



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Eliabe David de Carvalho Costa

Análise da resistência à *Macrophomina phaseolina* em plantas mutantes de melancia

MOSSORÓ

2024

Eliabe David de Carvalho Costa

Análise da resistência à *Macrophomina phaseolina* em plantas mutantes de melancia

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

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

Co-orientador: Dra. Deisy Alexandra Rosero Alpala

MOSSORÓ

2024

© 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.

CC837 Costa, Eliabe David de Carvalho.
a Análise da resistência à *Macrophomina*
phaseolina em plantas mutantes de melancia /
Eliabe David de Carvalho Costa. - 2024.
44 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientadora: Deisy Alexandra Rosero Alpala.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2024.

1. raios gama. 2. mutação. 3. marcadores
moleculares. 4. ISSR. I. Holanda, Ioná Santos
Araújo, orient. II. Alpala, Deisy Alexandra
Rosero, 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.

Eliabe David de Carvalho Costa

Análise da resistência à *Macrophomina phaseolina* em plantas mutantes de melancia

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

Defendida em: 03 / 04 / 2024

BANCA EXAMINADORA

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

Izabelle Rodrigues Ferreira Gomes, Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

Jorge Alves da Silva Neto, Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

Aos meus pais e ao meu irmão

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu Deus por tudo quanto tem feito em minha vida, pelo sustento, pelo consolo nos momentos difíceis e pelo cuidado. Por que dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Agradeço aos meus queridos pais, Antonia Geruza de Carvalho Costa e Antonio Carlos da Costa Junior por todo amor que me deram a vida inteira, por terem sido minha bússola, que contribuíram para me tornar quem sou hoje, vocês foram essenciais para o meu crescimento pessoal, espiritual e profissional.

Agradeço ao meu irmão, Marcelo, por todos os conselhos e incentivos, você foi um grande exemplo para mim de como desenvolver meu trabalho com esforço e dedicação.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Ioná, cujo exemplo inspirador e disposição contínua para oferecer assistência foram fundamentais para o meu desenvolvimento neste trabalho. Agradeço imensamente por todo o apoio e orientação recebidos ao longo deste período.

Agradeço a Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), pela oportunidade de adquirir conhecimentos de alto nível, os quais têm me capacitado como estudante e profissional.

Agradeço a Banca Examinadora, Jorge Alves da Silva Neto e Izabelle Rodrigues Ferreira por todas as considerações para aprimoramento do trabalho.

Agradeço aos meus amigos de laboratório que conquistei durante esse tempo, Deisy Alexandra, Karem, Gilsivan, Isadora e Maria de Fátima, por toda ajuda e palavras de ânimo, e por confiarem no meu potencial.

Agradeço também a todos os meus queridos amigos da vida pelo companheirismo e por estarem ao meu lado me ouvindo e incentivando.

"O temor do Senhor é o princípio da sabedoria,
e o conhecimento do Santo a prudência."

Provérbios 9:10

RESUMO

A melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) tem grande importância econômica mundialmente e é uma das principais cucurbitáceas cultivadas globalmente, com destaque para o Nordeste brasileiro, especialmente o estado do Rio Grande do Norte, como uma região produtora significativa. No entanto, as plantações enfrentam desafios, principalmente devido a doenças fúngicas do solo, como a podridão do carvão causada por *Macrophomina phaseolina*, que pode resultar em perdas significativas na produção, além de que os tratamentos para a podridão são pouco eficazes na diminuição da doença e não são tão benéficos para as plantas. Diante disso, a indução de mutação surge como uma estratégia promissora para desenvolver variedades resistentes a esses estresses bióticos, que associado a aplicação de análises moleculares através dos marcadores moleculares, promove um detalhamento dos resultados mais aprofundado para melhoria e desenvolvimento dos estudos, desse modo, os marcadores ISSR são uma opção plausível a ser analisada por conta de sua capacidade de replicação e independência de conhecimento prévio. A pesquisa proposta teve como objetivo avaliar a resistência de melancias *Sugar baby* M2 tratadas com radiação gama ao fungo *M. phaseolina*, bem como analisar os polimorfismos genéticos associados a essas plantas mutantes por meio de marcadores moleculares ISSR. Para a primeira análise, foram utilizadas sementes de 23 linhagens mutantes de melancia, juntamente com dois controles comerciais. Após a inoculação do fungo pelo método do palito, as plantas foram mantidas por 30 dias em casa de vegetação e avaliadas quanto à incidência e severidade da doença. Para a segunda análise, foram coletadas folhas de 10 plantas de uma linhagem mutante e um grupo controle, e o DNA foi extraído pelo método CTAB. Foi realizada a triagem de 13 marcadores ISSR, e os polimorfismos foram analisados. A mutação induzida por raios gama em linhagens de melancia *Sugar Baby* mostrou efeitos promissores na promoção de resistência ao fungo *M. phaseolina*. Observou-se que a dose de 200 Gy foi eficaz na indução de tolerância em seis linhagens de melancia em comparação ao grupo controle, enquanto doses de 100 Gy, 300 Gy e 400 Gy não produziram resultados satisfatórios. Não foram observados polimorfismos neste estudo, indicando que não foi possível detectar as prováveis mutações ocorridas nas plantas a nível de DNA, sugerindo a necessidade de explorar outras técnicas de análise genética com outros marcadores, como SSR. Contudo, foi possível observar o potencial da mutação induzida por raios gama como uma estratégia viável para melhorar a resistência de culturas comerciais a patógenos, embora sejam necessárias investigações adicionais para melhor compreender os mecanismos subjacentes.

Palavras-chave: raios gama, mutação, marcadores moleculares, ISSR.

ABSTRACT

Watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) holds significant global economic importance and is one of the major cucurbits cultivated worldwide, with particular emphasis on the Brazilian Northeast, especially in the state of Rio Grande do Norte, as a significant producing region. However, plantations face challenges, mainly due to fungal soil diseases, such as charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*, which can result in significant production losses. Additionally, treatments for rot are often ineffective in reducing the disease and not very beneficial for the plants. Therefore, mutation induction emerges as a promising strategy to develop varieties resistant to these biotic stresses. When coupled with molecular analysis through molecular markers, it provides a more detailed insight for improvement and development of studies. In this regard, ISSR markers are a plausible option to be analyzed due to their replication capability and independence from prior knowledge. The proposed research aimed to evaluate the resistance of M2 *Sugar baby* watermelons treated with gamma radiation to the fungus *M. phaseolina*, as well as to analyze the genetic polymorphisms associated with these mutant plants through ISSR molecular markers. For the first analysis, seeds from 23 mutant watermelon lines were used along with two commercial controls. After fungus inoculation using the toothpick method, the plants were kept for 30 days in a greenhouse and evaluated for disease incidence and severity. For the second analysis, leaves from 10 plants of a mutant line and a control group were collected, and DNA was extracted using the CTAB method. Screening of 13 ISSR markers was performed, and polymorphisms were analyzed. Gamma radiation-induced mutation in *Sugar Baby* watermelon lines showed promising effects in promoting resistance to the fungus *M. phaseolina*. It was observed that a dose of 200 Gy was effective in inducing tolerance in six watermelon lines compared to the control group, while doses of 100 Gy, 300 Gy, and 400 Gy did not yield satisfactory results. No polymorphisms were observed in this study, indicating the inability to detect probable mutations at the DNA level, suggesting the need to explore other genetic analysis techniques with different markers, such as SSR. However, the potential of gamma radiation-induced mutation as a viable strategy to improve the resistance of commercial crops to pathogens was evident, although further investigations are required to better understand the underlying mechanisms.

Keywords: gamma radiation, mutation, molecular markers, ISSR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagens representativas de *M. phaseolina* coletadas de picnídios em melancia *Sugar baby* tratada com 200 Gy de raios gama. **A:** picnídios presentes no colo da planta; **B:** esporos visualizados em lupa..... 29
- Figura 2 - Amostras de melancia *Sugar baby* inoculadas com *M. phaseolina* após avaliação de incidência e severidade. **A:** planta da linhagem T18 resistente a *Macrophomina* sem apresentar sintomas da doença. **B:** planta do grupo controle inoculado apresentando sintomas..... 30
- Figura 3 - Gel de agarose 1,2% demonstrando os produtos da amplificação de melancias *Sugar baby* mutantes com o marcador UBC-825. M. Marcador 100 pb (DNA Ladder Plus)..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação de linhagens mutantes de melancias <i>Sugar baby</i> por genótipo	21
Tabela 2 - Identificação, sequência e temperatura de anelamento (TA) de <i>Primers</i> ISSR utilizados para a caracterização molecular de melancias <i>Sugar baby</i> mutantes da linhagem T18	25
Tabela 3 - Efeito dos raios gama sobre a incidência de podridão do carvão em cada linhagem de melancia <i>Sugar baby</i> , e diferenças estatísticas entre os grupos.....	26
Tabela 4 - Efeito dos raios gama sobre a ocorrência de severidade causada pela podridão do carvão em cada linhagem de melancia <i>Sugar baby</i> , e diferenças estatísticas entre os grupos .	27
Tabela 5 - Classificação das linhagens de melancia de acordo com a incidência e severidade ocorrida em cada grupo	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIA	Álcool clorofórmio-isoamílico
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr	Doutor
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMD50	Meia dose eficaz
EMS	Metanosulfonato de etila
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
Gy	Grays
ISSR	Repetições de sequências simples interespaçadas
LD50	Dose letal média
PCR	Reação em cadeia polimerase
RNA'se	Ribonuclease
TBE	Tris Borate Edta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Cultura da melancia	14
2.2 Resistência a doenças em melancia	15
2.3 <i>Macrophomina phaseolina</i>	16
2.4 Mutação com raios gama	17
2.5 Análises moleculares.....	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivos gerais.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Seleção do material vegetal.....	21
4.2 Plantio e manutenção de plantas em estufa.....	22
4.3 Obtenção dos fungos.....	22
4.4 Inoculação do fungo.....	22
4.5 Avaliação da severidade, incidência e reação de classe.....	22
4.6 Extração e purificação de DNA do material vegetal	23
4.7 Quantificação de DNA por eletroforese.....	24
4.8 Seleção de <i>primers</i> ISSR e reação de amplificação via PCR.....	24
4.9 Análise dos dados.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Análise da incidência, severidade e reação de classe	26
5.2 Seleção de <i>primers</i> da detecção de fontes de resistência em linhagens mutantes.....	33
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), fruto da melancieira, é caracterizada como uma das cucurbitáceas mais produzidas no mundo, com uma quantidade de 1.912.909 toneladas produzidas no Brasil no ano de 2022 (IBGE, 2022). O Nordeste brasileiro se apresenta como uma grande região produtora de melancias, tendo em vista suas condições climáticas, de luminosidade e baixa incidência de chuvas que favorecem o plantio. Além disso, o estado do Rio Grande do Norte está entre os principais estados produtores de melancia da região, com uma taxa de 204 mil toneladas (Sales Júnior, *et al.*, 2019; IBGE, 2022).

