



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GILSIVAN SALES MEDEIROS DE AQUINO

**Análise proteômica da resistência de *Trianthema portulacastrum* L.
aos fungos *Macrophomina phaseolina* e *Macrophomina
pseudophaseolina***

Mossoró/RN

2022

GILSIVAN SALES MEDEIROS DE AQUINO

**Análise proteômica da resistência de *Trianthema portulacastrum* L.
aos fungos *Macrophomina phaseolina* e *Macrophomina
pseudophaseolina***

Monografia apresentada à Banca Examinadora, como trabalho final da componente curricular Estágio Supervisionado Obrigatório III do Curso de graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

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

Mossoró/RN

2022

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

A657a Aquino, Gilsivan Sales Medeiros de.
Análise proteômica da resistência de *Trianthema portulacastrum* aos fungos *Macrophomina phaseolina* e *Macrophomina pseudophaseolina* / Gilsivan Sales Medeiros de Aquino. - 2022.
46 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientador: Rui Sales Junior.
Monografia (graduação) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia, 2022.

1. Peroxidase. 2. SDS-PAGE. 3. fungos patogênicos. 4. patógeno-hospedeiro. I. Holanda, Ioná Santos Araújo, orient. II. Junior, Rui Sales, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

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

GILSIVAN SALES MEDEIROS DE AQUINO

**Análise proteômica da resistência de *Trianthema portulacastrum* L. aos fungos
Macrophomina phaseolina e *Macrophomina pseudophaseolina***

Monografia apresentada à Banca Examinadora, como trabalho final da componente curricular Estágio Supervisionado Obrigatório III do Curso de graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

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

Defendida em: 28/11/2022

BANCA EXAMINADORA

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

Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, Prof^a. Dr^a (UFERSA)
Membro Examinador

Tatiane Severo Silva, Ma.
Membro Examinador

À minha mãe, Maria Vanusa da Cruz Sales (*in memoriam*) ...

Dedico ao meu pai e a minha namorada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, ao Deus que um dia me salvou na cruz do calvário. Porquê dEle e para Ele são todas as coisas.

Agradeço a minha mãe, Maria Vanusa da Cruz Sales (in memoriam), que acreditava em mim, a quem me deu todo seu amor, proteção e me tornou hoje o homem que sou; escrevo em lágrimas, pois queria que soubesse a falta que seus braços e colo, me faz.

Agradeço ao meu pai, que sempre esteve ao meu lado, tanto em momentos de felicidade, quanto em momentos em que enfrentei tristezas e angústias e sempre me incentivou a buscar o melhor.

Agradeço a Maíla de Moraes Costa, essa mulher tão meiga, linda, amorosa e sonhadora, que o Senhor colocou ao meu lado, que tem suportado, minhas virtudes e defeitos, que tem compartilhado comigo, fracassos e vitórias, a ela, minha devoção e meu amor.

Agradeço ao meu amigo, Pedro Sidarque, que a vida me deu e que juntos pudemos compartilhar momentos de aprendizados e de alegrias, trazendo aos dias mais trabalhosos alívio para continuar fazendo o que precisa ser feito.

Agradeço à Universidade Federal Rural de Semi-Árido – UFERSA que me proporcionou aprendizados de qualidade, me tornando um acadêmico e profissional um pouco mais capaz de contribuir com a sociedade.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ioná Santos Araújo Holanda, que é um exemplo para mim e sempre esteve a disposição para me ajudar.

Agradeço a banca examinadora, Prof^a. Dr^a Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, a Ma. Tatiane Severo Silva, pela disponibilidade e contribuições.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, sem vocês este trabalho não concluiria e os dias no laboratório não teriam graça. Um grande abraço!

Existe para mim poderosa evidência de que há algo acontecendo por trás de tudo... parece como se alguém detalhadamente afinou os números da natureza para fazer o universo. A impressão do design é esmagadora.

Paul Davies

RESUMO

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) é de grande relevância agronômica e econômica no nordeste brasileiro, bem como para o mercado exportador. Entretanto, a presença de plantas daninhas no campo pode ocasionar problemas que venham impactar a produção do melão. A *Trianthema portulacastrum* L., nome vulgar breo, destaca-se por ser hospedeira alternativa para os fitopatógenos *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid e a *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye, fungos habitantes de solo responsáveis por provocar a Podridão Radicular e Declínio das Ramas do melão (PRDR) presentes em campos agrícolas. Entretanto, os mecanismos de defesa dessas plantas ainda não estão totalmente compreendidos, e com ajuda de ferramentas da proteômica é possível obter respostas acerca das proteínas ou enzimas responsáveis por conferir tolerância ou resistência a esses fungos. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de enzimas associadas a resistência de *T. portulacastrum* aos fitopatógenos *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*. Plântulas de breo e melão foram cultivadas em casa de vegetação, e inoculadas artificialmente com os referidos patógenos, utilizando o método do palito, para análise da incidência da doença. O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com fatorial 2x2+2, sendo duas espécies vegetais, *T. portulacastrum* e *C. melo* cultivar comercial (Goldex); duas espécies fúngicas, *M. phaseolina* (CMM-4742) altamente agressiva e *M. pseudophaseolina*; com um grupo controle para o melão e um grupo controle para o breo. Cerca de 3 dias para o melão e 30 dias para o breo após a inoculação, foram coletadas amostras de caule e raízes para realizar extrações de proteína/enzimas bem como para o isolamento do DNA dos grupos tratamentos e controles. A partir dos DNAs isolados realizou-se a identificação molecular com marcadores genes-específicos, análise enzimática da peroxidase e eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A partir da análise com marcadores genes-específicos, foi possível identificar o material genético dos isolados CMM-4742 e CMM-4780 no grupo controle positivo (melão comercial), com fragmentos de 350-pb, porém, não foi possível amplificar a região do DNA fúngico em material extraído do breo. Na análise da atividade enzimática da peroxidase, foi possível mensurar em plantas de breo uma maior atividade da enzima nas raízes de grupos inoculados com CMM-4742, já no caule, não houve atividade significativa. Em melão houve atividade da peroxidase de forma significativa na raiz quando infectado com *M. pseudophaseolina*; já no caule, houve atividade da mesma enzima quando o melão estava sob influência de *M. phaseolina*. Em análise de imagem de SDS-PAGE de breo, foi possível identificar um perfil de bandas numa faixa acima de 80 kDa, tal expressão desse proteoma se deve a mecanismos de defesa inerentes a planta daninha, que conferem a ela resistência ao entrar em contato com os isolados. Ao passo que o mesmo perfil não foi observado em gel de poliacrilamida de proteínas isoladas do melão. Por conseguinte, foram observadas faixas de proteínas isoladas do melão, entre 40-60 kDa, bem como abaixo de 20 kDa, perfil de bandas nítidas e com maior expressão na presença dos isolados, comparado com o controle negativo. Os resultados aqui elencados são pioneiros ao demonstrar a capacidade de *T. portulacastrum* em produzir proteínas de resistência frente aos isolados fitopatogênicos. Desse modo, espera-se corroborar com futuros estudos sobre esta espécie, uma vez que se trata de uma hospedeira alternativa e fonte de inóculo em campos de produção de melão.

Palavras-chave: Peroxidase, SDS-PAGE, fungos patogênicos, patógeno-hospedeiro

ABSTRACT

The melon crop (*Cucumis melo* L.) is of great agronomic and economic relevance in northeastern Brazil, as well as for the export market. However, the presence of weeds in the field can cause problems that may impact melon production. The *Trianthema portulacastrum* L., common name bredo, stands out as an alternative host for *Macrophomina phytopathogens phaseolina* (Tassi) Goid and *Macrophomina pseudophaseolin* Crous, Sarr & Ndiaye, soil-dwelling fungi responsible for causing melon Root Rot and Stem Decline (PRDR) in agricultural fields. However, the defense mechanisms of these plants are still not fully understood, and with the help of proteomics tools it is possible to obtain answers about the proteins or enzymes responsible for conferring tolerance or resistance to these fungi. The objective of this work was to analyze the expression of enzymes associated with the resistance of *T. portulacastrum* to the phytopathogens *M. phaseolina* and *M. pseudophaseolina*. Bredo and melon seedlings were cultivated in a greenhouse, and artificially inoculated with the referred pathogens, using the toothpick method, for analysis of the disease incidence. The experiment was carried out in a completely randomized design (DIC) with a 2x2+2 factorial, with two plant species, *T. portulacastrum* and commercial cultivar *C. melo* (Goldex); two fungal species, highly aggressive *M. phaseolina* (CMM-4742) and *M. pseudophaseolina*; with a control group for melon and a control group for bredo. About 3 days for melon and 30 days for bredo after inoculation, stem and root samples were collected to perform protein/enzyme extractions as well as for DNA isolation from treatment and control groups. From the isolated DNAs, molecular identification was carried out with gene-specific markers, enzymatic analysis of peroxidase and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). From the analysis with gene-specific markers, it was possible to identify the genetic material of isolates CMM-4742 and CMM-4780 in the positive control group (commercial melon), with 350-bp fragments, however, it was not possible to amplify the region of the Fungal DNA in material extracted from bredo. In the analysis of the enzymatic activity of peroxidase, it was possible to measure in bredo plants a greater activity of the enzyme in the roots of groups inoculated with CMM-4742, but in the stem, there was no significant activity. In melon there was significant peroxidase activity in the root when infected with *M. pseudophaseolina*; in the stem, there was activity of the same enzyme when the melon was under the influence of *M. phaseolina*. In SDS-PAGE image analysis of bredo, it was possible to identify a profile of bands in a range above 80 kDa, such expression of this proteome is due to defense mechanisms inherent in the weed, which give it resistance when coming into contact with the isolated ones. While the same profile was not observed in polyacrylamide gel of proteins isolated from melon. Therefore, bands of proteins isolated from melon were observed, between 40-60 kDa, as well as below 20 kDa, profile of clear bands and with greater expression in the presence of the isolates, compared to the negative control. The results listed here are pioneers in demonstrating the ability of *T. portulacastrum* to produce resistance proteins against phytopathogenic isolates. Thus, it is expected to corroborate with future studies on this species, since it is an alternative host and source of inoculum in melon production fields.

Keywords: Peroxidase, SDS-PAGE, pathogenic fungi, host-pathogen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mudas de brejo (<i>T. portulacastrum</i>) inoculados pelo método do palito com os isolados CMM-4742 e CMM-4780	28
Figura 2 - Mudas de melão amarelo inoculadas com os isolados CMM-4742 (a direita) e CMM-4780 (a esquerda)	28
Figura 3 - Estrutura de caule de melão com microescleródios, característicos da <i>M. phaseolina</i> ...	29
Figura 4 - Lâmina feita de tecido do caule do meloeiro inoculado com <i>M. phaseolina</i> , em microscópio óptico, para visualizar picnídios, sendo possível também a visualização de esporos. Objetiva 10x	30
Figura 5 - Amplicons de PCR dos isolados CMM-4742 e CMM-4780 com primers específicos MpKFI/MpKRI, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5% e corado com brometo de etídio. ML é referente ao melão, M ao marcador de peso molecular de 1 kb, o 1 é referente à <i>M. phaseolina</i> , o 2 refere-se à <i>M. pseudophaseolina</i> , o C ao DNA extraído do caule e o R extraído da raiz	31
Figura 6 - Atividade da peroxidase em <i>T. portulacastrum</i> em raiz e caule, expresso em Unidade de Enzima por grama de amostra. Grupos controle, grupo inoculado com <i>M. phaseolina</i> e grupo inoculado com <i>M. pseudophaseolina</i> , calculadas as médias, seguido de desvio padrão e teste de Tukey com 5% de significância ($p < 0,05$). Letras iguais significam que os elementos são iguais estatisticamente e letras diferentes significam que os elementos são diferentes entre si estatisticamente	33
Figura 7 - Atividade da peroxidase em <i>C. melo</i> em raiz e caule, expresso em Unidade de Enzima por Grama de Amostra. Grupos controle, grupo inoculado com <i>M. phaseolina</i> e grupo inoculado com <i>M. pseudophaseolina</i> , calculadas as médias, seguido de desvio padrão e teste de Tukey com 5% de significância ($p < 0,05$). Letras iguais significam que os elementos são iguais estatisticamente e letras diferentes significam que os elementos são diferentes entre si estatisticamente	34
Figura 8 - Gel desnaturante de poliacrilamida submetidos a eletroforese com amostras de proteínas isoladas de <i>T. portulacastrum</i> . O código M significa marcador de peso molecular (12-80 kDa), C significa a amostra da planta controle, MP significa inoculado com CMM-4742, MPDO significa inoculado com CMM-4780	35

