



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

WILLIANNY KAREM DE SOUSA

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* E MUTAÇÃO EM
DNA DE ACESSOS DE MELOEIRO TRATADOS COM RAIOS GAMA Co⁶⁰**

MOSSORÓ/RN

2023

WILLIANNY KAREM DE SOUSA

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* E MUTAÇÃO EM
DNA DE ACESSOS DE MELOEIRO TRATADOS COM RAIOS GAMA Co⁶⁰**

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

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ioná Santos Araújo
Holanda

Coorientador: Prof. Dr. Glauber Henrique de
Sousa Nunes

Coorientador: Prof. Dr. Rui Sales Júnior

MOSSORÓ/RN

2023

© 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.

S725a Sousa, Willianny Karem de.
Análise da resistência a *Macrophomina*
phaseolina e mutação em DNA de acessos de meloeiro
tratados com raios gama Co60 / Willianny Karem
de Sousa. - 2023.
66 f. : il.

Orientador: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientador: Rui Sales Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia, 2023.

1. mutagênese. 2. variabilidade genética. 3.
podridão radicular. 4. ISSR. 5. melão. I.
Holanda, Ioná Santos Araújo, orient. II. Sales
Júnior, Rui, 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.

WILLIANNY KAREM DE SOUSA

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* E MUTAÇÃO EM
DNA DE ACESSOS DE MELOEIRO TRATADOS COM RAIOS GAMA Co⁶⁰**

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

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Defendida em: 27/02/2023

BANCA EXAMINADORA

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

Presidente

Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes (UFERSA)

Membro Examinador

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

Membro Examinador

Dr^a Fabiane Rabelo da Costa Batista (INSA)

Membro Examinador

Prof Dr. José Torres Filho (UFERSA)

Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me sustentar, por seu amor e misericórdia. Sem Ele eu não teria conseguido.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia e seu núcleo de professores pela contribuição em minha formação profissional;

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

À minha orientadora Profa. Dra. Ioná Santos Araújo, pela confiança e ensinamentos importantes durante toda essa jornada acadêmica, sou grata pela compreensão, conselhos e por segurar minha mão nos momentos que precisei, pela disponibilidade e prontidão, pela amizade, conselhos e atenção dispensada. Você é inspiração.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa e Prof. Dr. Rui Sales Júnior por toda disposição em ajudar, contribuições que me deram suporte para a execução deste trabalho e por aceitar fazer parte do meu desenvolvimento.

Aos membros da banca, meu agradecimento por contribuírem para o meu desenvolvimento.

Ao laboratório de Biotecnologia Vegetal, meu respeito e gratidão a cada amigo e amiga. Todos são especiais e carrego um pouco de cada um comigo, obrigada por me receberem, me abraçarem e me incentivarem.

Ao Laboratório de Fitopatologia e todos seus integrantes por todo suporte e gentileza para comigo.

À toda minha família, em especial à minha amada filha, Lara Manuella e meu esposo Manoel Rabelo, por tanta dedicação, compreensão, paciência e amor em todos os momentos. Sou grata pelo apoio de todos os dias. Deus é tão generoso comigo, Ele sabia que sem vocês eu não teria conseguido. Vocês são fundamentais na minha vida. Amo vocês!

Aos meus pais que amo e admiro Maria do Carmo (Carminha) e Antonio Washington, por todo amor em forma de dedicação, apoio e incentivo. Pela vibração a cada vitória alcançada e pelas vezes em que chorou comigo. Obrigada pelo colo, pelo amparo, pelas orações e por sempre acreditarem em mim. Vocês são incomparáveis!

As minhas irmãs e irmão, Wany, Willienny, Gabriela e Wesley por fazerem parte da minha vida e, por compreenderem minha ausência nos almoços e reuniões em família. Em especial, quero externar minha gratidão a minha amada mana, Wany, por tanto amor e cuidado para comigo e minha filha. Te amo, mana.

Obrigada à todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização deste trabalho!

RESUMO

Este estudo teve como objetivo obter linhas mutantes de meloeiro visando avaliar características de resistência ao fungo *Macrophomina phaseolina* e identificar o potencial do tratamento com raios gama em causar alterações genéticas e fenotípicas nos acessos de melão da coleção de germoplasma da UFERSA. Para isso, sementes M0 de dois acessos de melão MR1 e C14 foram irradiadas com cinco diferentes doses (0, 100, 200, 300 e 400 Gy) de radiação gama contendo quatro repetições. Cada repetição tinha 25 sementes. O experimento foi dividido em quatro etapas. Na primeira etapa as sementes irradiadas M1 foram semeadas em substrato e areia, na proporção 1:1 e, mensuradas variáveis como potencial de germinação, taxa de germinação e índice de germinação. Na segunda etapa foi realizado o transplante das plantas germinadas para baldes de oito litros contendo substrato e areia, sendo quatro repetições com 15 plantas, cada. Foram avaliadas as variáveis associadas à floração, lâmina foliar e fruto. Foi utilizado o software de análises de imagens IMAGE J para a obtenção dos dados de folha e fruto e, a partir de mudanças morfológicas foram gerados dois dendrograma pelo método WARD. A partir dos frutos gerados por autofecundação, foram obtidas sementes da geração M2. A terceira e quarta etapa do experimento avaliou a resistência da geração M2 a *M. phaseolina* a partir da inoculação pelo palito de dente infestado com o fungo e, a análise que avalia a possível ocorrência de mutação a nível molecular a partir do uso de marcadores ISSR. A irradiação gama influenciou o potencial de germinação. A dose 100 Gy (87 %) foi superior ao controle (78,5%), em contrapartida as doses testadas não geraram efeitos na taxa de germinação, índice de germinação, o que evidencia a baixa sensibilidade dos acessos para as doses testadas. O comportamento diferencial de MR1 e C14 mostrou que o acesso MR1 é mais sensível pelo comportamento germinativo próprio do acesso com médias inferiores para todas as variáveis e na interação obteve os valores mais baixos de potencial de germinação (48%) na dose 400 Gy em relação ao controle (60%). As doses de raios gama influenciaram mudanças na floração dos acessos. A produção de flores femininas sofreu uma redução média de 39,35%, as flores masculinas tiveram um incremento com maior quantidade (39,25) na dose 300 Gy em relação ao controle (19,25). O mesmo comportamento foi observado na quantidade de flores bissexuais (0,25), anômalas (4,38), com até 4 pétalas (1,13) e anteras (3,25) com valores superiores para a dosagem de 300 Gy, e para número de flores com mais de 5 pétalas (0,50), que foi obtida pela dosagem 200 Gy. Os efeitos dos raios gama na frutificação foram evidentes na dose 400 Gy onde se obteve menor quantidade de frutos (10,37). As doses 200 e 300 Gy (26,29 - 29,18) obtiveram uma produção semelhante, enquanto a maior quantidade (32,71) foi obtida pela dose mais baixa 100 Gy. A irradiação gama provocaram variações morfológicas em folhas e frutos evidenciados nos dendrograma gerados. Para o acesso C14 foram formados dois agrupamentos A, com 16 indivíduos e B com três indivíduos. Para o acesso MR1 foram obtidos seis agrupamentos A, B, C, D, E e F, compondo 10, 3, 7, 4, 2 e 7 indivíduos, respectivamente. Na avaliação de resistência a *M. phaseolina*, a partir das notas obtidas, foram identificados fontes de resistência. Dois indivíduos derivados do acesso MR1, variou de suscetível a resistente à inoculação, e um indivíduo derivado do acesso C14 variou de moderadamente resistente a resistente, ambos os indivíduos classificados com nota 1. Usando a análise de Sequências Simples Repetidas Internas o polimorfismo genético de plantas M2 selecionadas foi investigado e observado alterações no DNA. A

amplificação com o marcador ISSR 13 (TriTGT5'CY) sugere mutação para MR1-344 e C14-1111 com padrão de bandas 290pb. As doses de raios gama testadas não geraram danos fisiológicos que afetaram negativamente os processos de germinação. Além disso, mostrou a baixa sensibilidade do acesso C14 e o potencial para ser testadas com doses mais altas. Os resultados mostram a eficiência dos raios gama na geração de variabilidade, permitindo identificar indivíduos promissores para o avanço geracional e materiais com potencial de resistência.

.

Palavras-chave: mutagênese, variabilidade genética, podridão radicular, ISSR, melão.

ABSTRACT

This study aimed to obtain mutant melon lines in order to evaluate characteristics of resistance to the fungus *Macrophomina phaseolina* and to identify the potential of treatment with gamma rays to cause genetic and phenotypic changes in melon accessions from the UFERSA germplasm collection. For this, M0 seeds of two MR1 and C14 melon accessions were irradiated with five different doses (0, 100, 200, 300 and 400 Gy) of gamma radiation containing four replications. Each repetition had 25 seeds. The experiment was divided into four stages. In the first stage, the M1 irradiated seeds were sown in substrate and sand, in a 1:1 ratio, and variables such as germination potential, twinning rate and germination index were measured. In the second stage, the germinated plants were transplanted into eight-liter buckets containing substrate and sand, with four replications with 15 plants each. Variables associated with flowering, leaf blade and fruit were evaluated. The IMAGE J image analysis software was used to obtain leaf and fruit data and, based on morphological changes, two dendrograms were generated using the WARD method. From the fruits generated by self-fertilization, seeds of the M2 generation were obtained. The third and fourth stage of the experiment evaluated the resistance of the M2 generation to *M. phaseolina* from inoculation with a toothpick infested with the fungus, and the analysis that evaluates the possible occurrence of mutation at the molecular level from the use of ISSR markers. Gamma irradiation influenced the germination potential. The 100 Gy dose (87%) was superior to the control (78.5%), on the other hand, the tested doses did not generate effects on the germination rate, germination index, which shows the low sensitivity of the accessions for the tested doses. The differential behavior of MR1 and C14 showed that the accession MR1 is more sensitive due to the germination behavior of the accession with lower averages for all variables and in the interaction it obtained the lowest values of germination potential (48%) at the dose of 400 Gy in relation to the control (60%). The doses of gamma rays influenced changes in accession flowering. The production of female flowers suffered an average reduction of 39.35%, male flowers had an increment with greater quantity (39.25) at the 300 Gy dose compared to the control (19.25). The same behavior was observed in the number of bisexual flowers (0.25), anomalous (4.38), with up to 4 petals (1.13) and anthers (3.25) with higher values for the 300 Gy dosage, and for number of flowers with more than 5 petals (0.50), which was obtained by dosing 200 Gy. The effects of gamma rays on fruiting were evident at the dose of 400 Gy, where the lowest amount of fruit was obtained (10,37). Doses 200 and 300 Gy (26.29 - 29.18) obtained similar production, while the highest amount (32.71) was obtained by the lowest dose 100 Gy. Gamma irradiation provoked morphological variations in leaves and fruits evidenced in the generated dendrograms. For accession C14, two groups A, with 16 individuals and B with three individuals, were formed. For accession MR1, six clusters A, B, C, D, E and F were obtained, comprising 10, 3, 7, 4, 2 and 7 individuals, respectively. In the evaluation of resistance to *M. phaseolina*, based on the scores obtained, sources of resistance were identified. Two individuals derived from the MR1 accession, ranged from susceptible to resistant to inoculation, and one individual derived from the C14 accession, ranged from moderately resistant to resistant, both individuals rated grade 1. Using Internal Repeated Single Sequence analysis the genetic polymorphism of plants Selected M2 was investigated and DNA changes were observed. Amplification with the ISSR 13 marker (TriTGT5'CY) suggests

a mutation for MR1-344 and C14-1111 with a pattern of 290pb bands. The tested doses of gamma rays did not generate physiological damage that negatively affected the germination processes. Furthermore, it showed the low sensitivity of the C14 approach and the potential to be tested with higher doses. The results show the efficiency of gamma rays in generating variability, allowing the identification of promising individuals for generational advancement and materials with resistance potential.

Keywords: mutagenesis, genetic variability, root rot, ISSR, melon.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Acessos da Coleção de germoplasma da UFERSA. **(A)** MR-1 (subespécie *momordica*); **(B)** C-14 (subespécie *agrestis*)..... 25
- Figura 2.** Ensaio para a avaliação de resposta germinativa as diferentes doses de radiação gama; Bandejas alocadas em casa de vegetação, na UFERSA..... 26
- Figura 3.** Ensaio para a condução do experimento; Mudas transplantadas para baldes de oito litros, em casa de vegetação, na UFERSA..... 27
- Figura 4.** **(A)** Plantas de melão em pleno florescimento; **(B)** Amostras de folhas de meloeiro registradas em foto e analisadas no programa ImageJ; **(C)** Frutos de melão coletados para avaliação..... 28
- Figura 5.** **(A)** Efeitos das doses de raios gama no número de flores femininas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores femininas..... 32
- Figura 6.** **(A)** Efeitos dos raios gama no número de flores masculinas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores masculinas..... 32
- Figura 7.** **(A)** Efeitos dos raios gama no número de flores bissexuais; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores bissexuais..... 33
- Figura 8.** **(A)** Efeitos dos raios gama no número de flores com anomalias; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores com anomalias..... 33
- Figura 9.** **(A)** Efeitos dos raios gama no número de flores com até 4 pétalas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para o número de flores com até 4 pétalas..... 33
- Figura 10.** **(A)** Efeitos dos raios gama no número de flores com mais de 5 pétalas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores com mais de 5 pétalas.. 34
- Figura 11.** **(A)** Efeitos dos raios gama no número de anteras; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de anteras..... 34
- Figura 12.** Alterações na morfologia floral dos acessos C14 e MR1 intensificada pelo uso de diferentes doses de raios gama..... 35
- Figura 13.** Efeitos dos raios gama no número de frutos para os acessos MR1 e C14..36
- Figura 14.** Efeitos dos raios gama na lâmina foliar dos acessos MR1 e C14..... 38
- Figura 15.** Efeitos dos raios gama no comprimento da lâmina foliar dos acessos MR1 e C14..... 39
- Figura 16.** Efeitos dos raios gama na largura da lâmina foliar dos acessos MR1 e C14..... 39

Figura 17. Dendrograma de agrupamento de linhas M1 com base nos dados quantitativos de folhas e frutos do acesso C14 irradiado com diferentes doses de raios gama; pelo Método de WARD, com distância Euclidiana..... 40

Figura 18. Dendrograma de agrupamento de linhas M1 com base nos dados quantitativos de folhas e frutos do acesso MR1 irradiado com diferentes doses de raios gama; pelo Método de WARD, com distância Euclidiana..... 41

CAPÍTULO III

Figura 1. (A) semeadura linhas M2 em bandejas; (B) momento do transplante; (C) Mudanças transplantadas para sacos de um litro.....48

Figura 2. (A) Isolado de *M. phaseolina*; (B) preparo do inóculo: transferindo discos contendo micélios e microescleródios do fungo para as placas com os palitos..... 51

Figura 3. Palito infestado de micélios e microescleródios do isolado inserido no hipocótilo da planta..... 52

Figura 4. Planta com sintomas e reisolamento dos fungos inoculados para completar os postulados de Koch..... 52

Figura 5. Severidade em dois acessos de melão inoculados com *M. phaseolina* e submetidos a quatro doses de raios gama. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidades..... 56

Figura 6. Severidade em linhas (derivadas do acessos de meloeiro MR1 submetidos a doses de Raios gama) inoculados com *M. phaseolina*..... 57

Figura 7. Mortalidade em linhas (derivadas do acessos de meloeiro MR1 submetidos a doses de raios gama) inoculados com *M. phaseolina*..... 58

Figura 8. Severidade em linhas (derivadas do acessos de meloeiro C14 submetidos a doses de raios gama) inoculados com *M. phaseolina*..... 59

Figura 9. Taxa de mortalidade de linhas (derivadas do acessos de meloeiro C14 submetidos a doses de raios gama) inoculados com *M. phaseolina*..... 60

Figura 10. Amplificação do padrão de DNA usando ISSR; Alteração no padrão de banda da linha MR1-344 (A) e alteração no padrão de banda da linha C14-1111 (B).. 60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Efeitos dos raios gama na germinação e sobrevivência dos acessos MR1 e C14 de melão.....	21
---	----

Tabela 2. Efeitos dos raios gama na germinação e sobrevivência dos acessos MR1 e C14 de melão.....	29
---	----

Tabela 3. Efeitos dos raios gama nas variáveis associadas aos frutos MR1 e C14 de melão.....	37
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Origem e identificação das linhas mutantes M2 de melão.....	49
--	----

Tabela 2. Lista de primers Repetição Inter-Simples de Sequência (ISSR).....	55
--	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO II.....	22
RESPOSTA DE ACESSOS DE MELOEIRO A DOSES DE RAIOS GAMA Co⁶⁰ E SEUS EFEITOS NA MORFOLOGIA DA GERAÇÃO M1	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. LOCAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
2.2. MATERIAL VEGETAL	25
2.3. IRRADIAÇÃO GAMA	26
2.4. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	26
2.4.1. Germinação de sementes.....	26
2.4.2. Características morfológicas	27
2.4.3. Análises estatísticas	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. EFEITOS NA GERMINAÇÃO.....	29
3.2. EFEITOS NA FLORAÇÃO	Erro! Indicador não definido.
3.3. EFEITOS NOS FRUTOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.4. EFEITOS NA LÂMINA FOLIAR	Erro! Indicador não definido.
3.5. DIVERSIDADE FENOTÍPICA	39
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
5. REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO III.....	44
ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A PODRIDÃO RADICULAR E MUTAÇÕES NO DNA EM ACESSOS DE MELOEIRO TRATADOS COM RAIOS GAMA	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS	47

2.1.	LOCAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
2.2.	MATERIAL VEGETAL.....	47
2.3.	MATERIAL FÚNGICO.....	49
2.3.1.	Preparo do inóculo	49
2.4.	INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES DE RESISTÊNCIA.....	50
2.5.	ANÁLISE DE POLIMORFISMO GENÉTICO DE PLANTAS M2.....	52
2.5.1.	Extração de DNA genômico.....	52
2.5.2.	Avaliação de mutação com marcadores ISSR.....	53
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1.	RESPOSTA DAS LINHAS M2 A INOCULAÇÃO COM <i>M. phaseolina</i>	55
3.2.	ANÁLISE MOLECULAR COM ISSR.....	59
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
5.	REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família Cucurbitaceae. É uma espécie olerícola de grande importância, sendo cultivada em diversas regiões do mundo, devido a sua ampla adaptabilidade (KESH & KAUSHIK, et al, 2021). A espécie está entre as hortaliças mais produzidas no mundo, apresentando grande desenvolvimento nas últimas décadas (FAO, 2021).

