



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

RHUT MIKAELLA ALVES DANTAS MEDEIROS

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ACESSOS DE MELOEIRO INOCULADOS COM
Monosporascus cannonballus

MOSSORÓ
2019

RHUT MIKAELLA ALVES DANTAS MEDEIROS

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ACESSOS DE MELOEIRO INOCULADOS COM
Monosporascus cannonballus

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

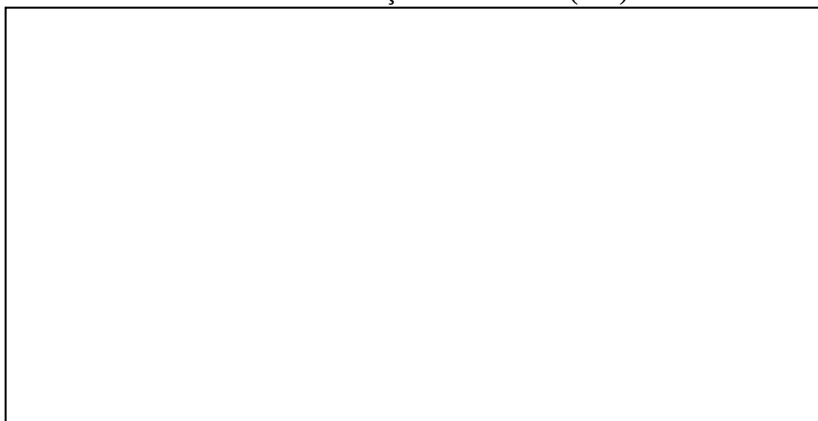
Orientador: Ioná Santos Araújo Holanda,
Prof^a. Dr^a.

MOSSORÓ

2019

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)



Bibliotecário-Documentalista
Nome do profissional, Bib. Me. (CRB-15/10.000)

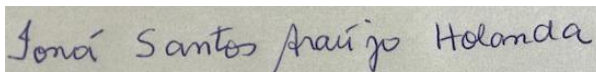
RHUT MIKAELLA ALVES DANTAS MEDEIROS

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ACESSOS DE MELOEIRO INOCULADOS COM
Monosporascus cannonballus

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 02 / 08 / 2019.

BANCA EXAMINADORA



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



Dr.ª. Shamyra Georgia de Azevedo Silva
Membro Examinador



Me. Wesley de Souza Paiva
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o único que é digno de receber toda honra e glória. Agradeço por seu amor, por ser meu Pai, meu melhor amigo, por sempre está comigo, me dando graça, sabedoria, paz (mesmo diante das dificuldades), forças para continuar a longa jornada, forças para lutar e, mesmo às vezes estando fraca, me fortalece. Sou grata por ter colocado pessoas especiais na minha vida, pessoas que irei levar comigo para sempre no meu coração e pensamentos.

Agradeço a minha linda mãe Lúcia, por ser a melhor mãe do mundo, por todo o cuidado, carinho e pelo amor que nunca faltou. Obrigada por sempre está ao meu lado, por ser a guerreira que és, por me inspirar e por ter me incentivado a correr atrás dos meus objetivos.

Agradeço aos meus irmãos, Maria do Socorro e Jonatas, principalmente por me darem três sobrinhas lindas Leticia, Alycia e Júlia, minhas princesas que tanto amo.

Agradeço a Marcosuel por ter acreditado no meu sonho e ter me ajudado na minha caminhada acadêmica, por ter estado ao meu lado em momentos difíceis.

Agradeço a minha orientadora e professora Ioná, a “Mulher Maravilha”, que além de exercer sua profissão com excelência, de ter muitos orientados, é esposa e mãe. Sempre muito atenciosa, carinhosa e que me inspira pela sua determinação, por ser uma mulher forte, guerreira, que luta pelos seus objetivos, que nos contagia com a sua alegria e seu bom humor. Obrigada por acreditar em mim e ter me dado a oportunidade de ser sua orientada.

Agradeço a Zacarias Júnior por ter me dado a oportunidade que estagiar na Syngenta, por ter acreditado no meu potencial e com pouco tempo me tornar responsável pelas análises sorológicas da Estação Quarentenária, e mesmo apreensiva puder ver o quanto sou capaz e o quanto pude crescer profissionalmente mesmo sem ainda está formada.

Agradeço ao meu amigo, meu pequeno grande Jorge Alves, por seu companheirismo, sua amizade sincera, por toda a ajuda que me deste durante todo meu experimento, sinceramente não sei teria conseguindo se você não estivesse por perto, palavras são poucas para expressar toda a minha gratidão por você. A Rose, pela amizade, por ter estado comigo durante a trajetória acadêmica, onde passamos dificuldades e alegrias juntas, Shamyra, pelos ensinamentos, pela humildade e por ser sempre acessível quando precisei, Talison, Suzana, Gilcivan e Pedro e Vitor, pela disponibilidade em ajudar no que fosse preciso, Renata, por ser amiga e pela ajuda compartilhada nos experimentos, e aos demais colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal por serem sempre solícitos e companheiros.

Agradeço aos meus colegas de turma 2013.2, que é a melhor turma, onde fui presenteada com amigos que jamais imaginaria conhecer, alguns permaneceram juntos, outros voaram para outras direções, mas cada um sempre lutando pelo que realmente desejava. Amo vocês.

Agradeço a todos os professores do curso de Biotecnologia da UFERSA por todo os ensinamentos e pelo aprendizado que pude obter com cada um de vocês.

Agradeço a professora Márcia Micheli, ao professor Emanuel Jereissati, ao professor Glauber, as técnicas Louise e Juliana que também contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.