Figura 9 - Gel desnaturante de poliacrilamida submetidos a eletroforese com amostras de proteínas isoladas de *C. melo*. O código M significa marcador de peso molecular (12-80 kDa), C significa a amostra da planta controle, MP significa inoculado com CMM-4742, MPDO significa inoculado com CMM-478036

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 A CULTURA DO MELÃO E SUA RELEVÂNCIA ECONÔMICA	15
2.2 FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO MELÃO	16
2.3 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS DANINHAS COMO HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS DE PATÓGENOS	16
2.4 MECANISMOS DE DEFESA DE PLANTAS A PATÓGENOS	17
2.5 <i>Macrophomina phaseolina</i> Tassi (Goid.) e <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> Crous, Sarr & Ndiaye	18
2.6 PROTEÔMICA	19
2.7 SDS-PAGE	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DO EXPERIMENTO	23
4.2 CRESCIMENTO DO FUNGO E OBTENÇÃO DOS INÓCULOS	24
4.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA	25
4.5 ANÁLISE DA PEROXIDASE	25
4.6 ANÁLISE COM ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	26
4.7 EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS A PARTIR DO MATERIAL VEGETAL	26
4.8 IDENTIFICAÇÃO COM MARCADORES GENE-ESPECÍFICOS	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 INCIDÊNCIA DOS ISOLADOS EM MUDAS DE BREDO E MELOEIRO	27
5.2 ANÁLISE MOLECULAR COM MARCADORES GENES-ESPECÍFICOS	30
5.3 ANÁLISE DA PEROXIDASE	32
5.4 ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	34
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1.INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma olerícola pertencente à família das *cucurbitaceae* e é cultivada em várias regiões do mundo, sejam em áreas temperadas, subtropicais ou tropicais (KESH; KAUSHIK, 2021; CUI *et al.*, 2022). O Brasil por sua vez, possui sua parcela de importância nessa escala produtiva, destacando-se a região semiárida nordestina, mais especificamente o Rio Grande do Norte e o Ceará, como líderes de produção do melão. Em 2021 foram plantados cerca de 22.044 hectares de área, produzindo em torno de 584.484 t da safra, tornando essa cultura mais relevante economicamente todos os anos (MELO *et al.*, 2022).

Entretanto, essa cultura está vulnerável à agentes que são responsáveis por desencadear doenças na plantação, impactando no desenvolvimento e consequentemente na produção, como as plantas daninhas e fungos fitopatogênicos. A *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.) é um patógeno de clima semiárido e árido, habitante de solo, que já foi relatado em todos os continentes do mundo, principalmente na América do Sul, causando a doença Podridão Radicular Seca (DRR)/Podridão de Carvão (CR) em mais de 700 culturas, e dentre elas está o melão, além de utilizar como hospedeiro alternativo plantas daninhas (PANDEY; BASANDRAI, 2020; SALES JÚNIOR *et al.*, 2020; LODHA; MAWAR, 2020).

Macrophomina pseudophaseolina Crous, Sarr & Ndiaye, também é um dos fungos fitopatogênicos que é transmitido por sementes e pelo solo, e é bastante semelhante com a *M. phaseolina* morfológicamente, exceto pela pouca diferença de tamanho entre os conídios (MAIA, 2021; SYBUIA *et al.*, 2022). Responsável por causar a doença da podridão do carvão em feijão-caupi, hibisco, quiabo e amendoim na região do Senegal (SARR *et al.*, 2014), em lentilha no Noroeste da Argélia (KOUADRI; ZAIM; BEKKAR, 2021), e em oleaginosas, como amendoim, algodão e mamona no Brasil, nos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte (MACHADO *et al.*, 2019). Essa espécie também foi relatada em plantas daninhas, como o brejo (*Trianthema portulacastrum* L.) também no nordeste do referido país (NEGREIROS *et al.*, 2020).

As plantas daninhas por sua vez estão presentes em campos de produção de várias culturas, e são responsáveis por liberar toxinas prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento de plantas da cultura principal, bem como são capazes de infestar o campo e competir por nutrientes disponíveis no ambiente. Outra problemática, é a associação dessas plantas com microrganismos causadores

de doenças, funcionando como hospedeiros alternativos e fonte de inóculo. Dentre muitos relatos de espécies, encontra-se a *T. portulacastrum* servindo de potencial reservatório para *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* (PEIXOTO *et al.*, 2018; MARTIN; PIRES; VEY, 2022).

Entretanto, as plantas são capazes de desenvolver mecanismos de defesa capaz de barrar a entrada e colonização de microrganismos patogênicos, sejam por barreiras pré- ou pós-formadas, conferindo assim resistência ao organismo. Sendo assim, as plantas possuem habilidades para reconhecer padrões moleculares entre suas células e as células do invasor, bem como produzir Proteínas Relacionadas à Resistência (PRPs); sendo um proteoma funcional e/ou regulatório, como enzimas precursoras da lignina, ou inativando enzimas produzidas pelos patógenos (CERESINI *et al.*, 2018; SCHAUFFLER, 2019).

Todavia, esse aparato defensor não está totalmente elucidado, e faz-se necessário a utilização de ferramentas da Proteômica para tentar compreender como se dá a expressão de determinados genes frente a infecção provocada por microrganismos invasores. A técnica da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é utilizada para analisar perfis de proteínas sejam elas diferencialmente expressas ou não, de um determinado organismo, sob determinadas condições ou influência do meio ao qual vive. A partir desse método, é possível obter respostas acerca dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas daninhas frente a interação com *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* (TSCHOEKE, 2021).

Sendo assim, é possível através de análises do proteoma, bem como a produção de enzimas de *T. portulacastrum* associado à *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*, obtermos indícios de resistência/tolerância dessa planta daninha que é tão pertinente em campos de produção de melão.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A CULTURA DO MELÃO E SUA RELEVÂNCIA ECONÔMICA

O meloeiro, *Cucumis melo* L., pertence à família *Cucurbitaceae* e possui como possível centro de origem a Índia. Porém por muito tempo atribuíam ao leste da África a sua origem, mas a maior diversidade de cultivares foram encontradas na Ásia a partir da espécie *Cucumis callosus* (Rottle) Cogn. et Harms (DÍAZ *et al.*, 2017; LANDAU *et al.*, 2020). É uma planta herbácea rasteira que possui notoriedade por ser a espécie mais variável do seu gênero com uma diversidade de formas, tamanhos, cor da casca e polpa do seu fruto formado, além de possuir uma riqueza de vitaminas, água e sais minerais (BARRETO, 2018).

O melão é um fruto que tem grande representatividade no mercado internacional da fruticultura, especialmente no Brasil, onde grande parte da produção é destinada à exportação (CARVALHO *et al.*, 2018). De acordo com o Anuário (2022) na safra de 2020 o país produziu cerca de 23.827 hectares de melão, gerando uma receita de US\$ 147.934,59, sendo o Rio Grande do Norte e o Ceará responsáveis por mais de 449 mil toneladas.

A principal área produtora de melão do país está localizada no semiárido nordestino, promovendo o desenvolvimento econômico e gerando emprego, renda e mudança do quadro social em uma das regiões mais pobres do Brasil (BESSA *et al.*, 2018). O agronegócio do melão brasileiro é um exemplo típico de evolução rápida para a inserção no mercado global, tendo a participação de grandes, médios e pequenos produtores (BARRETO, 2018).

O melão também se destaca como uma cultura olerícola que possui grande importância alimentícia, principalmente por possuir uma polpa comestível bastante palatável e nutritiva. O excedente da sua produção é destinado para o consumo *in natura*, utilizando também como ingrediente de saladas de frutas ou de hortaliças. Entretanto, a prática do processamento do fruto para obtenção de novos produtos ainda é pouca, como doces, geleias, sucos, néctares e bebidas alcoólicas diversas (BESSA *et al.*, 2018; LANDAU *et al.*, 2020).

2.2 FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO MELÃO

Em muitos países, essa olerícola tem grande importância econômica, sendo cultivada tanto em regiões tropicais quanto em regiões subtropicais (GOMES, 2018). No entanto, o cultivo do melão sofre com alguns fatores que desencadeiam doenças na cultura devido a interferência direta e indireta de pragas, microrganismos, nematoides, plantas daninhas, bem como fatores edafoclimáticos (EVANGELISTA *et al.*, 2022).

As plantas daninhas são responsáveis por impactar campos de produção agrícolas, pois além de competirem por recursos que estão disponíveis no ambiente, são capazes de liberar toxinas no solo prejudicando o crescimento pós-emergência e o desenvolvimento das plantas da cultura principal. Concomitantemente, são utilizadas por microrganismos patogênicos como hospedeiras alternativas, prolongando seu tempo e infecção no campo (CARVALHO *et al.*, 2020; JÚNIOR *et al.*, 2021).

Até o momento, relatos de espécies de plantas daninhas assintomáticas têm demonstrado abrigar o fungo *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* (NEGREIROS *et al.*, 2019; SALES JÚNIOR *et al.*, 2020). Apesar dos estudos que demonstram a presença de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* em plantas daninhas, ainda é um pouco incógnito o entendimento do papel do inóculo originário de espécies de plantas daninhas na epidemiologia da doença podridão do colo e radicular em melão. Nesse sentido, é relevante buscar compreender a relação desses agentes (fungos) com as plantas daninhas, sejam hospedeiras naturais bem como multiplicadoras de inóculo fitopatogênico, em áreas produtoras de melão, buscando encontrar soluções de manejo.

2.3 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS DANINHAS COMO HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS DE PATÓGENOS

As plantas daninhas além de estarem presentes em campos de produção agrícola, na natureza estão constantemente em interação com outros organismos, provocando impactos ecológicos, sejam eles negativos ou positivos no funcionamento dos sistemas de cultivo (JÚNIOR *et al.*, 2021). Outra problemática além da competição natural, são os relatos de que as plantas daninhas servem de reservatórios, ou, como hospedeiras alternativas de microrganismos fitopatogênicos, tornando assim persistente a incidência de doenças no campo durante a safra

(SALES JÚNIOR *et al.*, 2019; SANTOS, 2020).

Negreiros *et al.* (2019) relatou a presença de fungos fitopatogênicos ao melão em plantas daninhas comuns à região do semiárido nordestino no Brasil, dentre elas destaca-se a *T. portulacastrum*, que servia de hospedeira assintomática para os fitopatógenos *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*. Entretanto, as informações sobre a relação dessas espécies patogênicas com a planta daninha são escassas, pouco se conhece acerca dos mecanismos de defesa desenvolvidos para que não seja possível apresentarem os sintomas da doença.

Sendo assim, tal microrganismo que desencadeie uma patologia ao se ligar a um organismo resistente, irá se deparar com barreiras pré-formadas, sejam elas físicas ou químicas, capaz de bloquear a infecção e a expressão da doença (CABRAL, 2021). Por conseguinte, é possível que a ausência de sintomas em plantas daninhas que abrigam o fungo *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* deva-se pela premissa de haver um mecanismo de defesa bastante eficaz, seja esse mecanismo a produção e acúmulo de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRPs), bem como a liberação de metabólitos secundários; ou ainda não haja interação parasitária com a planta hospedeira, mas comensal ou até mesmo mutualística (STERGIOPOULOS; GORDON, 2014; ALVES *et al.*, 2021; CABRAL, 2021).

