

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae*
EM MELOEIRO VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS
RESISTENTES**

Bruna Fukumoto Kobayashi
Engenheira Agrônoma

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae*
EM MELOEIRO VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS
RESISTENTES**

Bruna Fukumoto Kobayashi

Orientadora: Profa. Dra. Leila Trevisan Braz

Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

2018

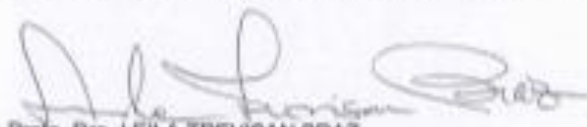
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae* EM MELOEIRO VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES

AUTORA: BRUNA FUKUMOTO KOBAYASHI

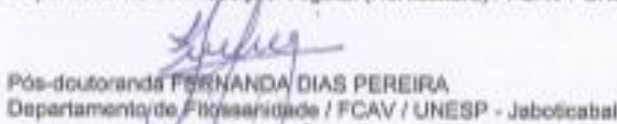
ORIENTADORA: LEILA TREVISAN BRAZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LEILA TREVISAN BRAZ

Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pós-doutoranda FERNANDA DIAS PEREIRA

Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. DANIEL RUFINO AMARAL

Instituto Federal do Triângulo Mineiro / Uberaba/MG

Jaboticabal, 27 de julho de 2018

K75m Kobayashi, Bruna Fukumoto
Metodologia de inoculação de *Didymella bryoniae* em meloeiro
visando à seleção de genótipos resistentes / Bruna Fukumoto
Kobayashi. -- Jaboticabal, 2018
x, 35 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientadora: Leila Trevisan Braz
Coorientadora: Rita de Cássia Panizzi
Banca examinadora: Daniel Rufino Amaral, Leticia Akemi Ito
Bibliografia

1. Cancro-da-haste. 2. *Cucumis melo*Cancro-da-haste. 3. Métodos
de avaliação. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias.

CDU 635.611:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BRUNA FUKUMOTO KOBAYASHI - nascida na cidade de Uberaba - Minas Gerais, em 15 de junho de 1993. Filha de Tereza Leiko Fukumoto Kobayashi e Nelson Kenji Kobayashi, graduou-se em Engenharia Agrônômica em 19 de fevereiro de 2016. Durante a graduação, foi voluntária do Programa de Iniciação Científica Voluntária (PIVIC), sob orientação do Professor Doutor Daniel Rufino Amaral, na área de fitopatologia em hortaliças. Foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET), tutorada pelo Professor Doutor Márcio José de Santana, desenvolvendo atividades de pesquisa, ensino e extensão, no período de 2011 a 2015. Em agosto de 2016, a autora mudou-se para Jaboticabal - São Paulo, ingressando no curso de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (UNESP-FCAV), como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Participou do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM), liderado pela Professora Doutora Leila Trevisan Braz, a qual foi sua orientadora durante 24 meses no projeto de dissertação intitulado “Metodologia de inoculação de *Didymella bryoniae* em meloeiro visando à seleção de genótipos resistentes”.

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores;
se não houver flores, valeu a sombra das folhas;
se não houver folhas, valeu a intenção da semente”.

Henfil

Aos meus pais, Tereza e Nelson, e minha irmã Cássia,
que me dão força e energia todos os dias.
Esta vitória é resultado de toda a dedicação,
amor e educação a mim concedidos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, oportunidades, ensinamentos e obstáculos que me deram força e moldaram no que sou hoje e me fizeram entender a beleza da vida.

Aos meus pais, Tereza e Nelson, que nunca mediram esforços para fazer do meu caminho o mais real e leve possível. Obrigada pela educação, valores e amor incondicional que me fazem feliz e realizada.

À minha irmã Cássia, que sempre foi minha companheira, amiga e nunca me desamparou. Por me proteger, cuidar e estar do lado dos meus pais nos momentos em que nossa família se fez necessária.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de instrumentos para realização deste trabalho.

À Professora Dra. Leila Trevisan Braz, minha orientadora, exemplo de profissional, humana e de inestimável caráter, pelo amparo durante todo o curso de mestrado e também por ter feito um papel além, ensinando valores que carregarei para sempre comigo.