Plantações de cucurbitáceas podem ser afetadas por uma série de problemas, dentre elas a ocorrência de doenças causadas por fungos habitantes do solo, principalmente entre meloeiros e melancieiras (Silva, *et al.*, 2022). Poucas cultivares têm a capacidade de resistir a danos causados por esses fungos, pois tais fatores perturbam o sistema normal das plantas e causam condições de estresse, por isso, são definidos como estressores bióticos, além disso, os tratamentos podem ser problemáticos, visto que técnicas como fumigação do solo, solarização e manutenção da umidade do solo têm demonstrado pouca efetividade ou nenhum benefício para as plantas (Hussain, 2015; Cohen, Elkabetz & Edelstein, 2016). Nesse sentido, a *Macrophomina phaseolina* é um dos principais fungos relacionados a doenças e redução da produtividade, tanto de melão, como de melancia, e entre outras 500 espécies de plantas (Cohen, *et al.*, 2022). As doenças causadas por *M. phaseolina* são frequentemente referidas como podridão do carvão, tendo em vista o aspecto e a coloração escura dos tecidos afetados pelo fungo (Pratt, *et al.*, 1998), que é causado pela secreção de diversas enzimas e toxinas capazes de penetrar nas células vegetais e destruir os tecidos da raiz e do colo do hospedeiro (Cohen, *et al.*, 2022).

Para superar os problemas causados por fatores bióticos e contornar a falta de tratamentos eficazes, ferramentas biotecnológicas como a indução a mutação têm sido frequentemente utilizadas nesse contexto, e tem provado ser uma técnica eficiente no estudo de várias plantas modelos, além de se caracterizarem como métodos seguros e acessíveis (Bhoi *et al.*, 2022). A radiação gama é o agente mutagênico físico mais utilizado para indução à mutação. Esse método possui vantagens por ter um bom custo-benefício, ser rápido e robusto, transferível, facilmente aplicável, e ecologicamente correto (Bhoi, *et al.*, 2022; Çelik *et al.*, 2021).

Vários autores já demonstraram a eficiência da radiação gama na produção de plantas mutantes, gerando efeitos positivos contra estresses bióticos e abióticos. Ghani e Sharma (2019)

ao aplicar doses 5 Gy de raios gama em linhagens de *Gerbera jamesonii*, identificaram três plantas que apresentaram resistência moderada ao oídio. Abdoun (et al., 2022) avaliaram a resistência de plantas de grão-de-bico a estresses abióticos causados por salinidade, após aplicação de várias doses de raios gama, e identificaram que a dose de 100 Gy se mostrou a mais eficiente para gerar mutações que promovam alívio do estresse salínico.

Uma vez que são produzidas plantas resistentes a estresses bióticos através de mutação gênica, as análises moleculares são uma alternativa interessante para avaliar os efeitos dessa mutação no genoma, desta forma a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) aplicada ao estudo de marcadores moleculares são essenciais para a identificação de mutações em diversas espécies vegetais, bem como na caracterização genética e identificação de polimorfismos (Barcaccia, 2009). Exemplos de marcadores amplamente utilizados e eficientes na detecção de polimorfismos são os ISSR (Repetições de sequências simples interespaçadas), os quais podem detectar variações genéticas sem necessidade de ter conhecimento prévio da sequência específica do genoma da planta (Savitri e Fauziah, 2020), e com base nisso, tais marcadores são uma alternativa interessante para o estudo de plantas mutantes.

Desse modo, tem-se observado que os objetivos imediatos para o melhoramento da *Citrullus lanatus* estão focados na maior tolerância a estresses bióticos e abióticos. Nesse contexto, a aplicação de raios gama para gerar plantas mais resistentes a danos causados por fungos se apresenta como uma alternativa interessante para melhorar a produção de culturas de importância econômica. Portanto, esta pesquisa tem por objetivo avaliar a resistência de plantas de melancia *Sugar baby*, submetidas a tratamentos com raios gama, ao fungo *M. phaseolina*, bem como avaliar os polimorfismos gerados em amostras de plantas resistentes através da análise de marcadores moleculares ISSR.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Cultura da melancia

A cultura de melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) é de grande importância comercial, social e econômica em todo o mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção mundial de melancia em 2022 foi de cerca de 100 milhões de toneladas (Faostat, 2023).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais, com uma produção anual de mais de 1 milhão de toneladas, sendo o Rio Grande do Norte o maior produtor do Nordeste brasileiro, com um valor de produção de mais de 100 mil reais (IBGE, 2022). Os frutos de melancia podem ser produzidos e comercializados em diferentes tamanhos, que variam de pequenos (caixa de gelo) a gigantes; e diferentes formatos, que podem ser redondos, ovais, quadrados ou alongados (Wehner, 2008).

As condições de plantio da melancia podem variar de acordo com a região e clima. Variantes de melancias selvagens já demonstraram ser capazes de tolerar condições de maiores estresses abióticos como seca, altas temperaturas e salinidade em regiões desérticas, como relatado por Malambane (*et al.*, 2023) no sul da África. Já no Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, o cultivo adequado se deve às condições edafoclimáticas, que envolvem alta incidência de luz, baixa ocorrência de chuvas e clima seco (Sales Júnior, *et al.* 2019). Além disso, o cultivo adapta-se bem a solos de textura média, desde que esses solos apresentem boa drenagem e fertilidade adequada, assim como também é possível cultivar a melancia em solos com baixa capacidade de retenção de água e fertilidade reduzida, porém, é necessário que sejam reforçadas as irrigações e fertilizações de maneira adequada, a fim de atender às necessidades hídricas e nutricionais da planta (Souza e Santos, 2019).

Outro ponto importante consiste na diversidade genética das melancias, a qual tem sido amplamente estudada em diversos cultivares. Em um estudo recente, Pal (*et al.*, 2020) analisaram a diversidade genética e estrutura populacional de um banco de germoplasma compreendendo 336 acessos de melancias *Citrullus* sp. na Índia, com o auxílio de marcadores moleculares, onde foi possível encontrar 69 alelos, com uma média de 3 alelos por *locus*, indicando uma alta diversidade genética dentro do país. No Brasil, a variabilidade genética de melancias também tem sido objetivo de muitas pesquisas. Em um estudo realizado por pesquisadores da Embrapa, foi relatado uma alta variabilidade genética entre 40 acessos de

melancia de oito regiões do Nordeste brasileiro, onde foi possível encontrar 41 alelos através da aplicação de 13 marcadores microssatélites (Gama *et al.*, 2013). Além disso, o Nordeste é considerado um centro secundário de diversidade de melancias no mundo inteiro, ficando somente atrás da África, em razão de fatores históricos, genéticos e ecológicos que levaram a amplificação da variabilidade da melancia na região (Romão, 2000).

Nesse contexto, o cultivo da variante de melancias conhecida como “*Sugar baby*” ou mini melancias tem ganhado espaço no mercado brasileiro de frutas, sendo considerada uma opção lucrativa para pequenos produtores rurais, os quais são muito frequentes em regiões semiáridas do Nordeste (Souza, Nunes e Zonta, 2019). Desse modo, devido ao grande potencial apresentado pelo cultivo de melancia *Sugar baby* no mercado, tem-se avaliado o desempenho agrônomo e a qualidade pós-colheita das minis melancias cultivadas em diferentes regiões do país, após diversos tratamentos para controlar a fitossanidade e adaptar cultivares às condições locais para o sucesso do cultivo (Cova, *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2021; Silva, *et al.*, 2021; Silva, *et al.*, 2022).

2.2 Resistência a doenças em melancia

Um problema recorrente na cultura de melancias consiste na ocorrência de doenças que atrapalham o desenvolvimento das plantas e causam perdas na produção. Essas doenças podem afetar qualquer parte das plantas e podem ser mais agressivas quando atacam as mudas prematuramente (Damicone e Brandenberger, 2020). No Brasil, a ocorrência de doenças é facilitada devido às condições climáticas e períodos de produções nos quais as melancias são cultivadas (Sales Júnior, *et al.*, 2010).