2.4 MECANISMOS DE DEFESA DE PLANTAS A PATÓGENOS

As plantas, no geral são resistentes à grande parte dos microrganismos que tentam penetrar em seus tecidos; a regra em si é a resistência, mas a exceção é a suscetibilidade, tal fenômeno é nomeado de resistência de não hospedeiro (RNH). A RNH é constituída de um sistema bastante elaborado composto por barreiras morfofisiológicas que são naturais da planta, ou produzidas ao ser detectado algum microrganismo, podendo ser físicos e/ou bioquímicos, também conhecidos como mecanismos pré- e pós-formados (CERESINI *et al.*, 2018).

Sendo assim, tais mecanismos são ativados isolados ou simultaneamente a depender da exposição ao patógeno, bem como ao variado tipo de estresse, podendo ser biótico ou abiótico. Ainda há ocasiões em que o microrganismo invasor consegue burlar o sistema de defesa da planta, fazendo com que o mesmo não seja detectado, causando assim uma reação de suscetibilidade (SCHAUFFLER, 2019; FREITAS, 2022).

As plantas hospedeiras e seus mecanismos pré-formados (lignina estrutural, parede celular

espessa, cutícula, tricomas, entre outros) possuem a capacidade de impedir de forma eficiente a infecção ou colonização do agente patogênico, como os fungos, por exemplo. Todavia, a defesa latente ocorre quando a planta consegue reconhecer padrões moleculares entre sua célula e as células do patógeno, com uma sinalização molecular capaz de ativar genes que induzem a síntese de PRPs, como as peroxidases, lipoxigenases, fenilalanina amônia-liases e outras. Estas enzimas são responsáveis por desencadear respostas de defesa, como conferir maior rigidez à parede celular, ou seja, lignificação, liberar sinalizadores contra estresses bióticos e abióticos e participar como precursores do metabolismo secundário na formação de compostos fenólicos, flavonoides, ésteres, comumarinas e outros (SCHAUFFLER, 2019).

2.5 *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.) e *Macrophomina pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye

O fungo *M. phaseolina* é um microrganismo pertencente à família *Botryosphaeriaceae* e é conhecido como um dos patógenos mais virulentos, capaz de infectar mais de 700 espécies de plantas cultivadas e selvagens em todo o mundo. Pode crescer rapidamente em plantas infectadas e, posteriormente, produz uma grande quantidade de escleródios que obstrui os vasos, resultando em murcha da planta (MARQUEZ *et al.*, 2021). A sintomatologia causada por esse fungo envolve cancro na haste, murcha de plântulas, podridão na raiz, podridão seca, murcha, murcha nas folhas e tombamento em pré e pós emergência (AMBRÓSIO *et al.*, 2015; FERREIRA, 2019).

As plantas afetadas pelo fungo apresentam lesão necrótica em diferentes partes, como galhos, pedúnculos e caules. Temperaturas altas e a baixa pluviosidade favorece o surgimento de sintomas e o desenvolvimento da doença (ZVEIBIL *et al.*, 2012). Os conídios são produzidos dentro de picnídios, que tem forma elipsoide para ovoide e medem 20-24 x 7-9 µm (FERREIRA, 2019). Os escleródios são formados nos tecidos infectados e liberados no solo quando a planta se decompõe (COHEN *et al.*, 2016). Os microescleródios são frequentemente esféricos, pretos e elípticos. Todavia, há uma grande variação em sua forma e tamanho, isso vem a depender do meio utilizado, isolados e temperatura (KHAN *et al.*, 2007).

Apesar de não haver nenhuma subespécie ou raça fisiológica catalogada, duas espécies novas de *Macrophomina* foram recentemente isoladas no Senegal, dentre elas está a *M. pseudophaseolina* que também se utiliza de várias espécies como hospedeiro (SARR *et al.*, 2014).

Em 2017 Brito *et al.* (2019) relataram pela primeira vez em um campo de produção de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em Janaúba, Minas Gerais, Brasil; hastes da planta com sintomas de podridão seca (pela *M. pseudophaseolina*), com áreas necróticas escuras e abundante formação de microescleródios, além da patogenicidade confirmada em mandioca através de experimentos. Negreiros *et al.* (2019) também relataram sua presença em campos produtores de melão no nordeste do Brasil, em associação com plantas daninhas assintomáticas, *T. portulacastrum* e *Boerhavia diffusa*, confirmando posteriormente a agressividade do agente (NEGREIROS *et al.*, 2020).

No campo, os patógenos mencionados anteriormente são de difíceis controle devido à especificidade heterogênea do hospedeiro, bem como das estruturas de resistência especializadas desenvolvida pelos fungos, visto que a severidade da doença está diretamente ligada à população de escleródios viáveis no solo que podem permanecer por 10 meses em condições de seca. Apesar das lesões provocadas nas plantas ao final da estação de crescimento, a *M. phaseolina*, bem como a *M. pseudophaseolina* geralmente infectam os caules logo após o plantio (KHAN, 2007; AMBRÓSIO *et al.*, 2015).

Sendo assim, com a utilização de ferramentas da proteômica é possível identificar a presença de proteínas/enzimas que são expressas pelo genoma, a partir do momento de infecção causado por esses fitopatógenos e identificar quais os tipos de barreiras pré ou pós-formadas estão sendo produzidas no combate à doença.

2.6 PROTEÔMICA

Proteômica é o estudo de um conjunto de proteínas expressas pelo genoma de uma célula sob determinado ambiente/condição, bem como suas estruturas e funções. Ao analisar a expressão de um proteoma de forma quantitativa e qualitativamente, torna-se possível compreender mecanismos funcionais e reguladores de respostas de defesa das plantas (FANG *et al.*, 2015; GOIS, 2021). Os métodos que essa área da ciência nos permite aplicar, abre portas para o desenvolvimento de novos estudos sobre a interação fungo-hospedeiro (ALI *et al.*, 2014; CHATTERJEE *et al.*, 2014; URANGA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2019).

As plantas frequentemente encontram condições desfavoráveis de crescimento. Respostas bioquímicas e fisiológicas complexas são geradas em plantas sob estresse biótico, mas poucos mecanismos moleculares dessas respostas foram totalmente elucidados. As plantas regulam a

expressão de proteínas de resistência intracelular relacionadas para ajustar seu estado fisiológico ou morfologia a um ambiente adverso. As plantas podem sentir, responder ao estresse biótico e ativar a expressão de genes relacionados à defesa (FANG et al., 2015; GUISSONI & CARDOSO, 2019). Portanto, a busca por proteínas (ou genes) relacionados à resistência pode melhorar significativamente nossa compreensão dos mecanismos de defesa das plantas, que por sua vez proporcionarão oportunidades para melhorar a resistência.

Dados proteômicos têm sido utilizados para determinar respostas sobre as alterações quantitativas e qualitativas nas proteínas e enzimas de plantas sob determinado estresse, para entender a relação entre essas proteínas e a resistência a condições adversas. Todavia, o proteoma de plantas além de confirmar fatores que desencadeiam respostas diretas de defesa, revela a relação direta ou indireta com o metabolismo energético da planta bem como o envio de sinais bioquímicos para determinadas regiões. Por conseguinte, é possível obter um vasto entendimento sobre respostas fisiológicas ao estresse, metabolismo bem como mecanismos reguladores desses organismos (KUSHALAPPA; GUNNAIAH, 2013).

O estudo dos proteomas por sua vez é capaz de conferir estratégias para o estudo da resistência das plantas, além de proporcionar reais avanços na modelagem de plantas-modelo e culturas de interesse econômico. Em todo organismo Eucarionte, o material genético (DNA) é idêntico em todas as células, no entanto, cada célula expressa de forma distinta seus genes. O resultado de tal expressão são as proteínas, que se diferencia sob uma condição de estresse; executando funções fisiológicas bem como regulando atividades intimamente ligadas ao ciclo biológico do organismo, sendo assim, é de suma importância realizar estudos se utilizando da proteômica para compreender de forma clara atividades complexas como essas (GOIS, 2021).

Técnicas usuais bem como muito sensíveis nos proporcionam mensurar a concentração proteica de tecidos que expressão diferencialmente sob condições fisiológicas que estão atreladas ao estresse. A proteômica por ser uma área muito nova auxilia com dados mais precisos estudos convencionais de fisiologia vegetal e genômica das plantas. As análises utilizadas para a criação de dados são: a eletroforese bidimensional (2DE), a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para a separação das proteínas, seguido de identificação por espectrometria de massa ou a utilização de cromatografia líquida, como método de separação, acoplada ao espectrômetro de massa (WITTMANN-LIEBOLD *et al.*, 2006; GUISSONI & CARDOSO, 2019).

2.7 SDS-PAGE

A SDS-PAGE ou eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio consiste numa matriz feita com uma solução de acrilamida e bis-acrilamida para realizar a separação de complexos proteicos de acordo com o peso molecular das proteínas, que são carregadas negativamente devido a presença do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio. A partir da porosidade do gel as proteínas que possuem uma massa molecular maior ficam para trás enquanto que as de menor massa correm com maior facilidade por meio de uma carga elétrica aplicada no aparato eletroforético, gerando assim um perfil de bandas; essa técnica permite uma separação eficiente das proteínas com uma ótima resolução (NOWAKOWSKI, *et al.*, 2014; HIDAYAT, B. T.; WEA, A.; ANDRIATI, N., 2018).

Para a visualização do bandejamento no gel de poliacrilamida é possível corar com zinco-imidazol, Nitrato de prata ou com uma solução de azul de Coomassie, possibilitando o aparecimento de proteínas com pesos moleculares variados, de no mínimo 0,1 µg e, só é possível visualizar proteínas nessa ordem de tamanho/massa devido ao entrelaçamento da malha polimérica presente no gel, quanto maior o cruzamento maior é a separação das proteínas tanto com maior massa quanto as de menor massa (EMIDIO *et al.*, 2015; KAULICH, Philipp T. *et al.*, 2020).

A partir da análise com SDS-PAGE associada com outras técnicas moleculares, como marcadores de DNA, estudiosos tem conseguido identificar variabilidade genética e proteômica entre acessos de plantas a partir dos perfis proteicos e polimorfismos gerados com marcadores RAPD de folhas e raízes de pimenta-do-reino (*Piper tuberculatum*) e abóbora-d'água por exemplo (SILVA&SOUZA, 2009; SRIVASTAVA *et al.*, 2014).

Por conseguinte, o estudo do proteoma tem sido e será de grande serventia para tentar elucidar respostas e mecanismos celulares em diversas espécies e, na biotecnologia vegetal entender da melhor forma a interação planta-patógeno, a resistência à determinadas doenças, respostas a fatores bióticos e abióticos, compreendendo por fim a síntese, função e regulação de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (OVERALL, 2014; EMIDIO *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a expressão de enzimas associadas a resistência de *Trianthema portulacastrum* L. aos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina* e *Macrophomina pseudophaseolina*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inocular sob condições controladas o fungo *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* em plantas de *T. portulacastrum*;
- Extrair enzimas de *T. portulacastrum* inoculadas com *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*;
- Quantificar as enzimas expressas relacionadas às plantas de *T. portulacastrum* na presença de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* por meio da técnica de espectrofotometria.
- Analisar o perfil proteico/enzimático diferencialmente expresso de plantas de *T. portulacastrum* inoculadas com a *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* por meio da técnica de SDS-PAGE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DO EXPERIMENTO

Sementes de *T. portulacastrum* foram obtidas de plantas adultas coletadas do campo experimental da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA, campus Mossoró, para a germinação das sementes. Fez-se necessário utilizar o método de superação de dormência para padronização do crescimento das mudas, descrito por Souza Filho *et al.* (1998). Este protocolo consiste de escarificação química, em que sementes de *T. portulacastrum* foram submersas em ácido sulfúrico concentrado, por aproximadamente 20 minutos, seguido de lavagem em água corrente por igual período de tempo, posteriormente as sementes foram postas para secar em temperatura ambiente e na sombra. Após 24 h, as sementes foram postas para germinar em placas de Petri com algodão e papel filtro embebidos de água destilada.