O Brasil exportou melão para diversos países. Em 2019 foram mais de 251 mil toneladas (BRASIL, 2020). No primeiro trimestre de 2020, o melão liderou as exportações de frutas brasileiras, com mais de 75 mil toneladas enviadas, gerando renda de quase US\$ 44 milhões (ABRAFRUTAS, 2020). O agronegócio do melão está centralizado no semiárido da região nordeste brasileira, que tem respondido por mais de 95% da produção nacional (SILVA et al, 2024; IBGE, 2022). Os estados do Rio Grande do Norte e Ceará se destacam na participação das exportações dessa espécie alcançando 80% no total brasileiro (HORTIFRUT BRASIL, 2021), com destaque para seus agropólos concentrados em Mossoró/Assu-RN, Baixo Jaguaribe-CE (IBGE, 2022) e Chapada do Apodi (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2017).

A expressividade dessa cultura na região Nordeste e a constante ampliação de áreas de produção em virtude das boas condições edafoclimáticas existentes (SALES JR. et al., 2020; CAVALCANTI et al, 2015), os cultivos sucessivos e a monocultura, favorecem o aumento da população de patógenos habitantes do solo (NASCIMENTO et al., 2018; NASCIMENTO, 2015).

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid tem sido isolado de raízes de meloeiro e de plantas daninhas em áreas de cultivo de melão no Nordeste do Brasil. Foi relatada no meloeiro como agente causal da podridão das raízes e declínio das ramas (SALES JÚNIOR et al., 2012). Trata-se de um fungo mitospórico, pertencente ao filo Ascomycota e classe Ascomycetes. Produz micélio uninucleado, picnídios marrom-escuros, solitários ou agregados, com 100 a 200 µm de diâmetro. A principal fonte de inóculo do fungo são os microescleródios (ALMEIDA et al., 2014), estruturas responsáveis pela fase saprófita do patógeno (KAUR et al., 2012). O fungo persiste no solo em restos

vegetais por 3 a 12 anos (SHARMA, KATOCH & RANA, 2016), dependendo das condições ambientais e, se estiverem ou não associados a tecidos do hospedeiro.

O ataque desse patógeno ao sistema radicular compromete o desenvolvimento das plantas, que apresentam amarelecimento nas folhas mais velhas e murcham devido à deficiência na absorção de água e nutrientes. Plantas no desenvolvimento inicial, por oferecerem menor resistência, morrem rapidamente. Enquanto, plantas desenvolvidas quando atacadas, apresentam produtividade reduzida, podendo ou não morrer. (SOBRINHO et al., 2008; BEDENDO, 2018). Os prejuízos causados por doenças a cultura do meloeiro são inúmeros já que não há tempo suficiente para recuperação da planta, por se tratar de uma cultura de ciclo curto (SALES JÚNIOR, 1999).

No Brasil, não existem fungicidas registrados para este patógeno em meloeiro. Logo, uma alternativa viável para o controle da podridão radicular é a utilização de variedades resistentes, por ser um método econômico, ambientalmente correto e de fácil adoção pelo produtor, além do uso de porta enxerto resistente (LINHARES, 2018).

Duas variedades crioulas de melão no Irã, “Sfidak bekhat” e “Sfidak khatdar”, foram identificadas por Salari et al. (2012) como moderadamente resistentes (MR) a *M. phaseolina*. Ambrósio et al. (2015) relataram sete acessos altamente resistentes a *M. phaseolina* (Ag-15591Ghana, DudCUM296Georg, Ag-C38Nig, Can-NYIsr, Con-Pat81Ko, Dud-QPMAfg e AcTGR1551Zimb), em estudo realizado em Valência na Espanha. Entretanto, apenas um destes acessos (Ag-15591Ghana) avaliados por Ambrósio et al. (2015) mostrou-se moderadamente resistente nas condições do Nordeste brasileiro (LINHARES, 2018).

Materiais com resistência têm sido encontrados em linhagens de melão, tais como MR-1 por possuir dois genes de efeitos complementares denominados Pc-1 e Pc-2 que conferem resistência a *Pseudoperonospora cubensis* (ALBUQUERQUE, 2014). No entanto, MR-1 é suscetível a *M. phaseolina*.

O desenvolvimento de materiais melhorados geneticamente com características de resistência torna-se uma das principais alternativas para o controle de doenças, como o aumento da incidência e severidade de doenças radiculares em regiões produtoras de melão (PORTO, 2015).

No intuito de atender as demandas do mercado agrícola, técnicas de melhoramento genético por mutação, mediante agentes mutagênicos, visando expandir a variabilidade genética das espécies cultivadas e o desenvolvimento de variedades com características agronômicas de interesse como: tolerância a condições de estresse, precocidade, resistência às doenças, maior capacidade de rendimento e qualidade (RAINA et al., 2022; RIVIELLO-FLORES et al., 2022; DUTTA et al., 2021; CHEN et al., 2018; XIONG et al., 2015; GOMEZ et al., 2010). Os mutagênicos físicos (raios X; raios gama, luz ultravioleta; partículas alfa e beta, nêutrons rápidos e térmicos) são usados mais amplamente para induzir artificialmente as mutações (BEYAZ & YILDIZ, 2017; HUSSAIN, 2015).

A radiação gama é considerada um dos principais indutores de mutação, com a finalidade de esterilizar (REID, 1995) ou de modificar o material (SINTZEL et al., 1997), considerando os aspectos da interação com a matéria e alterações na estrutura cromossômica (COIMBRA et al., 2004; PIMENTEL, 1990). As radiações gama possuem menor comprimento de onda e maior energia entre todas as ondas do espectro eletromagnético (DONYA et al., 2014), podendo gerar radicais livres que podem reagir com diferentes átomos e moléculas dentro da célula (KOVACS E KERESZTES, 2002). Os radicais livres, por sua vez, podem danificar ou modificar vários componentes das células vegetais, afetando a morfologia, anatomia, bioquímica e fisiologia das plantas de acordo com a intensidade da radiação (KIM et al., 2005).

Segundo Hasanain et al. (2014), a radiação ionizante possui algumas vantagens como alto poder de penetração no material, caráter isotérmico; não deixa resíduos no produto irradiado (SANDLE, 2013); é precisa em dosimetria, e pode ser realizada em várias fases de desenvolvimento da planta (KIM et al., 2009). Em geral, a sensibilidade das sementes tratadas é avaliada pelos efeitos dos agentes mutagênicos sobre o percentual de germinação, desenvolvimento das plantas e sobrevivência com o incremento das doses utilizadas (HAZRA et al., 2021; PAUL-ERNEST et al., 2020; VELKOV et al., 2016).

Altas exposições a raios gama podem causar danos nas sementes, afetando negativamente a germinação (KIM et al., 2021; MARCU et al., 2013) e geralmente apresentam efeitos inibitórios (THAPA, 1999). Kuzin et al. (1976), verificaram aumento da percentagem de germinação em doses mais elevadas e considera ser devido aos efeitos estimulantes sobre a ativação da síntese do RNA,

ou sobre a síntese proteica. A utilidade deste método foi observada em várias culturas (arroz, feijão, soja, melancia, quiabo) (HAZRA et al., 2021; PAUL-ERNEST et al., 2020); onde mutantes induzidos foram liberados como novas variedades (KHAN E TYAGI, 2013).

Com os avanços da genética e da biologia molecular combinações de técnicas de mutagênese associadas às técnicas de marcadores moleculares tem se apresentado como uma ferramenta científica bastante útil e promissora para a identificação de mutantes com potencial para o uso no melhoramento genético de cultivares já existente e na obtenção de novos genótipos.

Os marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), como marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), têm sido amplamente utilizados para a caracterização genética de plantas e detectar as diferenças entre mutantes e seus pais em diferentes espécies mutantes (DEH SHEIKH & MORADNEJAD, 2014; PESTANA et al., 2011).

ISSR é baseado nos marcadores SSR (Simple Sequence Repeats), conhecidos como microssatélites, usa primers únicos baseados em 16 a 18 pb desenhados com base em sequências repetidas dos microssatélites na extremidade 5', acrescentando-se alguns nucleotídeos na extremidade 3'. Assim, os primers anelam-se dentro das repetições para amplificar as regiões genômicas entre os microssatélites e analisar o polimorfismo dos produtos amplificados (CHEN et al., 2020; FALEIRO, 2007; GUIMARÃES et al. 2009).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos avaliar a resposta germinativa de sementes de dois acessos de melão, MR1 e C14, irradiadas com diferentes doses de raios gama, a partir dos efeitos sobre algumas das principais características na morfologia selecionar presumíveis mutantes da geração M2 e avaliá-los quanto à reação de resistência à podridão radicular e identificar possíveis alterações no DNA através dos marcadores ISSR.

2. REFERÊNCIAS

ABRAFRUTAS – Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados. Clipping: **Melão**: exportação mostra potencial do agronegócio do Ceará. 2020. Disponível em: <https://abrafrutas.org/2020/09/melao-exportacao-mostra-potencial-do-agronegocio-do-ceara/>

ALBUQUERQUE, L. B. **Reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* e identificação de Quantitative Trait Loci de resistência do meloeiro ao míldio**. Dissertação. Brasil. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2014.

ALMEIDA, A.M.R. et al., (2014) *M. phaseolina* em soja. Londrina: **Embrapa Soja**, 2014. 55 p.

AMBRÓSIO, M.M.Q. et al. Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *M. phaseolina*. **Euphytica**, Holanda, v. 206, n. 2, p. 287- 300, 2015.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2017 / CARVALHO, C. et. al. – Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017.88p. Disponível em: http://www.editoragazeta.com.br/wp-content/uploads/2017/03/PDF-Fruticultura_2017.pdf

BEDENDO, I.P. Damping-off. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. 5ª ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, p. 573. 2018.

BEYAZ, R. & YILDIZ, M. The use of gamma irradiation in plant mutation breeding. **Plant engineering**, p. 33-46, 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69974>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assuntos-Notícias: Brasil exporta primeira carga de melão para China após acordo bilateral. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-exporta-primeira-carga-de-melao-para-china>

CAVALCANTI, N.M.S.; DUTRA, A.F.; MELO, A.S. Aspectos agronômicos do meloeiro ‘mandacaru’ cultivado em ambiente protegido sob irrigação. **Irriga**, Botucatu, v. 20, n. 2, p. 261-272, abr. 2015.

- CHEN, C. et al. An EMS mutant library for cucumber. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 7, p. 1612-1619, 2018. doi: 10.1016/S2095-3119(17)61765-9
- CHEN, X., et al. Genetic polymorphisms in mutagenesis progeny of *Arabidopsis thaliana* irradiated by carbon-ion beams and γ -rays irradiations. **International Journal of Radiation Biology**, v. 96, n. 2, p. 267-275, 2020.
- COIMBRA, J.L.M. et al. Criação de variabilidade genética no caráter ciclo vegetativo em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p.159-166, 2004.
- DEH SHEIKH, A. A. & MORADNEJAD, M. Mutagenesis in olive (*Olea europaea* L.) calli caused by sodium azide and detection of mutants using ISSR and RAPD markers. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 153-158, 2014.
- DONYA, M. et al. Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations. **Global cardiology science & practice**, v. 2014, n. 4, p. 437–48, 2014.
- DUTTA, S. et al. Applied mutagenesis could improve economically important traits in bitter melon (*Momordica charantia* L.). **Journal of genetics**, v. 100, n. 2, p. 43, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12041-021-01283-5>
- FALEIRO, F. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina –DF: **Embrapa Cerrados**, 102 p, 2007.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Faostat** – Statistics Database. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 17 set. 2021.
- GUIMARÃES, C.T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v.30, n.253, p.24-33, 2009.
- HASANAIN, F. et al. Gamma sterilization of pharmaceuticals - a review of the irradiation of excipients, active pharmaceutical ingredients, and final drug product formulations **PDA journal of pharmaceutical science and technology**., v. 68, n. 2, p. 113–137, 2014.
- HAZRA, S. et al. Optimization of gamma radiation dose for induction of mutations in okra. **International Journal of Vegetable Science**, v. 27, n. 6, p. 574-584, 2021. <https://doi.org/10.1080/19315260.2021.1894626>
- HORTIFRUT BRASIL**: anuário 2021-2022. Piracicaba: USP, dez/2021. ISSN 1981-1837. Edição especial. Disponível em:

<https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2021-perspectiva-2022.aspx>. Acesso em: 9 fev. 2023.

HUSSAIN, B. Modernization in plant breeding approaches for improving biotic stress resistance in crop plants. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 39, p. 515-530, 2015.

KAUR, S. et al. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Mycobiology**, v.38, n. 2, p.136-151, 2012.

KESH, H. & KAUSHIK, P. Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. **Scientia Horticulturae**, v. 282, p. 110045, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110045>

KHAN, M.H. & TYAGI, S.D. A review on induced mutagenesis in soybean. **Journal of Cereals and Oilseeds**, vol. 4(2), págs. 19-25. 2013. <http://dx.doi.org/10.5897/JCO10.004>

KIM, Jin-Hong, et al. Characterization of metabolic disturbances closely linked to the delayed senescence of *Arabidopsis* leaves after γ irradiation. **Environmental and experimental botany**, 67.2: 363-371, 2009.

KIM, Jin-Hong, et al. Effects of γ irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. **Journal of Plant Biology**, 2005, 48.1: 47-56.

KIM, S. H. et al. Suggested doses of proton ions and gamma-rays for mutation induction in 20 plant species. **International Journal of Radiation Biology**, v. 97, n. 11, p. 1624-1629, 2021. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1969053>

KOVACS, E. & KERESZTES, A. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. **Micron**. v.33, n. 2, p. 199-210, 2002.

KUZIN, A. M.; VAGABOVA, M. E.; REVIN, A. F. Molecular mechanisms of the stimulating action of ionizing radiation on seeds. 2. Activation of protein and high molecular RNA synthesis. **Radiobiologiya**, v.16, p.259-261, 1976.

LINHARES, C.M.S. **Reação de acessos e herança da resistência a *M. phaseolina* e efeito da temperatura na podridão cinzenta em meloeiro**. Tese de Doutorado. Brasil. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2018.

MARCU, D. et al. Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). **Journal of Biological Physics**, v.39, p.625-634, 2013.

NASCIMENTO, P.G.M.L. **Comunidade microbiana do solo e podridão radicular em meloeiro em diferentes sistemas de manejo**. 2015. 76f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, 2015.

NASCIMENTO, P.M.L. et al. Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. **European Journal of Plant Pathology**, Holanda, v. 152, n. 2, p. 433- 33 446, 2018. Disponível em: Acesso em: 10 set. 2021.

PAUL ERNEST, F. et al. Radiosensitivity of two varieties of watermelon (*Citrullus lanatus*) to different doses of gamma irradiation. **Brazilian Journal of Botany**, v. 43, p. 897-905, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00659-8>

PESTANA, R.K.N. et al. Genetic dissimilarity of putative gamma-ray-induced ‘Preciosa-AAAB-Pome type’ banana (*Musa* sp) mutants based on multivariate statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*, 10, 3976–3986. 2011. <http://dx.doi.org/10.4238/2011.October.25.2>

PIMENTEL, M.C.G. **Indução de aberrações cromossômicas estruturais em milho (*Zea mays* L.) por radiação gama** Viçosa, 1990. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - UFV, 1990.

PORTO, M.A.F. **Associação de *Fusarium solani*, *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani* causando podridão radicular em meloeiro sob efeito de adubos verdes**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, 2015.

RAINA, A. et al. Gamma rays and sodium azide induced genetic variability in high-yielding and biofortified mutant lines in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Frontiers in plant science**, v. 13, 2022.

REID, B.D. Gamma processing technology: an alternative technology for terminal sterilization of parenterals. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 49, n. 2, p. 83–89, 1995.

RIVIELLO-FLORES, M.D.L.L. et al. Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1161, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11091161>

SALARI, M.; PANJEHKEH, N.; NASIRPOOR, Z.; ABKHOO, J. Reaction of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars to soil-borne plant pathogenic fungi in Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 87, p. 15324-15329, 2012.

SALES JR, R. et al. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012.

SALES JR., R. **Secuencia del ataque de patógenos fúngicos a raís de mélon. Histopatología de la infección por Acremonium cucurbitacearum** Alfaro-Gracia, W. Gams et J. Garcia-Jiménez. Tese de Doutorado. Espanha. Universidad Politécnica de Valencia. 1999.

SALES JÚNIOR, R. et al. Weeds as potential hosts for fungal root pathogens of watermelon1 . **Revista Caatinga**, v.32, n.1, p.1-6, 2020.

SANDLE, T. Gamma radiation. In: Sterility, **Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals**. 1. ed. Phyladelphia: Elsevier, p. 55–68. 2013.

SHARMA, A.; KATOCH, V. & RANA, C. Important diseases of cucurbitaceous crops and their management. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of cucurbits: Growth, cultural practices, and physiology**. CRC Press, 2016. p. 574.

