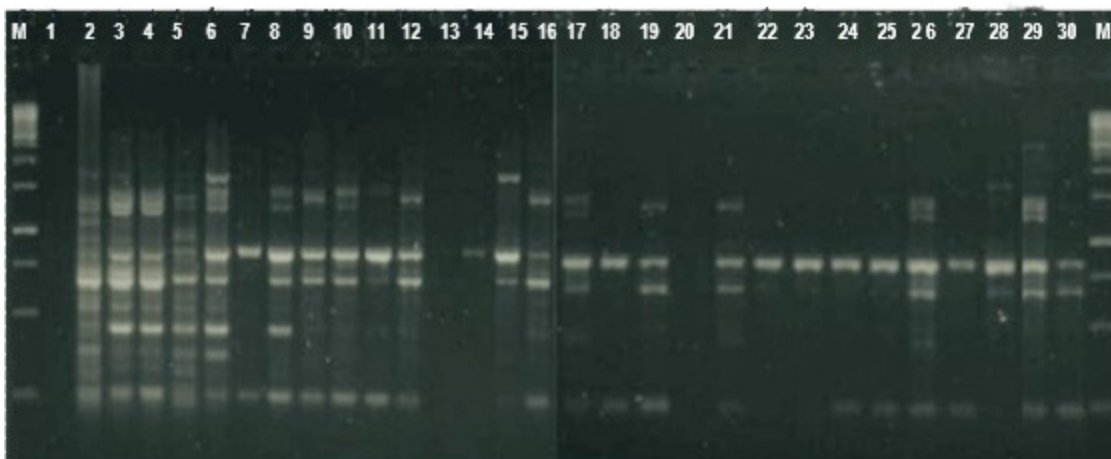
NBM: Número de Bandas Monomórficas

NBP: Número de Bandas Polimórficas

% de Polimorfismo: Porcentagem de Polimorfismo

PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica

Os 13 primers do marcador RAPD avaliados amplificaram 135 bandas das quais 97(71,85%) foram consideradas polimórficas. O número de bandas polimórficas amplificadas por primer variou de 3 (OPAA6) a 10 (OPH2, OPAA14 e OPAA15) sendo o primer OPH2 o que apresentou 90,91% de porcentagem de polimorfismo (Figura 2)



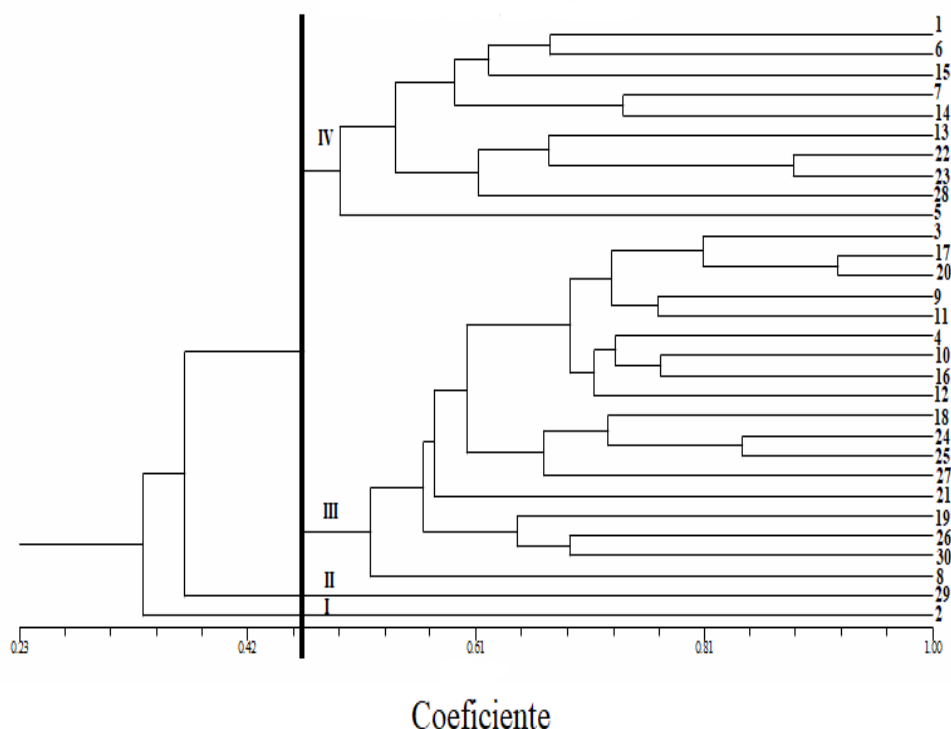
**Figura 2:** Produtos da amplificação de PCR dos 30 isolados (1 a 30) de *M. phaseolina* com o primer que apresentou a maior % de polimorfismo (OPH2). A letra “M” na primeira e última canaleta do gel representa o Marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 Kb