(Isaías 41:10)

RESUMO

O melão *Cucumis melo* L. é um fruto de grande importância no mercado internacional da fruticultura, e no Brasil as regiões do Rio Grande do Norte e Ceará se destacam devido à alta produção dessa cultura. Diversos fatores interferem na produção e qualidade do fruto, como doenças ocasionadas por fitopatógenos, dentre as principais doenças está as que são causadas pelo fungo *Monosporascus cannonballus*, que infecta as raízes do melão. O objetivo desse trabalho, foi avaliar o efeito da expressão proteica que possam estar associadas a resistência do meloeiro ao fitopatógeno *M. cannonballus* através da técnica SDS-PAGE. Foram utilizadas sementes de dois acessos de melão, sendo um considerado resistente (C-32) e o outro suscetível ('Vendrantais'), ao fungo. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, onde apresentaram um bom crescimento e após 30 dias de cultivo, foi realizada a inoculação do fungo *M. cannonballus*, através do método de imersão das raízes no meio caldo BD contendo o fungo. Após quatro dias de inoculação, as plantas apresentaram os sintomas ocasionado pelo fungo e as mesmas foram levadas para o laboratório para a realização da extração das proteínas através do método Fenol/SDS modificado. Realizou-se a quantificação proteica da cada raiz das plantas em espectrofotômetro e posteriormente as amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE, onde os géis de ambos os acessos apresentaram diferentes bandas tanto nos tratamentos, como em seus controles. Como os dois acessos apresentaram visivelmente os sintomas ocasionados pelo *M. cannonballus* após os quatro dias de inoculação, esses sintomas podem ser justificados devido ao método de inoculação por imersão, pois as raízes sofrem uma grande exposição aos conídios presentes no meio, permitindo um maior contato e penetração do fitopatógeno no hospedeiro. A partir das análises proteômicas, foi possível observar a presença de proteínas diferencialmente expressas, tanto no acesso potencialmente resistente (C-32) quanto no acesso potencialmente suscetível ('Vendrantais'). Estes resultados podem estar ocasionados à indução de expressão de proteínas de resistência, pois após a interação do patógeno com as raízes há a indução pelo reconhecimento da planta. Por outro lado, a expressão diferencial de proteínas no acesso suscetível pode estar associada a uma expressão inicial de resistência.

Palavras-chave: Fitopatógeno, Resistência, Suscetível, SDS-PAGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Acessos potencialmente resistentes (C-32) e suscetíveis (‘Vendrantais’) de *Cucumis melo* L.

Figura 2 – Acessos de *Cucumis melo* L. distribuídos na placa de Petri para posterior germinação.

Figura 3 – Acessos C-32 e Vendrantais antes da inoculação do *Monosporascus cannonballus* (A). Acessos C-32 e Vendrantais após a inoculação (B).

Figura 4 – Gel SDS-PAGE com o controle (C) e as repetições dos acessos C-32 com o tratamento, evidenciando a presença de bandas no tratamento e ausente no grupo controle. (M=Marcador de peso molecular)

Figura 5 – Gel SDS-PAGE com o controle (C) e as repetições dos acessos Vendrantais com o tratamento, evidenciando a presença de duas bandas no Controle e uma banda nos tratamentos 1, 2, 3, 5, 6 e 8 (A). Presença de quatro bandas no tratamento 9 que estão ausentes no grupo controle (B). (M=Marcador de peso molecular)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976) utilizando o protocolo do Fenol/SDS modificado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	<i>Dextrose Potato (Batata Dextrose)</i>
BDA	<i>Agar Dextrose Potato (Agar Batata Dextrose)</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin (Albumina do Soro Bovino)</i>
HCl	<i>Hydrochloric acid (Ácido Clorídrico)</i>
MAP	<i>Monoammonium Phosphate (Fosfato Monoamônico)</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo)</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida)</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine (Tetrametiletilenodiamina)</i>
TRIS	<i>(Hydroxymethyl)-aminomethane (Hidroximetil)-aminometano</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 A CULTURA DO MELÃO	15
2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM A CULTURA DO MELÃO	15
2.3 <i>Monosporascus cannonballus</i>	16
2.4 PROTEÔMICA	17
2.4.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (sds-page).....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	20
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
3.3 SEMEADURA DOS ACESSOS DE MELÃO	21
3.4 OBTENÇÃO DO FUNGO E PREPARO DO INÓCULO.....	22
3.5 INOCULAÇÃO DO FUNGO NAS PLANTAS	22
3.6 EXTRAÇÃO PROTEICA COM O MÉTODO FENOL/SDS MODIFICADO	22
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
3.8 ANÁLISE COM SDS-PAGE	23
3.8.1 Preparo do gel.....	23
3.8.2 Corrida eletroforética.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 ASPECTO VISUAL DOS ACESSOS DE MELOEIRO	25
4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	25
4.3 ANÁLISE COM SDS-PAGE DOS ACESSOS C-32 E VENDRANTAIS	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

O melão é um fruto de grande representatividade no mercado internacional da fruticultura, principalmente no Brasil, onde grande parte da sua produção é destinada à exportação. O estado do Rio Grande do Norte se destaca quando se trata da produção do melão, onde no ano de 2016 foram produzidas 354.793 toneladas deste fruto, contribuindo com 59% da produção total do país. Dessa forma, a produção do fruto favorece o desenvolvimento socioeconômico nessa região, que apresenta carência de recursos e oportunidades (CARVALHO, 2016; IBGE, 2018).

As doenças na cultura do melão constituem um dos maiores entraves ao seu desenvolvimento, pois inibem iniciativas empresariais de produção e de exportação, e sua ocorrência é capaz de prejudicar investimentos que poderiam gerar capital e trabalho. Existem uma grande variedade de doenças que acometem a cultura do melão, desde aquelas de causa microbiana, passando pelas fisiológicas e nutricionais, até aquelas decorrentes de fatores ambientais. No entanto, as primeiras são as que mais interessam ao produtor, não só pelo seu poder destrutivo, mas, principalmente, pelas consequências econômicas negativas que resultam de sua ocorrência, pois podem ser provocadas por uma grande diversidade de agentes patogênicos, como fungos, bactérias, vírus e nematóides (VIANA, 2001).

Em virtude de várias enfermidades, uma doença conhecida como colapso ou morte súbita do meloeiro causada pelo agente fitopatogênico *Monosporascus cannonballus* (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 1994), se destaca, por dificultar a produção de melão em diversos países. O fungo *M. cannonballus* Pollack & Uecker, tem se destacado por ser um dos principais fitopatógenos envolvidos nesta síndrome (BRUTON, 1998), podendo-se associar a outros agentes fitopatogênicos. O *M. cannonballus* pode ser encontrado em diversos países que são produtores do melão, sendo este também detectado no Brasil, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (SALES JÚNIOR. et al., 2004), pois o mesmo se adapta a climas áridos e semiáridos devido às suas características termófilas (REUVENI et al., 1983).