Por conseguinte, sabe-se que as doenças importantes que são ocasionadas em melancias são: manchas foliares, ferrugem de folha, antracnose, oídio, mancha bacteriana de frutas, míldio, murcha de fusário, ferrugem gomosa do caule, doenças virais, videira amarela, nematoide das galhas, murcha de *Verticillium* e podridão do carvão (Sales Júnior, *et al.*, 2019; Damicone e Brandenberger, 2020). Ademais, as principais estratégias para combater e gerir os cultivos infectados por tais doenças, que variam entre métodos químicos e físicos, são: rotação de culturas, enxertia, culturas de cobertura, consorciação, solarização do solo, correções do solo, controle biológico, fumigação do solo, fungicida, sementes e transplantes livres de patógenos, e escotismo. Vale salientar que a introdução de linhagens resistentes a patógenos se caracteriza como um dos métodos mais eficientes e econômicos em termos de controle de doenças (LI *et al.*, 2019; Damicone e Brandenberger, 2020; Rahman *et al.*, 2021). Nesse

contexto, Jiang *et al.* (2022) descreveram e caracterizaram a expressão de alguns genes que podem estar envolvidos com a resistência de melancias a várias doenças, sendo eles: *CIN1-YB8*, *CIN1-YA3*, *-YB1*, e *-YC4*, cuja super-expressão pode levar a maior resistência contra *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

É importante ressaltar que a resistência a doenças é uma característica importante para a produção de melancias, e que o conhecimento dos mecanismos que promovem essa resistência, bem como o emprego de estratégias que produzam melancias mais resistentes, por exemplo, a mutagênese, pode ser utilizada para o desenvolvimento de variedades de melancias mais resistentes a doenças e que atendam aos interesses do mercado (Marquez *et al.*, 2021).

2.3 *Macrophomina phaseolina*

Dentre as doenças que afetam cultivares de melancia, uma que se destaca é a podridão do carvão causada pelo fungo *M. phaseolina*, o qual é um habitante do solo e que provoca danos significativos a mais de 500 espécies de plantas (Marquez *et al.*, 2021; Cohen *et al.*, 2022). A presença de *M. phaseolina* em cultivos de melancia já foi registrada por diversos autores em várias partes do mundo (Apablaza *et al.*, 1993; Fujinaga *et al.*, 2002; Pisani *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2022), e essa doença pode ser desenvolvida nas plantas devido a condições ambientais favoráveis ao fungo e condições estressantes às plantas, como alta temperatura e baixa umidade do solo, aglomeração de mudas, ferimentos nas plantas, floração ou enchimento de sementes (Canaday *et al.*, 1986). Além da podridão do carvão, esse patógeno também é capaz de causar outras doenças como o cancro do caule, ferrugem das mudas, podridão seca da raiz, murchamento, ferrugem das folhas, ferrugem do caule e tombamento em pré-emergência e pós-emergência (Singh, Nene e Reddy, 1990). O mecanismo de ação pelo qual *M. phaseolina* consegue penetrar nas células das plantas com eficiência se dá pela secreção de enzimas endoglucanases, as quais são codificadas pelos genes *egl1* e *egl2*, sendo que a endoglucanase *egl1* possui a característica de não ter o domínio de ligação à celulose, o que aumenta a especificidade do substrato para incorporar celulose microcristalina (Kaur *et al.*, 2012).

Além das enzimas, *M. phaseolina* também é capaz de secretar toxinas e metabólitos fitotóxicos (Bhattacharya *et al.*, 1992), os quais, em melancia, são mais agressivos que as enzimas, já que se trata de plantas com caules inferiores mais duros e compactos, levando ao murchamento da planta, com podridão menos perceptível (Cohen *et al.*, 2022). Com o reconhecimento da importância da *M. phaseolina* na cultura da melancia, é importante a

elaboração de estratégias de controle para combater os danos significativos causados por este patógeno, o qual afeta o crescimento e a produtividade da planta.

2.4 Mutação com raios gama

A mutação por raios gama é uma técnica utilizada para indução de mutações em plantas visando a obtenção de novas variedades com características desejáveis, a qual é amplamente utilizada como alternativa ao melhoramento genético tradicional, uma vez que ele é demorado e de alto custo (Riviello-Flores *et al.*, 2022). Esta técnica se utiliza do agente mutagênico físico mais aplicado, por possuir alto grau de reprodutibilidade e precisão, e alta capacidade de penetração (Bhoi *et al.*, 2022), e tem sido utilizada como ferramenta para melhoramento genético em plantas ornamentais, medicinais e aromáticas (Agrawal e Kumar, 2021). Além disso, são utilizados para modificar características específicas em frutos, tais como tempo de floração, tamanho e coloração dos frutos, morfologia, ausência ou redução do número de sementes, níveis de ploidia, entre outros (Maurya *et al.*, 2022). Outra aplicação importante da mutagênese por raios gama consiste na produção de frutos com maior resistência a estresses bióticos e abióticos. O método tem sido amplamente empregado nesse contexto e vários trabalhos já foram realizados com esse intuito, tendo eles alcançado resultados promissores (Oloriz *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado por Hassine (*et al.*, 2022), investigou-se o efeito da mutação por raios gama na resistência do trigo duro (*Triticum turgidum ssp durum*) contra doenças causadas por *Septoria tritici*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* e *P. triticina*, e foi verificado que a dose ideal para conferir efeitos positivos nas plantas mutantes G5 foi de 150 Gy. Abdoun (*et al.*, 2022), também descrevem os efeitos de várias doses de raios gama sobre o estresse por salinidade de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.), demonstrando que a dose de 100 Gy aliviou os impactos da salinidade em uma concentração de 25 mM NaCl. Além disso, o uso de radiação gama também demonstrou ser eficiente na resistência da gérbera (*Gerbera jamesonii*) contra o fungo causador de oídio (*Oidium crysiphoides* f. sp.), a partir da aplicação da dose 5 Gy (Ghani e Sharma, 2019).

A melancia também tem sido objeto de estudo na aplicação de raios gama. Ernest (*et al.*, 2020) ao investigarem a radiosensibilidade de duas variantes de melancia, observaram que a dose letal (LD50) para as duas variantes consistia em 225,40 e 221,56 Gy, a fim de estabelecer um critério para produzir melancias mutantes sem que haja uma grande perda ou que os resultados sejam indesejáveis. Semelhantemente, outros autores também investigaram o efeito

dos raios gama na germinação de sementes de melancia, bem como determinaram a dose de mutação eficaz (EMD50), e foi relatado que a dose ideal de raios gamas para germinar as sementes em um período de 10 dias foi de 150 Gy, enquanto a dose de 278 Gy foi determinada como a EMD50. Entretanto, Há uma ausência de estudos relacionados a aplicação de raios gama voltados para indução de resistência de melancieiras a fungos de solo, o que destaca a importância deste trabalho para investigar o potencial dessa técnica nas plantas de melancia.

Desse modo, a mutação por raios gama tem se mostrado uma técnica eficiente para o melhoramento genético de várias espécies de plantas, permitindo a obtenção de novas variedades com características desejáveis, como a maior resistência a estresses bióticos e abióticos e características fenotípicas interessantes para o mercado, levantando a hipótese de que esse método é uma alternativa interessante para o melhoramento genético de melancias, no intuito de torna-las mais resistentes a doenças.

2.5 Análises moleculares

As análises moleculares representam uma eficiente ferramenta no estudo da genética molecular, permitindo à amplificação específica de segmentos de DNA (ácido desoxirribonucleico) e a análise de marcadores específicos envolvidos na diversidade genética de várias espécies de plantas (Pandey *et al.*, 2019). Essas técnicas desempenham um papel fundamental na caracterização genética de organismos e na descoberta de polimorfismos em plantas (Barcaccia, 2009). Com o avanço das técnicas genômicas contemporâneas e o progresso no estudo dos marcadores moleculares, as oportunidades na criação de mutações estão significativamente expandidas, além disso, no âmbito dos programas de melhoramento genético por meio de mutações, é crucial avaliar a variabilidade genética resultante da ação dos mutagênicos, visando a utilização otimizada dos recursos genéticos disponíveis. Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares oferece uma abordagem precisa e eficiente para identificar e caracterizar variações genéticas, fornecendo informações valiosas para a pesquisa e melhoramento genético de plantas (Raina *et al.*, 2020).

Nesse contexto, os marcadores ISSR são reconhecidos como a ferramenta mais eficiente para estudar a diversidade genética, devido às suas vantagens de custo acessível, facilidade de uso, capacidade de replicação e independência de conhecimento prévio. Devido à sua elevada variabilidade genética, os marcadores ISSR são extensamente utilizados. Além disso, esses marcadores podem identificar variações genéticas sem precisar reconhecer a sequência específica de bases no genoma da planta, contanto que as sequências repetidas estejam

distribuídas de forma abrangente e uniforme por todo o genoma (Satish *et al.*, 2015; Savitri e Fauziah, 2020).

Autores já têm corroborado essas ideias ao analisar marcadores ISSR em diferentes tipos de planta. Savitri e Fauziah (2020), aplicaram o método de indução a mutação por raios gama e EMS (metanosulfonato de etila) em plantas de soja preta e avaliaram sua diversidade genética utilizando marcador molecular ISSR, com os *primers* UBC 810, UBC 811, UBC 812, UBC 828 e K18, os quais conseguiram amplificar com sucesso e demonstraram sua diversidade genética, indicando que o tratamento com irradiação por raios gama resultou em um maior grau de polimorfismo do que o controle e o tratamento com EMS. Também foi possível observar em outros experimentos a capacidade de detectar polimorfismos presentes em cultivos de bananeiras (*Musa paradisíaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) que foram submetidas a tratamentos com radiação gama, utilizando seis *primers* para marcadores ISSR (ISSR 835, ISSR 836, ISSR 846, ISSR 847, ISSR 848 e ISSR 855), dos quais apenas 2 foram capazes de detectar polimorfismo acima de 50% (DUE *et al.*, 2019). A detecção de polimorfismo também foi verificada em uma pesquisa realizada com plântulas de morangueiro induzidas a mutação por raios gama, aplicando-se a técnica de PCR para analisar marcadores ISSR, onde foi demonstrado que 93,36% das 192 bandas avaliadas eram polimórficas, e a média dos valores para o grau de polimorfismo constatou o valor de 0,48 por *primer* (Asirah *et al.*, 2022).