A média de bandas polimórficas por iniciador foi de 7,5 resultado esse que foi considerado satisfatório para a verificação de polimorfismo com os primers selecionados. Já que segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) uma média de cinco fragmentos polimórficos por primer é um número considerado aceitável para detecção de polimorfismo. O valor de PIC variou de 0,24 (OPM 13) a 0,46 (OPAA 17), resultado esse que divergiu do obtido por Mahdizadeh et al (2012) que utilizando 15 primers do marcador RAPD (nove da série OPA, dois da série OPC, um da série OPB e três primers que não pertenciam a uma série específica) em isolados de *M. phaseolina* obtiveram um valor de PIC que variou de 0,26 a 0,33. Essa variação no valor de PIC entre os estudos pode ser devido aos diferentes conjuntos de primers utilizados em ambos os estudos. Esses resultados demonstram que os primers utilizados nesse estudo apresentaram uma variação genética maior comparado com o obtido por Mahdizadeh et al (2012) o que os tornam mais adequados para avaliar a diversidade genética em isolados de *M. phaseolina*.

Os resultados de porcentagem de polimorfismo (obtidos de acordo com o número de bandas polimórficas) e os valores do PIC (calculados de acordo com Chesnokov e Artemyeva (2015)). demonstram a confiabilidade dos primers utilizados para avaliar a ocorrência de variabilidade genética entre os isolados utilizando o marcador RAPD. O fato dos valores dessas duas variáveis não serem consideradas similares está relacionado com a forma como elas foram obtidas que foram diferentes.

Através da análise de agrupamento pelo método UPGMA foi gerado um dendrograma (Figura 3) cujo ponto de corte foi de 47% de similaridade no qual gerou a formação de quatro grupos principais sendo que os grupos III e IV foram subdivididos em subgrupos menores.

### Similaridade Genética da *Macrophomina phaseolina*



**Figura 3:** Análise de agrupamento de 30 isolados de *M.phaseolina* obtidos a partir da matriz de distâncias genéticas calculadas com base no coeficiente de similaridade de Jaccard.

Os grupos I e II foram os que concentraram a menor porcentagem de isolados (3,33%). O grupo I foi composto pelo isolado 2 que foi oriundo de *T. portulacastrum* com origem no município de Icapuí e o grupo II foi formado pelo isolado 29 que foi proveniente de *B. difusa*, com origem no município de Mossoró.

O Grupo III foi composto por 18 isolados (3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27 e 30) o que corresponde 60% do total dos isolados avaliados no qual houve uma variação tanto entre os hospedeiros em que foram coletados como também no local de origem das coletas. Nesse grupo, estão localizados os dois isolados mais próximos geneticamente (17,20) que foram oriundos do mesmo hospedeiro e da mesma origem geográfica.

O Grupo IV foi formado por 10 isolados (1, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 22, 23 e 28) o que corresponde a 33,33% do total dos isolados avaliados são oriundos da mesma espécie de hospedeiro porém de diferentes áreas geográficas.

Estes resultados demonstram que a formação dos grupos gerados pelo dendrograma não ocorreram totalmente de acordo com o hospedeiro ou a origem geográfica, o que pode está relacionado com a população ancestral que deu origem a esses grupos premissa essa