A sobrevivência das plantas depende, portanto, da habilidade de adaptação ao estresse, que atua como pressão seletiva. Essa adaptação e resistência das plantas são alterações no metabolismo da célula vegetal, dentre elas a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos. Tais proteínas exercem vários papéis na resistência e sobrevivência da planta, podendo agir de forma direta, combatendo o agente agressor, ou de

forma indireta, mantendo a estrutura e as funções celulares (MYSORE; RYU 2004, JONES; DANGL, 2006)

A atividade das proteínas que está associada à função do gene, é o produto final da regulação da atividade gênica, visando assim, a caracterização do conjunto de proteínas que são expressas em um determinado momento. Dessa forma, a proteômica surge para complementar os estudos relacionados a biologia molecular das células (WILKINS et al., 1996). Diversas tecnologias hoje utilizadas na proteômica foram desenvolvidas muito antes do seu início, porém, o que possibilitou o seu surgimento foi o avanço no desenvolvimento de tecnologias como, espectrometria de massas, eletroforese bidimensional e SDS-PAGE (TYERS; MANN, 2003).

A técnica SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) é muito utilizada para análises qualitativas de proteínas, sendo considerado um método de grande utilidade para se acompanhar a purificação de proteínas, onde as mesmas, são separadas de acordo com a sua massa molecular. O SDE-PAGE também é muito importante para a determinar a massa molecular relativa da proteína. (WILSON; WALKER, 2010).

Considerando a grande importância da cultura do melão para o nordeste brasileiro e as consequências negativas para o setor econômico com a perda das safras ocasionada principalmente por doenças fitopatogênicas, se faz necessário pesquisas que possibilitem a identificação de proteínas associadas a genes de resistência da doença, viabilizando estudos futuros que permitam a seleção de genótipos promissores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MELÃO

O melão (*Cucumis melo* L.), pertence à família *Cucurbitaceae*, mesma família das abóboras e da melancia, ao gênero *Cucumis*, mesmo gênero do pepino que compreende cerca de 38 espécies conhecidas (SILVA; COSTA, 2003). O meloeiro é uma planta herbácea e rasteira, com frutos de formato variável (redondo, oval ou alongado), com 20 a 25 cm de diâmetro, casca lisa, enrugada ou rendilhada, pesando de um a quatro quilos em média dependendo do tipo e do cultivar. É uma espécie exigente em temperaturas, de acordo com Nicolas et al. (1989) a temperatura ótima para seu desenvolvimento varia de 20 °C a 32 °C. Essas espécies da família das *Cucurbitáceas* são cultivadas em várias regiões do mundo, devido a sua fácil adaptação a vários solos e clima.

A região Nordeste é bastante favorável ao cultivo do meloeiro e segundo Mendes et al. (2008), no ano de 2005, o Nordeste brasileiro contribuiu com 94,6% da produção do melão, tal produção, predomina nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, onde o Ceará contribuiu com uma maior produção. Já no ano de 2017, segundo o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2018), devido as questões hídricas, a maior parte da produção que era realizada no Ceará, foi transferida para o Rio Grande do Norte, e dessa forma o estado passa a assumir a liderança na exportação do melão.

2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM A CULTURA DO MELÃO

Devido as condições climáticas favoráveis da região nordeste, é possível efetuar até três cultivos durante o ano. Estes cultivos se caracterizam por ocupar grandes áreas contínuas, com um ou poucos genótipos, que fornecem as condições ideais para a disseminação de pragas e doenças.

As doenças da cultura são fatores de grande relevância, pois interferem na produção e baixa a qualidade do produto final, preocupando assim toda a cadeia produtiva, ou seja, desde o agricultor até o consumidor. As principais doenças que comprometem a cultura do melão são o Cancro das hastes (*Didymella bryoniae*), Podridão-do-colo (*Macrophomina* sp.), Oídio (*Podosphaera xanthii*; *Oidium* sp.), Míldio (*Pseudoperonospora cubensis*), Antracnose (*Glomerella cingulata* var. *arbitulare*;

Colletotrichum lagenarium), Murcha de fusarium (*Fusarium* spp.), Mancha Bacteriana ou Catapora (*Pseudomonas* spp.), Nematóides (*Meloidogyne* spp.), Viroses (Watermelon mosaic vírus - WMV) 1 e 2, e Cucumber mosaic vírus (CMV). Um dos controles mais efetivo para essas doenças ainda é o químico, sendo estes produtos devidamente registrados pelo Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA) (COSTA et al., 2000).

Ainda há um grave problema na comercialização de alguns cultivares devido à curta vida de prateleira e ao surgimento de doenças em temperatura ambiente, que impede a colocação desses frutos nos mercados mais distantes com qualidade satisfatória. Isso ocorre devido a doenças pós colheita que podem iniciar ainda no campo. Dentre as principais doenças radiculares está as que são ocasionadas pelo ascomiceto *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker (MARTYN; MILLER, 1996).

2.3 *Monosporascus cannonballus*

O *Monosporascus cannonballus* é um fungo fitopatogênico habitante do solo, pertencente à classe Ascomycetes, que produz ascósporos em sua fase sexuada, porém a sua fase assexuada ainda é desconhecida (POLLACK; UECKER, 1975; SIVANESAN, 1991). Esse fungo é um ascomiceto que infecta as raízes de plantas, sendo identificado como agente causal de uma doença destrutiva do melão (MARTYN; MILLER, 1996; STANGHELLINI, KIM, RASMUSSEN, 1996). A enfermidade causada por este pelo *M. cannonballus* é denominada de “colapso” ou “morte súbita”, doença a qual, é considerada um dos principais fatores que dificultam o cultivo desta cucurbitácea.

O *M. cannonballus* se encontra distribuído em vários países produtores de melão como: Japão, Israel, Espanha, Estados Unidos, Índia, Líbia, Paquistão, Tunísia, Taiwan (MARTYN; MILLER, 1996), Arábia Saudita, Guatemala (COHEN et al., 1999), Honduras, México e Itália (SALES JÚNIOR et al., 2002). A primeira vez que este fitopatógeno foi detectado no Brasil, foi no ano de 2002, em áreas de cultivo de melão no Rio Grande do Norte e Ceará (SALES JÚNIOR et al., 2003) e desde então a produção desta olerícola vem sendo dificultada.

A região Nordeste brasileira, devido as suas condições climáticas com altas temperaturas, torna-se um excelente ambiente para o desenvolvimento de tal patógeno,

pois este, se adapta a climas áridos e semiáridos devido as suas características termófilas, tornando o controle dessa enfermidade cada vez mais difícil (REUVENI et al., 1983).