À Professora Dra. Rita de Cássia Panizzi, minha coorientadora, pelos ensinamentos, confiança e competência que me permitiram a concretização deste trabalho. Outrossim, sou grata à valiosa amizade estendida além da academia, à qual tenho eterna estima.

Aos Professores Dra. Margarete Camargo e Dr. José Carlos Barbosa, pela disponibilidade, conhecimentos passados e pelo exemplo profissional.

Aos Prof. Dr. Daniel Rufino Amaral e Profa. Dra. Leila, meus eternos orientadores, e Dra. Fernanda Dias, membros da minha banca de defesa, pela atenção, paciência e contribuição essenciais para realização deste projeto.

À Rosane e Mônica, secretárias do Departamento de Produção Vegetal, pela paciência, competência, atenção dada e constantes ajudas fornecidas.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM), Aline, Carolina, Carlos, Edgard, Larissa, Marcos, Renan e Renato, em especial aos

grandes parceiros de trabalho Lucas e Edicleide, com os quais construí forte amizade e tenho enorme carinho e gratidão.

Aos funcionários do Setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais, Reinaldo e Cláudio, pela ajuda durante a realização dos experimentos. Em especial, ao Inauro, que nunca mediu esforços para nos ajudar, exemplo de luta, força e honestidade, a quem tenho grande admiração.

Às minhas amizades construídas em Jaboticabal, Carla, Roberta e Mariana, pelos momentos de felicidade e cumplicidade, por terem sido família quando as nossas estavam longe.

Aos meus amigos de Uberaba que seguem há mais de uma década, em especial Ana Luísa, Arthur, Benito, Guilherme, Camila e Letícia. Grata pelo companheirismo, apoio e compreensão nos momentos difíceis e alegrias vividas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e o sucesso deste projeto.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | ii |
| ABSTRACT | iii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. A cultura do meloeiro | 3 |
| 2.2 <i>Didymella bryoniae</i> | 4 |
| 2.3 Cancro-da-haste na cultura do meloeiro | 5 |
| 2.4 Métodos de inoculação em programas de melhoramento | 6 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 8 |
| 3.1 Caracterização da área experimental | 8 |
| 3.2 Implantação dos experimentos | 9 |
| 3.3 Delineamentos experimentais e condução dos experimentos | 9 |
| 3.3.1 Experimento 1 | 9 |
| 3.3.2 Experimento 2 | 10 |
| 3.4 Isolamento do fungo <i>Didymella bryoniae</i> de plantas de meloeiro | 10 |
| 3.5 Metodologias de inoculação de <i>Didymella bryoniae</i> em mudas de meloeiro | 11 |
| 3.5.1 Método do grão de sorgo..... | 11 |
| 3.5.2 Método do disco de papel..... | 12 |
| 3.5.3 Método do palito colonizado | 13 |
| 3.5.4 Método do palito de dente | 14 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 18 |
| 5 CONCLUSÕES | 24 |
| 6 REFERÊNCIAS | 25 |

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae* EM MELOEIRO VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES

RESUMO- A escolha do método de inoculação para avaliação de genótipos resistentes é primordial para o sucesso dos programas de melhoramento. As metodologias variam de acordo com o comportamento do patógeno, a cultura e o tipo de resistência oferecido pela planta, buscando ao máximo simular as condições de infecção que ocorrem no campo. Objetivou-se por meio deste trabalho avaliar seis métodos de inoculação de *Didymella bryoniae* em meloeiro e verificar a interferência de ferimento na avaliação de plantas para essa resistência. Foram realizados dois experimentos, em bandeja e vaso, repetidos em dois períodos. Nos dois experimentos, foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso com seis plantas por parcela e três repetições. Ambos foram submetidos às mesmas condições ambientais durante todo o trabalho. Os métodos foram avaliados a partir de escala de notas e realizou-se o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença. Os dados foram submetidos à análise de variância conjunta, sendo as médias dos tratamentos agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) e, posteriormente, realizada correlação entre experimentos. Dentre os métodos, destacou-se o método do grão de sorgo sem ferimento nas plantas, em bandeja, que foi capaz de distinguir materiais resistentes, mostrando-se eficiente, rápido e menos trabalhoso.