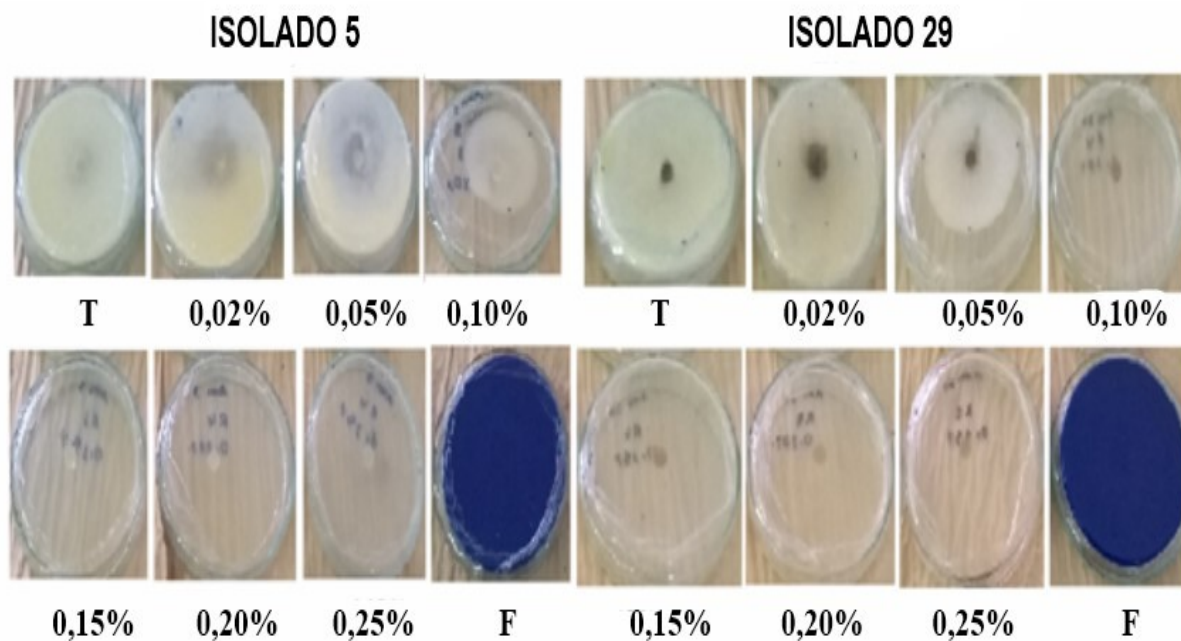
também verificada por Gautham; Singh; Sharma (2013), que avaliaram a diversidade genética da *M. phaseolina* em quatro localidades diferentes e Zivanov et al (2019), que estudaram a variabilidade genética de *M. phaseolina* oriundos de seis países diferentes (Turquia, Bulgária, Romênia, Espanha, Ucrânia e Sérvia) coletados de girassol (*Helianthus annuus*), milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), linho (*Linum usitatissimum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e planta zebra (*Aphelandra squarrosa*).

De acordo com o dendograma gerado, os isolados mais distantes geneticamente (menor similaridade = 0,23) foi observada entre os isolados 5 e 29. Já a maior similaridade genética (0,92) foi entre os isolados 17 e 20. Este resultado diferiu do obtido por Hilders; Laurentin (2011) que também verificaram a diversidade genética em isolados de *M. phaseolina* com uma menor similaridade (0,11) e a maior similaridade (0,46). Essa diferença entre os estudos com relação ao valor da variação de similaridade genética utilizando isolados da mesma espécie podem estar relacionadas à quantidade de isolados que foi de trinta para esse estudo e sete para o de Hilders; Laurentin (2011) e ao conjunto de primers avaliados que foram diferentes nos dois estudos.

O valor da correlação cofenética observada nesse estudo foi de  $r = 0,84$ , demonstra uma boa associação entre a matriz de distâncias obtidas pelo coeficiente de Jaccard e o dendograma gerado, indicando existir consistência entre os agrupamentos gerados entre os isolados de *M. phaseolina* utilizando o marcador RAPD o que torna uma opção de marcador viável para avaliar a diversidade genética. Resultado esse observado no presente estudo que diferiu do obtido por Zivanov et al (2019) que observaram um valor de correlação cofenética de  $r = 0,64$ . O que indicou uma média associação entre dados da matriz e o dendograma gerado. Essa diferença com relação ao valor da correlação cofenética em ambos os estudos demonstra que o conjunto de primers pode está relacionado com essa diferença de variabilidade genética dos isolados de *M. phaseolina* em ambos os estudos.