Ainda não existe um método efetivo para o controle deste patógeno, e alguns fatores dificultam esse controle, como cultivo intensivo e sucessivo do melão, proporcionando o acúmulo de inóculo, presença de ascósporos no solo de anos anteriores, dificuldade de aplicação e incorporação de defensivos no solo, excesso de plantas hospedeiras e falta de genótipos resistentes ou tolerantes à doença (MARTYN, 2002).

Como as doenças em plantas influenciam de forma negativa e significativa as atividades agropecuárias e florestais no mundo, foram desenvolvidas diversas técnicas, com quais fosse possível conhecer a dinâmica envolvendo a relação planta-patógeno (GONÇALVES, 2009).

A Biologia Molecular é uma ferramenta na qual é possível a obtenção de conhecimento acerca das moléculas encontradas nos sistemas vivos e também em fósseis. Desse modo, essa ferramenta é de grande utilidade para diagnosticar doenças em plantas, com base em dados moleculares que classificam espécies e grupos subespecíficos (LOPES et al., 2003), permitindo ter o conhecimento sobre o agente causal de doenças e quais medidas de manejo são as mais adequadas para o controle de doenças que podem ser causadas por fungos, nematoides e bactérias. Dentre as variadas técnicas existentes da biologia molecular, a proteômica pode ser utilizada para esse fim.

2.4 PROTEÔMICA

Segundo Wasinger et al. (1995), o proteoma consiste em um conjunto de proteínas expressas por um organismo em um determinado momento. É considerado um método direto para identificar, quantificar e estudar modificações pós traducionais das proteínas em uma célula. Dessa forma, a proteômica compreende técnicas tanto para estudo em larga escala de proteínas expressas como também para aplicações destas técnicas para análise dos problemas biológicos.

O início da proteômica se deu pelo marco da caracterização de perfis proteicos, passando, posteriormente, a focar outros aspectos como a quantificação de proteínas, as interações entre proteínas e as modificações pós-traducionais. A atividade das proteínas está proximamente associada à função do gene, uma vez que é o produto final da regulação da atividade gênica. Nesse sentido, a proteômica, que visa a caracterizar o

conjunto de proteínas expressas em um dado momento, surge como mais uma ramificação entre as ômicas para complementar os estudos sobre a biologia molecular das células (WILKINS et al., 1996).

A proteômica é também uma poderosa ferramenta no melhoramento genético, pois, diferentemente do que ocorre quando são utilizados marcadores fenotípicos ou baseados em DNA, a proteômica fornece informação em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma (PENNINGTON; DUNN, 2001).

Em estudos de proteômica, preparação da amostra é de extrema importância, ou seja, a extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo, é o passo mais importante para a subsequente separação, resolução e identificação (PARK, 2004). Dessa forma, a etapa inicial a ser realizada nesse método, consiste na padronização do processo de extração proteica para o tipo de tecido estudado, com o objetivo de se ter um bom rendimento em termos quantitativos, além de uma maior variabilidade de bandas, maximizando o número de proteínas presentes na amostra a ser avaliada.

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

A técnica de eletroforese baseia-se na migração de moléculas carregadas, em uma solução, com a aplicação de um campo elétrico. A realização de primeira eletroforese de proteínas ocorreu em 1937, e com o passar do tempo essa técnica tem passado por vários aperfeiçoamentos, o que possibilita análises cada vez mais precisas. O gel de poliacrilamida consiste em uma matriz formada por um polímero de acrilamida que possui ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, onde a porosidade pode ser escolhida. Dessa forma, quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da malha formada (ROCHA et al., 2005).

O SDS-PAGE é considerado o método mais utilizado para análises qualitativas de proteínas, e através desse método é possível acompanhar a purificação das proteínas. Nesse método, as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular, e as proteínas analisadas por SDS-PAGE também é de grande importância para determinar a massa molecular relativa das mesmas (WILSON; WALKER, 2010). Para que as proteínas sejam separadas de acordo com a sua massa molecular, é necessário que ocorra a eliminação de suas variáveis formas e carga negativa, e para que isso ocorra, as

proteínas são misturadas com SDS, um detergente aniônico e anfipático, que irá desnaturar as proteínas, onde as mesmas são convertidas em uma estrutura linear, cuja a forma nativa geralmente é globular, conferindo-lhes uma densidade de carga uniforme.

Cada proteína se moverá de forma diferente, e isso vai depender do seu tamanho, ou seja, as proteínas menores migrarão mais rapidamente, enquanto que as maiores terão mais dificuldade em atravessar a malha do gel, e conseqüentemente, se moverão de forma mais lenta. As proteínas podem ser visualizadas por coloração direta do gel, por corantes como o Comassie-Blue ou por tratamentos com nitrato de prata. O nitrato de prata é um dos métodos mais sensíveis de detecção, que permite a visualização de proteínas de até 10ng (ROCHA et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Foram avaliados dois genótipos de *Cucumis melo* L., com um acesso potencialmente resistente ao *Monosporascus cannonballus* (C-32) e um acesso suscetível a esse fitopatógeno ('Vendrantais'), em que todos os cultivares foram provenientes de bancos de germoplasma obtidos pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e mantidas em controle de temperatura e umidade até seu crescimento para a inoculação do fungo.



Figura 1 – Acessos potencialmente resistentes (C-32) e suscetíveis ('Vendrantais') de *Cucumis melo* L.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram utilizados os dois acessos (C-32 e 'Vendrantais') com 20 repetições de cada e 6 testemunhas (três de cada acesso), e um isolado do fungo *Monosporascus cannonballus* obtido do laboratório de Fitopatologia da UFERSA para indução em cada acesso de

meloeiro. Os isolados estão depositados e preservados na coleção de culturas de fungos no Laboratório de Fitopatologia do setor de fitossanidade da UFERSA.

Um total de 46 amostras foram utilizadas e divididas em dois grupos. O grupo 1 foi composto por 20 repetições do acesso (C-32) e 3 controles, e o grupo 2, com 20 repetições do acesso ('Vendrantais') e 3 controles.