Marcadores ISSR também já foram analisados em melancieiras para identificar polimorfismos e avaliar diversidade genética para agrupar os diferentes tipos de melancia de acordo com suas características agromorfológicas. Soghani *et al.* (2018) avaliaram a diversidade genética de 38 ecótipos de melancias e detectaram a presença de 89 bandas polimórficas utilizando 11 *primers* (UBC811, UBC812, UBC813, UBC815, UBC816, UBC817, UBC823, UBC824, UBC825, UBC826 e UBC876). Pandey *et al.* (2019) também aplicaram análises moleculares para avaliar polimorfismo em 25 genótipos de melancia utilizando marcadores ISSR (ISSR M1, ISSR M2, ISSR M3, ISSR M6, ISSR M8, ISSR M9, ISSR M11, ISSR M12, ISSR M18 e ISSR F3) e detectaram 95,4% de polimorfismo.

Tendo em vista os resultados satisfatórios para detecção de polimorfismos em diversos tipos de plantas, incluindo melancieiras, este trabalho também visa a utilização de *primers* para marcadores ISSR no intuito de identificar os polimorfismos presentes no genoma de melancias *Sugar baby* mutantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a resposta de linhas mutantes M2 de melancia *Sugar baby* quanto a resistência ao fungo *Macrophomina phaseolina* visando a seleção de linhas promissoras.

3.2 Objetivos específicos

- Observar a resposta de linhas mutantes M2 de melancia ao fungo *M. phaseolina*;
- Quantificar o nível de tolerância das linhas mutantes comparadas ao controle;
- Selecionar os materiais promissores com algum nível de tolerância para analisar presença de polimorfismos através de marcadores moleculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção do material vegetal

Foram utilizadas sementes de 23 linhagens mutantes de melancia (M2) do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV) da UFERSA, e dois grupos controles de linhagens comerciais da variedade *Sugar baby* não mutantes. As sementes mutantes são provenientes de melancias M1, cujas sementes foram submetidas a radiação gama oriunda de Cobalto-60 (^{60}Co), tipo Gammacell-220, com quatro doses (Y1=100, Y2=200, Y3=300 e Y4=400Gy). O processo de melhoramento está representado na tabela 1. Foram semeadas 10 sementes por linhagem tratada com raios gama e 10 de cada grupo controle pelo método de cultivo direto, formando 230 plantas mutantes e 20 plantas não mutantes, com um total de 250 unidades experimentais.

Tabela 1 - Identificação de linhagens mutantes de melancias *Sugar baby* por genótipo

Tratamento	Genótipos	Dose de raios gama (Gy)	Peso do fruto (g)
T1	Y1R3p8	100	174,4
T2	Y1R3p15	100	135,1
T3	Y1R4p18	100	287,7
T4	Y2R1p5	200	378,4
T5	Y2R1p9	200	273,3
T6	Y2R2p13	200	220,7
T7	Y2R2p24	200	128,3
T8	Y2R2p25	200	177,5
T9	Y2R3p2	200	243,3
T10	Y2R3p4	200	393,1
T11	Y2R3p7	200	300,0
T12	Y2R3p8	200	200,0
T13	Y2R3p10	200	317,6
T14	Y2R3p11	200	316,7
T15	Y2R3p16	200	307,1
T16	Y2R3p21	200	265,8
T17	Y2R3p25	200	461,1
T18	Y2R4p10	200	279,0
T19	Y2R4p13	200	297,7
T20	Y2R4p21	200	89,5
T21	Y3R4p1	300	104,6
T22	Y4R1p1	400	100,0
T23	Y4R1p4	400	330,0

Fonte: Elaboração do autor, 2024

4.2 Plantio e manutenção de plantas em estufa

As sementes foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 seg, e em água esterilizada por 15 seg. Após a lavagem das sementes em água esterilizada, foram secas em temperatura ambiente e semeadas em vasos de 700 mL contendo solo + substrato (Tropstrato). Uma semente por linhagem mutante foi semeada em cada vaso contendo a mistura de solo e substrato na proporção 2:1. As plantas foram irrigadas diariamente de acordo com sua necessidade e com a temperatura ambiente.

4.3 Obtenção dos fungos

Foram utilizados isolados de *Macrophomina phaseolina* A5P4 do acervo do Laboratório de Fitopatologia da UFERSA, previamente coletados de melancieiras em áreas produtoras do estado do Rio Grande do Norte - Brasil. Os isolados foram inoculados conforme metodologia descrita por Ambrósio (*et al.*, 2015).

4.4 Inoculação do fungo

Trinta dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas pelo método do palito (Ambrósio *et al.*, 2015), que consistiu em alocar palitos em placa de petri contendo meio de cultivo para crescimento de fungo, onde posteriormente foi inserido uma ponta de palito coberta com micélios e microescleródios do isolado da *M. phaseolina* no caule de cada planta, 1 cm acima do solo. Palitos não infestados e autoclavados foram usados como controles negativos. Outros palitos infestados foram utilizados como controle positivo em melancias *Sugar baby* não mutantes. As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias e posteriormente avaliadas quanto à sua severidade (Adaptado por Ambrósio *et al.*, 2015).

4.5 Avaliação da severidade, incidência e reação de classe

As plantas foram retiradas da casa de vegetação após 30 dias da inoculação artificial, e avaliadas quanto à incidência e severidade da doença e a duração do dano. Para a avaliação da incidência, foi considerada a ausência e presença de sintomas em cada planta de cada grupo e estabelecida uma porcentagem. Para a avaliação da severidade, uma escala de progressão da doença foi considerada para cada planta, onde 0 = assintomático, 1 = 3% tecidos infectados, 2

= 10% tecidos infectados, 3 = 25% tecidos infectados, 4 = 50% tecidos infectados e 5 = mais de 75% dos tecidos infectados (Ambrósio *et al.*, 2015).

Além disso, foi calculada a média de acordo com a severidade da doença para cada genótipo mutante a ser classificado de acordo com a reação, onde foram consideradas cinco classes de reação: 0 = imune; 0,1 a 1,0 = muito resistente; 1,1 a 2,0 = moderadamente resistente; 2,1 a 4,0 = suscetível e 4,1 a 5,0 = altamente suscetível (Salari *et al.*, 2012).

4.6 Extração e purificação de DNA do material vegetal

Uma planta do grupo T18, sem sintomas de podridão de carvão foi selecionada para avançar à fase de frutos, com intenção de coletar suas sementes e semeá-las em campo para análise genética e seleção de *primers* de resistência polimórficos. O DNA genômico foi extraído de folhas de *C. lanatus* M3 do grupo T18 e do grupo controle, ambos não inoculados, usando o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990). As folhas foram maceradas em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido e transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 800 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB, 1%PVP, 0,2% β-Mercaeptoetanol e água Milli-Q) em cada tubo e aquecidos em banho-maria a 60 °C por 40 min, sendo vertidos a cada 10 minutos.

Posteriormente, foi adicionado 800 µL de clorofórmio álcool isoamílico (CIA) às amostras, as quais foram vertidos novamente e centrifugadas por 8 min a 10.000 RPM. Em seguida, a fase aquosa superior de cada tubo foi transferida para novos tubos, onde foi adicionado novamente 800 µL de CIA e repetido o processo de centrifugação. Após isso, o sobrenadante foi transferido para novos Eppendorfs, onde foram adicionados 2/3 de isopropanol gelado e depositados no freezer pelo período overnight. Ao retirar as amostras do freezer, elas foram centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores por 10 min para formação do pellet compactado no fundo do tubo, desse modo, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% para primeira lavagem do material precipitado, logo em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente por 5 min e foi realizada a segunda lavagem com 1 mL de etanol 90%, para também serem centrifugadas por 5 min.

Com a finalização da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram postas para secar. Após a secagem, foi adicionado 50 µL de RNA'se (45 µL de água Milli-Q + 5 µL RNA'se) aos tubos, os quais foram incubados em banho-maria a 37 °C por 30 min.

4.7 Quantificação de DNA por eletroforese

Para a quantificação, as amostras foram aquecidas em banho maria a 60°C por 15 min e homogeneizadas com auxílio do vórtex. Em seguida, 2 mL de solução contendo DNA foram coletados e depositados em placa com adição de 2 mL de *Gel Loading Dye Blue*. Logo após, foi realizada a preparação do gel para eletroforese utilizando 1 g de agarose + 100 mL tampão TBE 1x pH 8,0, onde foi adicionado 5 µL de brometo de etídio. Posteriormente, em uma cuba foi inserido um pente e depositado sobre a mesma a solução de agarose, onde a eletroforese foi posta para correr em 30 min. Após esse tempo, as amostras foram levadas para análise em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP).

4.8 Seleção de *primers* ISSR e reação de amplificação via PCR

Foi conduzido um teste preliminar de polimorfismo utilizando 12 marcadores ISSR (conforme Tabela 2) empregando a técnica de PCR, com o intuito de selecionar os *primers* que apresentaram os melhores padrões de amplificação. Os marcadores ISSR escolhidos durante o teste de polimorfismo foram então empregados na amplificação do DNA de todos os acessos em estudo.

As reações de amplificação utilizando os marcadores ISSR foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo tampão 10x, MgCl₂ a 10 mM, *primer* a 10 pmol, dNTPs a 10 mM, 1 U de Taq DNA polimerase e 20 ng de DNA. As amostras foram submetidas à amplificação em um termociclador (Nexus, Eppendorf), seguindo a seguinte programação: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a uma temperatura variando entre 47°C e 58°C por 45 segundos (dependendo do *primer* utilizado), extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), contendo brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/mL, e foram visualizados sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP). O marcador de peso molecular utilizado foi o "DNA Ladder Plus" de 100 pb (Sinapse Biotecnologia).