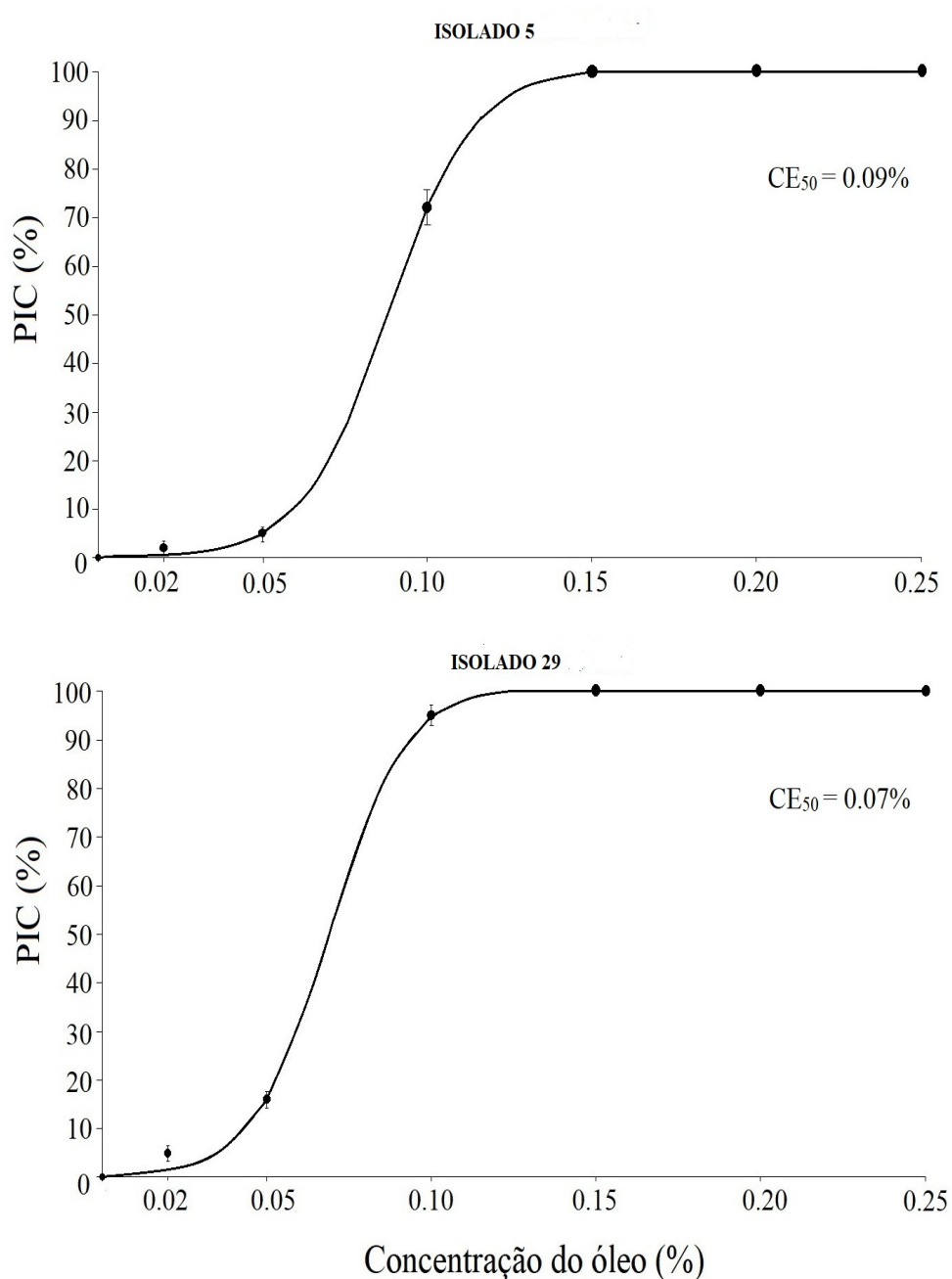
## **5.2 Análise com óleo essencial *C. flexuosus***

Com esse estudo foi verificado que todas as concentrações do óleo essencial de *C. flexuosus* promoveram inibição no crescimento micelial nos isolados testados (5 e 29) de *M. phaseolina*, com uma variação no percentual de inibição de 2 a 100% (Figura 4).



**Figura 4:** Crescimento micelial de isolados de *M. phaseolina* submetidos a diferentes concentrações de óleo essencial de *C. flexuosus*, T: Testemunha Negativa e F: Fungicida (400 mL L<sup>-1</sup> de Maxim).