SILVA, J.E.S.B. et al. Tratamentos pré-germinativos de sementes de melão para produção de mudas irrigadas com água biossalina. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 84, p.1-10, 2024.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.257314>

SINTZEL, M.B. et al. Influence of Irradiation Sterilization on Polymers Used as Drug Carriers—A Review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 9, p. 857–878, 1997.

SOBRINHO, R.B. et al. Produção integrada de melão. Fortaleza: **EMBRAPA**, 2008.

THAPA, C.B. Effect of acute exposure of gamma rays on seed germination of Pinus kesiyaGord and P. wallichiana A.B. Jacks. **Botanica Orientalis Journal of Plant Science**, p. 120-121, 1999.

VELKOV, N., TOMLEKOVA, N., & SARSU, F. Sensitivity of watermelon variety Bojura to mutant agents 60Co and EMS. **Journal of BioScience & Biotechnology**, v. 5, n. 1, 2016.

CAPÍTULO II

RESPOSTA DE ACESSOS DE MELOEIRO A DOSES DE RAIOS GAMA Co⁶⁰ E SEUS EFEITOS NA MORFOLOGIA DA GERAÇÃO M1

Este estudo teve como objetivo verificar a resposta de dois acessos de melão MR1 e C14 da coleção de germoplasma da Universidade Federal Rural do Semi-Árido à radiação gama na germinação e morfologia. Sementes de dois acessos de melão (C14 e MR1) foram submetidas a cinco doses de radiação gama (0, 100, 200, 300, 400 Gy) com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 25 sementes, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Essas sementes foram cultivadas em casa de vegetação, na UFERSA, seguindo um delineamento inteiramente casualizado. Potencial, taxa e índice de germinação foram avaliados, na primeira etapa do ensaio. Na segunda etapa foi realizado o transplante das plantas germinadas para baldes de oito litros contendo substrato e areia, sendo quatro repetições com 15 plantas, cada. Inflorescência, lâmina foliar e fruto foram avaliados. Foi utilizado o software de análises de imagens IMAGE J para a obtenção dos dados de folha e fruto e, a partir das variações morfológicas foram gerados dois dendrograma pelo método WARD. O potencial de germinação apresentou variação para as doses de raios gama testada, a taxa e índice de germinação não foram afetados. Maior número de flores com anomalias foram obtidas em tratamentos irradiados. Variações fenotípicas para folhas e frutos foram observadas e a distância entre os dois grupos com 16 (A) e 3 (B) indivíduos formados para o acesso C14 foi de 0,4240. Para o MR1, a distância entre os seis grupos formados com 10 (A), 3 (B), 7 (C), 4(D), 2 (E) e 7 (F) indivíduos foi de 0,06815. As doses de raios gama não afetaram os processos de germinação. O acesso C14 mostrou baixa sensibilidade às dosagens aplicadas. Os dendrograma permitiram identificar a diversidade gerada com o uso de radiação gama.

Palavras-chave: irradiação, variabilidade genética, mutação, fenótipos.

1. INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família Cucurbitaceae e é uma cultura olerícola cultivada em diversas regiões do mundo, devido a sua ampla adaptabilidade (KESH & KAUSHIK, et al, 2021). A cultura do meloeiro apresenta maior expressividade socioeconômica na região Nordeste do Brasil, centralizado no semiárido. O agronegócio do melão tem respondido por mais de 90% da produção nacional (SILVA et al, 2024). Os estados do Rio Grande do Norte e Ceará se destacam na participação das exportações dessa espécie alcançando 80% do total brasileiro (HORTIFRUT BRASIL, 2021).

No intuito de atender as demandas do mercado agrícola, técnicas de melhoramento genético têm se mostrado uma importante alternativa na obtenção de novos genótipos resistentes a estresses bióticos e abióticos, a partir de mutagêneses. As mutações genéticas são mecanismos importantes para a evolução de uma espécie, e da estabilidade do seu genoma. Tulmann Neto et al. (1995) e Paul Ernest et al. (2020) sugerem a técnica de mutações induzidas como alternativa promissora para o melhoramento, a qual tem contribuído de forma significativa com a criação e incorporação de novos genes de interesse agronômico.

A radiação gama é considerada um dos principais indutores de mutação, que provocam alterações em vários níveis nas plantas. O raio gama é uma onda eletromagnética que estimula respostas biológicas, podendo afetar desde o DNA até as organelas citoplasmáticas, modificando o fenótipo das plantas. O efeito biológico dos raios gama baseia-se na interação com átomos ou moléculas da célula, para produzir radicais livres (KOVA´CS & KERESZTES, 2002). Esses radicais podem danificar ou modificar componentes importantes das células vegetais e têm sido relatados como afetando diferencialmente a morfologia, anatomia, bioquímica e fisiologia das plantas, dependendo da dose de radiação (ASHRAF et al., 2004).

O efeito da radiação gama na produção agrícola tem sido relatado por pesquisadores de todo o mundo. Em geral, avalia-se inicialmente a sensibilidade das sementes aos efeitos dos agentes mutagênicos sobre a percentagem de germinação, desenvolvimento das plantas e sobrevivência (HAZRA et al., 2021; PAUL-ERNEST et al., 2020; VELKOV et al., 2016). A letalidade e a fertilidade

na geração M_1 devem ser consideradas quando se busca a frequência de mutação devido à dose de irradiação, pois a progênie M_2 deve ser gerada por reprodução em estudos de criação de mutações (JO & KIM, 2019).

Borzouei et. al. (2010), estudaram os efeitos da radiação gama na germinação e nas características fisiológicas de mudas de trigo utilizando doses de 100, 200, 300 e 400 Gy. Eles constataram que diferentes doses de radiação gama têm diferentes efeitos nas características bioquímicas das plantas, como aumento do teor de prolina e clorofila, estimulam a germinação e crescimento das mudas.

Beyaz et al. (2020) avaliando o impacto do pré-tratamento com irradiação gama no crescimento de ervilhaca relataram resultados positivos para germinação e desenvolvimento das mudas. Paul Ernest et al. (2020) avaliaram a sensibilidade de duas variedades de melancia (Kaolack e Crimson) a diferentes doses de radiação gama (100, 200, 300, 400 e 600 Gy) e para os parâmetros avaliados como a taxa de germinação, a taxa de sobrevivência e o comprimento da parte aérea das plantas, os valores diminuíram com o aumento da dose de irradiação.

Portanto, a resposta expressa depende da dose de radiação, que pode condicionar a ganhos ou perdas de características desejáveis. Embora a geração de novas variedades por radiação gama seja aleatória, elas podem ser identificadas e selecionadas em pouco tempo, acelerando o processo de estabelecimento e liberação (RIVIELLO-FLORES, 2022).

Considerando os efeitos da radiação gama nas plantas, o presente estudo foi conduzido para avaliar a resposta germinativa de sementes de dois acessos de melão, MR1 e C14, irradiadas com diferentes doses de raios gama e seus efeitos sobre algumas das principais características na morfologia de suas plantas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. LOCAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os acessos foram irradiados no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) e, os estudos conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Ciências Agronômicas e Florestais (DCAF), na Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), em Mossoró, Rio Grande do Norte.

O município de Mossoró está situado na latitude Sul 5° 12'48''; longitude 37° 18'44'' W e com altitude de 37 m acima do nível do mar. De acordo com a classificação de Köppen, o clima de Mossoró é do tipo BSw^h, ou seja, quente e seco com estação chuvosa no verão, atrasando-se para o outono (CARMO FILHO & OLIVEIRA, 1995). A temperatura média no local foi de 31 °C a 33 °C e a umidade relativa do ar entre 52,6 % e 53,9 %.

O delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi adotado em esquema fatorial. O primeiro fator consistiu das cinco doses de radiação gama: 0, 100, 200, 300 e 400 Gy e, o segundo fator consistiu na utilização de dois acessos de meloeiro C14 e MR1, com quatro repetições, as quais deram origem às plantas do ciclo M1.

Para isso, sementes M0 de dois acessos de melão foram irradiadas com cinco diferentes doses de radiação gama contendo quatro repetições. Para a avaliação de resposta germinativa cada repetição tinha 25 sementes, totalizando 100 sementes para cada tratamento de irradiação e acesso. Para a avaliação na morfologia das plantas do ciclo M1, cada repetição era composta por 15 plantas, totalizando 60 plantas para cada tratamento de irradiação e acesso.

2.2. MATERIAL VEGETAL

Sementes de dois acessos de melão pertencentes à Coleção Ativa de Germoplasma da UFERSA, acesso MR-1 (subespécie *momordica*) e acesso C-14 (subespécie *agrestis*) (Figura 1), foram utilizados nesse estudo.

A linhagem MR-1 é do tipo *momordica*, seus frutos são oblongos ou achatados. Possui coloração de casca amarela com nervuras verde-escura e polpa creme (Figura 1 A) (ALBUQUERQUE, 2014).

O Ag-15591Ghana, denominado C14, é um melão silvestre, originário de Gana e pertence ao grupo *agrestis*. Possuem frutos pequenos, ovalados, com listras verdes escuras e baixo teor de sólidos solúveis (< 5 °Brix) (Figura 1 B) (LINHARES, 2018).

Os acessos C14 e MR-1 não possuem valor comercial para a fruticultura nordestina, no entanto, são fontes de resistência a *M. phaseolina* e *P. cubensis*, respectivamente.

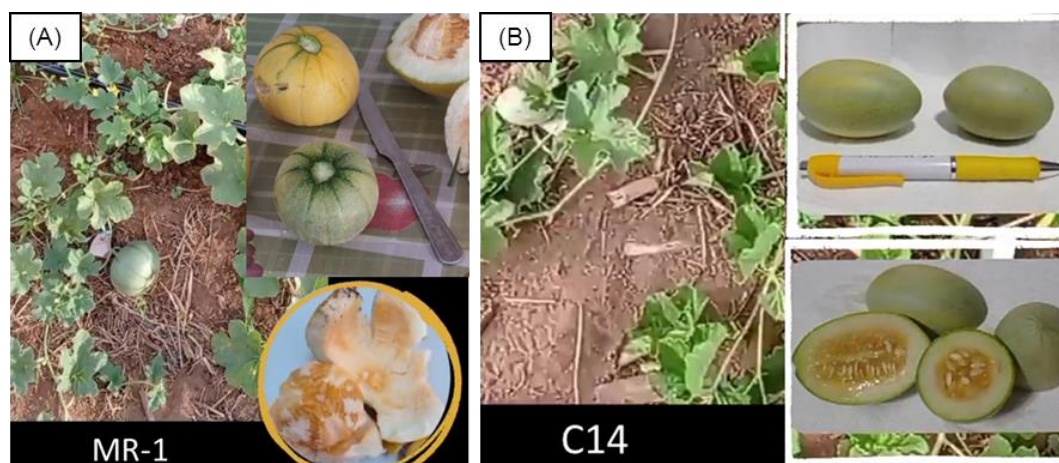


Figura 1. Acessos da Coleção de germoplasma da UFERSA. **(A)** MR-1 (subespécie *momordica*); **(B)** C-14 (subespécie *agrestis*).

2.3. IRRADIAÇÃO GAMA

Foram enviadas sementes de acessos de melão para o CENA/USP, em Piracicaba/SP e, com base na literatura disponível, as sementes foram irradiadas a cinco níveis (0, 100, 200, 300 e 400 Gy) de radiação provenientes de Cobalto-60 (^{60}Co), a partir de um irradiador do tipo Gammacell-220.

2.4. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

2.4.1. Germinação de sementes

As sementes depois de irradiadas foram semeadas em bandejas de 50 células, preenchidas com substrato comercial e areia lavada na proporção 1:1 (uma parte de solo e uma de substrato) esterilizada em autoclave (2 horas a 120 °C por dois dias consecutivos, com intervalo de 24 horas entre cada esterilização) umedecida com água a 60% da capacidade de retenção (BRASIL, 2009). As bandejas foram alocadas em casa de vegetação realizadas regas diárias a fim de manter as condições adequadas para a germinação. Contabilizou-se o número diário de plântulas normais emergidas (cotilédones formando um ângulo de 90°), até o 15° dia após a semeadura (Figura 2).

O número de sementes germinadas foi registrado durante 15 dias. Foram mensuradas: potencial de germinação, taxa de germinação e índice de germinação, onde:

Potencial de germinação (%) = (Número de sementes germinadas no 5º dia/número total de sementes) x 100%

Taxa de germinação (%) = (Número de sementes germinadas no 15º dia/número total de sementes) x 100%

Índice de germinação = $\sum (Gt/Dt)$, onde Gt representa o número de sementes germinadas em um dia t e Dt representa os dias de germinação.



Figura 2. Ensaio para a avaliação de resposta germinativa as diferentes doses de radiação gama; Bandejas alocadas em casa de vegetação, na UFERSA.

2.4.2. Características morfológicas

Do ensaio de germinação, foram selecionadas 15 plantas M1 por tratamento/repetição, sobre as quais foram transplantadas para baldes de 8 litros contendo substrato e areia na proporção 1:1 e conduzidas até obtenção de frutos, totalizando 600 plantas em casa de vegetação (Figura 3 A).

Foram realizados duas coletas de flores para a obtenção dos dados de inflorescência, com intervalo de 25 dias, durante o pleno florescimento (Figura 3 B). Para os dados associados à lâmina foliar, foram destacadas três folhas localizadas na parte basal, mediana e apical do ramo de cada planta, as amostras dispostas em uma mesa e fotografadas (Figura 3 C). Para análise de dados associados aos frutos, foram realizadas coletas de frutos (originados a partir da

polinização manual) e fotografados (Figura 3 D); foi realizada a contagem manual das sementes. As imagens foram analisadas no programa IMAGEJ para a obtenção dos dados.

As variáveis avaliadas associadas à inflorescência foram: número de flores femininas, número de flores masculinas, número de flores bissexuais, número de flores com anomalias, número de flores com até quatro pétalas, número de flores com mais de cinco pétalas e número de anteras.

As variáveis para lâmina foliar foram: comprimento (cm) e largura (cm).

As variáveis avaliadas associadas aos frutos foram: peso (g), largura (cm), comprimento (cm), espessura da polpa (cm), número de sementes e número de frutos.



Figura 3. Ensaio para a condução do experimento; Mudas transplantadas para baldes (A); Plantas de melão em pleno florescimento (B); Amostras de folhas de meloeiro registradas em foto e analisadas no programa ImageJ (C); Frutos de melão coletados para avaliação (D).

A partir dos dados obtidos das variações morfológicas foi construída uma matriz de distância euclidiana e dendrograma pelo método WARD, para cada acesso avaliado.

2.4.3. Análises estatísticas

Os dados foram analisados com auxílio do software estatístico Infoestat, para as análises de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($\alpha = 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EFEITOS NA GERMINAÇÃO

As doses de raios gama afetaram o potencial de germinação. A dose 100 Gy (87 %) foi superior ao controle (78,5%), em contrapartida as doses testadas não geraram efeitos na taxa de germinação, índice de germinação e taxa de mortalidade para os acessos C14 e MR1, o que evidencia a baixa sensibilidade dos acessos para as doses testadas (Tabela 1).

Contudo, para taxa de germinação o melhor para MR1 foi usando a dose 300 Gy, comportamento superior ao controle. As dosagens usadas não geram danos fisiológicos que afetem esse processo. Para o índice de germinação, o nível de dosagem 100 Gy para MR1 foi melhor e para o C14 foi a dosagem de 300 Gy.

Tabela 1. Efeitos dos raios gama na germinação e sobrevivência dos acessos MR1 e C14 de melão.

Dose(Gy)	Testes		
	Potencial de germinação	Taxa de germinação	Índice de germinação
0	78,50 ab	97,00 a	6,45 a
100	87,00 b	98,00 a	8,34 a
200	84,50 ab	98,50 a	7,68 a
300	68,00 a	99,00 a	8,50 a
400	72,50 ab	97,50 a	7,75 a

Genótipo				
MR1	61,00	a	96,00	a
C14	95,20	b	100,00	b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente quando avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Porquanto, Jaipo et al. (2019) avaliaram os efeitos da radiação nos parâmetros de germinação para a cultura do pepino e quiabo; e para a cucurbitácea os melhores valores encontrados no índice de germinação e taxa de germinação foram para aqueles que receberam a dosagem de 50 Gy. A resposta a sensibilidade ocorre de forma diferente entre as espécies.

Quando comparamos o comportamento dos dois acessos de meloeiro, o MR1 se mostrou mais sensível na atividade germinativa com médias inferiores para todas as variáveis e na interação obteve os valores mais baixos de potencial de germinação (48%) na dose 400 Gy em relação ao controle (60%) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos dos raios gama na germinação e sobrevivência dos acessos MR1 e C14 de melão.

Genótipo	Dose (Gy)	Testes		
		Potencial de germinação	Taxa de germinação	Índice de germinação
MR1	0	60,00 abc	94,00 a	4,58 a
MR1	100	77,00 bcd	96,00 a	4,84 a
MR1	200	71,00 abcd	97,00 a	4,62 a
MR1	300	49,00 ab	98,00 a	4,51 a
MR1	400	48,00 a	95,00 a	4,32 a
C14	0	97,00 d	100,00 a	8,33 ab
C14	100	97,00 d	100,00 a	11,84 b
C14	200	98,00 d	100,00 a	10,73 b
C14	300	87,00 cd	100,00 a	12,49 b
C14	400	97,00 d	100,00 a	11,18 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente quando avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Comportamento semelhante descrito por DUTTA et al (2021), avaliando o uso de radiação gama no melhoramento de cabaça amarga (*Momordica charantia* L.), uma cucurbitácea de importância comercial na Índia, observaram que a porcentagem de germinação na geração M1 variou para os quatro genótipos estudados. O genótipo Special Boulder, se mostrou o mais tolerante ao mutagênico, enquanto o Meghna-2 foi o mais suscetível à radiação.