Palavras-chave: Cancro-da-haste, *Cucumis melo*, métodos de avaliação.

METHODOLOGIE OF THE INOCULATION OF *Didymella bryoniae* IN MELON FOR THE SELECTION OF RESISTANT GENOTYPES

ABSTRACT- The choice of inoculation method to evaluate resistant genotypes is essential for the success of breeding programs. The methodologies vary according to the behavior of the pathogen, the crop and the type of resistance offered by the plant, trying to simulate the infection conditions that occur in the field. The objective of this work was to evaluate six methods of inoculation of *Didymella bryoniae* in melon and to verify the interference of injury in the evaluation of plants for this resistance. Two experiments were carried out, in tray and vessel, repeated in two periods. In both experiments, the randomized block design with six plants per plot and three replications was used. Both were subjected to the same environmental conditions throughout the work. The methods were evaluated from the scale of notes and the area under the Disease Progress Curve was calculated. The data were submitted to a joint analysis of variance, these being as tests of the tests grouped by the test of Scott-Knott ($p < 0,05$), and were realized among the experiments. Among the methods, the method of sorghum grain without fermentation in the plants, in the tray, was distinguished that was able to distinguish resistant materials, being efficient, fast and less laborious.

Keywords: Gummy stem blight, *Cucumis melo*, evaluation methods.

1 INTRODUÇÃO

O melão é uma hortaliça apreciada em todo o mundo, sendo consumido principalmente nos países da Europa, Estados Unidos e Japão. A China lidera a produção, com mais de 60% do total mundial (FAOSTAT, 2016). No Brasil, vem mantendo expressiva importância econômica, em virtude principalmente da procura do mercado externo (SANTOS et al., 2004), consolidando-se como nosso fruto mais exportado (SEAGRI, 2017).

A expansão de áreas de cultivo e intensificação da produção contribuem para o aumento da ocorrência de pragas e doenças, as quais podem aumentar os custos e reduzir a produtividade (RABELO, 2017). Segundo Wolukau et al. (2007), a produção do melão é severamente limitada por agentes patogênicos, destacando-se o fungo *Didymella bryoniae*, causador do cancro da haste, uma das mais expressivas doenças fúngicas da cultura do meloeiro, disseminada em todo o mundo.

Considerada também a doença mais importante das cucurbitáceas (VIDA, 1995), tem distribuição generalizada em nível mundial (NEERGAARD, 1973; BALA e HOSEIN, 1986). Os sintomas incluem cancro no caule, queima das folhas e apodrecimento de frutos (SCHENCK, 1968). Em muitas plântulas, a colonização circunscreve todo o caule, causando a seca do ramo na região situada acima da lesão, ocorrendo tombamento e morte (GASPAROTTO et al., 2009).

O agente causal é o fungo *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm [sin. *Mycosphaerella Citrullina* (C.O. Sm.) Gross.], anamorfo *Ascochyta Cucumis* Fautrey & Roum. [sin. *Phoma cucurbitacearum* (Fr.: Fr.) Sacc.], tendo como hospedeiro diversas espécies de *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita* e outros gêneros (KEINATH, 1995).

Os danos causados pelo patógeno podem ser elevados ou totais quando medidas de controle não forem aplicadas ou adequadas (VIDA et al., 2004). Para o controle da doença, produtos fitossanitários têm se mostrado ineficientes e o patógeno apresenta respostas de resistência a fungicidas (KEINATH, 2015). Nesse sentido, têm sido intensificados os estudos buscando cultivares resistentes.

Um dos principais processos que contribuem para o sucesso dos programas de melhoramento é a seleção de bons materiais por meio de avaliações de reação de genótipos frente à doença. Para Tanaka et al. (2001), os métodos de inoculação descritos na literatura apresentam distinta eficiência na reprodução de cada tipo de sintoma e, dependendo do objetivo do trabalho, seria conveniente eleger o mais adequado de acordo com a cultura e patógeno a que se deseja resistência.