Tabela 2 – Identificação, sequência e temperatura de anelamento (TA) de *Primers* ISSR utilizados para a caracterização molecular de melancias *Sugar baby* mutantes da linhagem T18

Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-----3')	TA (°C) ¹
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	47,6
UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	45,2
UBC-825	ACACACACACACACT	45,2
UBC-826	ACACACACACACACC	47,6
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAYC	49,5
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAYA	47,3
UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAYT	47,3
UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAYC	49,5
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAYG	49,5
UBC-846	GAGAGAGAGAGAGAA	45,2
UBC-866	CTCCTCCTCCTCCT	52,4
UBC-889	DBDACACACACACAC	46

Fonte: Elaboração do autor, 2024

4.9 Análise dos dados

Para os dados da incidência, severidade e classe de reação foi realizado uma análise de variância por ranks unidirecionais e uma comparação de médias pelo teste não paramétrico de Krukal-wallis através do software Statgraphics centurión 19. Os resultados foram expressos em média, considerando $p < 0,0001$. Para as análises moleculares os dados foram analisados quanto a presença ou ausência de bandas entre os indivíduos analisados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da incidência, severidade e reação de classe

Na análise da incidência da podridão do carvão em melancias *Sugar baby* foi verificado que seis linhagens dos grupos que receberam doses de 200 Gy de raios gama apresentaram os melhores resultados, sem nenhuma incidência da doença sobre as plantas, semelhantes ao controle não inoculado. Esses grupos consistiram nos tratamentos T13, T14, T15, T16, T17 e T18. Os grupos que apresentaram o menor desempenho, com alta incidência entre as plantas, semelhante ao controle inoculado, consistiram nos tratamentos T6, T7, T10 e T12, os quais também receberam doses de 200 Gy; T21, que recebeu dose de 300 Gy; T22 e T23, os quais foram tratados com doses de 400 Gy. Já as linhagens que receberam doses de 100 Gy (T1, T2 e T3), também apresentaram incidência da doença, sendo que o tratamento T2 também foi semelhante ao controle inoculado, e as outras duas linhagens iguais estatisticamente a outros grupos que receberam dose de 200 Gy. Os respectivos resultados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Efeito dos raios gama sobre a incidência de podridão do carvão em cada linhagem de melancia *Sugar baby*, e diferenças estatísticas entre os grupos

Tratamento	Incidência	Ranks	Grupo
T1	70,00	140,50	cd
T2	90,00	165,50	de
T3	70,00	140,50	cd
T4	10,00	75,50	ab
T5	20,00	85,50	abc
T6	100,00	210,50	e
T7	100,00	210,50	e
T8	60,00	115,50	bcd
T9	30,00	100,50	bc
T10	100,00	210,50	e
T11	70,00	140,50	cd
T12	100,00	210,50	e
T13	0,00	35,50	a
T14	0,00	35,50	a

T15	0,00	35,50	a
T16	0,00	35,50	a
T17	0,00	35,50	a
T18	0,00	35,50	a
T19	70,00	140,50	cd
T20	30,00	100,50	bc
T21	100,00	210,50	e
T22	100,00	210,50	e
T23	100,00	210,50	e
Controle +	0,00	35,50	a
Controle -	100,00	210,50	e
Faixa média	gl	C	p
24	0,94	234,17	<0,0001

Fonte: Elaboração do autor, 2024

Quanto a análise da severidade, os resultados estão descritos na tabela 4. A partir da avaliação da incidência, foi possível identificar que as linhagens que apresentaram os melhores resultados, sem nenhuma severidade nos sintomas da doença, consistiram nos grupos T13, T14, T15, T16, T17 e T18, assemelhando-se ao controle não inoculado. Todos esses grupos foram tratados com doses de 200 Gy. Já outras linhagens (T7 e T10), também tratadas com a mesma dose de raios gama, apresentaram sintomas da doença, e apresentaram níveis de severidade semelhantes ao controle inoculado. As linhagens tratadas com 100 Gy (T1, T2 e T3), 300 Gy (T21) e 400 Gy (T22 e T23) também apresentaram níveis de severidade, assemelhando-se tanto ao controle inoculado como a outras linhagens tratadas com 200 Gy.

Tabela 4 - Efeito dos raios gama sobre a ocorrência de severidade causada pela podridão do carvão em cada linhagem de melancia *Sugar baby*, e diferenças estatísticas entre os grupos

Tratamento	Severidade	Ranks	Grupo
T1	0,90	146,60	cde
T2	1,40	181,85	de
T3	0,90	146,60	cde
T4	0,50	78,50	ab
T5	0,20	80,90	ab

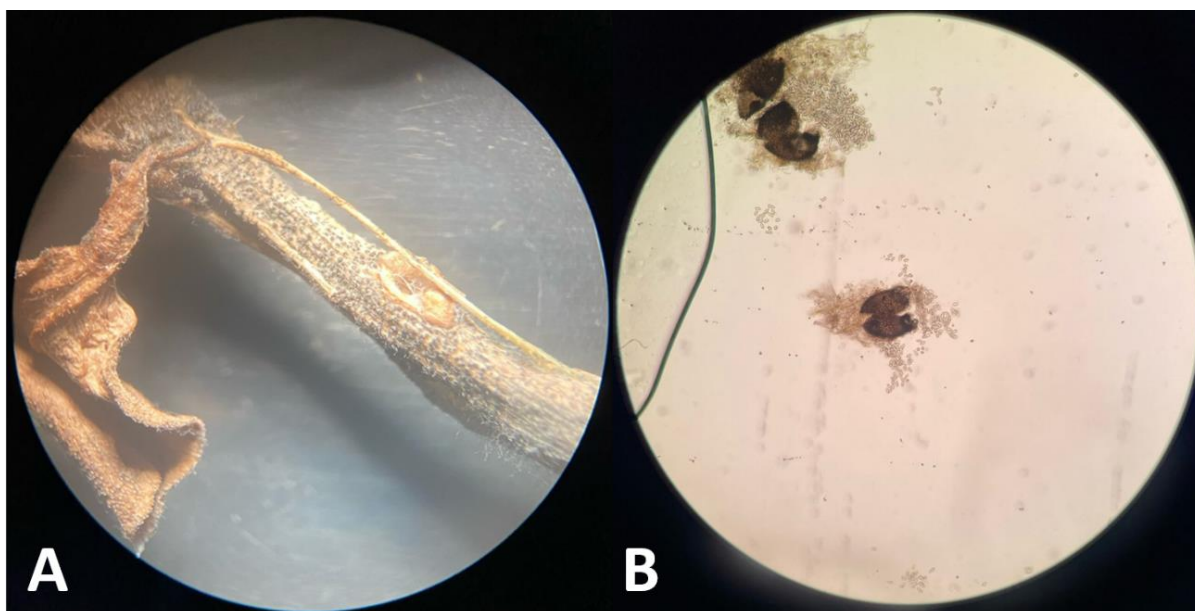
T6	1,20	178,70	de
T7	1,60	194,20	e
T8	0,70	129,80	bcd
T9	0,30	91,60	abc
T10	1,50	197,00	e
T11	0,70	134,40	bcd
T12	1,20	174,25	de
T13	0,00	59,50	a
T14	0,00	59,50	a
T15	0,00	59,50	a
T16	0,00	59,50	a
T17	0,00	59,50	a
T18	0,00	59,50	a
T19	1,20	148,80	cde
T20	0,30	91,60	abc
T21	1,10	172,60	de
T22	1,50	186,85	de
T23	1,50	192,55	de
Controle +	0,00	59,50	a
Controle -	1,60	194,20	e
Faixa média	gl	C	p
24	0,84	137,56	<0,0001

Fonte: Elaboração do autor, 2024

A severidade da doença nas plantas foi avaliada em cada uma e atribuída uma nota em uma escala de 1 a 5, sendo 5 a nota referente à maior severidade. Nesse contexto, a figura 1A demonstra um exemplo de uma planta do grupo T4 que, antes de completar o período de 30 dias na casa de vegetação, apresentou estágio avançado da doença, chegando a morrer. É possível notar a presença de muitos picnídios de *M. phaseolina* no colo da planta, indicando que a planta já estava apodrecida e morta. Alguns picnídios foram alocados em lâmina e observados na lupa, para visualização dos esporos do fungo, como mostra a figura 1B. O grupo T4 apresentou baixos níveis de severidade entre as plantas, exceto por uma única planta que registrou uma severidade de nota 5. Isso pode ser atribuído à susceptibilidade genética específica dessa planta, que se diferencia das demais do mesmo grupo devido a mutações

ocorridas de maneira aleatória. Além disso, variações ambientais, como variações na temperatura, umidade do solo ou exposição à luz, podem ter influenciado a capacidade da planta de resistir à infecção, ou ainda ter comprometido seu sistema imunológico.