Estudos comparando as respostas de duas variedades de melancia a cinco doses de radiação gama (100, 200, 300, 400 e 600 Gy) apresentaram comportamento significativo para a variedade Kaolack, na dose de 600 Gy, esta variedade obteve a menor taxa de sobrevivência; enquanto que para a variedade Crimson a menor taxa foi observada com a dose 300 Gy (PAUL ERNEST et al., 2020).

3.2. Efeitos na floração

Os dois acessos avaliados apresentaram um comportamento diferenciado na floração, onde as doses de raios gama geraram efeito na floração de ambos os acessos. O acesso MR1 obteve médias superiores para número de flores femininas (3,10) (Figura 4), masculinas (24,60) (Figura 5), bissexuais (0,10) (Figura 6) e flores com até 4 pétalas (0,80) (Figura 7). No entanto, o acesso C14 apresentou médias superiores para número de flores com anomalia (2,75) (Figura 8) e médias semelhantes para flores com mais de 5 pétalas (Figura 9). As doses de raios gama geraram mudanças na floração dos acessos, as flores femininas sofreram uma redução média de 39,35%, as flores masculinas tiveram um incremento com maior quantidade (39,25) na dose 300 Gy em relação ao controle (19,25). O mesmo comportamento foi observado na quantidade de flores bissexuais (0,25), anômalas (4,38), com até 4 pétalas (1,13) e anteras (3,25) com valores superiores para a dosagem de 300 Gy (Figura 10), e para número de flores com mais de 5 pétalas (0,50), que foi obtida pela dosagem 200 Gy.

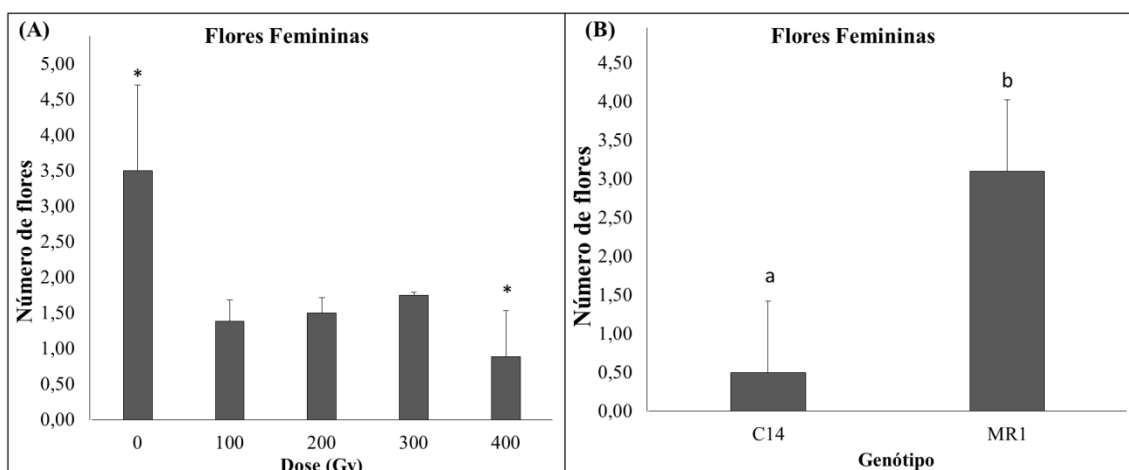


Figura 4. (A) Efeitos das doses de raios gama no número de flores femininas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores femininas.

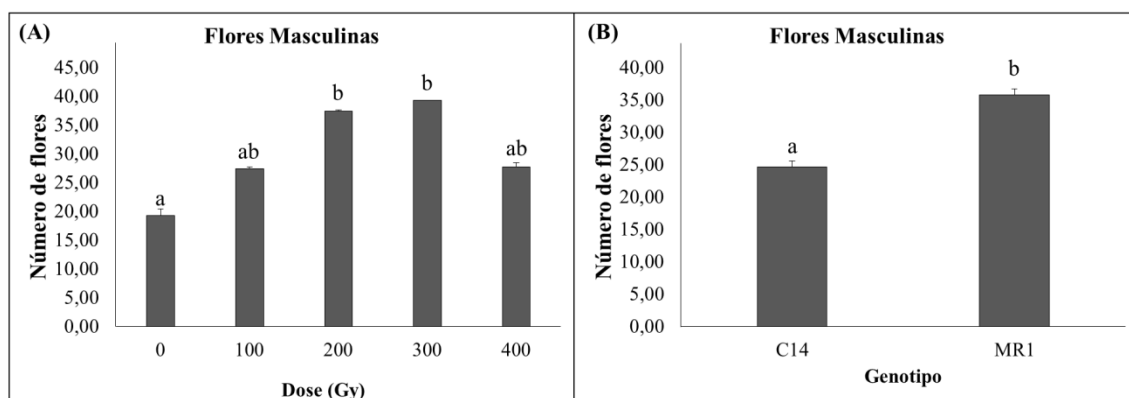


Figura 5. (A) Efeitos dos raios gama no número de flores masculinas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores masculinas.

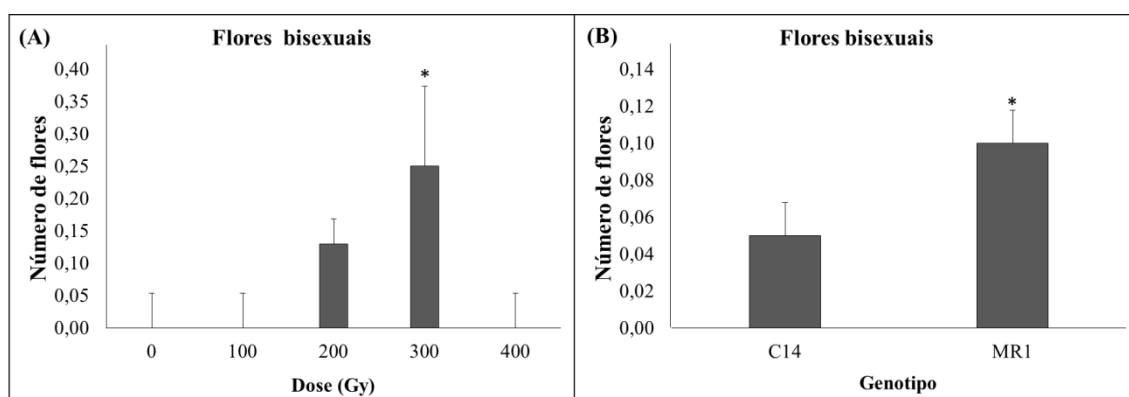


Figura 6. (A) Efeitos dos raios gama no número de flores bissexuais; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores bissexuais.

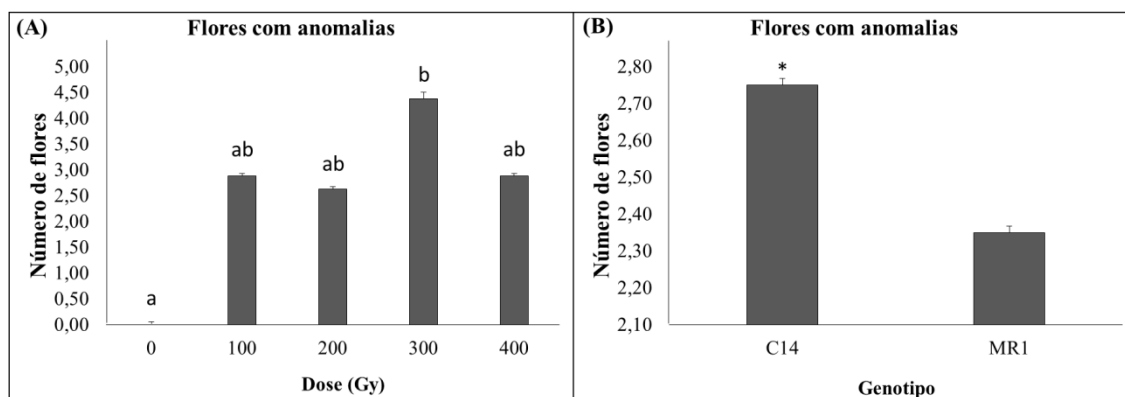


Figura 7. (A) Efeitos dos raios gama no número de flores com anomalias; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores com anomalias.

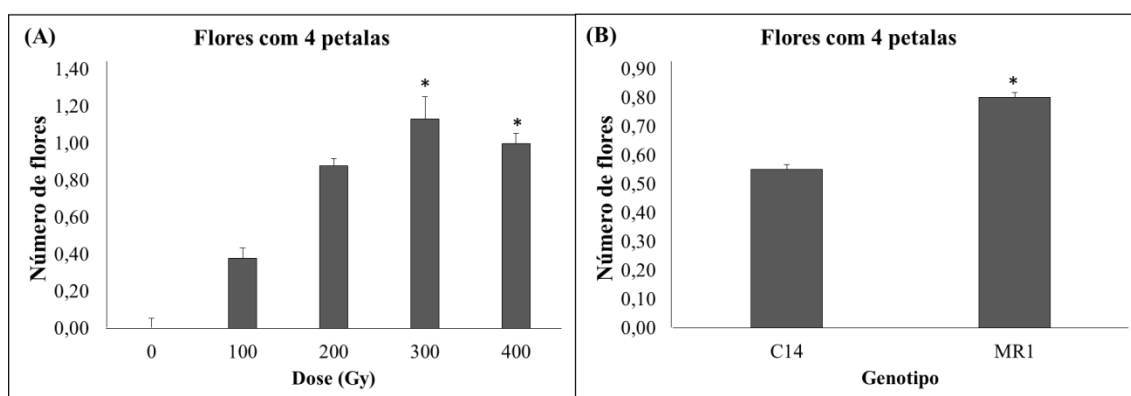


Figura 8. (A) Efeitos dos raios gama no número de flores com até 4 pétalas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para o número de flores com até 4 pétalas.

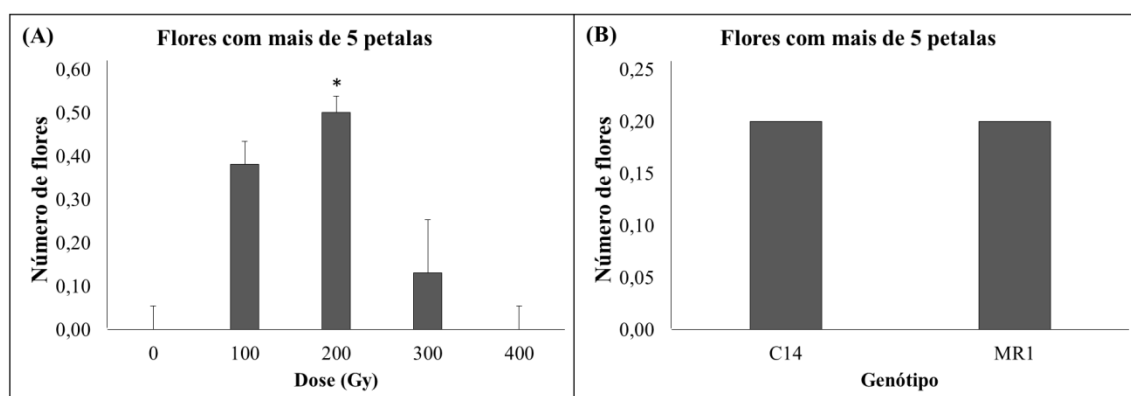


Figura 9. (A) Efeitos dos raios gama no número de flores com mais de 5 pétalas; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de flores com mais de 5 pétalas

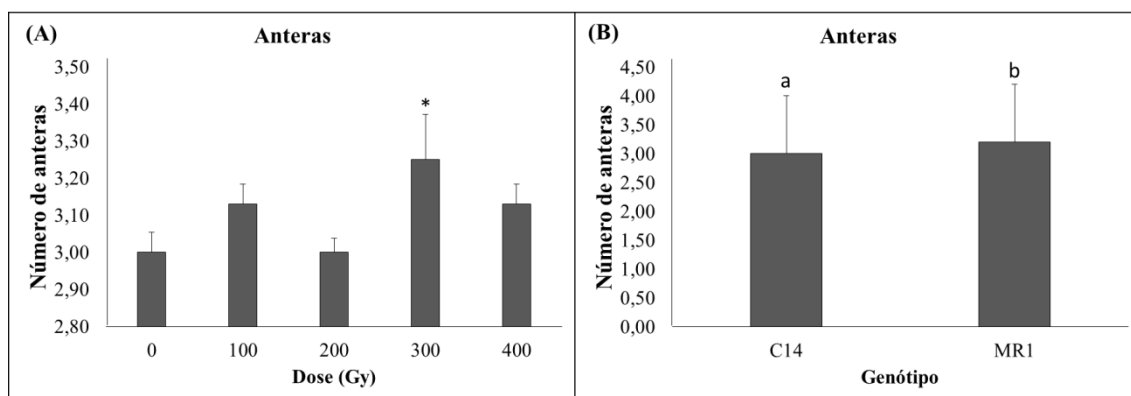


Figura 10. (A) Efeitos dos raios gama no número de anteras; **(B)** Resposta dos genótipos aos raios gama para número de anteras.

Portanto, o uso dos raios gama gerou uma redução na produção de flores femininas, quando comparadas ao controle. Para a geração de flores masculinas houve um incremento nas dosagens de 200 Gy e 300 Gy. No entanto, o acesso MR1 apresentou melhor resposta para esse comportamento.

Para o número de flores bissexuais, a dosagem 300 Gy intensificou a produção. E a maior ocorrência foi observada no acesso MR1.

Para o número de flores com anomalias, quando modificações na estrutura floral foram observadas, os acessos C14 e MR1 que receberam dose de 300 Gy apresentaram um maior incremento. Para essa variável, o acesso C14 apresentou uma maior variação em sua morfologia floral.

Então, em número de flores femininas, masculinas e bissexuais o MR1 pode ter sido influenciado pela radiação gama. Nos tratamentos do acesso C14 irradiados foi observado maior produção de flores com anomalias.

Para o número de flores com até 4 pétalas, o incremento na geração de flores foram em tratamentos que receberam dosagens de 300 Gy e 400 Gy. Sendo observado em maior número no acesso MR1.

Para o número de flores com mais de 5 pétalas foi observado um incremento na produção quando tratados com doses de 200 Gy. E ambos os acessos apresentaram um padrão de comportamento semelhante de produção dessas flores.

Para o número de anteras, foi observado um incremento quando utilizado a dose de 300 Gy e os acessos apresentaram comportamento semelhante para essa variável.

Alterações na morfologia floral utilizando radiação gama foram encontradas em alguns trabalhos com cucurbitáceas. Chen et al. (2018), conduziram uma

pesquisa utilizando o mutagênico etilmetilsulfonato (EMS) em uma linhagem de pepino para obtenção de uma biblioteca mutante e selecionaram as linhagens mutantes a partir de alterações morfológicas na arquitetura da planta, folhas, órgãos florais, frutos e outras características através das gerações M1 , M2 e M3. As mutações observadas nos órgãos florais incluíam tanto a forma da flor quanto a expressão do sexo.

Em nosso estudo foi observado variações na morfologia floral intensificada pelo uso de doses altas de raios gama (Figura 11). Enquanto, Velkov et al. (2016), avaliaram a sensibilidade da variedade de melancia Bojura aos agentes mutagênicos ^{60}Co e EMS e relataram que não houve alterações na estrutura das flores geradas.



Figura 11. Alterações na morfologia floral dos acessos C14 e MR1 intensificada pelo uso de diferentes doses de raios gama.

De acordo com Zhang et al. (2012) e Reddy & Anadurai (1992) plantas estéreis ou presença de alterações na estrutura das flores na descendência mutante é um dos marcadores associados à determinação da eficácia da dose de tratamento.

3.3. Efeitos nos frutos

Em concordância com a produção de flores femininas, o genótipo MR1 apresentou uma maior quantidade de frutos em relação ao C14 (Figura 12). Os efeitos dos raios gama na frutificação foram evidentes onde a dose 400 Gy influenciou no menor número de frutos formados. Nas doses 200 e 300 Gy os genótipos obtiveram uma produção semelhante, enquanto a maior quantidade (32,71) foi obtida quando irradiada com a dose mais baixa 100 Gy.

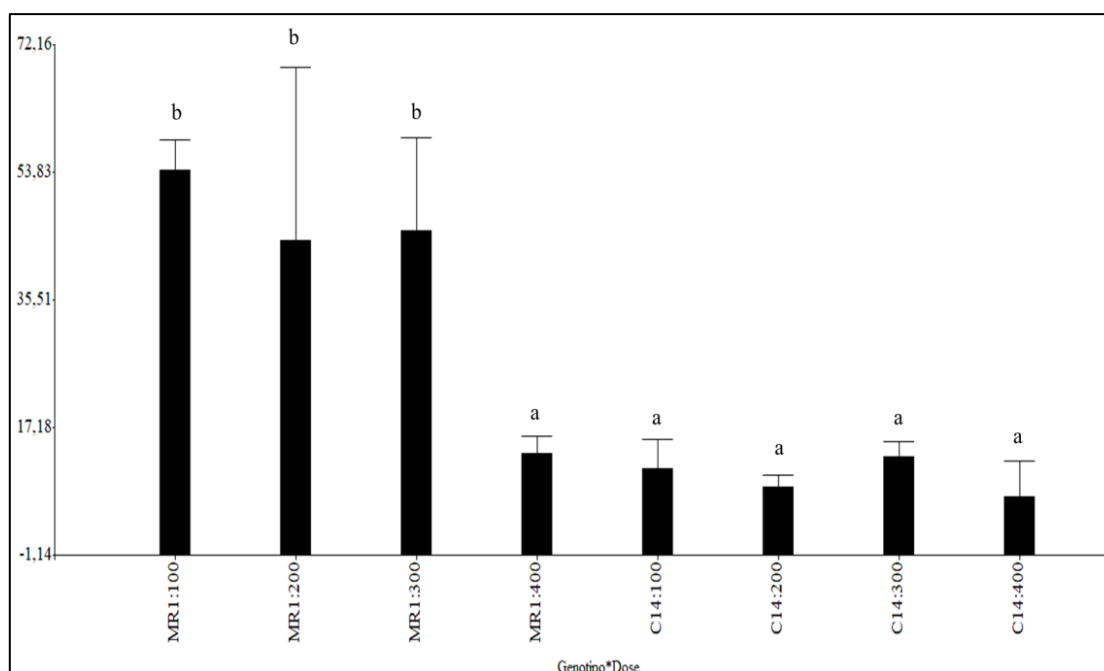


Figura 12. Efeitos dos raios gama no número de frutos para os acessos MR1 e C14

Dutta et al. (2021) trabalhou com Cucurbitáceas e obtiveram variações fenotípicas dos frutos, já Velkov et al. (2016) não relatou variações para os caracteres de frutos das plantas tratadas.