A inoculação artificial de patógenos para avaliação de genótipos resistentes, de maneira geral, envolve ferimento nas plantas, e esse processo geralmente aumenta a rapidez na resposta do hospedeiro à doença, além de ser de fácil execução (CLAUDINO, 2013). No entanto, esses métodos são incapazes de simular o que ocorre em condições naturais de infecção, podendo ocasionar estresses à planta ou mesmo quebra de resistência mecânica, quando houver, influenciando, consequentemente, nas avaliações.

Nesse sentido, há controvérsias quanto à necessidade de se efetuar ferimento para haver infecção do hospedeiro (TANAKA et al., 2001). Justaposto a isso, o objetivo do trabalho foi avaliar seis métodos de inoculação de *Didymella bryoniae* em meloeiro e verificar a interferência de ferimento na avaliação de plantas para essa resistência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do meloeiro

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) pertence à família Cucurbitaceae, representada também principalmente pelas abóboras (*Cucurbita* spp.), pepinos (*Cucumis sativus* L.), melancias [*Citrullus lanatus* (Thumb)], dentre outros (PITRAT et al., 2000). A espécie *C. melo* é considerada a mais variável do gênero *Cucumis* (JEFFREY, 1980; BATES e ROBINSON, 1995).

Ainda há divergências entre pesquisadores quanto à origem do melão. Registros arqueológicos e históricos relatam o cultivo de melão no Egito e Irã no segundo e terceiro milênio a.C., respectivamente (ROBINSON e DECKER-WALTERS, 1997). Outros registros são datados há 2.000 a.C. na província de Shaanxi (China) e no Japão (WALTERS, 1989).

Há grande diversidade morfológica, principalmente em frutos, sendo considerada a espécie de maior polimorfia do gênero *Cucumis* (LUAN et al., 2010). São classificadas mais de 66 espécies de *C. melo* em todo o mundo (SEBASTIAN et al., 2010). Os grupos botânicos propostos em estudos mais recentes são: *acidulus*, *conomon*, *momordica*, *makuwa*, *chinensis*, a subespécie *agrestis*; além de *chate*, *flexuosus*, *tibish*, *adana*, *ameri*, *cantalupensis*, *chandalak*, *reticulatus*, *inodorus* e *dudaim*, a subespécie *melo* (PITRAT, 2008; BURGER et al., 2010).

Nessa diversidade, ainda existem os grupos de melões melhorados. No Brasil, os tipos mais comercializados são os grupos botânicos: *inodorus* (Amarelo, Pele de Sapo, e Honeydew); *cantaloupensis* (Charentais) e *reticulatus* (Cantaloupe e Gália). Tem crescido a demanda pelo tipo Cantaloupe, grupo dos aromáticos, de polpa salmão, com bom sabor e maior teor de açúcar (°Brix). Os melões do tipo “pele de sapo”, “gália” e “charentais” têm grande comercialização no mercado externo, especialmente o europeu (COSTA et al., 2000).

A produção mundial de melão no ano de 2016 foi de cerca de 31 milhões de toneladas, compondo área de 1,2 milhão de hectares, sendo os principais produtores a China (48,6%), Turquia (5,76%) e Irã (5,09%) (FAOSTAT, 2018).

O Brasil ocupa o 11º lugar no *ranking* mundial em produção de melão, com 596 mil toneladas no ano de 2016, produtividade média 25,81 t/ha, ocupando cinco

mil hectares distribuídos em todas as regiões do Brasil (FAOSTAT, 2018). Somente a região nordeste foi responsável por 96% dessa produção, com destaque aos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, que representaram 76% desse montante (IBGE, 2018).

A grande vantagem de regiões semiáridas no cultivo do melão é a baixa ocorrência de chuvas, favorecendo a menor incidência de doenças e a melhor qualidade dos frutos (COSTA et al., 2000). A temperatura é um dos fatores mais importantes para a cultura do melão, pois interfere no teor de açúcar (Brix), sabor, aroma e consistência do fruto, essenciais à comercialização e, principalmente, exportação (SENAR, 2007; BONETTI et al., 2011). De forma geral, a temperatura ideal para o cultivo de melão varia de 20°C a 30°C (WHITAKER e DAVIS, 1962; BONETTI et al., 2011).