A partir da emissão da radícula, as sementes foram depositadas em bandejas sementeiras com 55cm x 28cm de largura e 8 cm de profundidade, em solo com esterco e substrato (1:1:1) autoclavado por dois dias consecutivos, as sementes foram postas próximo ao nível do solo (1 cm), em seguida as bandejas foram depositadas em casa de vegetação, temperatura aproximada de 30,3 °C e umidade relativa de 62%. Após o desenvolvimento das folhas verdadeiras, 10 dias, as plântulas foram transplantadas em vasos de 0,5L e regados diariamente. Para as sementes de melão (controle positivo), foram escolhidos acessos comerciais de melão amarelo Goldex, pois possuem maior suscetibilidade aos fungos fitopatogênicos conhecidos na literatura. Para a germinação das sementes seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para a germinação de sementes de plantas daninhas, em placas de Petri, papel filtro e algodão, posteriormente, foram plantadas em vasos de 0,5L, colocados em casa de vegetação e regados diariamente. Para os vasos de melão houve a necessidade de adubar com fosfato monoamônico (MAP) fertilizante fosfatado, composto por 10% de nitrogênio (3g) e ureia (2g) para 1000 mL de água destilada, aplicando 3 mL por vaso duas vezes por semana.

4.2 CRESCIMENTO DO FUNGO E OBTENÇÃO DOS INÓCULOS

Os isolados de *M. phaseolina* (CMM-4742) (número no GenBank: MH373466) e *M. pseudophaseolina* (CMM-4780) (número no GenBank: MH373515) foram coletados de *T. portulacastrum* e pertencem à Coleção de Culturas de Fungos fitopatogênicos “Profª. Maria Menezes” (CMM), localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. O método de inoculação utilizado foi o método do palito, descrito por Ambrósio *et al.* (2015). Pedacos de palitos de 12 mm, de ponta fina, foram colocados em orifícios formados em papel filtro de 90mm de diâmetro. Os palitos foram dispostos em placas de petri com o mesmo diâmetro do papel, posteriormente, as placas contendo os palitos foram autoclavadas a 121 °C por 30 min por duas vezes, em intervalos de 24 h entre as autoclavagens.

Cerca de 20 mL de meio gelificante batata-dextrose-ágar (BDA) foram adicionados às placas de Petri contendo os palitos. Após a polimerização do meio de cultura, foi realizada a transferência de 4 discos (6 mm de diâmetro) de estruturas (micélios e microescleródios) de culturas puras dos isolados de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*. As placas foram mantidas em estufa do tipo BOD (Demanda Biológica de Oxigênio), no escuro por 7 dias. As mudas de melão e bredo foram inoculadas 14 dias após o transplântio, os palitos infestados pelo micélio foram inseridos na região do colo das mudas, aproximadamente a 1 cm acima do solo. Palitos autoclavados não infestados foram utilizados nas plântulas testemunhas (controle negativo).

As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias para as plantas de bredo e até a manifestação de sintomas para as plantas de melão Goldex, que se apresentaram de 3-4 dias após a inoculação, para então ser realizada a extração enzimática de todos os grupos, tanto plantas sintomáticas quanto assintomáticas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 + 2, sendo duas espécies vegetais, (bredos e melão amarelo Goldex), dois isolados fúngicos, (um de *M. phaseolina* e outro de *M. pseudophaseolina*) e 2 testemunhas de cada espécie de planta, com 8 repetições, totalizando 48 plantas.

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

4.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A extração proteica de caule e raízes de *T. portulacastrum* e *C. melo* foi baseada no método descrito por Bezerra Neto & Barretos (2011). O material vegetal, previamente lavado com água corrente foi posto em almofariz, adicionado 25 mg de Polivinilpirrolidone (PVP) e macerado na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados 2,5 mL de tampão acetato (0,1M, pH 5,0) e 0,5 mL de EDTA (1mM). A solução foi homogeneizada junto ao macerado e colocado em tubos Eppendorf de 2,5 mL. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foram transferidos para novos tubos e imediatamente foram armazenados em super freezer (-80°C) para posterior utilização em análises.

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando o Coomassie Brilliant Blue G-250 como reagente para coloração e a albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão para o estabelecimento da curva padrão. A análise foi então realizada em espectrofotômetro de luz visível a 595 nm.

4.5 ANÁLISE DA PEROXIDASE

Para a análise da peroxidase (BEZERRA NETO & BARRETOS, 2011) presente em amostras de caule e raízes de bredo e melão, foram adicionados em tubos Eppendorf 1 mL de tampão fosfato (0,2M, pH 6,0) seguido de 250 µL de peróxido de hidrogênio (0,38M) e 25 µL de guaiacol (0,2M). As amostras foram submetidas a suave agitação e iniciando a reação enzimática adicionando 25 µL do extrato proteico extraído anteriormente. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de luz visível a 470 nm, intercaladas de 10 segundos, durante 1 minuto. Para o branco (controle), o extrato proteico foi substituído por água destilada. Os dados das absorbâncias foram plotados em planilha para então calcular a atividade da enzima (UE/g) por grama de amostra e as médias, para então ser feito o teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$) em software Sisvar 5.8 (Build 92).

4.6 ANÁLISE COM ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A análise com SDS-PAGE foi realizada em cuba vertical. Os géis de poliacrilamida foram confeccionados em 12,5% (0,375 M de Tris-HCl pH 8,8, 12,5% (v/v) de acrilamida-Bis, 0,1%(v/v) de SDS pH 7,2, 0,05% (v/v) de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED) e 4% (0,125 M de Tris-HCl pH 6,8, 4%(v/v) de acrilamida-Bis, 0,1% (v/v) de SDS pH 7,2, 0,05% (v/v) de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED). Para a aplicação em gel, as amostras de proteínas foram misturadas com tampão de amostra na proporção de 1:1 e aquecidas em banho maria por 5 minutos a 95 °C e em seguida aplicadas no gel. A corrida foi então realizada em tampão Tris-glicina (Tris-HCl 20 mM, glicina 0,192 mM e SDS 0,1%) e submetida a 80 v por 30 minutos seguida de 120 v por 2h30min. Após a corrida, o gel foi lavado e corado em tampão corante contendo comassie brilliant blue por 12 horas seguidas de 3h para descoloração.

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS A PARTIR DO MATERIAL VEGETAL

O DNA genômico foi extraído de caule e raízes de *T. portulacastrum* e *C. melo* com e sem sintomas, dos grupos controle e inoculados com os isolados de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* usando o método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990). O material vegetal (150 mg) foi macerado em almofariz e pistilo utilizando nitrogênio líquido e transferidos para tubos Eppendorf de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 800 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 2%CTAB, 1%PVP, 0,2% β-Mercaeptoetanol e água Milli-Q) previamente aquecida a 60 °C, em seguida os tubos foram agitados e encubados em banho-maria a 60 °C por 40 min, realizando inversões a cada 10 min.

Em seguida, 800 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram adicionados aos microtubos, que foram agitados e então centrifugados a 10.000 g por 10 min. Posteriormente, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, repetindo mais uma vez esta mesma etapa. A seguir, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol resfriado, homogeneizando a solução até a formação de um precipitado. Por conseguinte, os tubos foram incubados a -20 °C por pelo menos 2 horas, depois foram centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente e o sobrenadante foi descartado. Para

a etapa de lavagens do material precipitado, 1 mL de etanol (70%) foi adicionado ao microtubo, que foi então centrifugado a 10.000 g por 5 min, descartando o sobrenadante. Por fim, outra lavagem foi realizada com 1 mL de etanol (90%) seguida de centrifugação a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado mais uma vez e o material foi posto para secar em temperatura ambiente, após isso 45 µL de água ultrapura e 5 µL de RNase (10 µg mL⁻¹) foram adicionados aos microtubos, que por sua vez foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 min.

Para verificação da qualidade da extração bem como a quantificação do material genômico extraído, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose (1%) por 30 min, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado em fotodocumentador.

4.8 IDENTIFICAÇÃO COM MARCADORES GENE-ESPECÍFICOS

A identificação dos isolados para fins de confirmação a nível molecular, de espécie, foi realizada com os primers MpKFI/MpKRI de acordo com a metodologia descrita por Babu *et al.* (2007) para *M. phaseolina* os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 2,5% corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) submetidos a eletroforese a 120V por ± 2 horas em tampão TBE 1X. Um padrão de 1 Kb (BioLabs/ New England) foi utilizado como marcador de peso molecular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INCIDÊNCIA DOS ISOLADOS EM MUDAS DE BREDO E MELOEIRO

Na análise de incidência da podridão no sistema radicular nas plantas inoculadas com os fungos *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*, foi verificado que ambos os isolados, CMM-4742 e CMM-4780 não foram capazes de infectar as mudas de breo, e consequentemente causarem doença (Figura 1), no período de 30 dias após a inoculação, sem o aparecimento de sintomas. No entanto, a incidência se mostrou diferente no grupo do controle positivo, melão, com incidência de 100% (Figura 2) nas plantas inoculadas com *M. phaseolina* e de 37,50% nas plantas inoculadas com *M. pseudophaseolina*, salvo as testemunhas da mesma cultura que permaneceram com ausência de podridão no sistema radicular.



Figura 1. Mudanças de breão (*T. portulacastrum*) inoculadas pelo método do palito com os isolados CMM-4742 e CMM-4780. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 2. Mudanças de melão amarelo inoculadas com os isolados CMM-4742 (à direita) e CMM-4780 (à esquerda). Fonte: Arquivo pessoal.

A ausência de sintomas aparentes em plantas de breão, já tem sido relatado por Negreiros *et al.* (2019), pelo qual foram descobertos isolados de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* em campos de produção agrícola de melão, no nordeste do Brasil. Essas plantas foram encontradas assintomáticas, confirmando resultados de outros pesquisadores, de que o breão é um hospedeiro alternativo, assintomático, desses patógenos.

Das plantas de melão que demonstraram murcha e tombamento, também foi identificada na região caulinar a presença de estruturas inerentes aos fitopatógenos abordados neste estudo, como os microescleródios (Figura 3). Destacando-se somente o isolado de *M. phaseolina*, as

estruturas de resistência do fungo foram visualizadas em microscópio óptico e confirmado, bem como estruturas de esporos (Figura 4). Para a confirmação dos postulados de Koch, foram reisolados de melão os microrganismos inoculados, porém, não foi reisolado de breo, pois não foi observada a infecção nas plantas.



Figura 3. Estrutura de caule de melão com microescleródios, característicos da *M. phaseolina*.
Fonte: Arquivo pessoal.

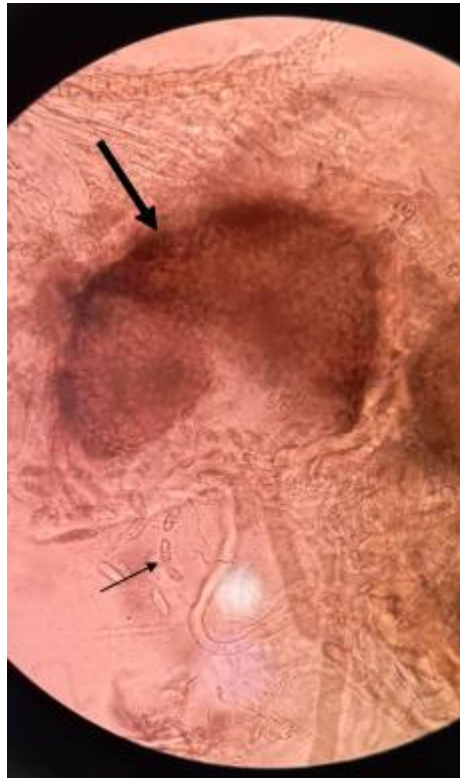


Figura 4. Lâmina feita de tecido do caule do meloeiro inoculado com *M. phaseolina*, em microscópio óptico, para visualizar picnídios (apontado pela seta maior), sendo possível também a visualização de esporos (apontado pela seta menor). Objetiva de 10x. Fonte: Arquivo Pessoal

5.2 ANÁLISE MOLECULAR COM MARCADORES GENES-ESPECÍFICOS

A análise com os marcadores genes-específicos foi realizada neste estudo a fim de confirmar a presença do microrganismo em breo, apesar da sua condição assintomática. Todavia, não foi possível identificar fragmentos de regiões que são específicas em *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*. Por outro lado, foram amplificadas no controle positivo (melão) bandas de DNA de 350-bp (Figura 5) utilizando os primers MpKFI/MpKRI. Estes amplicons apresentam o tamanho esperado (Babu *et al.* 2007).