Tabela 3. Efeitos dos raios gama nas variáveis associadas aos frutos MR1 e C14 de melão.

Genótipo	Dose (Gy)	Peso	Comprimento	Largura	Polpa	Nº sementes
MR1	100	11,06 a	2,38 a	2,91 a	0,38 ab	19,56 ab
MR1	200	11,03 a	2,47 a	2,84 a	0,34 ab	18,36 ab
MR1	300	13,28 a	2,67 ab	3,11 a	0,33 ab	18,00 ab
MR1	400	10,18 a	2,48 ab	2,95 a	0,20 a	8,00 a
C14	100	20,23 a	4,13 b	3,27 a	0,58 b	87,83 b
C14	200	18,71 a	3,36 ab	3,41 a	0,5 b	71,25 ab
C14	300	17,57 a	3,71 ab	3,00 a	0,53 b	61,25 ab
C14	400	28,14 a	3,72 ab	4,13 a	0,6 b	81,75 ab

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente quando avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.4. Efeitos na lâmina foliar

Foram observadas variações morfológicas quanto aos caracteres avaliados da lâmina foliar (Figura 13).

Para as observações do comprimento e largura da folha em relação à irradiação os dados mostraram um efeito significativo para o acesso C14 quando irradiado na dose 400 GY com uma média de 9,08cm para o comprimento (Figura 14) e 8,77cm para a largura (Figura 15) da folha, nos permitindo inferir que os níveis de raios gama geram mudanças na lâmina foliar. Para o genótipo MR1 o comportamento semelhante foi observado, com um aumento para o tamanho da lâmina foliar para as doses crescentes, 300 e 400 GY.

Chen et al. (2018) observou modificações morfológicas na arquitetura da planta, folhas, órgãos florais, frutos, porém os mutantes foliares tiveram a maior participação, que foi de 33,6%, entre as mutações nas folhas. Rolim (2019) estudando a variabilidade induzida por radiação gama em berinjela (*Solanum melongena* L.) verificou diferenças significativas entre os tratamentos para caracteres analisados, dentre eles, comprimento da folha, largura da folha., dentre eles, comprimento da folha, largura da folha. E aponta estas características como indicadora da variação genética existente na variação total apresentada pelos materiais.

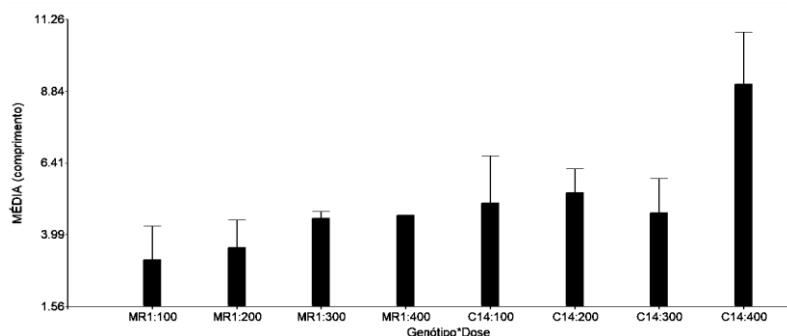


Figura 14. Efeitos dos raios gama no comprimento da lâmina foliar dos acessos MR1 e C14

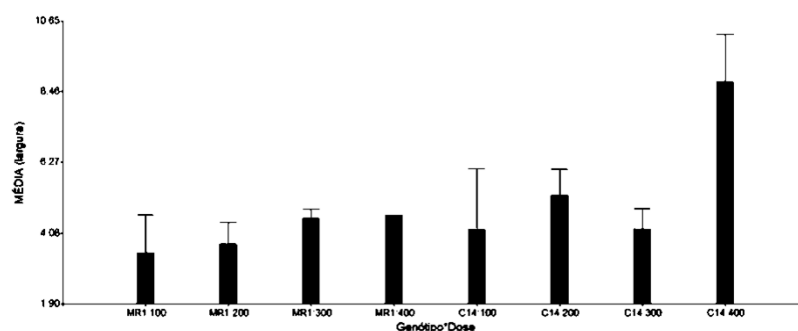


Figura 15. Efeitos dos raios gama na largura da lâmina foliar dos acessos MR1₃₈ e C14

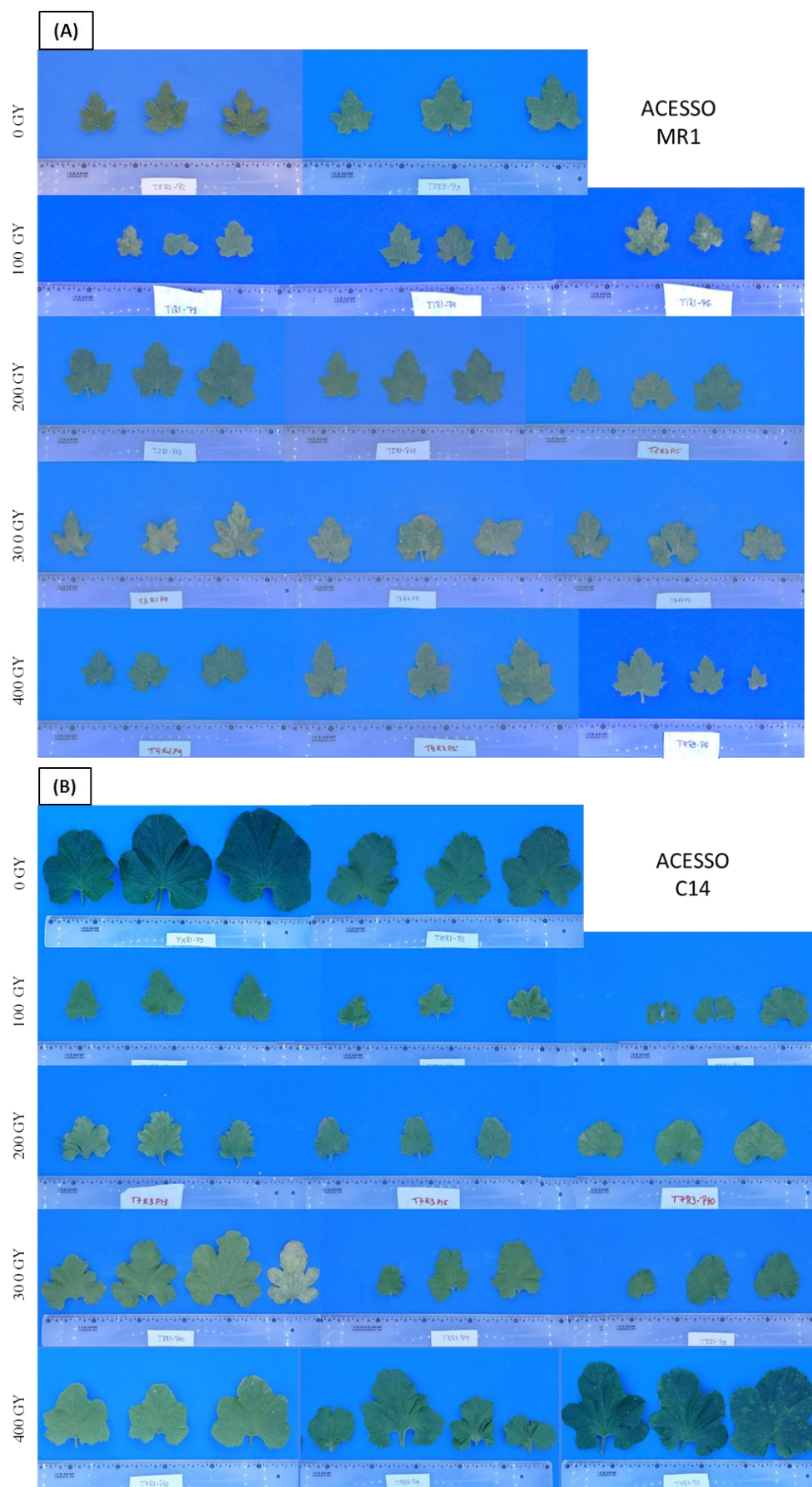


Figura 13. Efeitos dos raios gama na lâmina foliar dos acessos MR1 e C14

3.5. DIVERSIDADE FENOTÍPICA

As variáveis avaliadas de folha e fruto para cada um dos acessos irradiados nas diferentes doses permitiram gerar dois dendrogramas evidenciando os efeitos dos raios gama nas variações fenotípicas para os genótipos. De 600 plantas M1 geradas de sementes irradiadas, foram selecionadas 52 linhas que exibiram variações fenotípicas distintas entre os acessos estudados e com os dados obtidos.

Para as linhas derivadas do acesso C14, foi formado 2 agrupamentos A (16), B (3) (Figura 16). Observa-se no primeiro clado A o agrupamento de 16 indivíduos dos totais avaliadas. E o clado B compostos por três indivíduos; uma vez combinados, a distância entre os grupos foi de 0,4240.

Os indivíduos mais distantes corresponderam aos tratamentos que receberam doses de 100 e 400 Gy, correspondentes aos indivíduos C100R2P13, C400R1P2 E C400R1P11 que caracterizaram por apresentarem lâminas foliares e frutos maiores, e alto conteúdo de sementes ente 115 a 221.

Para as linhas derivadas do acesso MR1 foi formado 6 agrupamentos A (10), B (3), C (7), D (4), E (2) e F (7) (Figura 17). A distância entre os grupos foi de 0,06815. Observa-se no grupo B composto pelos indivíduos 100R1P8, 200R2P2, 100R206 e o grupo F composto pelos indivíduos 100R2P12, 200R2P10, 100R4P4, 100R4P7, 100R4P3 E 200R4P4 são os grupos com maior distância dentro de cada clado, o que faz deles indivíduos que apresentaram maiores diferenças morfológicas em lâmia foliar e fruto. A população avaliada do MR1 foi mais variável morfológicamente que o acesso C14.

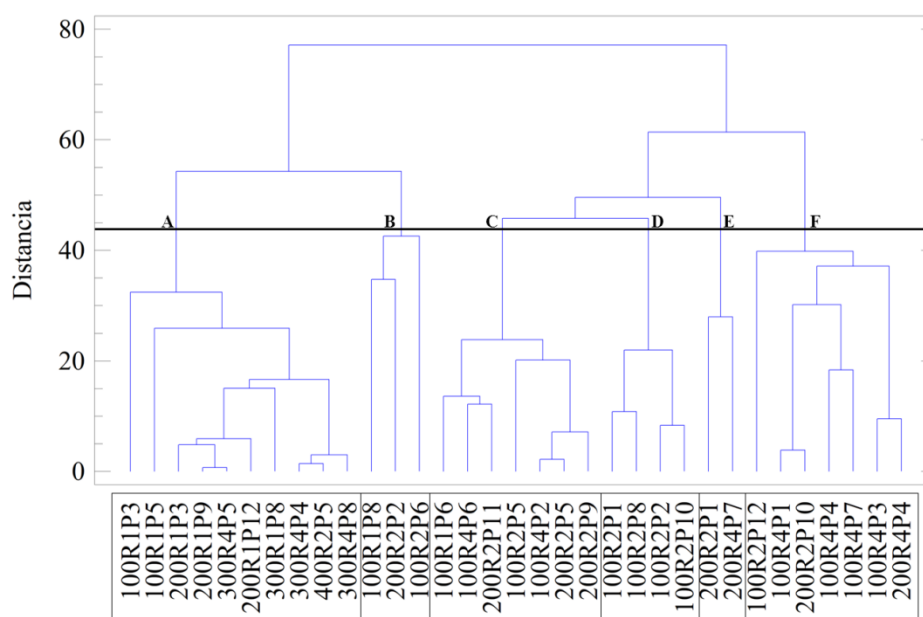


Figura 16. Dendrograma de agrupamento de linhas M1 com base nos dados quantitativos de folhas e frutos do acesso MR1 irradiado com diferentes doses de raios gama; pelo Método de WARD, com distância Euclidiana.

Outros trabalhos realizados com mutagênese também apresentaram uma grande diversidade fenotípica das linhas obtidas em gerações muito avançadas, como no trabalho de Zulfiqar et al., (2021), onde realizaram indução de mutação e obtiveram variações até a geração M7 e M8.

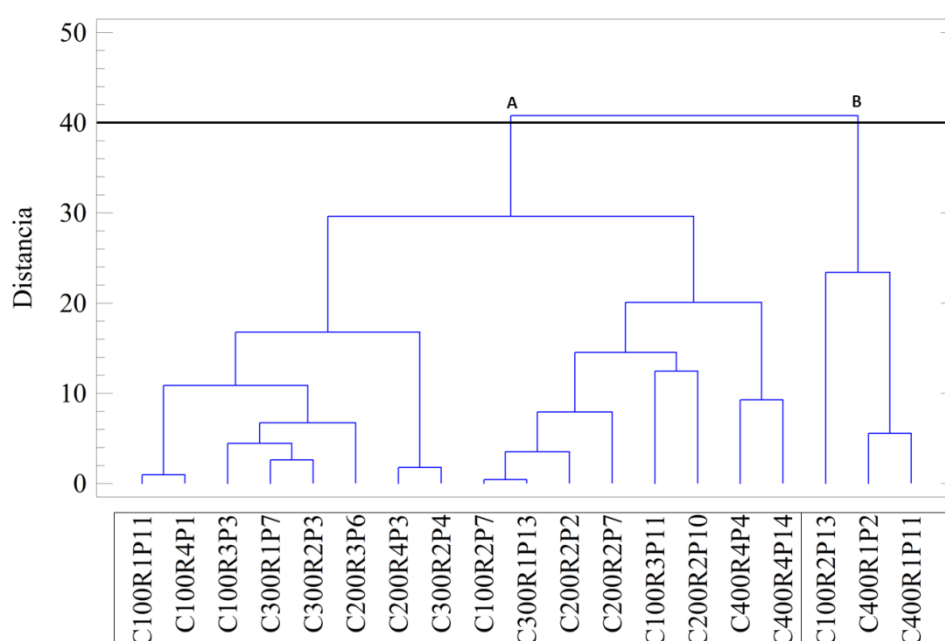


Figura 17. Dendrograma de agrupamento de linhas M1 com base nos dados quantitativos de folhas e frutos do acesso C14 irradiado com diferentes doses de raios gama; pelo Método de WARD, com distância Euclidiana.

Este estudo permite observar que os níveis de raios gama não esteve associado a uma variação específica, por isso há uma diversidade de indivíduos nos diferentes clados. Observa-se variação morfológica gerada nos grupos formados evidencia, permitindo sugerir a mutagênese induzida como uma opção viável para o desenvolvimento de novos híbridos/variedades de mutantes promissores para o melhoramento genético do meloeiro.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doses de raios gama testadas não geraram danos fisiológicos que afetaram negativamente os processos de germinação. Além disso, mostrou a baixa sensibilidade do acesso C14 e o potencial para ser testadas com doses mais altas.

Os resultados para a primeira geração de mutantes rastreadas a partir das características morfológicas avaliadas mostram a eficiência dos raios gama na geração de variabilidade indicando a possibilidade da ocorrência de mutações.

A diversidade dos efeitos resulta das respostas de cada genótipo. É importante ressaltar que, embora a irradiação seja baseada no acaso, bons resultados podem ser obtidos se ela for direcionada a um alvo e estiver vinculada a técnicas biotecnológicas. O uso dessa técnica pode reduzir tempo e recursos em programas de melhoramento de meloeiro

Daremos continuidade com esta pesquisa, pois experimentos subsequentes são necessários para obter uma coleção de mutantes com alterações para características de importância econômica, como tolerância ao estresse abiótico e biótico.

5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L. B. **Reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* e identificação de Quantitative Trait Loci de resistência do meloeiro ao míldio**. Dissertação. Brasil. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2014.

ASHRAF, M., Cheema, A. A., Rashid, M., & Qamar, Z. Effect of gamma rays on M l generation in basmati rice. **Pakistan Journal of Botany**, v. 35, n. 5; SPI, p. 791-796, 2004

BEYAZ, R. Impact of gamma irradiation pretreatment on the growth of common vetch (*Vicia sativa* L.) seedlings grown under salt and drought stress. **International Journal of Radiation Biology**, v. 96, n. 2, p. 257-266, 2020.

<https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1688885>

BORZOU EI, A., KAFI, M., KHAZAEI, H., NASERIYAN, B., & MAJDABADI, A.. Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Pak. J. Bot**, v. 42, n. 4, p. 2281-2290, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ ACS, 2009. 395 p.