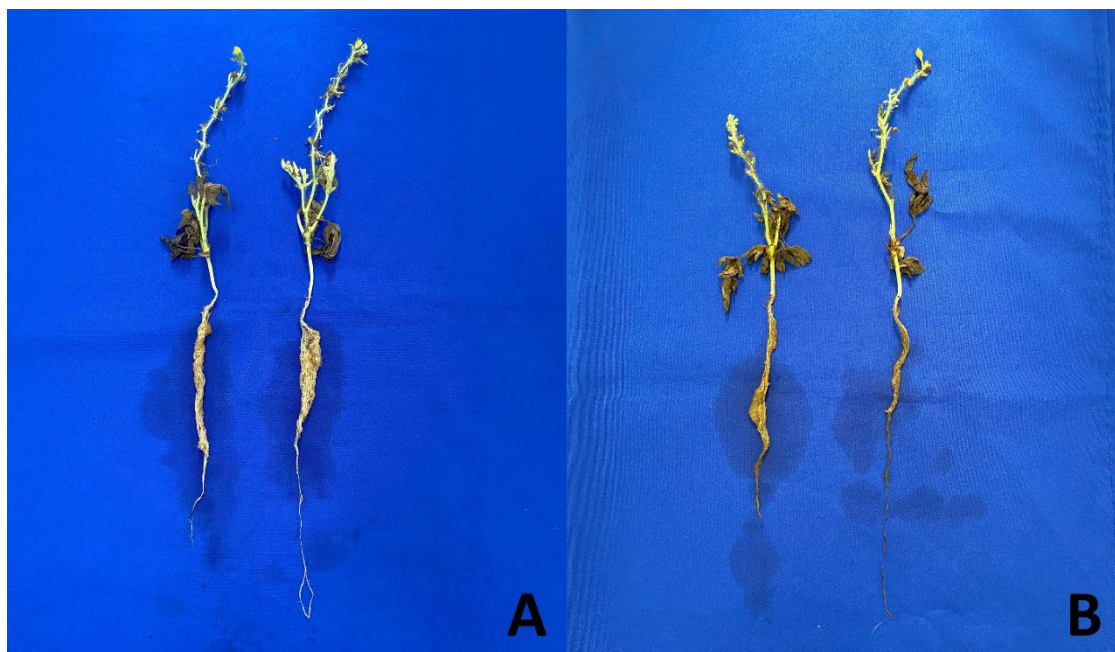
Figura 1 - Imagens representativas de *M. phaseolina* coletadas de picnídios em melancia *Sugar baby* tratada com 200 Gy de raios gama. **A**: picnídios presentes no colo da planta; **B**: esporos visualizados em lupa



Fonte: Registros do autor, 2024

A figura 2 demonstra um exemplo de planta da linhagem T18 inoculada com *M. phaseolina*, porém sem ocorrência de morte da planta ou aparição de sintomas da doença antes de 30 dias de permanência na casa de vegetação, tal exemplo não apresentou níveis de severidade, diferenciando-se do grupo controle inoculado (figura 2B), o qual possuiu lesões no colo e raízes mais escuras. Pode-se observar que as plantas das linhagens que não apresentaram incidência de podridão ou progressão de sintomas possuíam o estado do seu colo íntegro, sem manchas ou feridas externas.

Figura 2 - Amostras de melancia *Sugar baby* inoculadas com *M. phaseolina* após avaliação de incidência e severidade. **A:** planta da linhagem T18 resistente a *Macrophomina* sem apresentar sintomas da doença. **B:** planta do grupo controle inoculado apresentando sintomas



Fonte: Registros do autor, 2024

Neste estudo, foi verificado que todas as linhagens que não apresentaram incidência possuíram nenhum grau de severidade, o que pode ter sido causado por mudanças metabólicas ou indução da expressão de genes de defesa, como os genes que estão envolvidos na atividade enzimática de β -1,3-glucanase, fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO) (Jeong *et al.*, 2017). Além disso, a defesa de planta contra patógenos também está relacionada com o acúmulo de compostos fenólicos, os quais participam de uma variedade de processos que impedem o crescimento e desenvolvimento de patógenos e estão envolvidos em reações de defesa em várias partes da planta, como folhas, caules e raízes, tanto de forma localizada quanto sistêmica (Daayf *et al.*, 2012).

A partir das notas atribuídas às plantas durante a avaliação da severidade, a média dessas notas foi calculada e utilizada para definir as classes de cada tratamento, a fim de detalhar o nível de resistência das plantas. A análise estatística demonstrou que as mesmas linhagens que não apresentaram incidência ou níveis de severidade da doença (T13, T14, T15, T16, T17 e T18) também se classificaram como imunes, uma vez que obtiveram nota 0, assemelhando-se ao controle não inoculado. Apenas o grupo T7 foi semelhante estatisticamente ao controle

inoculado, apresentando um nível moderado de susceptibilidade à *M. phaseolina*, como descrito na tabela 5.

Tabela 5 - Classificação das linhagens de melancia de acordo com a incidência e severidade ocorrida em cada grupo

Tratamento	R.C.	Ranks	Grupo
T1	0,90	140,50	cdef
T2	1,40	195,50	fgh
T3	0,90	140,50	cdef
T4	0,50	105,50	bcd
T5	0,20	75,50	ab
T6	1,20	175,50	efg
T7	1,60	240,50	h
T8	0,70	120,50	bcd
T9	0,30	90,50	abc
T10	1,50	215,50	gh
T11	0,70	120,50	bcde
T12	1,20	175,50	efg
T13	0,00	35,50	a
T14	0,00	35,50	a
T15	0,00	35,50	a
T16	0,00	35,50	a
T17	0,00	35,50	a
T18	0,00	35,50	a
T19	1,20	175,50	efg
T20	0,30	90,50	abc
T21	1,10	155,50	defg
T22	1,50	215,50	gh
T23	1,50	215,50	gh
Controle +	0,00	35,50	a
Controle -	1,60	240,50	h
Faixa média	gl	C	p
24	0,97	242,10	<0,0001

Fonte: Elaboração do autor, 2024

Os resultados deste trabalho mostraram que a geração M2 de *Sugar baby* avaliada em sua resposta contra infecção por *M. phaseolina* apresentou seis grupos onde foi induzida tolerância e foram classificados como imunes, as quais receberam tratamento com 200 Gy, enquanto doses superiores ou inferiores não foram suficientes para gerar mutações satisfatórias, demonstrando que uma dose intermediária pode ser eficiente para gerar alterações no cultivo de melancia.

Entretanto, outros grupos tratados com 200 Gy também foram suscetíveis à podridão do carvão, que pode ter ocorrido por conta da variação de radiosensibilidade influenciada por fatores genéticos existentes em diferentes plantas, onde a radiação pode atingir regiões da dupla-hélice que não são rapidamente reparadas e resultam em mutações detectáveis ou são reparadas e resultam em mutação nenhuma (Sigurbjörnsson, 1983), um fato que associado a aleatoriedade das mutações geradas pela irradiação, leva a concluir que as alterações genotípicas e fenotípicas podem variar de planta para planta, mesmo tendo recebido a mesma dose de raios gama.

Outra explicação para esses resultados envolve a quantidade eficaz de radiação gama para combater doenças em plantas, que pode variar conforme o tipo específico de patógeno vegetal e pela capacidade de tolerância à radiação do material vegetal em questão (Zulkifli *et al.*, 2023).

Os dados de tolerância deste estudo corroboram com os resultados encontrados por Nikiema (*et al.*, 2020), ao aplicarem diferentes doses de raios gama em sementes de sorgo para gerar resistência contra *Striga hermonthica*, e descobriram que a dose de 200 Gy também foi eficaz para produzir mutações que geram resistência nas plantas. Badigannavar *et al.* (2018) também relataram os efeitos dos raios gama junto com o tratamento com EMS sobre plantas de sorgo mutantes, onde a irradiação gerou efeitos positivos em três linhagens, as quais se apresentaram tolerantes à podridão do carvão.

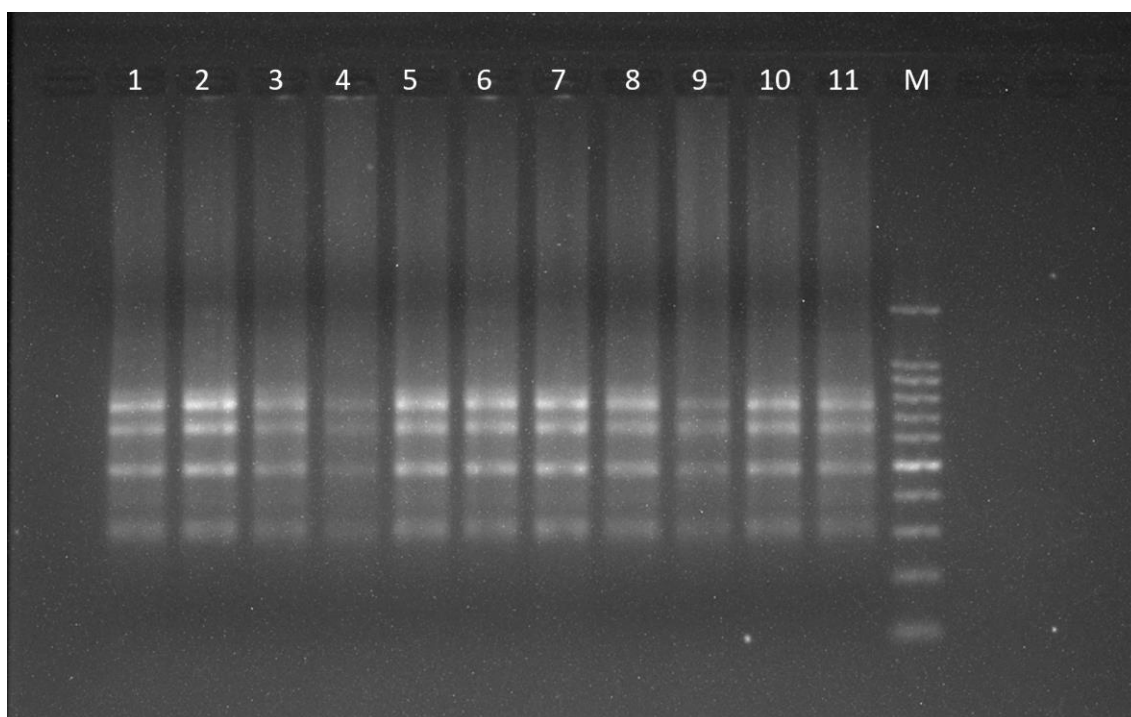
Entretanto, em termos de resposta a estresses bióticos, é necessário realizar análises subsequentes em outras gerações além da M2 para verificar se as alterações visíveis nos genitores permanecerão em todas as gerações, levando a conclusão de que realmente houve mutação em genes de resistência. Tendo em vista que alguns materiais apresentavam grande potencial para seguir com o avanço geracional, foi selecionada uma planta específica do grupo T18 que, durante os 30 dias na casa de vegetação, não apresentou sintomas de podridão de carvão no colo, no intuito de continuar com a manutenção da mesma até chegar a fase de dar

frutos. Dos frutos dessa planta foram recolhidas algumas sementes e semeadas novamente em campo para coletar seu material genético e realizar uma seleção de *primers* de resistência que apresentem polimorfismo. As plantas M3 de melancias *Sugar baby* do grupo T18 apresentaram um excelente desenvolvimento com relação a resistência a *M. phaseolina*.