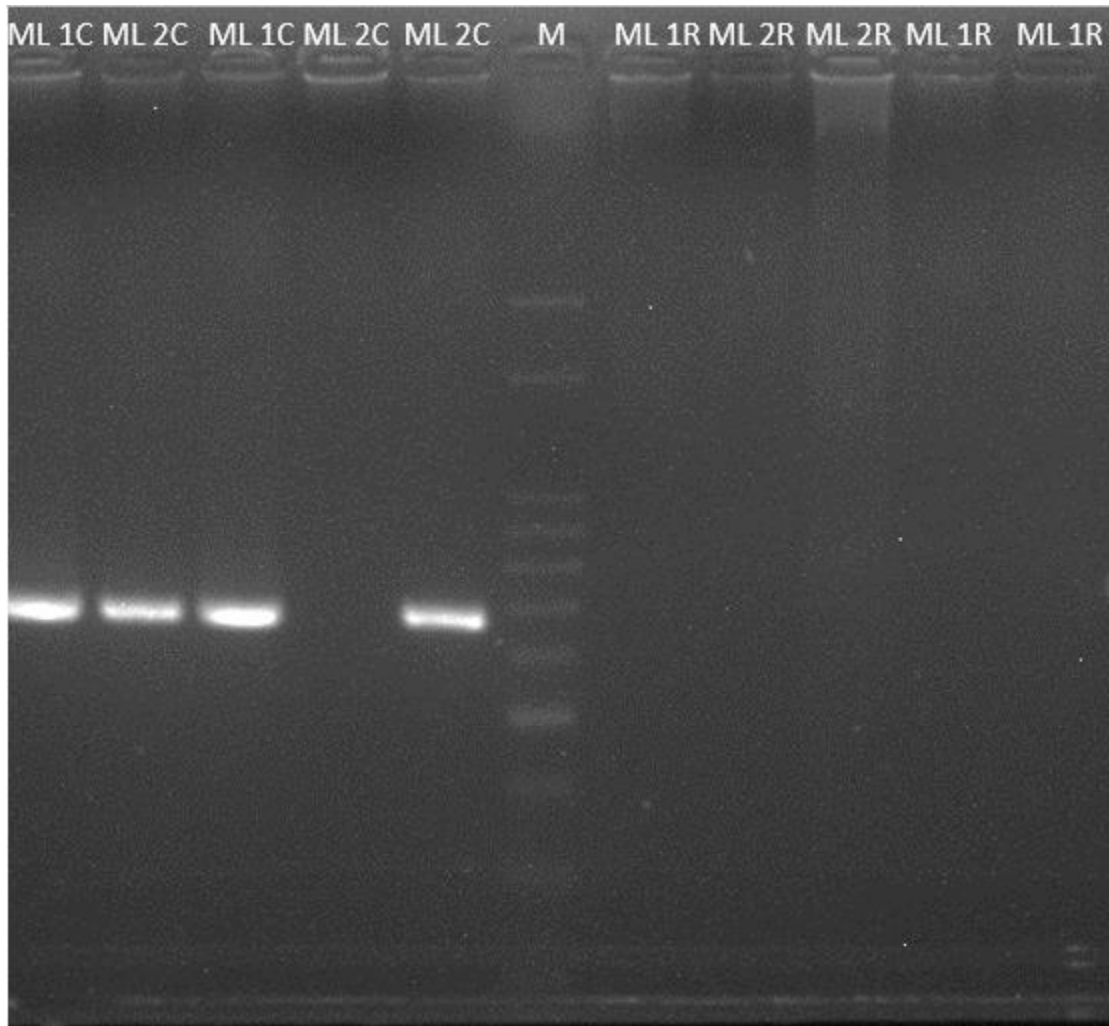


Figura 5. Amplicons de PCR dos isolados CMM-4742 e CMM-4780 com primers específicos MpKFI/MpKRI, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5% e corado com brometo de etídio. ML 1C refere-se à amostra do caule de melão inoculado com *M. phaseolina*, ML 2C é referente à amostra do caule de melão inoculado com *M. pseudophaseolina*, ML 1R refere-se à amostra da raiz da planta inoculada com *M. phaseolina* e ML 2R é referente à amostra da raiz da planta inoculada com *M. pseudophaseolina*. Fonte: Arquivo pessoal.

A ausência de bandas de DNA equivalentes a genes-específicos para os isolados de *Macrophomina* extraídos de breço pode estar relacionada, possivelmente, ao sistema de defesa que é inerente ao organismo da planta. Nawas, Malik & Ali (2001) conseguiram isolar a partir da *T. portulacastrum* um tetraterpenóide antifúngico, chamado de triantenol, em ensaios com fungos patogênicos. Estes autores testaram o composto em *M. phaseolina* obtendo um resultado de

inibição de crescimento de 40%. Sendo assim, é possível inferir que a síntese de triantenol nos tecidos do breo pode ser responsável por inibir o crescimento de *M. pseudophaseolina*, se for levado também em consideração outros mecanismos de defesa, essa inibição (de 40%) pode aumentar.

5.3 ANÁLISE DA PEROXIDASE

Na análise da peroxidase, a atividade enzimática foi significativamente maior nas raízes de breo inoculada com *M. phaseolina* do que no caule, com uma média de 6,61 Unidades de enzima por grama de amostra (Figura 6). Já o grupo controle (sem inóculo) apresentou 3,51 Unidades de enzima e o grupo inoculado por *M. pseudophaseolina* uma média de 2,51 Unidades de enzima. Estes dois últimos não tiveram uma atividade significativa. A partir do teste Tukey com 5% de significância ($p < 0,05$), os grupos de breo sem inóculo e inoculados com *M. pseudophaseolina* não demonstraram diferenças estatísticas.

No entanto, ao ser analisada a atividade da peroxidase em melão, que foi considerado o controle positivo, por ser uma espécie suscetível aos patógenos, foi possível observar atividade enzimática tanto na raiz quanto no caule (região em que foram postos os palitos com inóculo). Nesse caso, na raiz, a atividade da peroxidase foi mais significativa nas plantas infectadas por *M. pseudophaseolina* (3,64). Já nas raízes de plantas contaminadas com *M. phaseolina* não houve atividade significativa (2,71). A partir do teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$), os grupos de melão sem inóculo e o inoculado com *M. phaseolina* não apresentaram diferenças estatísticas. No entanto, o primeiro grupo é diferente do grupo inoculado por *M. pseudophaseolina*.

De acordo com El-Hasan e Buchenauer (2009) que inocularam *Fusarium moniliforme* em milho (*Zea mays*), conseguiram identificar uma maior atividade da peroxidase tanto em brotos, quanto nas raízes das plantas inoculadas, segundo esses autores a presença do microrganismo desencadeou uma resposta sistêmica de defesa, sendo possível medir a atividade da peroxidase em todos os tecidos. As raízes por serem o órgão responsável por absorver e transportar os nutrientes necessários para as partes aéreas, são capazes também de produzir altas quantidades de peroxidase. Confirmando os resultados da produção dessas enzimas nas raízes de breo, e no caule e raízes de melão.

Em consonância a esses resultados, na região do caule da planta de melão (5,97) (Figura 7) houve uma alta atividade da peroxidase de igual forma, dando destaque para o grupo que estava na presença de *M. phaseolina*. De acordo com Campos *et al.* (2004) a peroxidase está envolvida no metabolismo dos polifenóis, na biossíntese de compostos secundários, bem como está associada com ferimentos vegetais. Além de ser um indicador da biossíntese de lignina, que atua como uma barreira na infecção provocada por microrganismos, precisamente na região onde ocorre o ferimento. Assim, uma resposta sistêmica é ativada pelas células adjacentes ao local que, por sua vez, ativa novas expressões de genes, sintetizando novas enzimas, novos proteomas.

Campos *et al.* (2004) ao tratarem acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com ácido salicílico associado à *Colletotrichum lindemuthianum* perceberam que houve um aumento significativamente na atividade da peroxidase. Desta forma, demonstra-se que a presença de fungos parasitas em plantas pode desencadear a produção de enzimas capazes de agir como antioxidantes ou até mesmo inativar o centro ativo de enzimas provenientes desses microrganismos, impedindo o processo de infecção em alguns casos. Sendo assim, é possível inferir que, a não detecção dos isolados CMM-4742 e CMM-4780 tanto por isolamento em BDA como em análise molecular por primers gene-específicos possam ser explicados por alguns desses fatores acima mencionados.

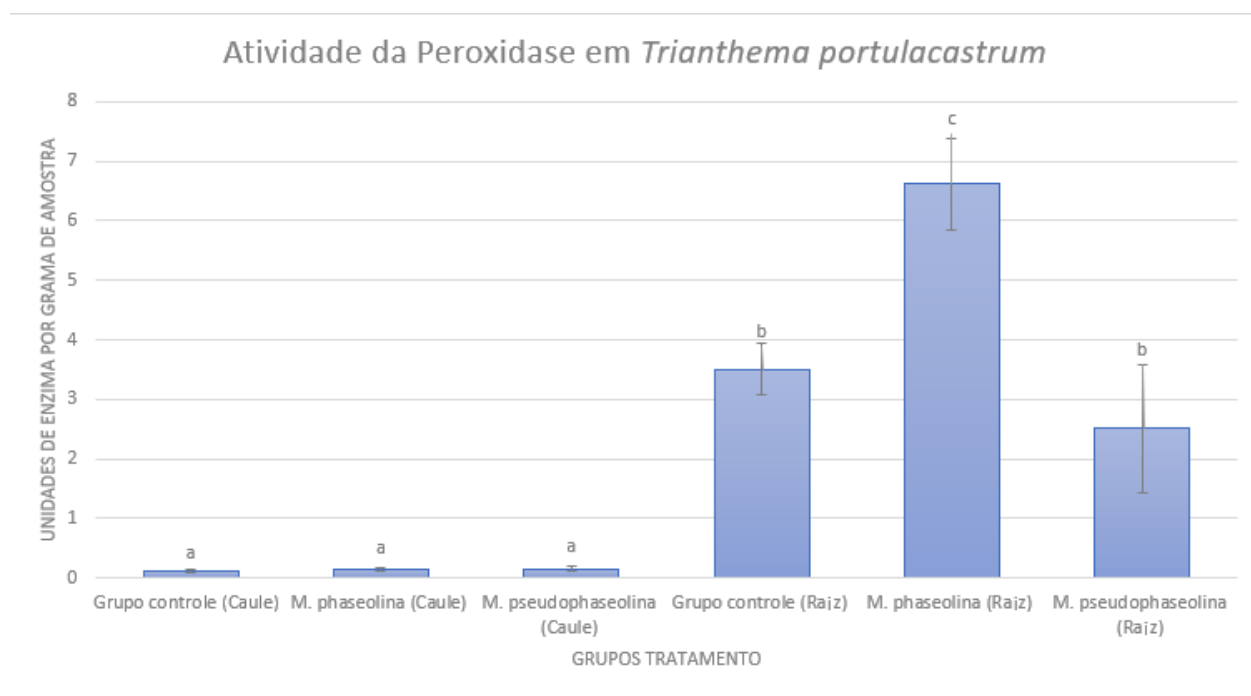


Figura 6. Atividade da peroxidase em *T. portulacastrum* em raiz e caule, expresso em Unidade de Enzima por grama de amostra. Grupos controle, grupo inoculado com *M. phaseolina* e grupo

inoculado com *M. pseudophaseolina*, calculadas as médias, seguido de desvio padrão e teste de Tukey com 5% de significância ($p < 0,05$). Letras iguais significam que os elementos são iguais estatisticamente e letras diferentes significam que os elementos são diferentes entre si estatisticamente. Fonte: Arquivo pessoal.