CHEN, C. et al. An EMS mutant library for cucumber. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 7, p. 1612-1619, 2018. doi: 10.1016/S2095-3119(17) 61765-9

DUTTA, S. et al. Applied mutagenesis could improve economically important traits in bitter melon (*Momordica charantia* L.). **Journal of genetics**, v. 100, n. 2, p. 43, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12041-021-01283-5>

HAZRA, S. et al. Optimization of gamma radiation dose for induction of mutations in okra. **International Journal of Vegetable Science**, v. 27, n. 6, p. 574-584, 2021. <https://doi.org/10.1080/19315260.2021.1894626>

HORTIFRUT BRASIL: anuário 2021-2022. Piracicaba: USP, dez/2021. ISSN 1981-1837. Edição especial. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2021-perspectiva-2022.aspx>. Acesso em: 9 fev. 2023.

JAIPO, N., KOSIWIKUL, M., PANPUANG, N., & PRAKRAJANG, K. Low dose gamma radiation effects on seed germination and seedling growth of cucumber and okra. **Journal of Physics: Conference Series**. v. 1380, No. 1, p.012106, 2019. doi:10.1088/1742-6596/1380/1/012106

JO, Y.D & KIM, JB. Frequency and spectrum of radiation-induced mutations revealed by whole-genome sequencing analyses of plants. **Quantum Beam Science**, v. 3, n. 2, p. 7, 2019.

KESH, H. & KAUSHIK, P. Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. **Scientia Horticulturae**, v. 282, p. 110045, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110045>

KOVACS, E. & KERESZTES, A. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. **Micron**. v.33, n. 2, p. 199-210, 2002.

LINHARES, C. M. DE S. **Reação de acessos e herança da resistência a *Macrophomina phaseolina* e efeito da temperatura na podridão cinzenta em meloeiro**. Tese de Doutorado. Brasil. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2018.

MAHURE, H. R. et al. Mutation in chrysanthemum through gamma irradiation. **Indian journal of horticulture**, v. 67, n. 4, p. 356-358, 2010.

MANJU, P., & GOPIMONY, R.. Anjitha-a new okra variety through induced mutation in interspecific hybrids of abelmoschus spp. **Induced plant mutations in the genomics era**, p. 87-90, 2009.

OLIVEIRA MAIA, V.R. **Patogenicidade e expressão do perfil de proteínas por SDS-Page da relação *Macrophomina Pseudophaseolina* X *Cucumis melo* L.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/ Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2021. 39p.

PAUL ERNEST, F. et al. Radiosensitivity of two varieties of watermelon (*Citrullus lanatus*) to different doses of gamma irradiation. **Brazilian Journal of Botany**, v. 43, p. 897-905, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00659-8>

RIVIELLO-FLORES, M.D.L.L. et al. Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1161, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11091161>

ROLIM, R.R. **Variabilidade Genética Induzida Por Radiação Gama (Cobalto-60) em berinjela (*Solanum melongena* L.) e caracterização morfoagronômica dos mutantes**. 2019. 63f. Dissertação - (Mestrado) - UFPB/CCA. Areia, PB, 2019.

SILVA, J.E.S.B. et al. Tratamentos pré-germinativos de sementes de melão para produção de mudas irrigadas com água biossalina. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 84, p.1-10, 2024. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.257314>

TULMANN NETO, A. et al. Indução de mutação visando obtenção de resistência a doenças na cultivar de trigo IAC-24. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 497-504, 1995.

VELKOV, N., TOMLEKOVA, N., & SARSU, F. Sensitivity of watermelon variety Bojura to mutant agents ⁶⁰Co and EMS. **Journal of BioScience & Biotechnology**, v. 5, n. 1, 2016.

ZHANG, Y et al. Characteristics of a novel male–female sterile watermelon (*Citrullus lanatus*) mutant. **Scientia horticulturae**, v. 140, p. 107-114, 2012.

CAPÍTULO III

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A PODRIDÃO RADICULAR E MUTAÇÕES NO DNA EM ACESSOS DE MELOEIRO TRATADOS COM RAIOS GAMA

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência à podridão radicular causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* em linhas mutantes M2 derivadas do avanço geracional de dois acessos de melão MR1 (suscetível a *M. phaseolina*) e C14 (moderadamente resistente a *M. phaseolina*) da coleção de germoplasma da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, irradiados com raios gama, e a detecção de possíveis alterações no DNA através de marcadores moleculares, do tipo ISSR. Para isso, foram realizadas inoculações artificiais do fungo com o método do palito em 52 linhas M2 compostas por seis repetições, cada. Foram dadas notas associadas aos sintomas usando uma escala de severidade da doença, analisados pelo teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade e de tabulação cruzada para as variáveis de notas de resistência, mortalidade versus tratamento. A resposta de dois indivíduos MR1-414 e MR1-135 derivadas do acesso MR1 variaram de suscetível a resistente à inoculação e, o indivíduo C14-344 derivado do acesso C14 variou de moderadamente resistente a resistente, ambos com nota 1. Usando a análise de Sequências Simples Repetidas Internas, o polimorfismo genético de plantas M2 selecionadas foi investigado. O marcador ISSR 13 (TriTGT5'CY) com 290pb identificou alterações no DNA dos indivíduos MR1-344s2 e C14-1111s2, ambos com nota 3. Esses resultados sugerem diferenças na base genética da resistência nas diferentes fontes irradiadas com raios gama. Os acessos resistentes são sugeridos para serem testados em condições de campo para confirmar o nível de resistência na fase adulta da planta e sob condições estressantes. A avaliação revelou que fontes de resistência geradas a partir de sementes irradiadas com raios gama a esse fungo são promissoras.

.

Palavras chave: mutação induzida, ISSR, *Macrophomina phaseolina*, melão.

1. INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família Cucurbitaceae e é uma cultura olerícola cultivada em diversas regiões do mundo, devido a sua ampla adaptabilidade (Kesh & Kaushik, et al, 2021). A cultura do meloeiro apresenta maior expressividade socioeconômica na região Nordeste do Brasil, centralizado no semiárido. O agronegócio do melão tem respondido por mais de 90% da produção nacional (Silva et al, 2024). Os estados do Rio Grande do Norte e Ceará se destacam na participação das exportações dessa espécie alcançando 80% no total brasileiro (HORTIFRUT BRASIL, 2021).

Apesar do sucesso do cultivo do meloeiro nos principais polos produtivos do Brasil, cultivos sucessivos e a monocultura têm, ao longo dos anos, favorecido o aumento da população de patógenos habitantes do solo e causado prejuízos econômicos aos produtores (NASCIMENTO et al., 2018). Por esse motivo, estas regiões têm apresentado um aumento da incidência e severidade de doenças radiculares disseminadas por esses microrganismos (PORTO, 2015). O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid tem sido isolado de raízes de meloeiro e de plantas daninhas em áreas de cultivo de melão no Nordeste do Brasil e foi relatada em melão como agente causal da podridão das raízes e declínio das ramas (SALES JÚNIOR et al., 2012).

O controle deste fungo é difícil de ser realizado, por possuir estrutura de resistência e ampla gama de hospedeiros (KAUR et al 2012). Uma das alternativas viáveis ao controle destes fungos é a utilização de variedades resistentes, pois apresenta baixo custo, fácil uso, alta eficácia e por ser ecologicamente desejável (SILVA et al., 2014).

Duas variedades crioulas de melão no Irã, “Sfidak bekhat” e “Sfidak khatdar”, foram identificadas por Salari et al. (2012) como moderadamente resistentes (MR) a *M. phaseolina*. Ambrósio et al. (2015) relataram sete acessos altamente resistentes a *M. phaseolina* (Ag-15591Ghana, DudCUM296Georg, Ag-C38Nig, Can-NYIsr, Con-Pat81Ko, Dud-QPMAfg e AcTGR1551Zimb), em estudo realizado em Valência na Espanha. Entretanto, apenas um destes acessos

(Ag-15591Ghana) avaliados por Ambrósio et al. (2015) mostrou-se moderadamente resistente nas condições do Nordeste brasileiro (LINHARES, 2018).

Materiais com resistência têm sido encontrados em linhagens de melão, tais como MR-1 por possuir dois genes de efeitos complementares denominados Pc-1 e Pc-2 que conferem resistência a *Pseudoperonospora cubensis* (ALBUQUERQUE, 2014). No entanto, MR-1 é suscetível a *M. phaseolina*.

No melhoramento de plantas, a irradiação de sementes pode resultar no aumento da variabilidade genética permitindo ao melhorista selecionar novos genótipos com características melhoradas (ASHRAF et al., 2004). A radiação gama é considerada um dos principais indutores de mutação, pois em um processo de irradiação o material é exposto à radioatividade intencionalmente de maneira controlada e considerando os aspectos da interação com a matéria e alterações na estrutura cromossômica tem a finalidade de esterilizar ou de modificar o material (SPENCER et al., 2018; REID, 1995; SINTZEL et al., 1997; COIMBRA et al., 2004; PIMENTEL, 1990; KIM et al., 2005).

A radiação gama pode ser útil para a alteração de caracteres fisiológicos (KIONG et al., 2008). O efeito biológico dos raios gama baseia-se na interação com átomos ou moléculas da célula, principalmente água, para produzir radicais livres (KOVACS & KERESZTES 2002). Esses radicais podem danificar ou modificar componentes importantes das células vegetais e têm sido relatados como afetando diferencialmente a morfologia, anatomia, bioquímica e fisiologia das plantas, dependendo da dose de radiação (ASHRAF et al., 2004). Este método se mostrou importante em várias culturas (arroz, feijão, soja, melancia, quiabo) (HAZRA et al., 2021; PAUL ERNEST et al., 2020); onde mutantes induzidos foram liberados como novas variedades (KHAN & TYAGI, 2013).

Os raios gama também estão sendo amplamente utilizados como técnicas de mutação em uma tentativa de aumentar a tolerância ao estresse abiótico e variedades de culturas resistentes a doenças (RAINA et al., 2022).

Os marcadores ISSR (Sequências Simples Repetidas Internas) tem se apresentado como uma ferramenta científica bastante útil e promissora para a identificação de mutantes com potencial para o uso no melhoramento genético de cultivares já existentes e na obtenção de novos genótipos.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência a podridão radicular causada por *M. phaseolina* em linhas da geração M2 de acessos de meloeiro irradiados com raios gama e detectar por meio de marcadores ISSR alterações a nível de DNA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. LOCAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A pesquisa foi conduzida em Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, na Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA). O ensaio foi instalado em casa de vegetação e, o desenvolvimento do experimento no Laboratório de Fitopatologia II e Laboratório de Biotecnologia vegetal, do Departamento de Ciências Agrônômicas e Florestais (DCAF).

Em delineamento inteiramente casualizados (DIC), foram testados para resistência a *M. phaseolina* 52 linhas da geração M2 derivadas de frutos obtidos



por autofecundação do avanço geracional de dois acessos de melão (C14 e MR1) geração M1, irradiados com diferentes doses de raios gama (Figura 1). Cada linha selecionada com seis repetições.

Figura 1. (A) semeadura linhas M2 em bandejas; (B) momento do transplante; (C) Mudanças transplantadas para sacos de um litro.

2.2. MATERIAL VEGETAL

Previamente, sementes dos acessos C14 (Ag-15591Ghana) e MR-1 da Coleção Ativa de Germoplasma do meloeiro da UFERSA, denominado geração M0, foram irradiadas com 0, 100, 200, 300 e 400 Gy de raios gama, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo. Depois de irradiadas as sementes são denominadas geração M1. A semeadura da geração M1 foi realizada em casa de vegetação para obtenção de frutos e sementes da geração M2. A seleção das linhas M2 (Tabela 1) para o avanço geracional foi realizada com base nas alterações morfológicas associadas a flores, folhas e frutos.

Portanto, linhas mutantes da geração M2 derivadas do avanço geracional de dois acessos de melão (C14 e MR1) irradiados com raios gama, foram utilizadas nesse estudo. Os acessos C14 e MR-1 não possuem valor comercial para a fruticultura nordestina, no entanto, são fontes de resistência a *M. phaseolina* e *P. cubensis*, respectivamente. Oliveira (2021) relata C14 com resistência moderada e MR-1 suscetível a *M. phaseolina* (LINHARES et al., 2018; AMBRÓSIO et al., 2015).

Tabela 1. Origem e identificação das linhas mutantes M2 de melão

Origem (M0)	Origem (M1)	Linhas M2	Origem (M0)	Origem (M1)	Linhas M2
Acesso	Dose (Gy)	Mutantes	Acesso	Dose (Gy)	Mutantes
MR1	0	-	C14	0	-
MR1	100	MR-121	C14	100	C-616
MR1	100	MR-1210	C14	100	C-6111
MR1	100	MR-135	C14	100	C-627
MR1	100	MR-143	C14	100	C-6213
MR1	100	MR-144	C14	100	C-633
MR1	100	MR-146	C14	100	C-6311
MR1	100	MR-149	C14	100	C-641
MR1	200	MR-213	C14	200	C-722
MR1	200	MR-214	C14	200	C-727
MR1	200	MR-219	C14	200	C-7210
MR1	200	MR-2112	C14	200	C-7215
MR1	200	MR-221	C14	200	C-736
MR1	200	MR-247	C14	200	C-743
MR1	300	MR-311	C14	300	C-817
MR1	300	MR-312	C14	300	C-8113
MR1	300	MR-322	C14	300	C-822
MR1	300	MR-3210	C14	300	C-823
MR1	300	MR-3310	C14	300	C-824
MR1	300	MR-342	C14	300	C-8211

MR1	300	MR-344	C14	300	C-844
MR1	300	MR-345	C14	300	C-845
MR1	400	MR-414	C14	300	C-847
MR1	400	MR-416	C14	400	C-9111
MR1	400	MR-432	C14	400	C-944
MR1	400	MR-433	C14	400	C-949
MR1	400	MR-435	C14	400	C-9414

As sementes das linhas M2 foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (NaClO) 1,5% durante dois minutos, lavadas em água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente sob papel absorvente durante 24 horas.

A semeadura foi realizada em bandejas, tipo sementeira de 200 células e, após 18 dias as plântulas foram transplantadas em sacos plásticos para mudas, com capacidade para um litro, ambos preenchidos com substrato comercial e areia lavada esterilizada em autoclave (2 horas a 120 °C por dois dias consecutivos, com intervalo de 24 horas entre cada esterilização), na proporção 1:1 (uma quantidade de solo e uma de substrato), umedecida com água a 60% da capacidade de retenção (BRASIL, 2009).

2.3. MATERIAL FÚNGICO

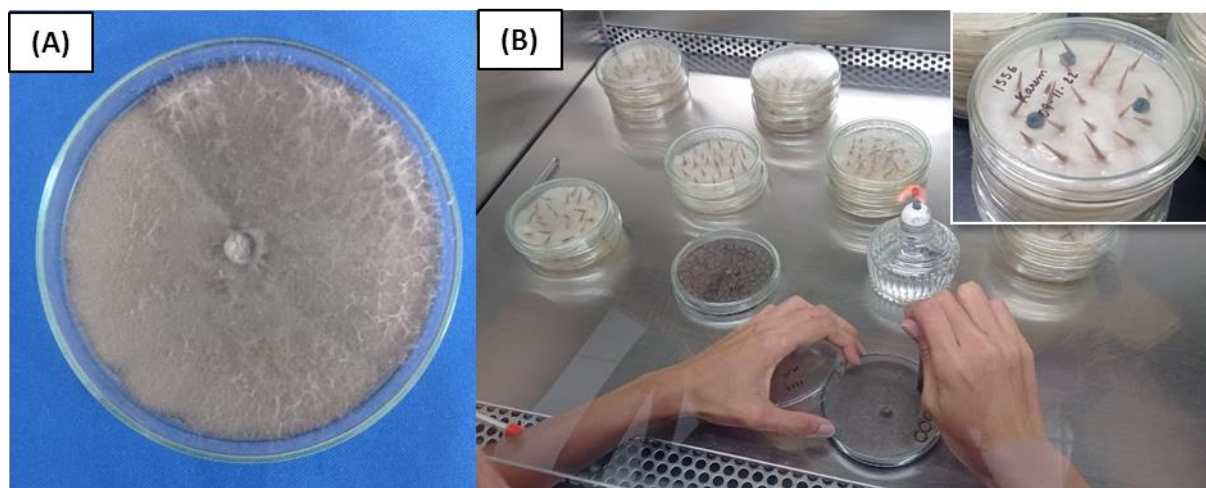
Um isolado CMM 1556 de *M. phaseolina* (MN355981) com características agressivas (MEDEIROS et al., 2015), da coleção de cultivos de fungos fitopatogênicos da UFERSA, foi utilizado. Foi realizado repicagem do isolado em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) com tetraciclina (0,05 g/L) e, posteriormente, mantido em estufa do tipo Biological Oxygen Demand (BOD) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, durante sete dias, para a utilização no preparo do inóculo.

2.3.1. Preparo do inóculo

A multiplicação do inóculo do isolado de *M. phaseolina* foi preparada no Laboratório de Fitopatologia II, da UFERSA.

O método de inoculação utilizado foi o método do palito (palito de dente), descrito por Ambrósio et al. (2015), devido à fácil multiplicação do inóculo e rápida inoculação (NEGREIROS et al., 2019) e relatado por Medeiros et al. (2015) como o mais eficiente em discriminar os acessos em classes distintas de resistência dependendo do isolado.

Para a preparação do inóculo, as extremidades dos palitos de dente são cortadas a aproximadamente 1 cm e distribuídos verticalmente em disco de papel de filtro com dimensão equivalente ao diâmetro da placa de Petri, em seguida, realizada a esterilização em autoclave, durante 30 minutos, por 2 dias com intervalo de 24h, a 121°C. Para a colonização dos palitos por *M. phaseolina*, foi adicionado as placas contendo os palitos meio de cultivo BDA, com exposição de 2 mm da extremidade dos palitos e, após a polimerização do meio, foram



repicados três discos com aproximadamente 0,5 mm de diâmetro contendo micélios e microescleródios do fungo, e transferidos com distribuição equidistante (Figura 2). As placas foram mantidas em estufa BOD no escuro por 8 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (MEDEIROS et al., 2015).