De acordo com os resultados obtidos através da equação de logística de quatro parâmetro (Figura 5) foi verificado que, à medida que aumentava as concentrações do óleo essencial *C. flexuosus* aumentava os valores de PIC (Porcentagem de Inibição de Crescimento) nos isolados de *M. phaseolina*. Resultado similar ao obtido com esse estudo também foi verificado por Adinarayana et al (2012), na utilização desse mesmo OE em isolados de *Aspergillus niger*.



**Figura 5:** Porcentagem de inibição de crescimento (PIC %) de *M. phaseolina* em função de concentrações do óleo essencial *C. flexuosus*

A  $CE_{50}$  nessa pesquisa refere-se à concentração na qual o OE *C. flexuosus*, induz uma resposta na metade entre a taxa inicial e a máxima após um tempo especificado de exposição. Ela é usada normalmente como medida da potência nesse caso do OE utilizado. Então de acordo com a  $CE_{50}$  foi verificado que para inibir 50% do PIC no isolado 5 foi necessário uma concentração de 0,09% do OE de *C. flexuosus* enquanto que para o isolado 29, foi necessário uma concentração de 0,07% (figura 5).

De acordo com a figura 5 foram observadas que as porcentagens de inibição de crescimento do patógeno aumentaram até atingirem o valor máximo (PIC = 100%) que foi obtido na concentração 0,15% do óleo essencial *C. flexuosus* nos dois isolados de *M. phaseolina* avaliados. Essa concentração foi considerada a concentração mínima, ou seja, a menor concentração do óleo essencial testada capaz de inibir totalmente o crescimento micelial dos isolados avaliados. O fato da concentração mínima de 0,15% do OE *C. flexuosus* ter inibido o crescimento *in vitro* dos dois isolados avaliados está relacionado a presença de componentes que apresentam propriedades antifúngicas. A importância de se conhecer a concentração mínima do OE *C. flexuosus* é considerado um fator importante no ponto de vista econômico porque sabendo a concentração mínima necessária para inibir o fitopatógeno conseqüentemente haverá uma economia na utilização do OE para a sua utilização em testes *in vitro*.

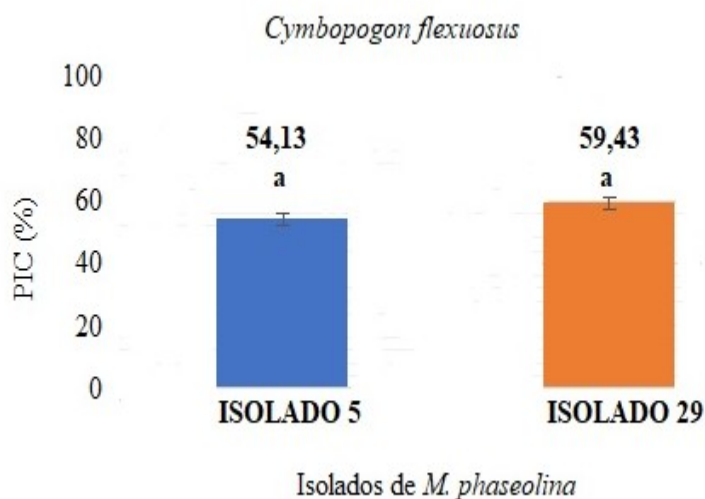
Os resultados verificados através dessa pesquisa foram considerados superiores comparados aos de Marques et al. (2003), que verificaram a inibição do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* com o OE *C. citratus* a uma concentração de 1,0 e 1,5%, concentração essa de OE considerada maior que a utilizada nesse estudo com o OE *C. flexuosus*. Essa diferença ocorre porque os patógenos envolvidos são diferentes entre os dois estudos e também porque devido ao OE utilizados nos estudos serem extraídos de plantas que apesar de pertencerem ao mesmo gênero, *Cymbopogon* e até apresentem algumas características semelhantes porém se tratam de duas plantas diferentes o que pode acarretar porcentagens diferentes desses componentes com propriedades fungicidas.