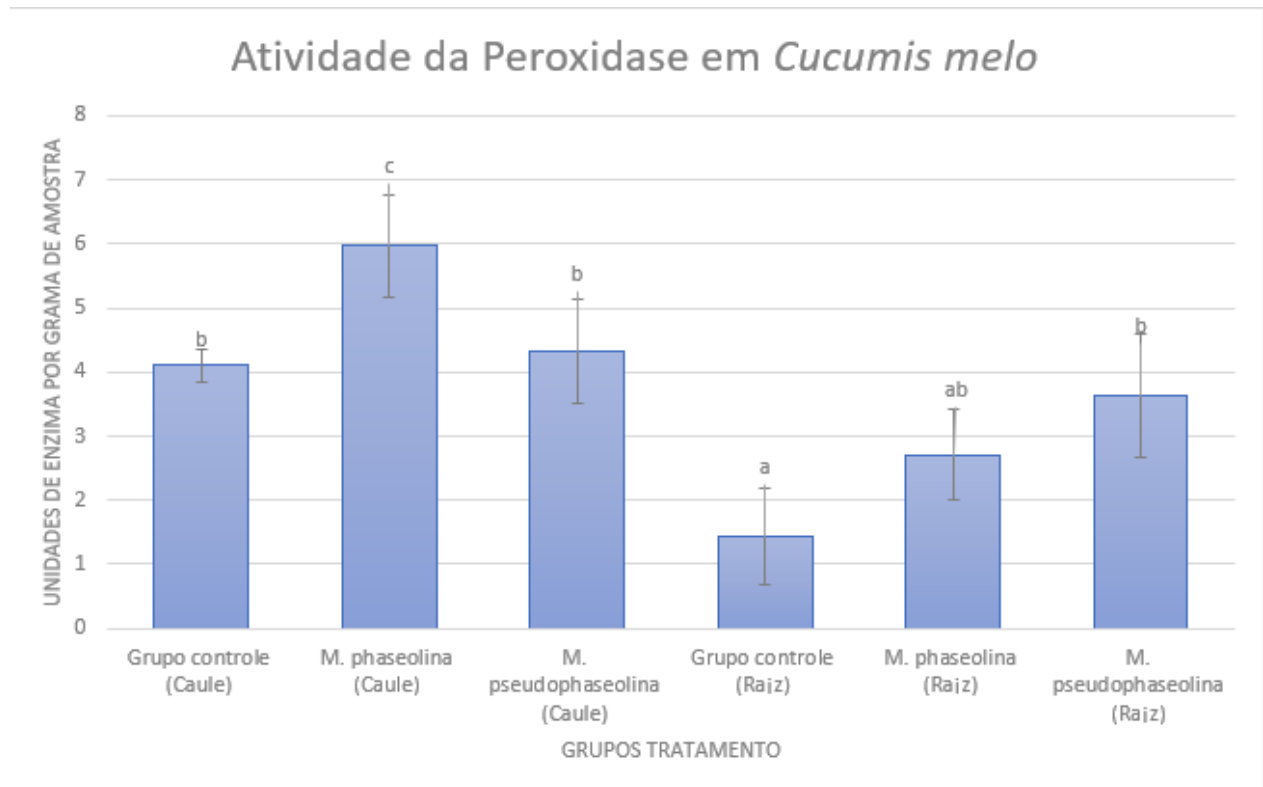


Figura 7. Atividade da peroxidase em *C. melo* em raiz e caule, expresso em Unidade de Enzima por Grama de Amostra. Grupos controle, grupo inoculado com *M. phaseolina* e grupo inoculado com *M. pseudophaseolina*, calculadas as médias, seguido de desvio padrão e teste de Tukey com 5% de significância ($p < 0,05$). Letras iguais significam que os elementos são iguais estatisticamente e letras diferentes significam que os elementos são diferentes entre si estatisticamente. Fonte: Arquivo pessoal.

5.4 ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Na análise de SDS-PAGE foram comparados o perfil de bandas de proteínas do bredo (Figura 8) com o perfil do melão amarelo, grupos controle e grupos tratamento com *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*. A partir da imagem registrada dos géis, foi possível observar a presença

de bandas nítidas na região acima de 80 kDa mais expressa para as amostras de breço do que para as amostras de melão. Outra região de destaque seria entre 60 e 40 kDa, onde se encontra um perfil de bandas bem mais nítido para as amostras de melão do que para as amostras de breço, tanto nos grupos controles como nos grupos dos tratamentos.

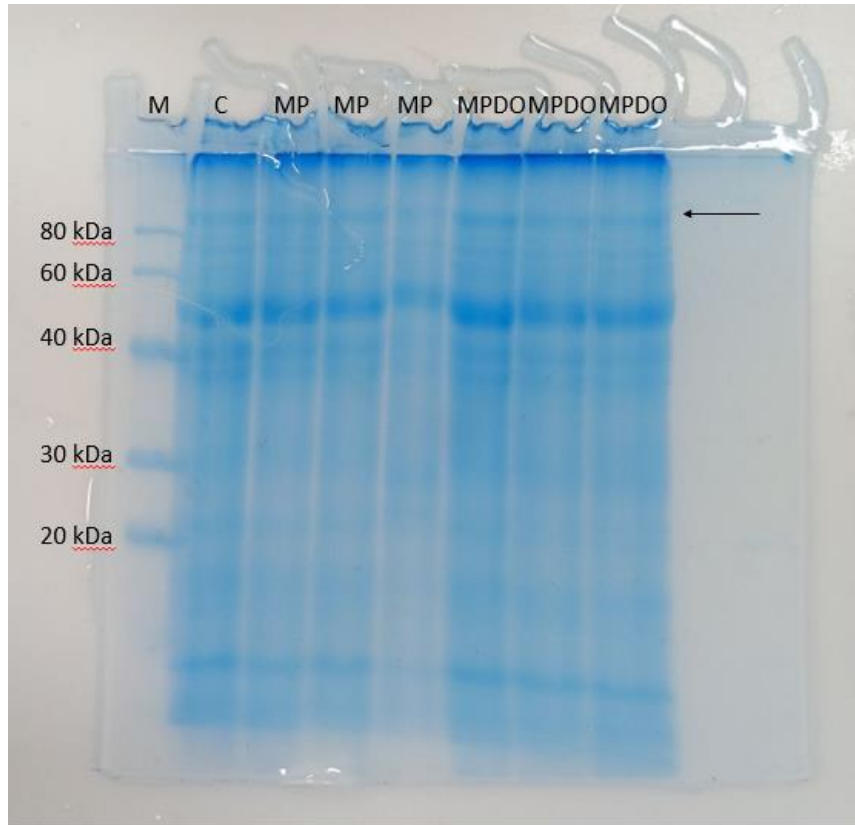


Figura 8. Gel desnaturante de poliacrilamida submetidos a eletroforese com amostras de proteínas isoladas de *T. portulacastrum*. O código M significa marcador de peso molecular (12-80 kDa), C significa a amostra da planta controle, MP significa inoculado com CMM-4742, MPDO significa inoculado com CMM-4780. Fonte: Arquivo pessoal.

No gel observado com o perfil de proteínas de melão (Figura 9), foi possível visualizar um perfil de bandas abaixo de 12 kDa, que se expressa de acordo com o microrganismo presente na planta, visto que o perfil do controle negativo está como menos intensidade comparado ao perfil das plantas de melão com os isolados CMM-4742 e CMM-4780. Tal expressão no proteoma pode indicar a presença de proteínas diferencialmente abundantes que estejam correlacionadas ao metabolismo secundário da planta, que estão associadas ao estresse biótico e abiótico que o organismo venha a enfrentar. Esses metabólitos são classificados de acordo com suas vias de

sintetize, em esteroides, terpenos e fenólicos, conferindo a capacidade de proteger as plantas frente à patógenos. Mais uma vez, remetendo ao que foi observado com relação à peroxidase e o composto triantenol, que podem estar presentes em todos os tecidos do hospedeiro (QUEIROZ, 2021).

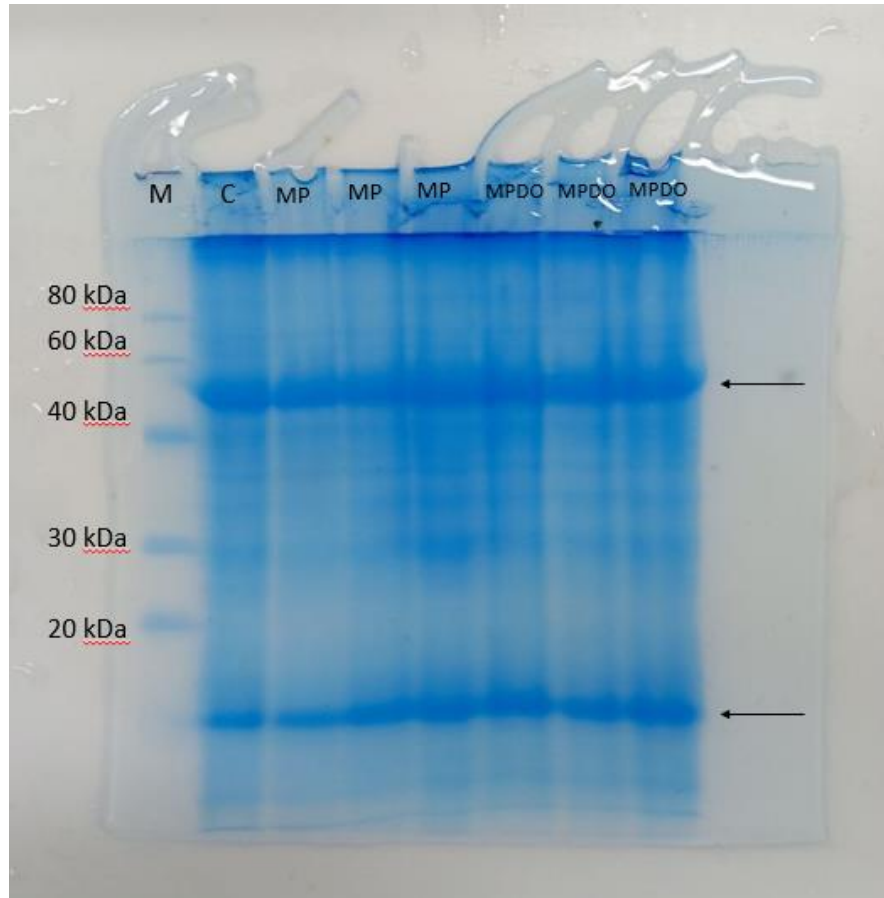


Figura 9. Gel desnaturante de poliacrilamida submetidos a eletroforese com amostras de proteínas isoladas de *C. melo*. O código M significa marcador de peso molecular (12-80 kDa), C significa a amostra da planta controle, MP significa inoculado com CMM-4742, MPDO significa inoculado com CMM-4780. Fonte: Arquivo pessoal.

Um teste bastante semelhante ao que foi desenvolvido neste trabalho, com acessos de melão Ag-15591Ghana inoculados com *M. pseudophaseolina* (CMM-4826 e CMM-4807), bastante agressivos para essa mesma espécie de acordo com a literatura. Foram realizadas análises de SDS-PAGE com tecidos de caule e raiz desses acessos, constatando a presença de proteínas diferencialmente expressas em ambas as partes da planta, entre os grupos controle e tratamento. Correlacionando com testes de patogenicidade, confirmou-se que o acesso Ag-15591Ghana possuía resistência moderada a nova espécie *M. pseudophaseolina* (MAIA, 2021).