2.4. INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES DE RESISTÊNCIA

As mudas das linhas M2 foram inoculadas 40 dias após o plantio, quando os palitos estavam completamente colonizados pelos isolados do patógeno, inserindo a ponta do palito infestados de micélios e microescleródios do isolado no hipocótilo de cada planta, 1 cm acima do solo (Figura 3). Palitos não infestados e autoclavados foram usados como controles negativos.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições de luz natural e temperatura média de 33°C , suprimento hídrico diário com rega manual

Figura 2. (A) Isolado de *M. phaseolina*; (B) preparo do inóculo: transferindo discos contendo micélios e microescleródios do fungo para as placas com os palitos.

e não foram realizadas adubações durante o experimento até o dia da avaliação. Para o avanço geracional e obtenção de sementes da geração M3, as linhas M2



sobreviventes à inoculação de *M. phaseolina* foram conduzidas até a obtenção de frutos.

Figura 3. Palito infestado de micélios e microescleródios do isolado inserido no hipocótilo da planta.

Trinta dias após a inoculação, a severidade da doença foi avaliada usando uma versão modificada da escala de avaliação descrita por Ambrósio et al. (2015), onde, 0 = sem sintomas, 1 = menos de 3% de tecidos da parte aérea infectados, 2 = 3 a 10% de tecidos de brotos infectados, 3 = 11 a 25% de tecidos de brotos infectados, 4 = 26 a 50% de tecidos de brotos infectados e 5 = mais de 50% dos tecidos da parte aérea infectados.

A severidade média da doença foi calculada para cada linha M2 e utilizada para classificá-las em cinco classes de reação: 0 = imune (I); 0,1–1,0 = altamente resistente (HR); 1,1–2,0 = moderadamente resistente (MR); 2,1–4,0 = suscetível (SU) e 4,1– 5,0 = altamente suscetível (HS) (SALARI et al. 2012).

A mortalidade foi calculada pela porcentagem do número de plantas morta em relação ao total de plantas vivas de cada linha. Fragmentos de tecidos de plantas que apresentaram sintomas (Figura 4) foram colocados em placas Petri



com BDA para o reisolamento do fungo inoculado e completar os postulados de Koch (Figura 5).

Figura 4. Planta com sintomas e reisolamento do fungo inoculado para completar os postulados de Koch

Os dados da severidade da doença foram analisados pelo teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o Programa R. de tabulação cruzada para as variáveis de notas de resistência, mortalidade versus tratamento, no STAGRAPHSICS.

2.5. ANÁLISE DE POLIMORFISMO GENÉTICO DE PLANTAS M2

Para a análise molecular a seleção de plantas da geração M2 foi realizada com base no teste de resistência por meio da escala de notas atribuídas à severidade da doença por *M. phaseolina*. Foram selecionadas aquelas que receberam notas entre 1 a 3, indivíduos derivados da geração M1 dos acessos (MR1 e C14) que receberam doses de radiação gama (controle, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy e 400 Gy).

2.5.1. Extração de DNA genômico

Folhas jovens de plantas de cada linha previamente selecionadas foram coletadas e levadas ao laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências Vegetais, da UFERSA.

A extração de DNA foi realizada mediante o método CTAB e pelo protocolo elaborado por Doyle & Doyle (1990). Para a extração, as amostras do material vegetal foram maceradas em nitrogênio líquido, as células maceradas são misturadas em um tampão de extração contendo Tris-HCl 100mM pH 8,0; NaCl 500 mM; EDTA 0,20m, β -mercaptoetanol 0,6%, PVP, CTAB 7% e água ultrapura. Essa suspensão foi submetida a temperaturas de 65°C durante 40 minutos, vertendo o conteúdo a cada 10 minutos, para facilitar a solubilização e a homogeneização. Essa suspensão foi submetida à extração com um solvente orgânico (clorofórmio-álcool isoamílico - CIA) e, por meio de centrifugação, as fases orgânica (inferior) e aquosa(superior) são separadas. A fase superior

(contendo DNA, RNA e alguns polissacarídeos) foi transferida para um novo micro tubo (do tipo eppendorf), onde é repetida a extração com o CIA. Em seguida, foi usado o isopropanol gelado e adicionado à fase aquosa, separada na etapa anterior. Na presença de álcool, o DNA forma um precipitado, frequentemente visível, que pode ser “peletizado” por centrifugação, após incubação a -20°C por um tempo que pode variar de ± 30 minutos a 12 horas. Após lavagens do precipitado de DNA/RNA com álcool 70% e 90%, respectivamente, o pellet foi então ressuspenso em solução de RNase, restando apenas o DNA genômico desejado.

O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g/mL}$) submetido à eletroforese a 120v por 30 minutos. Visualizado em transluminador sob a luz ultravioleta e fotografada em equipamento de fotodocumentação.

2.5.2. Avaliação de mutação com marcadores ISSR

Foram testados e selecionados marcadores moleculares de síntese (primers) em gel de agarose a 2% que apresentaram boa amplificação através da técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) de amostras de linhas de melão da geração M2.

Para a amplificação do DNA das linhas M2, foram utilizados 11 primers ISSR listados na Tabela 2. A reação de amplificação com volume final de 12 μL , foi composta por 1X tampão MgCl_2 ; 0,16 mM dNTP; 1U Taq DNA Polimerase (Trans); 0,33 μM de cada um dos primers; BSA 0,25 mg/ml-1 e 30 ng de DNA. A amplificação ocorreu em termociclador automático (Amplitherm), em programa de amplificação ISSR, com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento em temperatura de entre 47 a 50°C (de acordo com o primer) por 40 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e a extensão final a 72°C por 7 minutos (VERMA et al., 2017). Os produtos amplificados foram separados em géis de agarose 2% corados com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g/mL}$) Um marcador de DNA de 1kbp (Sinapse Biotecnologia) foi utilizado como padrão de comparação das bandas geradas e visualizado em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz ultravioleta.

Os perfis de marcadores ISSR das linhas M2 foram avaliadas para a

Nº	Primer	Sequência	Ta
1	DiCA5'CY	CYCACACACACACACACA	50
2	DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	50
3	TriCAC3'RC	CACCACCACCACCACRC	55
4	TriGTG	GTGGTGGTGGTGGTG	55
5	TriGTG3'YC	GTGGTGGTGGTGGTGYC	50
6	TriTGT5'CY	CYTGTTGTTGTTGTTGT	50
7	TriAAG3'RC	AAGAAGAAGAAGAAGRC	47
8	TriACA3'RC	ACAACAACAACAACARC	47
9	TriTCA3'RC	TCATCATCATCATCARC	47
10	TriTCT3'RC	TCTTCTTCTTCTTCTRC	50
11	TriTCC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	50

Ta: Temperatura de anelamento

ausência de bandas (0) ou presença (1) de marcadores de alta densidade (bandas).

Foi realizada uma análise descritiva dos dados.

Tabela 2. Lista de primers Repetição Inter-Simples de Sequência (ISSR)

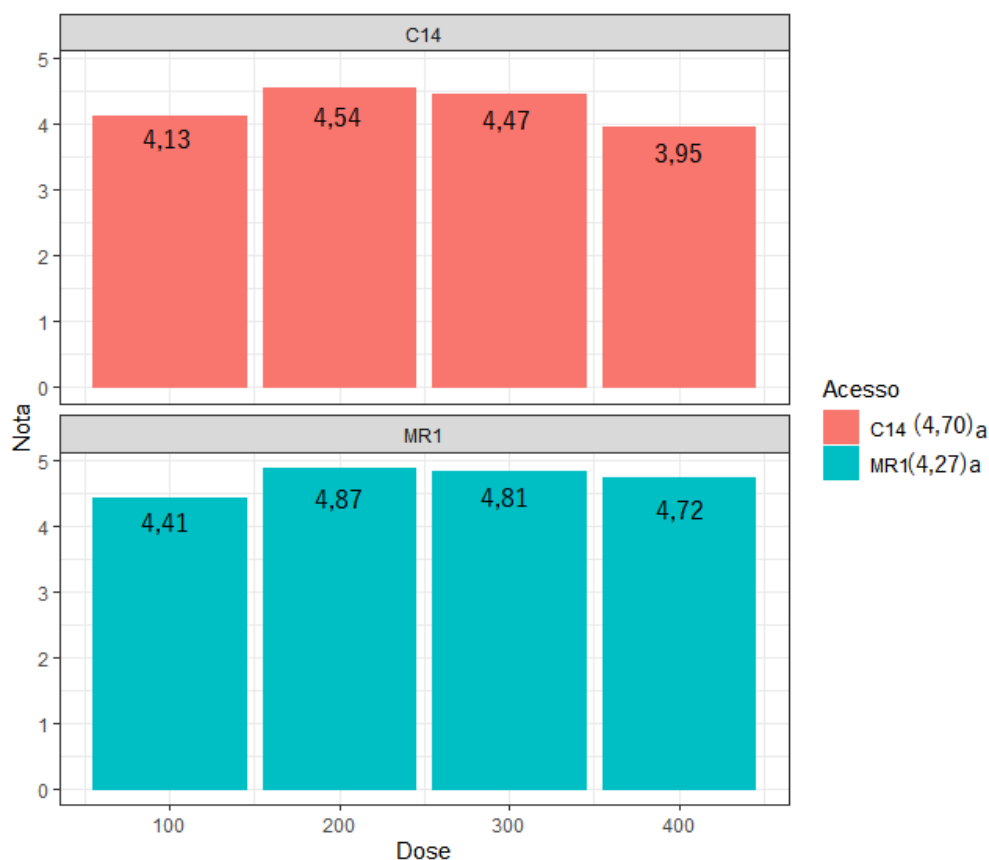
Os perfis de marcadores ISSR das linhas M2 foram avaliados para a ausência de bandas (0) ou presença (1) de marcadores de alta densidade (bandas).

Foi realizada uma análise descritiva dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. RESPOSTA DAS LINHAS M2 A INOCULAÇÃO COM *M. phaseolina*

A análise estatística e de comparação de médias do teste Mann-Whitney não permitiu diferenciar os acessos C14 e MR1 que tiveram médias de severidade de 4.70^a e 4.27^a (Figura 5). Porém, para C14 nas dosagens de 100 e 400 Gy se observou as menores médias com 4.13 e 3.95, respectivamente, mostrando uma leve redução de severidade a esses tratamentos apresentando indivíduos com notas abaixo de cinco. Para o genótipo MR1 a menor severidade foi obtida na dosagem 100 com 4.41, permitindo inferir a presença de indivíduos com notas baixas. A dose 100 e 400 Gy para C14 e 100 Gy para MR1 podem ser avaliadas em maior



profundidade, considerando que o teste não permitiu diferenciar estatisticamente o genótipo suscetível MR1 e o moderadamente resistente C14.

Figura 5. Severidade em dois acessos de melão inoculados com *M. phaseolina* e submetidos a quatro doses de raios gama. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidades.

Avaliando as linhas derivadas do Acesso MR1 (susceptível), os níveis de raios gama de 100 a 400Gy tem a capacidade de gerar indivíduos com algum nível de resistência a *M. phaseolina*. As análises de frequência mostraram valores altos de nota 5 (14.74 a 27.56%) (Figura 6).

O genótipo susceptível MR1 mesmo após o tratamento continuou expressando alto nível de susceptibilidades, porém este estudo permitiu identificar frequências baixas para notas diferentes de 5, conferindo assim a influência dos raios gama na promoção de ganho em resistência ao fungo avaliado. Para a nota 4 a frequência mais alta foi obtida pelo tratamento irradiado com 400 Gy (4) com 1.92%, seguido do tratamento que recebeu 300 Gy(3) com 1.28%. para a nota 3, se obteve 1.28% para os tratamentos 100, 200 e 300 Gy(1, 2 e 3).

No caso da nota 2, genótipos tolerantes com menor nível de dano no colo foram obtidos pelos tratamentos 100, 300 e 400 com 0.64,0.64 e 1.92% respectivamente. Para a nota 1 com menor dano e potenciais indivíduos tolerantes foram encontradas as frequências de 0.64 % para 100 e 400Gy. Que correspondem a 1 indivíduo por cada tratamento da população avaliada do genótipo MR1, evidenciando que mesmo em baixas frequências os raios gama podem gerar indivíduos tolerantes a *M. phaseolina* ou com algum nível de tolerância (3.85%).

O nível de tolerância induzido pelos raios gama não está associado ao nível de exposição específico para MR1, as frequências aconteceram ao acaso por quanto $p < 0.24$ para o teste de (X^2), mas poderia considerar os níveis 100 e 400 Gy que obtiveram indivíduos de nota 1.

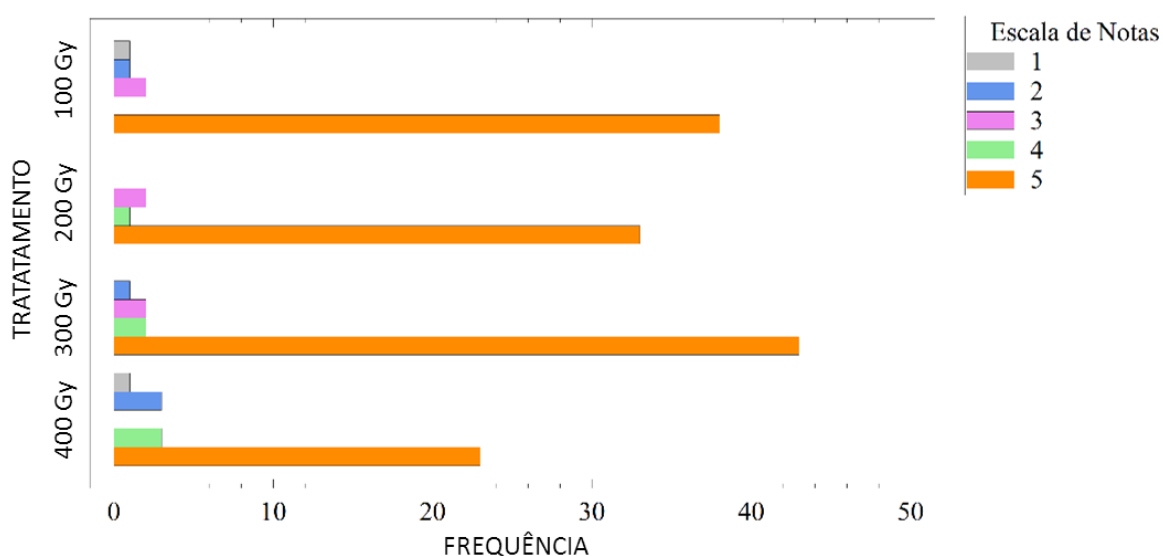


Figura 6. Severidade em linhas (derivadas do acesso de meloeiro MR1 submetido a doses de Raios gama) inoculados com *M. phaseolina*.

Raimondi et al. (2020) avaliaram a eficiência da mutação induzida na geração de variabilidade genética para tolerância a temperaturas baixas em populações M2 de cultivares de arroz. Houve grande variabilidade genética em todas as populações e obtiveram oito linhagens que apresentaram maior tolerância à temperatura baixa. A mutação induzida foi eficiente na geração de variabilidade genética para tolerância a temperaturas baixas na germinação do arroz.

A partir das análises das plantas inoculadas, foi observado que a mortalidade pode ser reduzida pelos efeitos dos raios gama (Figura 7). Observou que frequências altas de mortalidade foram obtidas pelo tratamento 300 Gy (3) de até 30.77%, mas os valores mais baixos foram obtidos pelo tratamento 400 Gy (4) com 16.67%. Os tratamentos 100, 200 e 400 Gy apresentaram frequências de 3.85, 0.64 e 2.56% de plantas que não morreram pelo fungo *M. phaseolina*, os tratamentos que receberam doses de 100 e 400 Gy poderiam se considerar promissores para obtenção de indivíduos tolerantes com 6 e 4 indivíduos. Levando em consideração que a mortalidade e sobrevivência estiveram associadas ao tratamento ($p < 0.02$). Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir o uso da dose 100 Gy.

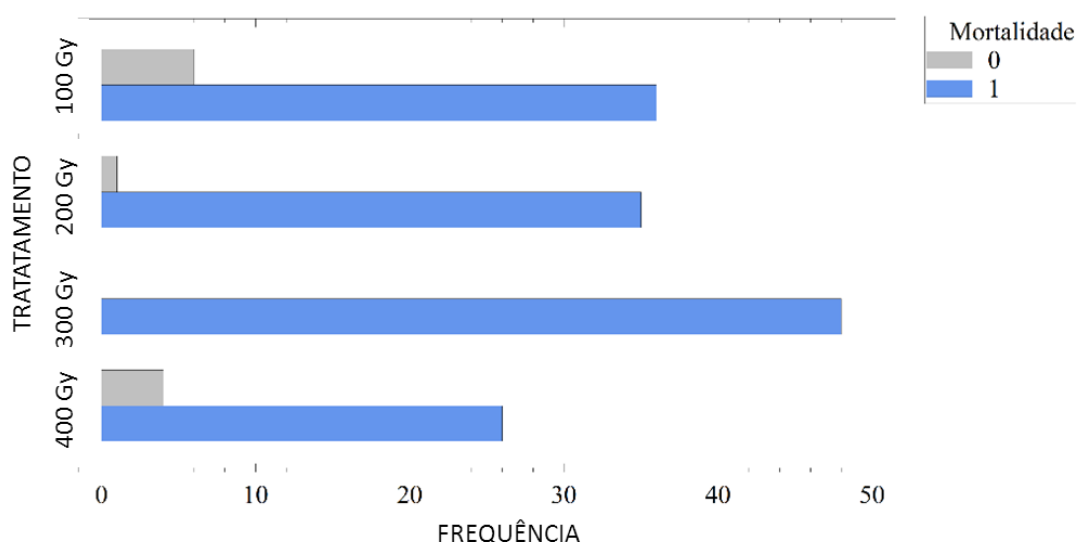


Figura 7. Mortalidade em linhas (derivadas do acesso de meloeiro MR1 submetido a doses de raios gama) inoculados com *M. phaseolina*.