3.3 SEMEADURA DOS ACESSOS DE MELÃO

Primeiramente foi realizada a desinfestação das sementes em hipoclorito de sódio a 1% e água destilada. Posteriormente, os acessos de meloeiro foram germinados de acordo com a metodologia de Muniz et al. (2004). As sementes foram distribuídas em placas de Petri (10 sementes por placa) contendo algodão umedecido de água destilada (Figura 2). As placas foram embaladas com papel alumínio e colocadas em estufa à 37 °C por 24 horas, a fim de uniformizar e acelerar a germinação. Após esse processo, retirou-se as placas da estufa e estas foram colocadas dispostas em uma bancada as quais receberam água destilada uma vez ao dia durante três dias. Finalizado essa etapa, cada acesso de melão foi transplantado para uma bandeja de polietileno com 200 células individuais contendo substrato comercial, regadas duas vezes ao dia por um período de 10 dias cultivados em casa de vegetação da UFERSA. Em seguida, as plantas foram transferidas individualmente para sacos plásticos para mudas com capacidade total de dois litros e que continham uma mistura de solo e substrato comercial Tropstrato na proporção de 2:1 (duas quantidades de solo e uma de substrato), sendo o solo previamente esterilizado em autoclave a 121 °C. As plantas foram regadas duas vezes ao dia por um período de 20 dias. Todos os acessos foram adubados com uréia e MAP três vezes na semana e o cultivo foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) com temperatura controlada entre 25 °C e 30 °C com umidade relativa em torno de 60% (MEDEIROS et al., 2015).



Figura 2 – Acessos de *Cucumis melo* L. distribuídos na placa de Petri para posterior germinação.

3.4 OBTENÇÃO DO FUNGO E PREPARO DO INÓCULO

O fungo *Monosporascus cannonballus* foi cedido pelo Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia I da UFERSA. Os discos de micélio do fungo foram repicados em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos em estufa incubadora tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 28 °C, por cinco dias. Posteriormente, o fungo foi repicado para Erlenmeyer contendo meio de cultura BD (Batata Dextrose) onde permaneceram em temperatura ambiente, por dez dias sendo agitados duas vezes ao dia.

3.5 INOCULAÇÃO DO FUNGO NAS PLANTAS

Após 20 dias do cultivo na casa de vegetação, foi realizado a inoculação artificial do fungo nas plantas (Acessos C-32 e Vendrantais). Estas foram inoculadas pelo método de imersão, onde as raízes das plantas foram cortadas com laminas de bisturi estéril cerca de 2 cm da sua extremidade e imersas, por 30 minutos, no inóculo produzido previamente. Em seguida, foi realizado o transplântio, até que os sintomas apareçam para realização da extração de proteínas. Nas testemunhas, as plantas foram imersas em água, sem o fungo (CAVALCANTI; COÊLHO; PEREZ, 2002).

3.6 EXTRAÇÃO PROTEICA COM O MÉTODO FENOL/SDS MODIFICADO

As raízes das plantas foram maceradas em cadinho, utilizando nitrogênio líquido e em seguida foi ressuspensionado 250 mg do macerado em 0,8 mL de Tris fenol saturado pH 8,0 e 0,8 mL de tampão de SDS [0,1M Tris-HCl pH 8,0, SDS à 2%, β -mercaptoetanol à 5%, sacarose à 30%; 1 mM PMSF] em cada microtúbulo. As amostras foram submetidas vigorosamente ao vórtex por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 16.000 rpm à 4 °C. Logo após, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (0,5 mL). As proteínas foram precipitadas por 2 horas a -20 °C com 3 volumes do acetato de amônia à 0,1 M em metanol gelado. Passado esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 16.000 rpm à 4 °C. O precipitado foi lavado uma vez com 1 mL de acetato de amônia a 0,1 M em metanol gelado e uma vez lavado com 1 mL de acetona a 80% gelada, sendo agitadas no vórtex e posteriormente secas a vácuo. Após a extração, as proteínas foram solubilizadas com 50 μ L de uréia 7 M e Tiuréia 2 M. Depois de solubilizadas, as amostras de proteínas foram sonicadas duas vezes por 30 segundos em sonicador com banho maria à 20 °C (RODRIGUES et al, 2012).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas solubilizadas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976), onde utilizou-se 10 μ L da amostra proteica, 90 μ L de água deionizada e 1 mL de Bradford. As amostras foram lidas via espectrofotômetro de luz visível (Biospectro SP-220) a 595 nm com uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

3.8 ANÁLISE COM SDS-PAGE

3.8.1 Preparo do gel

O gel separação (Main gel) foi preparado a uma concentração de 12,5% (12,5 mL de acrilamida 30%, 7,5 mL de tris-HCl 1,5M pH 8,8, 300 μ L de SDS 10% pH 7,2, 300 μ L de persulfato de amônia 10%, 30 μ L de TEMED e 9,369 mL de água milli Q), sendo este gel adicionado primeiro. Já o gel de empilhamento (Stacking gel) foi preparado a uma concentração de 4% (1,33 mL de acrilamida 30%, 2,5 mL de tris-HCl 0,5M pH 6,8, 100

μ L de SDS 10% pH 7,2, 100 μ L de persulfato de amônia 10%, 10 μ L de TEMED e 5,96 mL de água milli Q), sendo este gel adicionado por último.

3.8.2 Corrida eletroforética

As análises com SDS-PAGE foram realizadas em cuba vertical 10x10cm, adequada para identificação e separação de proteínas de diferentes pesos moleculares, tendo como base o protocolo descrito por Laemmli (1970) com modificações. As amostras foram previamente desnaturadas a uma temperatura de 95 °C por 10 minutos, contendo a proporção de 1:2 com o tampão da amostra (Tris HCl 1M pH 6,8; SDS 10%; glicerol 2%; azul de bromofenol e água destilada). O tampão para a execução da eletroforese foi o Tris-glicina 5x (Tris-HCl 20 mM, glicina 0,192 mM e SDS 0,1%) submetida a 80 v por 30 minutos para o gel de empilhamento e 120 v durante 60 minutos para o gel de separação. Após a corrida, o gel foi corado com solução Comassie Brilliant Blue por 24 horas, em seguida, o gel foi descorado durante 3 horas em solução descorante. Posteriormente, o gel foi fotografado em fotodocumentador.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ASPECTO VISUAL DOS ACESSOS DE MELOEIRO

Após 4 dias da inoculação do fitopatógeno, foi possível observar um grande grau de sintomatologia nos dois acessos utilizados (Figura 3B). Após a comparação dos acessos utilizados (C-32 e Ventrantais), não foi possível observar uma diferença da sintomatologia aparente, pois os dois acessos se mostraram suscetíveis ao *Monosporascus cannonballus*.



Figura 3 – Acessos C-32 e Ventrantais antes da inoculação do *Monosporascus cannonballus* (A). Acessos C-32 e Ventrantais após a inoculação (B).