Em ensaios de patogenicidade associado com técnicas de proteômica aplicados por Aboshosha *et al.* (2008) em cultivares de girassóis, foi possível observar perfis de proteínas em diferentes faixas de peso molecular. Cultivares que possuíam maior resistência a *M. phaseolina* possuíam bandas de 100 kDa, enquanto que as cultivares suscetíveis não possuíam bandas expressas nessa faixa. Os autores desse trabalho também relataram que essas proteínas estavam ligadas à PRPs, bem como sinalizações ou até mesmo novas isoenzimas. A atividade da peroxidase também foi mensurada, caracterizando assim como uma das respostas primárias relacionada a defesa da planta contra agentes invasores.

6. CONCLUSÃO

Com a análise de incidência do patógeno, molecular e proteica foi possível obter indícios da tolerância de *T. portulacastrum*, ao qual não foi possível observar sintomas aparentes e nem incidência da doença, bem como identificar através da SDS-PAGE um perfil de bandas característico de plantas possuidoras de um proteoma capaz de conferir essa tolerância à patógenos. Verificar através de análise enzimática a produção de enzimas (peroxidases) responsáveis por impedir a colonização de CMM-4742 (*M. phaseolina*) em brejo.

No entanto, com as análises de incidência do patógeno, foi possível observar nas plantas de melão 100% de incidência para *M. phaseolina* e 37,50% para *M. pseudophaseolina*, com sintomas bastante evidentes e tombamento das plantas, já nas análises de SDS-PAGE não foi possível identificar um bandejamento de proteínas semelhante ao de plantas resistentes/tolerantes às duas espécies de patógenos aqui utilizadas. Todavia, nas análises enzimáticas foi possível observar uma maior produção de peroxidases na região do caule, quando o melão estava na presença de *M. phaseolina* (CMM-4742), e uma maior atividade enzimática na raiz quando a planta estava na presença de *M. pseudophaseolina* (CMM-4780).

Os resultados aqui elencados são pioneiros no que tange a busca de conhecimentos a nível molecular no estudo da resistência de *T. portulacastrum* frente aos isolados fitopatogênicos. Através da verificação da tolerância do brejo a esses microrganismos, por uma alta produção de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRPs). Desse modo espera-se corroborar com futuros estudos sobre esta espécie, uma vez que se trata de uma hospedeira alternativa e fonte de inóculo em campos de produção de melão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOSHOSHA, S. S. *et al.* Protein analysis and peroxidase isozymes as molecular markers for resistance and susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseolina*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 10, n. 1, p. 28-34, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Eman-ElA-rgawy/publication/241155236_Protein_Analysis_and_Peroxidase_Isozymes_as_Molecular_Markers_for_Resistance_and_Susceptibility_of_Sunflower_to_Macrophomina_phaseolina/links/564c4ceb08ae020ae9f8eda7/Protein-Analysis-and-Peroxidase-Isozymes-as-Molecular-Markers-for-Resistance-and-Susceptibility-of-Sunflower-to-Macrophomina-phaseolina.pdf. Acesso em: 12 out. 2022.

ALI, A. *et al.* Quantitative proteomics and transcriptomics of potato in response to *Phytophthora infestans* in compatible and incompatible interactions. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 497, 2014. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-497>. Acesso em: 5 out. 2022.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI 2022. Brazilian Horti & Fruti Yearbook 2022. **Editora Gazeta**. Disponível em: <<https://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-de-horti-fruti-2022/>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

AGUSTÍ-BRISACH, C. *et al.* Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and Petri disease pathogens. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 803-810, 2011. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS-12-10-0888>. Acesso em: 5 out. 2022.

ALVES, João Vitor da Silva *et al.* Indução de resistência a *Colletotrichum* sp. em *Heliconia psittacorum* x *sparthocircinata* cv. Golden Torch cultivada em ambiente sombreado e pleno sol. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 320-326, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/dSrssNWWLhVYyPNLqJQNP9b/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 9 nov. 2022.

AMBRÓSIO, M. M. Q. *et al.* Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Euphytica**, v. 206, n. 2, p. 287-300, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-015-1452-x>. Acesso em: 7 nov. 2022.

BABU, B. K. *et al.* 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: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15572536.2007.11832511?scroll=top&needAccess=true>. Acesso em: 15 out. 2022

BARRETO, Alcileide Vieira *et al.* **Identificação e diversidade genética de *rotylechulus reniformis* em áreas de cultivos de meloeiro (*cucumis melo* l.).** 2018. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018. Disponível em:

https://repositorio.ufersa.edu.br/bitstream/prefix/847/1/AlcileideVB_DISSERT.pdf. Acesso em: 12 jul. 2022.

BESSA, Mizael Augusto Diógenes *et al.* Bebida alcoólica fermentada de melão (*Cucumis melo* L.): processamento e caracterização. **Braz. J. Food Technol**, v. 21, p. e2017217, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/pgy6MHpGGHQmLPBjngyXmrJ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 jul. 2022.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. **Análises químicas e bioquímicas em plantas**. CEP, v. 52171, p. 900, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>. Acesso em: 4 nov. 2022.

BRITO, Amanda Cupertino de Queiroz *et al.* First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 4, p. 1245-1245, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42161-019-00309-3>. Acesso em: 7 nov. 2022.

CABRAL, Sarah Kirchhofer de Oliveira *et al.* **Estudo de microRNAs de plantas responsivos à infecção por fungos do gênero *Colletotrichum* spp.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/228594/TCC_Cabral%20SKO.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 13 out. 2022.

CAMPOS, Ângela Diniz *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 637-643, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/YZDCPZzC7mZCbmcHQPXKwb/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 24 nov. 2022.

CARVALHO, N. *et al.* Análise da variabilidade genética de linhagens de melão do tipo pele de sapo utilizando marcadores SSR e ISSR. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2018. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1099424/1/Boletimmelaopeledesa_po3.pdf. Acesso em: 23 jun. 2022.

CARVALHO, Donato Ribeiro *et al.* **Períodos de interferência e alternativas para o controle de plantas daninhas na cultura do melão**. 2020. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2020. Disponível em: https://repositorio.ufersa.edu.br/bitstream/prefix/5660/1/DonatoRC_TESE.pdf. Acesso em: 14 out. 2022.

CERESINI, Paulo Cesar *et al.* **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: Editora

UFPel. 2018. Disponível em: http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/bitstream/prefix/4207/1/RESIST%c3%8aNCIA%20GEN%c3%89TICA%20DE%20PLANTAS%20A%20PAT%c3%93GENOS_EBOOK.pdf. Acesso em: 26 out. 2022

CHAMORRO, M. *et al.* Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. **Crop Protection**, v. 67, p. 279-286, 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219414003330?casa_token=y0OUfNU6JCYAAAAA:Ybf0DNMPBjkZoKjNqkegUzwONg-Fq1IH0yauh3YDVLdye3shOB15uSSISY6bA0kSCWudUjcvtk. Acesso em: 7 out. 2022.

CHATTERJEE, M. *et al.* Analysis of root proteome unravels differential molecular responses during compatible and incompatible interaction between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* Race1 (Foc1). **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 949, 2014. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-949>. Acesso em: 7 out. 2022.

COHEN, R. *et al.* Variation in the responses of melon and watermelon to *Macrophomina phaseolina*. **Crop Protection**, v. 85, p. 46-51, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219416300461?casa_token=hP4bA4iE6nEAAAAA:kHewupJ9bBpLZXk3zqm8xsdouDuH1uFAivjzAjjp947FnEs1kkpfBBY65rUhJavOHRBOeH652s8. Acesso em: 12 out. 2022.

CUI, Lei *et al.* Breeding melon (*Cucumis melo*) with resistance to powdery mildew and downy mildew. **Horticultural Plant Journal**, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468014122000814>. Acesso em: 13 out. 2022.

DELAUNOIS, B. *et al.* Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 249, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00249/full>. Acesso em: 2 nov. 2022.

DÍAZ, Aurora *et al.* Quantitative trait loci analysis of melon (*Cucumis melo* L.) domestication-related traits. **Theoretical and applied genetics**, v. 130, n. 9, p. 1837-1856, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-017-2928-y>. Acesso em: 10 jun. 2022.

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.

EL-HASAN, Abbas; BUCHENAUER, Heinrich. Actions of 6-pentyl-alpha-pyrone in controlling seedling blight incited by *Fusarium moniliforme* and inducing defence responses in maize. **Journal of phytopathology**, v. 157, n. 11-12, p. 697-707, 2009. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0434.2009.01565.x?casa_token=l25Cj2xD8h8AAAAA:Mtc1gInkWyRcd53rLXj9jOpd4bdBRpny8x_gkVRDrpzViesjgOYJRkIcl8k3or8ELoJ2fKpfjqZ5QTzr. Acesso em: 1 dez. 2022.

EMIDIO, N. B.; CARPANEZ, A. G.; QUELLIS, L. R.; FARANI, P. S.; VASCONCELOS, E. G.; Faria-Pinto, P. (2015). Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, 2015. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/2482/831>.

Acesso em: 15 jun. 2022.

EVANGELISTA, Luiz Fernando Bezerra *et al.* Controles alternativos no manejo da podridão por *Fusarium* sp. em pós-colheita do melão: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e34811931940-e34811931940, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/31940/27204>. Acesso em: 27 jun. 2022.

FANG, X. *et al.* Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. **Proteomics**, v. 15, n. 9, p. 1525-1543, 2015. Disponível em: https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201400384?casa_token=Sgb8v9WP94QAAAAA:X0KAzLlMPfK_PLn9aBflmAJSVGMaumDoW-t6gih5tGKgAuXMaGyWP5fyVombSty4VaqhkCmaHYX7ViaY. Acesso em: 24 jul. 2022.

FERREIRA, Cristiane Silva *et al.* **Interação diferencial entre *Phaseolus vulgaris* e *Macrophomina phaseolina***. 2019. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/9555/5/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20-%20Cristiane%20Silva%20Ferreira%20-%202019.pdf>. Acesso em: 17 out. 2022.

FREITAS, Fábio Ribeiro de *et al.* **Adaptação de isolados de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio, frente a mecanismos de defesa conferidos por diferentes genes de resistência em videira**. 2022. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/235362/PRGV0366-D.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 17 out. 2022.

GOIS, Andressa Fernanda Ducatti de. **Caracterização do proteoma de folhas, caules e raízes de plantas de *Eucalyptus grandis* sob déficit hídrico**. 2021. Tese de Doutorado (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-31032021-150358/publico/Andressa_Fernanda_Ducatti_de_Gois_versao_revisada.pdf. Acesso em: 13 nov. 2022.

GUISSONI, Ana Carla Peixoto; DE PAULA CARDOSO, Divina das Dores. Proteômica: uma ferramenta analítica. **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 62-75, 2019. Disponível em: <https://www.revista.fasem.edu.br/index.php/fasem/article/view/193>. Acesso em: 15 out. 2022.

HIDAYAT, B. T.; WEA, A.; ANDRIATI, N. Physicochemical, sensory attributes and protein profile by SDS-PAGE of beef sausage substituted with texturized vegetable proteins. **Food Research**, v. 2, n. 1, p. 20-31, 2018. Disponível em: <http://www.myfoodresearch.com/uploads/8/4/8/5/84855864/fr-2017-106.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2022.

JACOB, C. J. *et al.* A severe outbreak of charcoal rot in cantaloupe melon caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. **Plant disease**, v. 97, n. 1, p. 141-141, 2013. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-06-12-0588-PDN>. Acesso em: 17 out. 2022.

JÚNIOR, Carlos Zacarias Joaquim *et al.* **Manejo de plantas daninhas na cultura do algodoeiro: breve revisão.** v. 5, p. 1-5, 2021. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/ensino/departamentos/cienciasdaproducaoagricola/laboratoriodeematologia-labmato/revistaagronomiabrasileira/rab202125.pdf>. Acesso em: 12 out. 2022.

KAULICH, Philipp T. *et al.* Complementarity of Different SDS-PAGE Gel Staining Methods for the Identification of Short Open Reading Frame-Encoded Peptides. **Proteomics**, v. 20, n. 19-20, p. 2000084, 2020. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pmic.202000084>. Acesso em: 12 out. 2022.