Avaliando as linhas derivadas do Acesso C14 (moderadamente resistente) (Figura 8), observou-se que os efeitos dos raios gama foram positivos na geração de algum nível de tolerância a *M. phaseolina*. As frequências de nota 5 foram altas com valores de até 20.51%, para 300Gy (3), as frequências para a nota 4 foram 6.41% com 10 indivíduos para o tratamento 300 Gy, para a nota 3 as frequências mais altas foram obtidas pelos tratamentos 100 e 300 Gy com 4.49%.

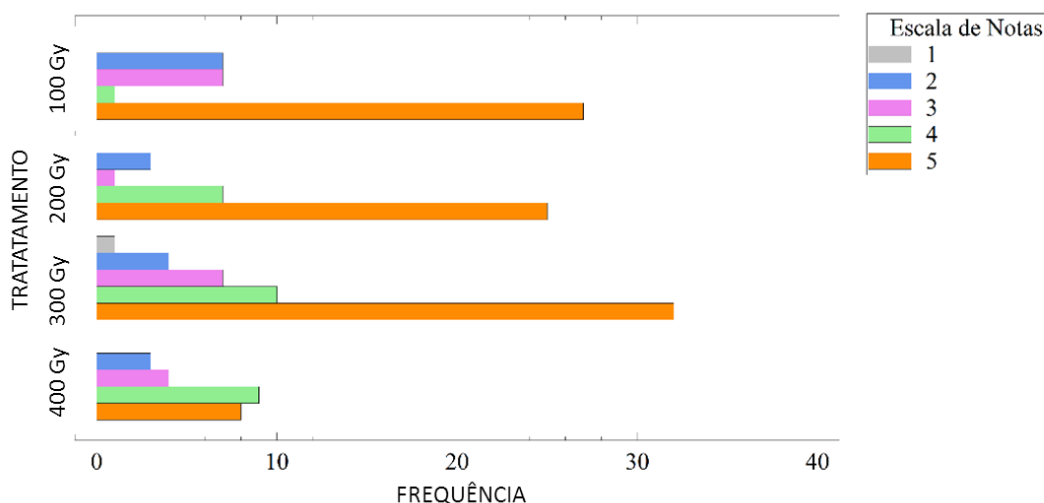


Figura 8. Severidade em linhas (derivadas do acessos de meloeiro C14 submetidos a doses de raios gama) inoculados com *M. phaseolina*.

Para os indivíduos com nota 2 as frequências mais altas foram obtidas pelo tratamento 200 Gy com 4.49%, que corresponde a um total de 7 indivíduos, seguido do tratamento 300 Gy com uma frequência de 2.56% que correspondeu a 4 indivíduos. Finalmente, indivíduos irradiados na dosagem 300 Gy se obteve 1 indivíduo com nota 1 (0.64%). A dosagem 300 Gy influenciou valores mais altos para frequência de indivíduos que receberam nota 5, mas em contraste permitiu a obtenção de 1 indivíduo de nota 1. As frequências das notas de nível de dano por *M. phaseolina*, estão relacionadas com o tratamento ($p < 0.032$).

Albertoni et al. (1987) trabalharam com indução de mutação usando raios gama em uma cultivar de Caupi imune ao Vírus do Mosaico Severo (VMSC). Eles tinham objetivo de mudança na coloração do tegumento mantendo a resistência. Então realizaram inoculações do vírus nas plantas da geração M 2 e observaram a segregação de dois tipos de reação à virose: suscetibilidade e resistência. Avaliaram também os dados pelo teste de qui-quadrado, pois o teste ajuda a determinar se existe uma associação entre duas variáveis categóricas.

As linhas derivadas do acesso C14 obtiveram baixas frequências de mortalidade em relação a sobrevivência (Figura 9), a frequência mais alta foi obtida pelo tratamento 100 Gy (1) com 14.10%. e no tratamento 400 Gy foi de apenas 2.56%. A sobrevivência (66.67%) foi superior a mortalidade (33.33%). As frequências de sobrevivência superiores (0) foram obtidas pelo tratamento 300 Gy com 28.21% que correspondeu a 44 indivíduos vivos, a mortalidade está associada ao tratamento ($p < 0.001$), com uma redução inversamente proporcional ao nível de raios gama, pelos resultados obtidos neste estudo, para genótipo C14 a dosagem recomendável na procura de resistência a *M. phaseolina* poderia ser 300 Gy.

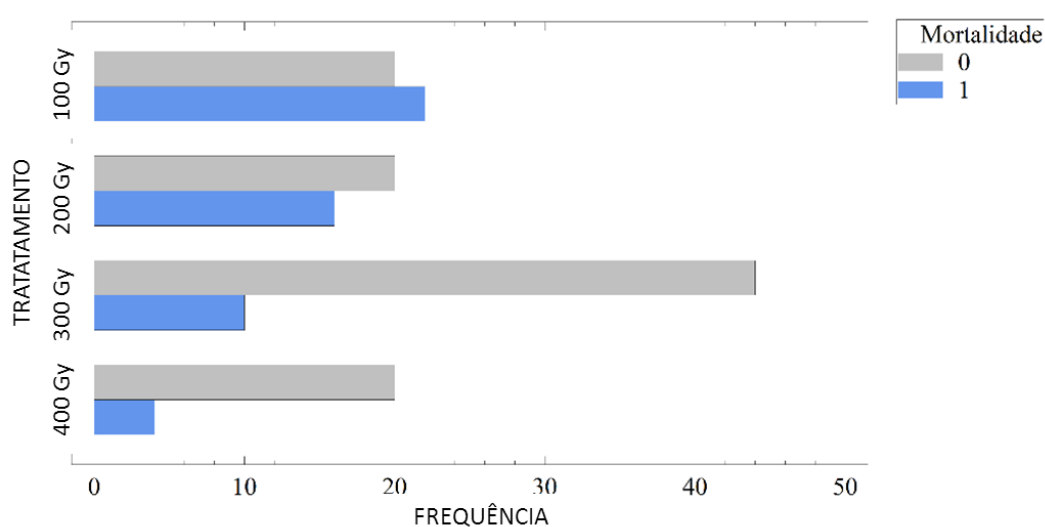


Figura 9. Taxa de mortalidade de linhas (derivadas de dois acessos de meloeiro submetidos a doses de raios gama) inoculadas com *M. phaseolina*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sharma et al. (2010), aos quais observaram que, das 486 progênies mutantes de ervilha, apenas 25 apresentaram resistência à murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. Pisi.

3.2. ANÁLISE MOLECULAR COM ISSR

Para a análise molecular foram analisados os DNAs das amostras de plantas selecionadas de cada tratamento (controle, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy e 400 Gy) com base na escala de notas atribuídas à severidade da doença por *M. phaseolina*, ou seja, aquelas que receberam notas entre 1 a 3. Para a análise molecular foram analisados os DNAs das amostras de plantas selecionadas de cada tratamento (controle, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy e 400 Gy) com base na escala de notas

atribuídas à severidade da doença por *M. phaseolina*, ou seja, aquelas que receberam notas entre 1 a 3. Dos 11 primers pré- selecionados de acordo com seus padrões de amplificação, apenas um primer detectou presença de bandas polimórficas (Figura 10). O primer TriTGT5'CY produziu 3 padrões de bandas polimórficas no DNA dos tratamentos MR1-344 e C14-1111 sendo a linha MR1-344 derivada do acesso MR1 irradiado com 300 Gy e a linha C14-1111 derivada do acesso C14 irradiado com 100 Gy..

O polimorfismo resultante da amplificação ISSR sugere a alterações genéticas nos tratamentos irradiados com raios gama. Em um estudo com cultivares de banana (*Musa paradisiaca* L.) irradiadas com diferentes níveis de raios gama, Due et al. (2019) observou diferentes padrões de fragmentos entre os tratamentos quando analisado com os marcadores ISSR. Os marcadores ISSR foram capazes de identificar polimorfismo entre mudas de *Sophora davidii* tratadas com diferentes níveis de raios gama, demonstrando alto poder discriminativo entre mutantes ou loci mutados (WANG et al, 2017).

É inadequado identificar a mutação apenas de acordo com as alterações morfológicas nos estágios de crescimento pois são facilmente afetados pelo ambiente. Portanto, como um complemento para identificação morfológica, é importante avaliar as variações genéticas por marcadores de alta eficiência.

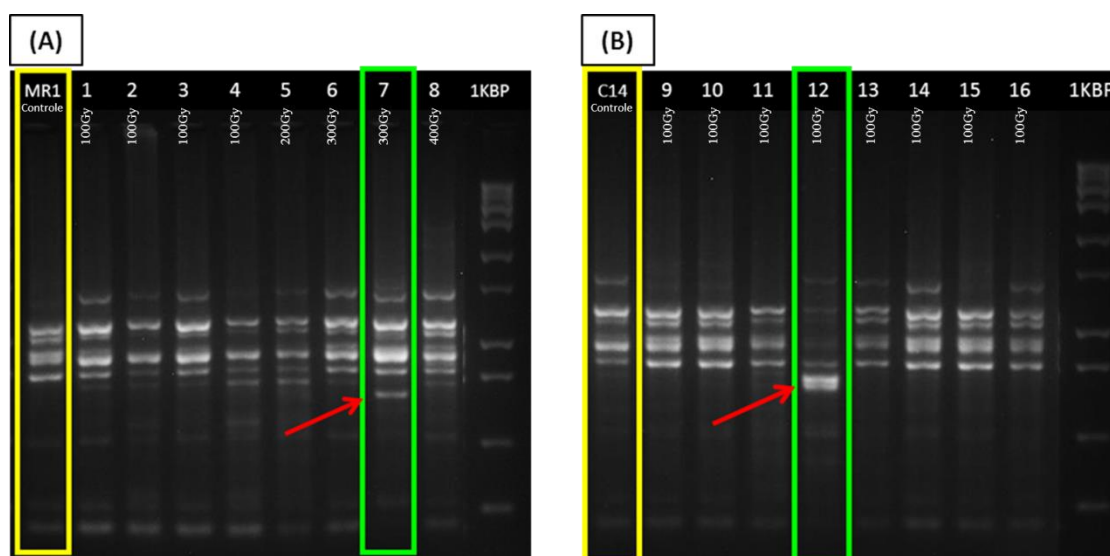


Figura 10. Amplificação do padrão de DNA usando ISSR; Alteração no padrão de banda da linha MR1-344 (A) e alteração no padrão de banda da linha C14-1111 (B).

O polimorfismo resultante da amplificação ISSR vem de variações nas sequências de DNA no local de ligação do primer. De acordo com Reddy et al. (2002), o polimorfismo pode ser devido a mutação em sítios de priming e/ou evento de inserção ou deleção dentro da região SSR; e a extensão do polimorfismo também varia com a natureza e a repetição da sequência do primer usado.

Portanto, os indivíduos que apresentaram algum nível de resistência para genótipo MR1 poderia estar associado a indução da expressão de genes relacionados com a defesa, como o obtido para *P. expansum* que envolve tanto alterações metabólicas como da expressão de genes (JEONG et al., 2017).

Assim os indivíduos identificados nas notas 1 e 2 de MR1 e C14 podem ser selecionados para o avanço geracional para a fixação da mutação, levando em consideração que em estudos feitos em ervilha os resultados mostraram que a mutação induzida levou a resistência a doenças e variação genética em mutantes de ervilha e, que os mutantes resistentes podem ser usados para a produção de ervilha, e o desenvolvimento de novas cultivares de ervilha resistentes (DENG et al., 2022).

As baixas frequências obtidas para os indivíduos com algum nível de tolerância com a nota 1 para C14 como para MR1 de indivíduos tratados com raios gama foram reportadas previamente para trigo, onde, um mutante apresentou resistência a oídio entre outras características agrônômicas de interesse (TULMAN et al., 1995).

Os indivíduos de MR1 com nota 1 e 2 podem ser levados para avanços de gerações e a herdabilidade desse caráter avaliada, além dos genótipos identificados molecularmente com variações. Neste sentido, os genótipos resistentes obtidos por mutagêneses podem ser considerados dentro de programas de melhoramento como novas fontes de resistência e podem ser usados em programas de reprodução, caracterização funcional e implantação de resistência (VLEESHOUWERS & OLIVER, 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Consideramos promissores o uso dos raios gama em acessos de meloeiro para obtenção de indivíduos que apresentem características de resistência, levando

em consideração que a mortalidade e sobrevivência estiveram associadas ao tratamento ($p < 0.02$).

Pelos resultados obtidos neste estudo, foi possível identificar a ocorrência de alteração no DNA das plantas irradiadas, por meio dos marcadores ISSR, identificando materiais com potencial para iniciar em programas de melhoramento genético do meloeiro. O marcador ISSR foi satisfatório na detecção da mutação.

5. REFERÊNCIAS

- AMBRÓSIO, M.M.Q. et al. Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *M. phaseolina*. **Euphytica**, Holanda, v. 206, n. 2, p. 287- 300, 2015.
- ASHRAF, M., Cheema, A. A., Rashid, M., & Qamar, Z. Effect of gamma rays on M l generation in basmati rice. **Pakistan Journal of Botany**, v. 35, n. 5; SPI, p. 791-796, 2004.
- BRASIL**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ ACS, 2009. 395 p.
- COIMBRA, J.L.M. et al. Criação de variabilidade genética no caráter ciclo vegetativo em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p.159-166, 2004.
- DENG, D. et al. **Disease Resistance and Molecular Variations in Irradiation Induced Mutants of Two Pea Cultivars**. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 8793. <https://doi.org/10.3390/ijms23158793>
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.
- DUE, M.S.; SUSILOWATI, A. & YUNUS, A.. The effect of gamma rays irradiation on diversity of *Musa paradisiaca* var. sapientum as revealed by ISSR

molecular marker. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 20, n. 5, 2019.

HAZRA, S. et al. Optimization of gamma radiation dose for induction of mutations in okra. **International Journal of Vegetable Science**, v. 27, n. 6, p. 574-584, 2021. <https://doi.org/10.1080/19315260.2021.1894626>

HORTIFRUT BRASIL: anuário 2021-2022. Piracicaba: USP, dez/2021. ISSN 1981-1837. Edição especial. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2021-perspectiva-2022.aspx>. Acesso em: 9 fev. 2023.

JEONG Rae-Dong et al. Gamma irradiation-induced disease resistance of pear (*Pyrus pyrifolia* “Niitaka”) against *Penicillium expansum*. **Journal plant Phatology**, [Volume165, Issue9](#), Pages 626-633 First published: 11 July 2017 <https://doi.org/10.1111/jph.12601>

KAUR, S. et al. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Mycrobiology**, v.38, n. 2, p.136-151, 2012.

KESH, H. & KAUSHIK, P. Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. **Scientia Horticulturae**, v. 282, p. 110045, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110045>

KHAN, M. H.& TYAGI, S. D., A review on induced mutagenesis in soybean. **Journal of Cereals and Oilseeds**, vol. 4(2), págs. 19-25. 2013. <http://dx.doi.org/10.5897/JCO10.004>

KIM, Jin-Hong, et al. Effects of gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. **Journal of Plant Biology**, 2005, 48.1: 47-56.

KOVACS, E. & KERESZTES, A. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. **Micron**. v.33, n. 2, p. 199-210, 2002.

MEDEIROS, A. C. et al. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2083>

- PAUL ERNEST, F. et al. Radiosensitivity of two varieties of watermelon (*Citrullus lanatus*) to different doses of gamma irradiation. **Brazilian Journal of Botany**, v. 43, p. 897-905, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00659-8>
- PIMENTEL, M.C.G. **Indução de aberrações cromossômicas estruturais em milho (*Zea mays* L.) por radiação gama** Viçosa, 1990. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - UFV, 1990.
- PORTO, M.A.F. **Associação de *Fusarium solani*, *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani* causando podridão radicular em meloeiro sob efeito de adubos verdes**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, 2015.
- RAINA, A., LASKAR, R. A., WANI, M. R., JAN, B. L., ALI, S., & KHAN, S. Gamma rays and sodium azide induced genetic variability in high-yielding and biofortified mutant lines in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Frontiers in plant science**, v. 13, 2022.
- REID, B. D. Gamma processing technology: an alternative technology for terminal sterilization of parenterals. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 49, n. 2, p. 83–89, 1995.
- SALES JR, R.; et al. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012.
- SILVA, J.E.S.B. et al. Tratamentos pré-germinativos de sementes de melão para produção de mudas irrigadas com água biossalina. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 84, p.1-10, 2024. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.257314>
- SINTZEL, M. B. et al. Influence of Irradiation Sterilization on Polymers Used as Drug Carriers—A Review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 9, p. 857–878, 1997.
- TÜLMANN NETO A. et al. Indução de mutação visando a redução da altura de planta e resistência às doenças no cultivar de trigo (*Triticum aestivum* L.) IAC-17. **Sci. Agric.**, Piracicaba, 52(2): 287-293. <http://old.scielo.br/pdf/sa/v52n2/14.pdf>.
- Vleeshouwers, V. G. A. A. & Oliver, R.P. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant

Pathogens. **MPMI** Vol. 27, No. 3, 2014, pp. 196–206.
<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0313-IA>

WANG, P. et al. Effect of gamma rays on *Sophora davidii* and detection of DNA polymorphism through ISSR marker. **BioMed research international**, v., 2017.