5.2 Seleção de *primers* da detecção de fontes de resistência em linhagens mutantes

A análise dos marcadores ISSR foi realizada neste estudo para identificar os polimorfismos presentes no DNA de acordo com os padrões de bandas de DNA das amostras. A PCR foi realizada com dez amostras de plantas de melancias mutantes e uma amostra do grupo controle não mutante. Nenhuma das plantas foi inoculada com *M. phaseolina*. Dos 12 *primers* utilizados, apenas dois apresentaram bom padrão de amplificação para a linhagem de melancia T18 (UBC-811 e UBC-825), um deles está representado na figura 3, enquanto os outros não amplificaram bem, assim como, também não forneceram informações relevantes ou apresentaram polimorfismos. Isso demonstra que neste trabalho não foi possível identificar mutações a nível de DNA através dos marcadores ISSR.

Figura 3 - Gel de agarose 1,2% demonstrando os produtos da amplificação de dez plantas de melancias *Sugar baby* mutantes (1 a 10) e o controle (11) com o marcador UBC-825. M. Marcador 100 pb (DNA Ladder Plus)



Embora a avaliação de marcadores ISSR tenha apresentado excelentes resultados em diversos trabalhos, nem sempre será possível encontrar informações relevantes no genoma em todas as espécies de plantas, embora as mesmas plantas apresentem alterações fenotípicas em decorrência da ação de mutagênicos. Isso pode ocorrer por causa das mutações ocorridas terem sido apenas estruturais, com modificações pontuais em uma molécula do DNA e não na troca de nucleotídeos, ou por causa de problemas na otimização da PCR. Além disso, vale ressaltar que as alterações ocasionadas pelos raios gama podem ter sido causadas apenas na superfície das sementes M1, e não no DNA das plantas.

Desse modo, isso sugere que sejam realizadas novas análises subsequentes em trabalhos futuros utilizando outras técnicas com novos marcadores, como SSR, os quais são amplamente utilizados em diversas espécies agrícolas para estudar variações genéticas naturais, realizar mapeamento genético comparativo, investigar taxonomia e evolução molecular, além de exibirem características como codominância e presença de múltiplos alelos, oferecendo uma quantidade significativa de informações genéticas (Al-hadeithi e Jasim, 2021); ou outros *primers* de ISSR, na intenção de analisar mais a fundo o genoma destas melancias mutantes e identificar polimorfismos, e avaliar a existência real da presença de mutação genética.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo destacam a eficácia da indução de mutações por meio de raios gama como uma estratégia promissora para promover resistência a estresses bióticos em plantas comerciais, como a melancia *Sugar baby*. A análise das linhas M2 revelou uma resposta diferenciada à infecção por *M. phaseolina*, com grupos significativos demonstrando tolerância à doença após tratamento com dose de 200 Gy de raios gama. No entanto, observou-se também uma variação na suscetibilidade à podridão do carvão entre as diferentes linhas, indicando a complexidade dos efeitos da radiação sobre o material genético das plantas.

Além disso, os resultados sugerem a necessidade de investigações adicionais para confirmar a estabilidade das características mutacionais ao longo de várias gerações e para elucidar as alterações moleculares subjacentes. A utilização de técnicas complementares de análise genética, como marcadores ISSR, revelou-se valiosa, embora tenha destacado desafios na detecção de polimorfismos em algumas amostras.

Portanto, para um entendimento mais abrangente dos efeitos da radiação gama e para explorar plenamente o potencial das mutações induzidas, recomenda-se a aplicação de abordagens moleculares adicionais, SSR ou outros marcadores, em estudos futuros. Essa abordagem multidisciplinar permitirá uma compreensão mais profunda das mudanças genéticas e fenotípicas nas plantas mutantes, contribuindo para o desenvolvimento de variedades mais resistentes e adaptadas às demandas dos produtores e desafios ambientais.

REFERÊNCIAS

- ABDOUN, A. A. N. *et al.* Effects of γ -radiation on chickpea (*Cicer arietinum*) varieties and their tolerance to salinity stress. **Acta Agriculturae Slovenica**, Ismailia, v. 118, n. 2, p. 1-16, 2022. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/1f57/1e6b04a963549bf07421ad0a5e285e48c63b.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2024.
- ADDAI, I. K.; SALIFU, B. Selection of mutants with improved growth and total grain yield in the M2 generation of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) in the northern region of Ghana. **Journal of Agronomy**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 88-93, 2016.
- AGRAWAL, L.; KUMAR, M. Improvement in ornamental, medicinal, and aromatic plants through induced mutation. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 162-169, 2021.
- AL-HADEITHI, Z. S. M.; JASIM, S. A. Study of plant genetic variation through molecular markers: An overview. **J. Pharm. Res. Int.**, v. 33, n. 45B, p. 464-473, 2021.
- AMBRÓSIO, M. M. Q. *et al.* Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Euphytica**, [S.l.], v. 206, n. 2, p. 287–300, 2015.
- APABLAZA, H. *et al.* Charcoal rot of melon and watermelon (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich) in the metropolitan region of Chile. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago – Chile, v. 20, n. 3, p. 101-105, 1993.
- ARISAH, H. *et al.* Disclosing the Genetic Diversity of ‘Earlibrite’ Strawberry Mutant Induced by Gamma-ray Irradiation Using ISSR Markers. **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S.l.], v. 1114, n. 1, p. 012010, 1 dez. 2022. IOP Publishing. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/1114/1/012010>. Acesso em: 26 mar. 2024.
- BADIGANNAVAR, A. *et al.* Gamma ray induced genetic improvement of sorghum landraces for grain yield and charcoal rot tolerance. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 9, n. 3, p. 894-898, 2018.
- BARCACCIA, G. **Molecular Techniques in Crop Improvement**. 2. ed. S/L: Springer, 2009. 772 p.
- BHATTACHARYA, D. *et al.* Phytotoxic metabolites of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, Rajasthan – India, v. 22, n. 1, p. 54-57, 1992.
- BHOI, A. *et al.* Mutagenesis: A coherent technique to develop biotic stress resistant plants. **Plant stress**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 123-153, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100053>. Acesso em: 26 mar. 2024.
- BISWAS, C. *et al.* A simple method of DNA isolation from jute (*Corchorus olitorius*) seed suitable for PCR-based detection of the pathogen *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Letters in applied microbiology**, [S.l.], v. 56, n. 2, p. 105-110, 2013.

BRESSANO, M. *et al.* An in vitro method for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. **Physiol Mol Plant Pathol**, v.74, n.1, p. 201– 204, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.12.003>. Acesso em: 26 mar. 2024.

CANADAY, C. H. *et al.* Effects Herbicide-induced stress on root colonization of soybeans by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, Mississippi State, v. 70, n. 9, p. 863, 1986. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n09_863.pdf. Acesso em: 26 mar. 2024.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S.l], v. 42, n. 2, p. 225-226, 1939.

ÇELİK, O. *et al.* Comparison of tolerance related proteomic profiles of two drought tolerant tomato mutants improved by gamma radiation. **Journal of Biotechnology**, [S.l], v. 330, n.1, p. 35-44, 2021.

CHO, S. R. *et al.* Gamma-ray irradiation control of whiteflies *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and *Trialeurodes vaporariorum* in the exportation of fresh strawberries. **Journal of Economic Entomology**, [S.l], v. 112, n. 4, p. 1611-1617, 2019.

COHEN, R. *et al.* Variation in the responses of melon and watermelon to *Macrophomina phaseolina*. **Crop protection**, São Paulo, v. 85, n.1, p. 46-51, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.03.015>. Acesso em: 26 mar. 2024.

COHEN, Roni *et al.* Occurrence of *Macrophomina phaseolina* in Israel: challenges for disease management and crop germplasm enhancement. **Plant Disease**, Mississippi State, v. 106, n. 1, p. 15-25, 2022.

COVA, A.M.W. *et al.* Production and quality of mini watermelon under drip irrigation with brackish water. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 33, n.2, p. 766-774, 2020.

DAAYF, F. *et al.* Phenolic compounds in plant defense and pathogen counter-defense mechanisms. **Recent advances in polyphenol research**, [S.L.], v. 3, n.8, p. 191-208, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118299753.ch8>. Acesso em: 26 mar. 2024.

DAMICONE, J.; BRANDENBERGER, L. **Watermelon diseases**. Oklahoma Cooperative Extension Service, 2020.

SILVA, A. A. R. *et al.* Hydrogen peroxide to mitigate the effects of salt stress in the mini watermelon under hydroponic cultivation. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v. 15, n. 1, p. 198-208, jan. 2024. GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20240024>. Acesso em: 26 mar. 2024.

SILVA, A. V. Da. *et al.* Productive potential of watermelon under different plant spacings in the semi-arid region of Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 238-243, 2021.

SILVA, J. S. *et al.* Physiological responses and production of mini-watermelon irrigated with reject brine in hydroponic cultivation with substrates. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.l.], v. 29, n. 8, p. 11116-11129, 2022.