Cavalcanti (2002), realizando teste de diferentes tipos de inoculação de *Fusarium oxysporum* em linhagens de feijoeiro, constatou que linhagens que se mostraram resistentes em inoculação por perfurações do solo, foram considerados susceptíveis quando inoculados pelo método de imersão de raízes. Isso é relatado como sendo devido a maior exposição da área das raízes aos conídios presentes no meio, aumentando com isso o contato e penetração do patógeno no hospedeiro. Esse resultado também é relatado em vários trabalhos como Pastor-Corrales e Abawi (1987); Piza (1993); Nascimento et al. (1995) e Rava et al. (1996).

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As amostras de proteínas obtidas das raízes das plantas do meloeiro, foram extraídas pelo método Fenol/SDS modificado. Com base nas médias obtidas na quantificação de proteínas foi possível observar uma boa extração de proteínas pelo método de extração utilizado em ambos os acessos estudados (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976) utilizando o protocolo do Fenol/SDS modificado.

Acessos	Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	
	Controle	Tratamento
C-32	$3,32 \pm 0,67$	$3,06 \pm 0,37$
Vendrantais	$2,97 \pm 0,41$	$2,74 \pm 0,33$
Média $\pm$ Desvio Padrão		

Conforme os dados da tabela 1, foi possível observar que o acesso C-32 obteve uma maior concentração de proteínas, tanto no grupo controle (testemunhas), como no grupo experimental (tratamento).

O método Fenol/SDS modificado mostrou-se eficiente quanto a extração de proteínas totais das raízes do meloeiro, onde obteve-se valores satisfatórios tanto no grupo controle quanto no grupo tratamento de ambos os acessos. Rodrigues et al (2012), ao extrair proteínas de raízes de soja através do método Fenol/SDS modificado, considerou que através desse protocolo pôde-se obter uma boa extração de proteínas e, isso pode ser atribuído a diminuição do número de etapas de lavagens do pellet, evitando a perda de proteínas e, ao mesmo tempo possibilitando que a imagem no gel tenha uma melhor qualidade, reduzindo assim, manchas ou listras verticais e/ou horizontais no fundo do gel. O autor relata que o aumento no rendimento proteico é de extrema importância, principalmente quando o material a ser analisado é limitado ou quando o teor de proteína é relativamente baixo.

4.3 ANÁLISE COM SDS-PAGE DOS ACESSOS C-32 E VENDRANTAIS

A Figura 4 mostra o perfil eletroforético das proteínas isoladas de raízes do acesso C-32. Foi possível observar uma banda presente no controle que estava ausente nos tratamentos e cinco bandas diferenciais encontradas no tratamento 1 com a inoculação com *M. cannonballus* em relação ao grupo controle, duas bandas diferenciais nos tratamentos 7 e 8 e uma banda diferencial nos tratamentos 3, 4, 5, 6. Isto pode estar associado a indução de expressão de proteínas de resistência. Após a interação do patógeno com as raízes (KNOESTER et al., 1999), há a indução pelo reconhecimento da planta. Esse

reconhecimento gera uma resposta e um posterior sinal primário gerado pelo hospedeiro, sendo depois produzido fito-hormônios que são trasnlocados até a atuação do patógeno. (KUC; HAMMERSCHMIDT, 1995). Outra possibilidade seria a esse sinal primário acarretar a produção de proteínas e substâncias associadas a patogênese (proteínas-RP) que podem atuar em interação negativa com a parede celular do fungo (HAMMERSCHMIDT, 1999). As respostas geradas por essas proteínas podem ter gerado as bandas diferenciais encontradas no gel.

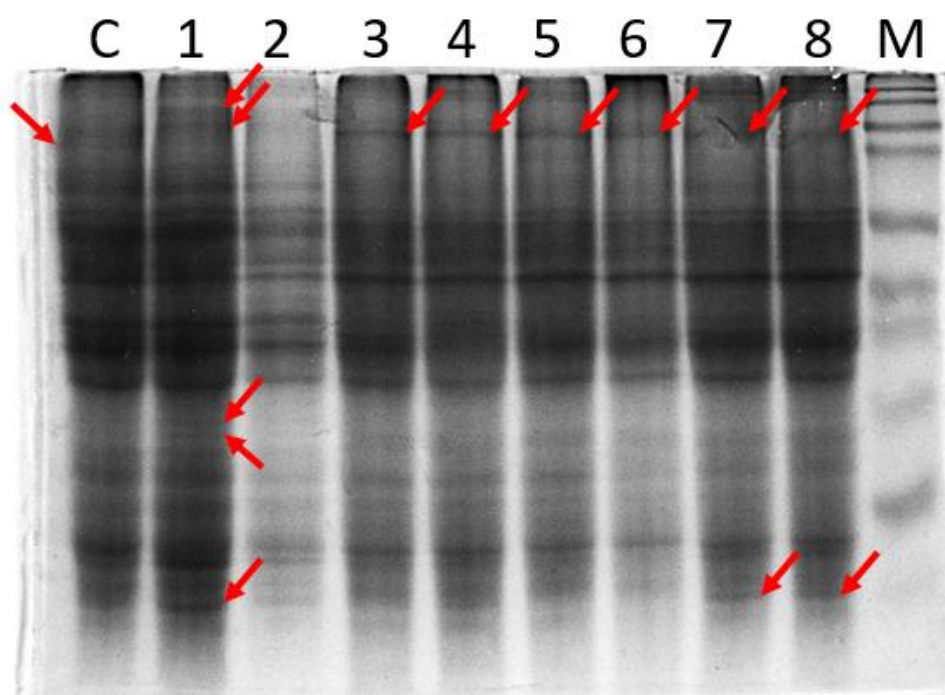


Figura 4 – Gel SDS-PAGE com o controle (C) e as repetições dos acessos C-32 com o tratamento, evidenciando a presença de bandas no tratamento e ausente no grupo controle. (M=Marcador de peso molecular)

Moura (2013) avaliando a expressão diferencial da interação do feijão-de-corda ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, identificou um aumento da expressão de enzimas relacionadas com o ciclo do ácido cítrico como a malato desidrogenase, succinato desidrogenase (ubiquinona), onde ambas estão relacionadas a redução das coenzimas NAD (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (Flavina adenina dinucleotídeo) que estão envolvidas na síntese de ATP (Adenosina Trifosfato). Esse aumento de expressão reforçam o fato em que os mecanismos de resistência a esse patógeno exigem grandes energias para a liberação de substâncias que contenham ação contra o patógeno (SWARBRICK et al., 2006; BERGER et al., 2007).