Outro fator importante é a umidade relativa do ar, com faixa ótima para o cultivo entre 65% a 75% (BRANDÃO-FILHO e VASCONCELOS, 1998). Em elevadas condições de umidade, ocorre má formação de frutos e aumento na disseminação de doenças.

Uma das maiores limitações na produção do meloeiro é a ocorrência de enfermidades. Favorecida por condições de elevada temperatura e umidade, uma das mais relevantes doenças na cultura do meloeiro é o crestamento gomoso do caule, que também tem grande importância em pepino e melancia. Segundo Gasparotto et al. (2011), a doença é capaz de limitar o plantio em regiões que apresentam tais condições, até mesmo em cultivo protegido.

2.2 *Didymella bryoniae*

O fungo, na sua fase telomórfica, *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm [anamórfica *Phoma cucurbitacearum* (Fr.) Sacc.], causador do crestamento gomoso ou podridão negra das cucurbitáceas, foi descrito em 1869 como *Bryonia* (*Bryonia* ou lúpulo selvagem) na Europa Central (VAN STEEKELENBURG, 1986). No Brasil, foi relatado em 1954 pela primeira vez em Campinas-SP, infectando plantas de melão do grupo Cantaloupe (TSUTSUMI, 1995). É um dos fungos mais importantes que atacam as cucurbitáceas, incluindo melão, melancia, pepino, abóbora, dentre

outros (PARET et al., 2011). O patógeno já foi registrado em todos os continentes, apresentando ao menos 12 gêneros e 23 espécies em cucurbitáceas (KEINATH, 2011).

O fungo produz dois tipos de estruturas reprodutivas, um produzido sexualmente – os peritécios, que dão origem aos ascos, contendo os ascósporos – e o outro produzido assexuadamente, os picnídios, que liberam os conídios. Os peritécios e picnídios podem ser encontrados na mesma lesão (PARET et al., 2011).

Ascósporos e conídios são disseminados a longas distâncias pelos ventos, e a curtas, pela água. O fungo é capaz de sobreviver em sementes, restos culturais e solo (CAMARGO, 2018). Embora não seja um patógeno transmitido pelo solo, é capaz de causar podridão do colo da planta no nível do solo ou próximo dele, e o potencial de inóculo, representado por restos infectados de plantas, pode apresentar sério problema para as futuras culturas de cucurbitáceas (DAVIDS et al., 1988).

O comportamento do fungo é influenciado pelas condições ambientais. Santos e Café-Filho (2005) verificaram que a liberação dos ascósporos ocorre após cerca de uma hora depois de cessado o período de precipitação, associado à temperatura média entre 18 a 25°C e umidade relativa do ar superior a 85%. A doença se desenvolve rapidamente em condições de umidade relativa do ar elevada.

2.3 Cancro-da-haste na cultura do meloeiro

O cancro-da-haste, também conhecido como crestamento gomoso do caule, é uma doença comum em regiões tropicais e subtropicais do mundo (SITTERLY e KEINATH, 1996). É apontada como a doença foliar mais destrutiva das cucurbitáceas (CHOI et al., 2010) e considerada de grande importância para a cultura do meloeiro, crescendo principalmente devido à exploração comercial desse produto (TSUTSUMI e SILVA, 2004). A umidade é um dos fatores ambientais mais importantes para o desenvolvimento da doença (SANTOS, 2016).

O fungo causador dessa doença (*Didymella bryoniae*) é capaz de infectar qualquer tecido e estágio de desenvolvimento da planta, tendo variações de sintomas como manchas nas folhas, caules, apodrecimento das plantas e podridão

negra dos frutos (CHIU e WALKER, 1949). Em fase de mudas, é capaz de provocar o tombamento e necrose na região do colo (CAMARGO, 2018).

As lesões no caule crescem longitudinalmente e transversalmente, ocorrendo exsudação de goma e, nos tecidos com sintomas mais velhos, formação de numerosos corpos de frutificação negros (GASPAROTTO et al., 2009). Quando se aloja no colo da planta, pode provocar o fendilhamento do córtex, expondo os tecidos internos, causando o murchamento e levando à morte da planta (VIANA et al., 2001).