SOUSA, V. F. De; SANTOS, F. J. De S. Irrigação da cultura da melancia. In: SOUSA, V. F. De *et al.* **Tecnologias para a produção de melancia irrigada na Baixada Maranhense**. São Luís - MA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. p. 10-25. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/210964/1/Irigacao-cultura-62-80.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2024.

DUE, M. S.; SUSILOWATI, A. R. I.; 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**, [S.l.], v. 20, n. 5, 2019.

ERNEST, F. P. *et al.* Radiosensitivity of two varieties of watermelon (*Citrullus lanatus*) to different doses of gamma irradiation. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 43, p. 897-905, 2020.

FUJINAGA, M. *et al.* Charcoal rot of watermelon newly found in Nagano and Kanagawa prefectures and pathogenicity of causal fungus *Macrophomina phaseolina*. **Japanese Journal of Phytopathology**, [S.l.], v. 68, n. 2, p. 148-152, 2002.

GAD, M. A. *et al.* Effects of gamma rays on rusts, yield, and seed quality of some wheat genotypes. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 101, n. 2, p. 606-617, 2023.

GAMA, R.N.C. da S.; SANTOS, C.A.F.; DIAS, R.De. Genetic variability of watermelon accessions based on microsatellite markers. **Genetics And Molecular Research**, Bethesda – EUA, v. 12, n. 1, p. 747-754, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4238/2013.march.13.3>. Acesso em: 26 mar. 2024.

GHANI, M.; SHARMA, S. K. Induction of powdery mildew resistance in gerbera (*Gerbera jamesonii*) through gamma irradiation. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 159-166, 2019.

GOMES, De O. *et al.* Production, water-use efficiency and post-harvest quality of hydroponic mini watermelon under salinity stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1, 2021.

HASSINE, M. *et al.* Screening of the Effect of Mutation Breeding On Biotic Stress Tolerance and Quality Traits of Durum Wheat. **Gesunde Pflanzen**, Brasília, v. 76, n. 2, p. 837-846, 2022.

XIAO, H.E. *et al.* Watermelon disease detection based on deep learning. **International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence**, França, v. 35, n. 05, p. 2152004, 2021.

HUSSAIN, B. Modernization in plant breeding approaches for improving biotic stress resistance in crop plants. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, [S.l.], v. 39, n. 4, p. 515-530, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção de melancia**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melancia/br>. Acesso em: 12 abr. 2024.

JEONG, R.D.; JEONG, M.A.; PARK, M.R. Gamma irradiation-induced disease resistance of pear (*Pyrus pyrifolia* “Niitaka”) against *Penicillium expansum*. **Journal of Phytopathology**, [S.l.], v. 165, n. 9, p. 626-633, 2017.

JIANG, S. *et al.* The NF-Y Transcription Factor Family in Watermelon: Re-Characterization, Assembly of ClnF-Y Complexes, Hormone-and Pathogen-Inducible Expression and Putative Functions in Disease Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, São Paulo, v. 23, n. 24, p. 15778, 2022.

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

KAUR, M *et al.* Gamma rays induced variability for economic traits, quality and red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Int. J. Environ. Sci. Technol**, v. 5, n. 2, p. 355-65, 2016.

KHAN, A. N. Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolina* strains causing pathogenicity on sunflower and chickpea. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 8, p. 1309, 2017.

LI, C.X. *et al.* Treatment with wheat root exudates and soil microorganisms from wheat/watermelon companion cropping can induce watermelon disease resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. **Plant disease**, Mississippi State, v. 103, n. 7, p. 1693-1702, 2019.

SANTOS, B.L.O.S. *et al.* First report of charcoal rot, caused by *Macrophomina phaseolina*, on blueberry in southwestern Spain. **Plant Disease**, Mississippi State, v. 90, n.4, p. 10-20, 2019.

MALAMBANE, G. *et al.* Drought stress tolerance mechanisms and their potential common indicators to salinity, insights from the wild watermelon (*Citrullus lanatus*): A review. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2022.

MARQUEZ, N. *et al.* *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 12, p. 634397, 2021.

MAURYA, Poonam *et al.* Mutational breeding in fruit crops: A review. 2022.

NAFADY, N.A. *et al.* The combined effect of arbuscular mycorrhizae and plant-growth-promoting yeast improves sunflower defense against *Macrophomina phaseolina* diseases. **Biological Control**, [S.l.], v. 138, n. 1, p. 104-149, 2019.

NIKIÈMA, M.P. *et al.* Induced resistance to *Striga hermonthica* in sorghum by gamma irradiation. **American Journal of Plant Sciences**, [S.l.], v. 11, n. 10, p. 1545-1561, 2020.

PAL, S. *et al.* Understanding genetic diversity, population structure and development of a core collection of Indian accessions of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai). **Plant Genetic Resources**, Santa catarina, v. 18, n. 5, p. 359-368, 2020.

OLORIZ, María I. *et al.* Selection and characterisation of sugarcane mutants with improved resistance to brown rust obtained by induced mutation. **Crop and Pasture Science**, v. 62, n. 12, p. 1037-1044, 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA – FAO. **Production: Crops and livestock products**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 12 abr. 2024.

PANDEY, A. *et al.* Genetic diversity and population structure of watermelon (*Citrullus* sp.) genotypes. **3 Biotech**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

PISANI, C. *et al.* First Report of *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium brachygibbosum*, and *Lasiodiplodia theobromae* Causing Fungal Watermelon Vine Decline in Southwest and West-Central Florida. **Plant Health Progress**, São Francisco, v. 22, n. 4, p. 544-551, 2021. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHP-09-20-0077-RS>. Acesso em: 26 mar. 2024.

PRATT, R. G. *et al.* Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* to mature plant tissues of alfalfa and white clover. **Plant disease**, Mississippi State, v. 82, n. 9, p. 1033-1038, 1998. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1998.82.9.1033#:~:text=The%20strong%20pathogenicity%20of%20M,in%20the%20southeastern%20United%20States>. Acesso em: 26 mar. 2024.

RAHMAN, M. Z. *et al.* Biology, Diversity, Detection and Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum Causing Vascular Wilt Disease of Watermelon (*Citrullus lanatus*): A Review. **Agronomy**, São Paulo, v. 11, n. 7, p. 1310-1410, 2021.

RAINA, A. *et al.* Characterization of induced high yielding cowpea mutant lines using physiological, biochemical and molecular markers. **Scientific reports**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 3687, 2020.

RIVIELLO-FLORES, M.De.L. *et al.* Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties. **Plants**, [S.l.], v. 11, n. 9, p. 1161, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9102721/>. Acesso em: 26 mar. 2024.

ROMÃO, R.L. Northeast Brazil: A secondary center of diversity for watermelon (*Citrullus lanatus*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, [S.l.], v. 47, n. 2, p. 207-213, 2000.

SALARI, M. *et al.* Reaction of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars to soil-borne plant pathogenic fungi in Iran. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 11, n. 87, p. 15324-15329, 2012.

SALES J.R.R. *et al.* First report of *Monosporascus cannonballus* on watermelon in Brazil. **Plant Disease**, Mississippi State, v. 94, n. 2, p. 278-278, 2010.

SALES JÚNIOR, R. *et al.* Weeds as potential hosts for fungal root pathogens of watermelon. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 1, p. 1-6, 2019.

SATISH, L. *et al.* Direct plant regeneration from in vitro-derived shoot apical meristems of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, [S.l], v. 51, n. 10, p. 192-200, 2015.

SAVITRI, E. S.; FAUZIAH, S. M. Role of issr molecular marker in analysis of genetic diversity of mutant glycine soja through mutation induction with combination of gamma ray irradiation and ems (ethyl methane sulfonate). **Journal of Applied Biological Sciences**, [S.l], v. 14, n. 1, p. 113-123, 2020.

SCHÄFER, W. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. **Annual review of phytopathology**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 461-477, 1994.

SILVA, S.S. *et al.* Production and post-harvest quality of mini-watermelon crop under irrigation management strategies and potassium fertilization. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 26, p. 51-58, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v26n1p51-58>. Acesso em: 26 mar. 2024.

SILVA, S. M. F. *et al.* A simple and cost-effective diagnostic of *Macrophomina phaseolina* on watermelon by direct PCR. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá/State, v. 45, n.2, p. 10-25, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v45i1.56141>. Acesso em: 26 mar. 2024.

ŞİMŞEK, M.; KAÇIRA, M.; TONKAZ, T. The effects of different drip irrigation regimes on watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.)] yield and yield components under semi-arid climatic conditions. **Australian journal of agricultural research**, [S.l], v. 55, n. 11, p. 1149-1157, 2004.

SINGH, S. K.; NENE, Y. L.; REDDY, M. V. Influence of cropping systems on *Macrophomina phaseolina* population of Soil. **American Phytopathological Society**, [S.l], v. 10, n.1, p. 810-815, 1990.

TARIGAN, R. *et al.* Characterization of gamma ray induced mutations in PepYLCV-infecting local pepper in Karo Regency, Sumatra Utara, Indonesia. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. [S.l], v. 20, n.3, p. 12-21, 2023.

WEHNER, T. **Watermelon Vegetables I: asteraceae, brassicaceae, chenopodiaceae, and cucurbitaceae**. New York: Springer, 2008. 428 p.

WU, H. *et al.* First Report of Watermelon Charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*) in China. **Plant Disease**, Mississippi State v. 106, n. 5, p. 1521, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-21-1362-PDN>. Acesso em: 26 mar. 2024.

ZULKIFLI, N. A. *et al.* Advances in Irradiation Technology for Plant Disease Resistance: a review. **Agricultural Reviews**, [S.l], v. 1, n. 1, p. 18-32, 25 nov. 2023. Agricultural Research Communication Center. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18805/ag.rf-284>. Acesso em: 26 mar. 2024.