A figura 5 mostra o perfil eletroforético do acesso suscetível Vendrantais. Pôde-se identificar três bandas diferenciais (Figura 5A), sendo duas pertencentes ao grupo controle que não estão presentes nos tratamentos e uma nos tratamentos que não estão presentes no controle. Já na figura 5B, observou-se quatro bandas presentes no tratamento 9, que não estavam presentes no controle. A expressão diferencial dessas bandas proteicas presente nas plantas, pode estar associada a uma expressão inicial de resistência.

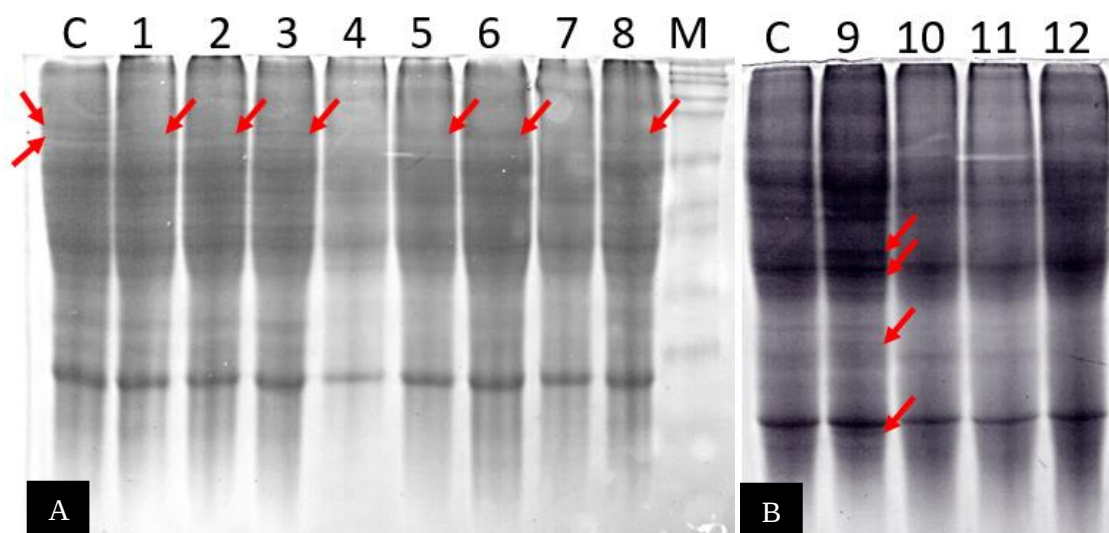


Figura 5 – Gel SDS-PAGE com o controle (C) e as repetições dos acessos Vendrantais com o tratamento, evidenciando a presença de duas bandas no Controle e uma banda nos tratamentos 1, 2, 3, 5, 6 e 8 (A). Presença de quatro bandas no tratamento 9 que estão ausentes no grupo controle (B). (M=Marcador de peso molecular)

Moura (2013) mostrou ainda em sua pesquisa com feijão-de-corda, que 16 proteínas apresentaram expressão diminuída após o contato com o fungo. Segundo o autor, essa diminuição está relacionada com proteínas como enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, enzima frutose 1,6-bifosfatase que estão relacionadas com a glicólise e gliconeogênese. Essa inibição poderia bloquear possíveis fontes de energia para o patógeno e a qualidade de açúcares disponíveis como nutrientes. Martins (2010), estudando proteínas diferenciais em tomate inoculadas com *Xanthomonas campestris*, relata também uma expressão diminuída ou inibida de três proteínas avaliadas no controle em relação ao grupo inoculado. Santos (2014), estudando alterações proteômicas induzidas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* em cacaueiro, verificou-se a expressão e também a supressão de alguns spots presentes em suas análises.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o método de extração utilizado, foi possível obter um bom resultado na extração de proteínas tanto no acesso potencialmente resistente (C-32), como no acesso suscetível ('Vendrantais'). E com a realização da extração de proteínas e a aplicação da eletroforese através da técnica SDS-PAGE, foi possível observar nos géis dos dois acessos, a expressão de proteínas que estavam presentes no tratamento e não estavam presentes no controle e vice-versa.

Para se estudar as diferenças na expressão proteica de modo mais sensível, tanto nos acessos C-32 quanto nos acessos Vendrantais do meloeiro, é importante realizar novas repetições experimentais além de uso de ferramentas de análises moleculares como eletroforese bidimensional (2-D) e o sequenciamento de tais proteínas. Desse modo se viabilizará mais resultados relacionados a expressão dessas proteínas afim de se encontrar outras bandas proteicas que possam estar relacionadas a resistência do fitopatógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4019-4026, 2007.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein tilizing the principle of proteindye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254., 1976.;

Brasil, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018). Produção anual de melão no Brasil em 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>>. Acesso em :10 de maio de 2019.

BRUTON, B. D. Soilborne diseases in Cucurbitaceae: Pathogen virulence and host resistance. In: McCreight, J. (Ed.) CUCURBITACEAE '98. Amer. Soc. of Hort. Sci. Press, Alex., Va, 1998. pp.143-166.

CARVALHO, N. **Variabilidade genética de linhagens e cultivares de melão utilizando marcadores moleculares**. 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

CAVALCANTI, L. S; COÊLHO, R. S. B.; PEREZ, J. O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro A *Fusarium oxysporum* F. SP. Phaseoli. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.1, p.1-5, 2002.

COELHO, R. S. B.; GURGEL L.M.S.; TAVARES, S.C.C.H. **Controle de doenças do melão pelo uso de cultivares resistentes**. In: TAVARES, S.C.C.H. (Ed.). *Melão. Fitossanidade: aspectos técnicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 40-45.

COHEN, R.; PIVONIA, S.; SHTIENBERG, D.; EDELSTEIN, M.; RAZ, D.; GERSTIL, Z.; KATAN, J. Efficacy of fluazinam in suppression of *Monosporascus cannonballus*, the causal agent of sudden wilt of melons. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1137-1141, 1999.

COSTA, N. D.; DIAS, R. C. S.; FARIA, C.M.B.; TAVARES, S.C.C.H.; TERAPO, D. **Cultivo do melão**. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 2000. 67p.