O crestamento gomoso é capaz de provocar grandes perdas tanto em produtividade quanto na qualidade dos frutos. Afetam a aparência do produto com a presença de manchas na casca, provocando descarte da maioria dos frutos e ainda aumentando o custo de produção em virtude da utilização de produtos fitossanitários em excesso na tentativa de recuperar o cultivo (CÉSAR e SANTOS, 2001). Além disso, o controle químico tem demonstrado baixa eficiência nos campos de melão (SILVA et al., 2012), principalmente sob condições de alta umidade e temperatura (PEREIRA et al., 2012). Sendo assim, o uso de cultivares resistentes é boa estratégia para controle da doença. Justaposto a isso, são necessários maiores estudos de germoplasmas advindos de fontes de resistência no Brasil.

2.4 Métodos de inoculação em programas de melhoramento

Para avaliação de germoplasma resistente à doença é necessário padronizar e desenvolver metodologias que possibilitem seleção segura das fontes de resistência e a determinação precisa da reação de resistência ou suscetibilidade dos genótipos avaliados (MEDEIROS et al., 2000).

A garantia de sucesso dos programas de melhoramento tem início desde a primeira triagem de germoplasmas selecionados até a obtenção da cultivar resistente. Para tanto, a seleção de genótipos resistentes deve ser feita de forma criteriosa, o que tem relação direta com o preparo do inóculo e, posteriormente, a inoculação do patógeno para avaliação de genótipos resistentes, evitando, assim, resultados errôneos. Portanto, faz-se necessário buscar o método de inoculação mais eficiente para o patossistema.

Para avaliação de *D. bryoniae*, nos primeiros estudos a metodologia de inoculação adotada foi à base de suspensão de esporos, aplicada em plantas transferidas para vasos (FRANTZ e JAHN, 2004; WOLUKAU et al., 2007; WOLUKAU et al., 2009). Apesar de utilizado em muitos trabalhos, Mahmoudi e Ghashghaie (2012) relataram baixa eficiência na discriminação de plantas resistentes e suscetíveis.

A fim de reduzir tempo e encontrar um método eficiente para avaliar genótipos resistentes, Siviero e Menten (1995) utilizaram palito de dente colonizado com micélio do fungo (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*) causador do cancro-da-haste em soja para avaliar resistência de plantas. Nesse sentido, Verzignassi et al. (2004) adaptaram o método para o uso em meloeiro e pepino-japonês para *D. bryoniae*, tendo sucesso na discriminação de materiais resistentes dos suscetíveis. O método ainda foi utilizado para avaliar a reação a *D. bryoniae* em diversas cucurbitáceas (ITO et al., 2009; SILVA et al., 2012). Em seguida, a fim de tornar o método de inoculação mais prático, Santos (2016) propôs adaptação ao método, realizado em mudas na bandeja, obtendo sucesso na avaliação de materiais quanto à reação a *D. bryoniae*.

Dentro desse contexto, os métodos artificiais de inoculação envolvem, na maioria dos casos, a utilização de ferimentos nas plantas. Segundo Claudino (2013), estes apresentam como vantagem a rapidez da resposta e a facilidade de execução, porém o fato de não simularem as condições naturais de infecção pode provocar subestimação dos níveis de resistências dos genótipos avaliados.

Estudando métodos de avaliação de resistência com genótipos de soja a *Sclerotinia sclerotiorum*, Juliatti et al. (2014) observaram que o método de inoculação utilizando ferimento resultou em lesões maiores, quando comparado ao método de inoculação sem ferimento, não havendo também interação significativa entre os métodos e as cultivares utilizadas. Sendo assim, os métodos foram considerados indistintos para o resultado da reação de resistência das cultivares.

Em melão, Grossenbacher (1909) demonstrou que a penetração de *D. bryoniae* era possível por meio da superfície não lesionada do caule da planta. O mesmo foi observado por Barbosa et al. (2010), avaliando métodos de inoculação de

infestação do solo com arroz colonizado por *Sclerotium rolfsii*, sem causar ferimentos em plantas de tomateiro.