KESH, Hari; KAUSHIK, Prashant. Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. **Scientia Horticulturae**, v. 282, p. 110045, 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423821001527?casa_token=VoNA7ZQ2t4AAAAA:1Y-wW7uy29obkx5iWYHUEwsQ6KTWXdtBzDBvfwq1yA_S1Qx4Buq6oTg2OeshBudiZIKvZtkN7yk. Acesso em: 14 out. 2022.

KHAN, A. N. *et al.* Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolina* strains causing pathogenicity on sunflower and chickpea. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1309, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01309/full>. Acesso em: 7 out. 2022.

KISS, L. *et al.* Deciphering the biology of *Cryptophyllachora eurasiatica* gen. et sp. nov., an often cryptic pathogen of an allergenic weed, *Ambrosia artemisiifolia*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10806, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-29102-5>. Acesso em 10 set. 2022.

KOIKE, S. T. *et al.* Status of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in California and preliminary characterization of the pathogen. **International Journal of Fruit Science**, v. 16, n. sup1, p. 148-159, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15538362.2016.1195313>. Acesso em: 17 set. 2022.

KOUADRI, Mohamed El Amine; ZAIM, Souad; BEKKAR, Ahmed Amine. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* infecting *Lens culinaris*. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 16, n. 1, p. 1-3, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13314-021-00440-0>. Acesso em: 13 nov. 2022.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends in plant science**, v. 18, n. 9, p. 522-531, 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138513001039?casa_token=LkW0NAgcv7QAAAAA:h_6M225OcPPLQvOseQLu_9N8h6JhfAGamp-YKEegn1yMvyvXU6KcQv0EsLQE7gJGHcJ_faEOc84. Acesso em: 10 set. 2022.

LANDAU, Elena Charlotte *et al.* Evolução da produção de melão (*Cucumis melo*, *Cucurbitaceae*). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1122691/1/Cap34->

[EvolucaoProducaoMelao.pdf](#). Acesso em: 16 ago. 2022.

LODHA, Satish; MAWAR, Ritu. Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 1, p. 1-17, 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jph.12854?casa_token=MT-12eLjRQgAAAAA:uFEDmKdDo-rX7CGtA5K9xfEPcWcECQpSnikTMoylCmBxpuc8LDr33Dc_m63gK2Z893Ff8ZouSbBP4Odi. Acesso em: 8 ago. 2022.

MAIA, Vitor Rafael Oliveira. **Patogenicidade e expressão do perfil de proteínas por SDS-Page da relação *Macrophomina pseudophaseolina* X *Cucumis melo* L.** 2021. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufersa.edu.br/bitstream/prefix/7044/1/VitorROM DISSERT.pdf>. Acesso em: 17 out. 2022.

MALCOLM, G. M. *et al.* Hidden host plant associations of soilborne fungal pathogens: an ecological perspective. **Phytopathology**, v. 103, n. 6, p. 538-544, 2013. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-08-12-0192-LE>. Acesso em: 12 ago. 2022.

MACHADO, Alexandre Reis *et al.* Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-018-1545-1>. Acesso em: 17 out. 2022.

MARQUEZ, Nathalie *et al.* *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 634397, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.634397/full>. Acesso em: 14 out. 2022.

MARTIN, Thomas Newton; PIRES, João Leonardo Fernandes; VEY, Rosana Taschetto. Tecnologias aplicadas para o manejo rentável e eficiente da cultura da soja. Santa Maria: **Editora GR**. 2022. Disponível em: <file:///C:/Users/gilsi.LAPTOP-J0C5N9J5/Downloads/LV-SOJAversao-on-line.pdf>. Acesso em: 23 out. 2022.

MELO, Talyana Kadja de *et al.* Future Emission Scenario Effects on Melon Cultivars (*Cucumis melo* L.) in the Brazilian Semi-Arid Region. **Agronomy**, v. 12, n. 11, p. 2890, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/12/11/2890>. Acesso em: 15 nov. 2022.

NAWAZ, Hafiz Rub; MALIK, Abdul; ALI, Muhammad Shaiq. Trianthenol: an antifungal tetraterpenoid from *Trianthema portulacastrum* (Aizoaceae). **Phytochemistry**, v. 56, n. 1, p. 99-102, 2001. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200002703?casa_token=qjO46r868GAAAAA:0r3JQC2e0KJiqBKyVlwYXphXmZdExL9Nv6x2BJx47T1VW7GS0pYbT5uGu6SewDrmT565W09bpuw. Acesso em: 12 nov. 2022.

NEGREIROS, A. M. P. *et al.* Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 6, p. 326-337, 2019. Disponível em:

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jph.12801?casa_token=U4Q9gpcvhtoAAAAA:xW-3dHEMMgUCoE-_BsLZapFxDhvbvIHQomNy6ZNpbluQdc4jR8cLpnN--GTot0EQqcl6b4P6ciyFz9r. Acesso em: 27 out. 2022.

NEGREIROS, Andréia Mitsa Paiva *et al.* Characterization of adaptability components of Brazilian isolates of *Macrophomina pseudophaseolina*. **Journal Of Phytopathology**, v. 168, n. 7-8, p. 490-499, 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jph.12927?casa_token=4hCflfhQpmEAAAAA:yvgzMTHFP_ekSRamwevabLs99QOOt1BpFyh6_BMslGltSJ11FvA5doJ4dWlCwesHz3FhlNMS_PpMnA-Up. Acesso em: 27 out. 2022.

NOWAKOWSKI, A. B.; WOBIG, W. J.; PETERING, D. H. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 1068-1078, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/metallomics/article/6/5/1068/6015401?login=false>. Acesso em: 22 nov. 2022.

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

PEIXOTO, Gustavo Henrique Silva *et al.* OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *FIBROIDIUM EMILIAE-SONCHIFOLIAE* EM PLANTAS DE *EMILIA SONCHIFOLIA* EM IPAMERI, GOIÁS. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 8, n. 3, 2018. Disponível em: [file:///C:/Users/gilsi.LAPTOP-J0C5N9J5/Downloads/3037-Texto%20do%20artigo-16419-1-10-20181211%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/gilsi.LAPTOP-J0C5N9J5/Downloads/3037-Texto%20do%20artigo-16419-1-10-20181211%20(1).pdf). Acesso em: 20 nov. 2022.

QUEIROZ, Claudia Afras de *et al.* **Análise da interação entre guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) e *Fusarium decemcellulare* agente causal do superbrotamento: uma visão morfoanatômica, transcriptômica e proteômica.** 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2021. Disponível em: https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/8841/2/Tese_ClaudiaQueiroz_PPGBIOTEC.pdf. Acesso em: 13 out. 2022.

SALES JÚNIOR, R. *et al.* Weeds as potential hosts for fungal root pathogens of watermelon. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 1, p. 1-6, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcaat/a/dVZVdL3x63WvVzsPDd3vFQt/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 17 nov. 2022.

SALES JÚNIOR, R. U. I. *et al.* PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Macrophomina* COLETADAS DE PLANTAS DANINHAS EM FEIJÃO-CAUPI. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 395-401, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcaat/a/NbsffLTmZnnLWX9Zzxx9rxc/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 13 nov. 2022.

SANTOS, Alessandro dos. **Plantas daninhas e plantas cultivadas como possíveis hospedeiras de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.** 2020. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020. Disponível em:

<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/30055/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2022.

SARKAR, T. S. *et al.* Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease of jute: complexity of the interplay between necrotroph–host plant interactions. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107348, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0107348>. Acesso em: 17 jun. 2022.

SHARGIL, D. *et al.* New weed hosts for *Cucumber green mottle mosaic virus* in wild Mediterranean vegetation. **European journal of plant pathology**, v. 148, n. 2, p. 473-480, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-016-1105-5>. Acesso em: 23 jun. 2022.

SCHAUFFLER, Giana Paula *et al.* **Resistência de variedades crioulas e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a helmintosporiose e mecanismos de defesa envolvidos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/214254/PRGV0314-D.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 24 out. 2022.

SHISHKOFF, N. Susceptibility of some common container weeds to *Phytophthora ramorum*. **Plant disease**, v. 96, n. 7, p. 1026-1032, 2012. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-10-0695-RE>. Acesso em: 15 out. 2022.

SILVA, Redinaldo dos Santos; SOUZA, Cláudia Regina Batista de. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Revista ACTA Amazonica** vo. 39, p. 255 – 260, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aa/a/9gPgNmm4pT4tY5qZQrvbQYQ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SOUZA FILHO, Antonio P. da S.; DUTRA, Saturnino; SILVA, Maria AMM. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. **Planta Daninha**, v. 16, p. 3-11, 1998. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pd/a/rmMXjYSCSd48LwNt5kLdjXD/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 set. 2022.

SRIVASTAVA, D., KHAN, N. A., SHAMIM, M. D., YADAV, P., PANDEY, P., SINGH, K. N. Assessment of the genetic diversity in bottle gourd (agenaria siceraria [Molina] Standl.) genotypes using SDS-PAGE and RAPD Markers. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40009-013-0207-2>. Acesso em: 7 ago. 2022.

STERGIOPOULOS, I.; GORDON, T. R. Cryptic fungal infections: the hidden agenda of plant pathogens. **Frontiers in plant science**. v. 26, p. 506, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00506/full>. Acesso em: 3 jun. 2022.

SUPRONIENE, S. *et al.* Asymptomatic weeds are frequently colonised by pathogenic species of *Fusarium* in cereal-based crop rotations. **Weed Research**, 2019. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/wre.12367?casa_token=Q-sHOU-0yA0AAAAA:JmAJ75wVdOB4ogSxLWBRk8zPMLKOWwdm89vArP9yHRdBydgiNIQ_SAU_Ehg_ZwiufsaIhhKZk7tSruDuG. Acesso em: 27 jul. 2022.

SUPRONIENE, Skaidre *et al.* Weed species within cereal crop rotations can serve as alternative hosts for *Fusarium graminearum* causing *Fusarium* head blight of wheat. **Fungal ecology**, v. 37, p. 30-37, 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1754504818301363?casa_token=KyG5Yr4UxR8AAAAA:r0at9ESR3-8X6rkidOApOkf6BHTPsQHeEk1Gozi0iFCOfnYXw8FrAIfLgSB9cqfJWGwkwLzAr2M. Acesso em: 14 jun. 2022.

SYBUIA, Priscila Ayumi *et al.* Parasexual recombination in *Macrophomina pseudophaseolina* and vegetative compatibility reactions in *M. euphorbiicola*. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-14, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-022-02530-w>. Acesso em: 17 nov. 2022.

THOMPSON, S. M. *et al.* *Diaporthe novem* isolated from sunflower (*Helianthus annuus*) and other crop and weed hosts in Australia. **European journal of plant pathology**, v. 152, n. 3, p. 823-831, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-018-1515-7>. Acesso em: 17 jul. 2022.

TSCHOEKE, Bruno Augusto Prohmann. **Aplicação da proteômica e metabolômica no entendimento da interação de *Austropuccinia psidii* durante o processo de infecção de *Eucalyptus grandis* e *Syzygium jambos***. 2021. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-16062021-123425/publico/Bruno_Augusto_Prohmann_Tschoeke.pdf. Acesso em: 15 set. 2022.

URANGA, C. C. *et al.* Novel proteins from proteomic analysis of the trunk disease fungus *Lasiodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae). **Biochimie open**, v. 4, p. 88-98, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221400851730007X>. Acesso em: 12 out. 2022.

WITTMANN-LIEBOLD, B. *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4688-4703, 2006. Disponível em: https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.200500874?casa_token=Q9az_o3lbfoAAAAA:NbWbpL7BP1MpEnF34kv_vIM-AiBmzPk2q_ZRBh7zMURHvw-ywvLw37P0URSLDDdsnkhrVuwsNP_Vez8U. Acesso em: 9 jun. 2022.

ZHAO, X. *et al.* Transcriptome and proteome analyses of resistant preharvest peanut seed coat in response to *Aspergillus flavus* infection. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 82-90, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345819300090>. Acesso em: 14 jul. 2022.

ZVEIBIL, A. *et al.* Survival, host–pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 265-272, 2012. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-04-11-0299>. Acesso em: 14 jul. 2022.