EDITORA GAZETA. **Anuário brasileiro de fruticultura 2018**. Santa Cruz do Sul, 2018, Anual.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ-FERRER, G.; ARMENGOL, J.; VELÁZQUEZ, M. T., ORTIZ, M., JUÁREZ, M., ORTEGA, A., JORDÁ, C., e ALFAROGARCÍA, A. Agentes asociados al “colapso” del melón em distintas zonas españolas. **Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas**, Madrid, v. 19, n. 1, p. 401-423, 1994.

GONÇALVES, R. C. Biologia Molecular Aplicada à Diagnose de Doenças de Plantas. **Embrapa Acre-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55(2), p. 77-84, 1999.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.

KUC, J.; HAMMERSCHMIDT, R. Induced resistance to disease in plants. **Vol.(Eds, Hammerschmidt, R. and Kuc, J.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands**, p. 169-175, 1995.

KNOESTER, M., PIETERSE, C. M. J., BOL, J. F., VAN LOON, L. C. (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 720-727.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LOPES, S. A.; et al. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum atrains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, v. 87, p. 544-549, 2003.

MARTINS, M. L. B. **Proteínas e peptídeos relacionados à defesa de plantas e análise proteômica de folhas de tomate inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatori***. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

MARTYN, R. D. *Monosporascus* root rot and vine decline of melons. **The Plant Health Instructor**. v. 10, p. 0612-01, 2002.

MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot and vine decline, an emerging disease of melons worldwide. *Plant Disease* 80:716-725. 1996.

MEDEIROS, A. C.; MELO, D. R. M.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; NUNES, G. H. S.; COSTA, J. M. Methods of inoculation of *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* in melon (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.281-286, 2015.

MENDES, A.; FARIA, C.; TERÃO, D.; SILVA, D.; BATISTA, D.; MOREIRA, F.; RESENDE, G.; ALENCAR, J.; OLIVEIRA, J.; ARAUJO, J.; PINTO, J.; GRANJEIRO, L.; LIMA, M.; SILVA, M.; LIMA, M.; COSTA, N.; DIAS, R.; TAVARES, S.; CUNHA, T. A cultura do Melão. EMBRAPA. 2. ed. Brasília: Coleção Plantar, 2008.

MOURA, H. F. N. **Análise proteômica diferencial da interação incompatível entre o feijão-de-corda e o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.** 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MUNIZ, M. F. B. et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.2, p.144-149, 2004.

MYSORE, K. S.; RYU, C. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2): 97-104.

NASCIMENTO, S. R. C.; MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Comportamento de variedades e linhagens de feijoeiro ao *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 20, n. 3, p. 458-463, 1995.

NICOLAS, M. Z. et al. **El Melon**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1989. 173p.

PARK, K.O. 2004. Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular*.

PASTOR-CORRALES, M. A. et al. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*. **Plant disease**, v. 71, n. 11, p. 990-993, 1987.

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

PIZA, S. M de T. Patogenicidade de *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* e reação de germoplasma de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Summa Phytopathologica**, v. 19, n. 3/4, p. 165-167, 1993.

POLLACK, F. G.; UECKER, F. A. Development and cytology of *Monosporascus cannonballus*. **Botanical Gazette**, v.136, p.333-340, 1975.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; DA COSTA, J. G. C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum F. sp. Phaseoli* em casa de vegetação. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1996.

REUVENI, R., KRIKUN, J.; SHANI, U. The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melons plants in an arid area of Israel. *Phytopathology* 73:1223-1226, 1983.

RIFFEL, A.. et al. Avaliação de métodos de extração de proteínas de tecido foliar e radicular de cana-de-açúcar para estudos de proteômica. 2012. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Aracajú, v. 1, p. 20, 2012.

ROCHA, T. L. et al. Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 2005.

RODRIGUES, E. P. et al. A simple, economical and reproducible protein extraction protocol for proteomics studies of soybean roots. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 348-352, 2012.

SALES JÚNIOR, R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; KOBORI, R. F. Comportamento de cultivares de meloeiro e melancia inoculados com *Acremonium cucurbitacearum* e *Monosporascus cannonballus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 206-210, 2002.

SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, O. F.; SENHOR, R. F.; ALVES, M. Z. *Monosporascus cannonballus* agente causal do colapso em plantas de melão no Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 567, 2003.

SALES JÚNIOR, R., NASCIMENTO, I. J. B., FREITAS, L. S., BELTRÁN, R., ARMENGOL, J., VICENT, A.; GARCIAJIMÉNEZ, J. First report of *Monosporascus cannonballus* on melon in Brazil. *Plant Disease* 88:84. 2004.

SANTOS E. C. **Alterações proteômicas induzidas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* em genótipos de cacaueiro contrastantes para resistência à vassoura-de-bruxa.** 2014. Dissertação (Mestrado Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz. ILHÉUS– BAHIA.

SILVA, H. R.; COSTA, N. D. **Melão, Produção Aspectos técnicos, Série Frutas do Brasil.** Brasília-DF: Embrapa Semi-Árido, 2003. 144p.

SIVANESAN, A. *Monosporascus cannonballus*. **Mycopathologia** v.114, p.53-54, 1991.

STANGHELLINI, M. E., KIM, D. H., AND RASMUSSEN, S. L. 1996. Ascospores of *Monosporascus cannonballus*: Germination and distribution in cultivated and desert soils in Arizona. *Phytopathology* 86:509-514.

SWARBRICK, P. J.; SCHULZE-LEFERT, P. A. U. L.; SCHOLLES, J. D. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. **Plant, Cell & Environment**, v. 29, n. 6, p. 1061-1076, 2006.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. *Nature*, v.422, n.6928, p.193-197, 2003.

VIANA, F. M. P. et al. Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na região Nordeste. **Embrapa Agroindústria Tropical-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Recomendações para o Controle das Principais Doenças que Afetam a Cultura do Melão na Região Nordeste.** Circular técnica 12, Fortaleza CE v. 17, p. 47-55, 2001.

WASINGER, V. C., CORDWELL, S. J., CERPA-POLJAK, A., YAN, J. X., GOOLEY, A. A., WILKINS, M. R.; HUMPHERY-SMITH, I. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16(1): 1090-1094.

WILKINS, M. R. et al. Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*, v.17, p.830-838, 1996.

WILSON, K.; WALKER, J. (Ed.). **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology.** Cambridge university press, 2010.

ZAMBOLIM, L. et al. Controle das doenças em póscolheita de frutos tropicais. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas.** Viçosa: UFV, 2002. p.443-500.