Para Dusi et al. (1994), os métodos sem fermento permitem explorar os mecanismos de resistência à penetração do fungo na planta. Nos casos em que não é necessário fermento para permitir entrada de patógenos nas plantas hospedeiras, é possível fazer avaliação com mesmo grau de confiabilidade, evitando ainda que genótipos contendo certo nível de resistência sejam descartados dos programas de melhoramento em virtude das avaliações subestimadas.

Em condições ambientais adequadas, geralmente os patógenos fúngicos penetram no hospedeiro por aberturas naturais ou por penetração direta através da cutícula. De acordo com Russel (1978), as plantas podem ser inoculadas aplicando esporos viáveis ou depositando pedaços de micélio do agente patogênico nas partes apropriadas das plantas hospedeiras tão uniformemente quanto possível, e acondicionadas em ambientes que favoreçam a ocorrência da infecção. Assim, os métodos sem fermento também são opção, podendo ser menos agressivos e mais próximos das condições naturais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em dois experimentos: experimento 1, desenvolvido em bandeja e experimento 2, em vaso. Os experimentos foram repetidos em dois períodos: 19 dezembro de 2017 a 5 de fevereiro de 2018 (repetição I); 20 de fevereiro a 07 de abril de 2018 (repetição II).

3.1 Caracterização da área experimental

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais e no Laboratório Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade, na Faculdade de Ciências Agrárias (UNESP-FCAV) – Câmpus de Jaboticabal, com coordenadas geográficas: latitude 21°15'22" S, longitude 48°18'58" W e altitude de 595 metros. O clima da região é do tipo Aw com transição para Cwa (KÖPPEN, 1948), ou seja, clima tropical com estação seca no inverno e transição para clima subtropical, com chuvas no verão e relativamente seco no inverno.

3.2 Implantação dos experimentos

Foram utilizados dois genótipos de melão contrastantes quanto à reação a *D. bryoniae*, a cultivar comercial Eldorado 300, como padrão de suscetibilidade (TSUTSUMI e SILVA, 2004) e o PI 420145, padrão de resistência a *D. bryoniae*, (WOLUKAU et al., 2007), que contém gene de resistência (*Gsb-6*) reportado por Bi et al. (2015), a fim de validar a disparidade dos materiais dentro dos métodos de avaliação de resistência. Foram estabelecidos seis tratamentos: grão de sorgo colonizado por *D. bryoniae* sem e com ferimento na planta (grão de sorgo); disco de papel colonizado pelo fungo sem e com ferimento na planta (disco de papel); palito colonizado pelo patógeno inserido na planta (palito colonizado); palito com disco de meio de cultura contendo o fungo e inserido na planta (palito disco do fungo); dois controles: testemunha sem ferimento e testemunha com ferimento (palito). Esses dois últimos estão isentos da presença do fungo.

Nos dois experimentos, para produção das mudas foram utilizadas bandejas de poliestireno expandido contendo 128 células e substrato comercial Bioplant[®], autoclavado a 120°C e 1 ATM por 30 minutos. Foram colocadas duas sementes de cada genótipo por célula e, posteriormente, realizado desbaste das mudas de acordo com a uniformidade na linha das demais plântulas.

Após 22 dias da semeadura, quando as mudas apresentavam duas folhas definitivas, procedeu-se à inoculação de acordo com o método adotado nos tratamentos.

3.3 Delineamentos experimentais e condução dos experimentos

3.3.1 Experimento 1

O delineamento adotado foi em blocos ao acaso (DBC) com seis tratamentos, três repetições e seis plantas por parcela, distribuídas em uma linha na bandeja.

Na semeadura deste experimento, a distribuição das parcelas foi realizada intercalando fileiras sem substrato, evitando microclima, adensamento das plântulas e facilitando o processo de inoculação. Cada bloco foi composto por duas bandejas.

3.3.2 Experimento 2

Foi utilizado delineamento de blocos ao acaso (DBC), com seis tratamentos e três repetições. Cada bloco foi composto por dois vasos compondo a parcela, cada um com três mudas.