Já Singh (2010) avaliando a atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais obtidos das folhas de *C. flexuosus*, *Ocimum sanctum*, *Eucalyptus melliodora*, *Mentha arvensis* e *Citrus limetta* sobre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium griseofulvum*, verificou que o óleo de *C. flexuosus* foi considerado mais eficaz em comparação com os outros óleos essenciais avaliados e isso pode ter ocorrido devido à alta concentração de citral, componente considerado majoritário na composição química desse óleo e que apresenta propriedades antifúngicas.

Kurita et al. (1981) afirmam que a atividade fungicida do citral é decorrente da alta capacidade apresentada por este composto de receber elétrons provenientes da célula do fungo, por meio de uma transferência de carga com um elétron doador presente nesta célula, resultando assim na morte do fungo. Trabalhos recentes, como o de Kumar et al. (2008) relatam a importância da hidrofobicidade dos óleos essenciais e de seus constituintes, sendo assim capazes de interagirem com a camada lipídica das membranas celulares, causando

alterações em suas estruturas e as tornando menos seletivas, podendo ocasionar o extravasamento de íons e outros constituintes celulares.

Com relação à comparação da porcentagem de inibição de crescimento entre os isolados 5 e 29 de *M. phaseolina* tratados com o óleo *C. flexuosus* não foi verificada diferença estatística significativa com relação ao efeito inibitório desse óleo essencial entre os dois isolados avaliados de acordo com teste de Mann Whitney com  $p > 0,05$  (Figura 6).



**Figura 6:** Médias da inibição do crescimento micelial submetidos a óleo de *C. flexuosus* entre os isolados de *M. phaseolina*.

Os resultados observados comprovam que o efeito do óleo essencial de *C. flexuosus* sobre a porcentagem de inibição de crescimento micelial de *M. phaseolina* foi praticamente o mesmo entre os dois isolados avaliados, apesar dos mesmos serem considerados distantes geneticamente o que demonstra nesse estudo a eficiência do óleo essencial de *C. flexuosus* em *M. phaseolina*.



## 6 CONCLUSÕES

- Foi possível verificar a variação genética entre os isolados avaliados por meio do marcador RAPD, demonstrando assim ser uma boa opção de marcador mais acessível para avaliar a diversidade genética dos isolados de *M. phaseolina*;
- O óleo essencial *C. flexuosus* foi considerado um potencial inibidor de *M. phaseolina*, pois reduziu o crescimento micelial do patógeno na maioria das concentrações nos dois isolados avaliados.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R. et al. Phenotype diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, [s.l.], v. 28, n3, p.279-285, jun. 2003. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 set. 2019.
- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASE, H.; COSTA, M. C.; GAUDÊNCIA, C. A. *Macrophomina phaseolina em soja*. Londrina: Embrapa Soja, 2014.
- ADINARAYANA, G et al. EVALAUATION OF ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF FIELD DISTILLED AND WATER-SOLUBLE ESSENTIAL OILS OF *Cymbopogon flexuosus*. *Journal Of Pharmacognosy*, Hyderabad, v. 3, n. 2, p. 142-146, abr. 2012. Disponível em: scholar.google.com.br. Acesso em: 01 maio 2020.
- ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J.; BIONDI, C. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; SALES JUNIOR., R. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n. 4, p.327-333, 2005. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 set. 2018.
- ARAGÃO, F. A. S. **Divergência Genética de Acessos E Interação Genótipo X Ambiente De Famílias De Meloeiro**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi - Árido, Mossoró, 2011. Disponível em: scholar.google.com.br. Acesso em: 1 ago. 2018.
- BABU, B. K; SAXENA, A. K; SRIVASTAVA, A. K; ARORA D. K. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. **Mycologia**;v .99, n. 6, p.797-803, 2007. Disponível em: scholar.google.com.br. Acesso em: 1 ago. 2018.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005.p. 333-349.
- BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J. SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.
- BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**,v. 34, p. 565-569, 2005. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

- BRUTON, B. D.; WANN, R. Podredumbre de carbón. In: ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. **Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2004. p. 9-11.
- CELIN, E. F.; PASTORI, P. L.; NUNES, G. H. S.; ARAGÃO F. A. S. Agronegócio brasileiro do melão na última década. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. Horticultura brasileira., v. 31, n. 2, (**Suplemento-CD Rom**), julho, 2014
- CHESNOKOV, Y.U.V.; ARTEMYEVA, A.M.. EVALUATION OF THE MEASURE OF POLYMORPHISM. **Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya**, [s.l.], v. 50, n. 5, p. 571-578, out. 2015. Disponível em: [scholar.google.com.br](http://scholar.google.com.br). Acesso em: 13 set. 2019.
- CRUZ, C. D; FERREIRA, F. M; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011, 620p. Disponível em: [scholar.google.com.br](http://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 out. 2018.
- CRUZ, R. P; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 107-116. Disponível em: [scholar.google.com.br](http://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 out. 2018.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. 166f. Monografia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1978.
- DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade dos óleos de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathol.**, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010. Disponível em: [scholar.google.com.br](http://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 out. 2019.
- EDGINTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v.62, n.7, p.42-44, 1971. Disponível em: [scholar.google.com.br](http://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 out. 2018.
- FALEIRO, F. G. et al. **BIOTECNOLOGIA estada da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 730 p. Disponível em: [scholar.google.com.br](http://scholar.google.com.br). Acesso em: 13 ago. 2018.
- FAO (Food and Agriculture Organization). **FAOSTAT - Food and agriculture data**. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 1 mai. 2020.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases, United States National Fungus Collections, ARS, USDA**. 2018. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>. Acesso em: 1 mai. 2020.
- FERREIRA, M. E; GRATTAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 1995. 220p.
- FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220.(EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20). Disponível em: [scholar.google.com.br](http://scholar.google.com.br). Acesso em: 13 ago. 2018.

FIGUEIREDO, R. O., et al. Effect of growth regulators in citral content in lemongrass in different seasons. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 569, n. 22, p. 47-49. 2002. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 1 ago. 2018.

FITA, A; PICÓ, B; NUEZ, F. Melon roots under stress: melon vine decline. **Plant Stress** 1: 93-104, 2007. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 out. 2018.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. D. S.; GONÇALVES, M. G.; JÚNIOR, P.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G. & PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, p.45-50, 2015. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 out. 2018.

GANJEWALA, D. *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 3, p. 56-65, 2009. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 out. 2019.

GAUTAM, R; SINGH, S. K; SHARMA, V. RAPD and Nuclear rDNA ITS Polymorphism Within *Macrophomina phaseolina* Isolated from Arid Legumes of Western Rajasthan. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 84, n. 1, p.171-181, 9 jul. 2013. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 08 set. 2018.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v.160, p.167–180, 2012

HILDERS, A. M; LAURENTIN, H. Caracterización Fenotípica Y Molecular De *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Proveniente De La Zona De Producción De Ajonjolí En Venezuela: **Bioagro**, v. 24, n.3, p. 187-196. 2011. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 08 set. 2018.

IBGE (2018). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>. Acesso em: 12 out. 2018.

ISLAM, M. S. et al. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, Londres, v. 13, n. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-493> Acesso em: 1 mai. 2020.

KHAN, A. N. et al. Molecular Identification and Genetic Characterization of *Macrophomina phaseolina* Strains Causing Pathogenicity on Sunflower and Chickpea. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-11, 19 jul. 2017. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 dez. 2019.

KUMAR, A. *et al.* Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 575-580, 2008. Disponível em: [scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br). Acesso em: 01 dez. 2019.

KURITA, N. *et al.* Antifungal activity of components of essential oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 945-952, 1981. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 dez. 2019.

LIMA, B. T. M. **CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, EFICÁCIA ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE TINTURA DE PEGA-PINTO (Boerhavia diffusa L.)**. 2018. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2018. Disponível em: scholar.google.com.br. Acesso em: 13 nov. 2019.

LINHARES, C. M. de S. **REAÇÃO DE ACESSOS E HERANÇA DA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* E EFEITO DA TEMPERATURA NA PODRIDÃO CINZENTA EM MELOEIRO**. 2018. 65 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi - Árido, Mossoró, 2018.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; SOARES, D. J.; GOMES, A. A. Med.; PEREIRA, O. L. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 153, n. 1, p. 89-100, 30 jul. 2018.. Disponível em: scholar.google.com.br. Acesso em: 01 maio 2020.

MAHDIZADEH, V. *et al.* Intraspecies diversity of *Macrophomina phaseolina* in Iran. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, [s.l.], v. 45, n. 8, p.963-976, maio 2012. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

MARTINS, A. P. V. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e variabilidade genética em populações de *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, Minas Gerais**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 1 maio 2018.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, p.4050-4063, 2009. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

MOREIRA, H. J. C. **Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti. Campinas: Fmc, 2011. 1017 p.**

MOREIRA, M. R. *et al.* Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT- Food Science and Technology**, v.38, n.5, p.565-570, 2005. Disponível em: <http://www.scienceirect.com>. Acesso em: 12 abr. 2019.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORTUTIDA, A. C. G.; SCAPIM, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum**, v.25, n.2, p.491-496, 2003. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

NEGREIROS, A. M. P. et al. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal Of Phytopathology**, [s.l.], v. 167, n. 6, p.326-337, 13 abr. 2019. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 13 out. 2019.

NUZHAT, T; VIDYASAGAR, G. M. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, Suppl.2, p.19-28, 2013. . Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

OLIVEIRA, M. S. P; FERREIRA, D. F; SANTOS, J. B. Divergência genética entre acessos de açaizeiro fundamentada em descritores morfoagronômicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42. n.4. p. 501-506. 2007. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

OOTANI, M. A; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C.; BRITO D. R.; SILVA, J. B. D. & CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 81-84, 2003. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 07 out. 2019.

PAVÓN, M. A. et al. ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.165-171, out. 2012. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

PEREIRA, R. B.; et al. **Identificação e manejo das principais doenças fúngicas do meloeiro**. Circular Técnica. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2012. 8p.

RODRIGUES, A. P. M. S. **Ocorrência de plantas daninhas como hospedeiras alternativas de fitopatógenos radiculares e avaliação da patogenicidade sobre as culturas do melão e da melancia**. 76p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal Rural do SemiÁrido, Mossoró, Brasil. 2013.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 38 p.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-307, 2008. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

SAIKI, R. K.; BUGUWAN, G. T.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a semi-stable DNA polymerase, **Science**, v.239, p. 487-494, 1988. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

SALAHLOU, R., SAFAIE, N. AND SHAMS-BAKHS, M. Genetic diversity of *Macrophomina phaseolina* populations, the causal agent of sesame charcoal rot using inter-simple sequence repeat markers. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 18 (1): 277-278, 2018. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 mar. 2019.

SALES JR., R. Secuencia del ataque de patógenos fúngicos a raíz de melón. Histopatología de la infección por *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-Gracia, W. Gamset J. Garcia- Jiménez. 199. 204f. Tesis (Doctoral em Fitopatología) – Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 1999.

SALES JR, R.; OLIVEIRA, O. F.; MEDEIROS, E. V.; GUIMARÃES, I. M.; ORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

SANTOS G. et al. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. **Revista Argentina de Microbiología**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.143-147, abr. 2015. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 mar. 2019.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. p. 14

SCHAWN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMERO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. P.125-138, 2005. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

SARR, M. P., NDIAYE, M., GROENEWALD, J. Z., ; CROUS, P. W. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, 53, 250–268, 2014 Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2018.

SCHNEIDER, T. et al. Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.12-24, 30 maio 2018. **Revista Brasileira de Herbicidas**. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2019.

SILVA, J. L. da. **Óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* fosfito de potássio no controle da antracnose do feijoeiro**. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013. Disponível em: scholar.google.com.br. Acesso em: 19 ago. 2019.

SINGH, S. Atividade antifúngica in vitro de alguns óleos essenciais sobre fungos que degradam alimentos. **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**, Udaipur, v.4, n.2, p.107 -111, 2010. Disponível em: <scholar.google.com.br>. Acesso em: 01 out. 2019.

SOKAL, R. R; ROHLF, F. J. **The comparison of dendrograms by objective methods**. Taxon 11: 30-40, 1962. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/>. Acesso em: 13 dez. 2019.

WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990. Disponível em: <[scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br)>. Acesso em: 01 out. 2018.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005. Disponível em: <[scholar.google.com.br](https://scholar.google.com.br)>. Acesso em: 01 out. 2018.

ZIVANOV, S.T et al. Analysis of genetic diversity among *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. isolates from Euro-Asian countries. **Journal Of Plant Diseases And Protection**, [s.l.], v. 126, n. 6, p.565-573, 13 ago. 2019. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/>>. Acesso em: 13 dez. 2019.