Após 20 dias da sementeira, dois dias antes da inoculação, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de dois litros preenchidos com mistura de terra, areia e esterco na proporção 2:3:1, previamente autoclavada a 120°C e 1 ATM, por 1 hora.

3.4 Isolamento do fungo *Didymella bryoniae* de plantas de meloeiro

Para execução dos experimentos, foi realizado isolamento do fungo *D. bryoniae* de mudas de meloeiro do Setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais (UNESP-FCAV), com sintoma de cancro-da-haste.

Após coleta, hastes de mudas com sintomas foram mantidas em câmara úmida em placas de Petri com algodão umedecido com água, por três dias. Foi utilizada a técnica de isolamento direto, na qual estruturas do fungo (picnídios e peritécios) foram retiradas da superfície dos caules (Figura 1 A) e transferidas para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e mantidas em BOD com temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12horas, por três dias (Figura 1 B).

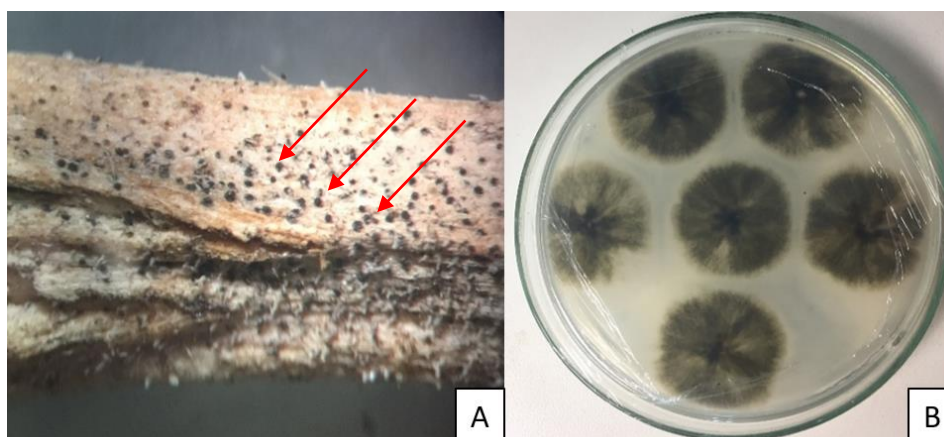


Figura 1. A) Estruturas de reprodução de *Didymella bryoniae* na superfície do caule da muda de melão; B) visão da placa de Petri contendo BDA com crescimento micelial de *Didymella bryoniae* após isolamento.

Após o crescimento micelial nos pontos de transferência das estruturas, discos de 5mm foram transferidos para novas placas, a fim de se obter cultura pura do fungo, e submetidos à temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas em BOD por dez dias, garantindo a sobrevivência do fungo.

3.5 Metodologias de inoculação de *Didymella bryoniae* em mudas de meloeiro

3.5.1 Método do grão de sorgo

O método consiste na multiplicação de *D. bryoniae* em grãos de sorgo como inóculo. Para higienização, foi realizada tríplex lavagem dos grãos em água destilada, sucedendo a retirada de resíduos. Logo após, os grãos foram transferidos para frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL e acrescentados 5 mL de água destilada, sendo esterilizados por autoclavagem a 120°C e 1 ATM por 30 minutos, três dias consecutivos. Após a última autoclavagem, tendo os grãos resfriados, foram adicionados seis discos de 5 mm do fungo repicado da cultura pura já citada, além de 5 mL de água destilada. Esses foram mantidos em temperatura ambiente (25°C ± 2°C) e 12 horas de luz, agitados duas vezes ao dia, por dez dias (Figura 2 A).

Na inoculação, foi borrifada água no colo das plântulas para aumento da umidade no ponto de inoculação. Assim, no tratamento sem fermento, foram depositados dois gramas de sorgo colonizado ao redor e em contato com o colo das mudas, e no tratamento com fermento realizou-se ranhura em forma de “z” com auxílio de haste pontiaguda esterilizada (Figura 2 B), também no colo das plântulas e foi adicionada a mesma quantidade de inóculo (Figura 2 C e D).

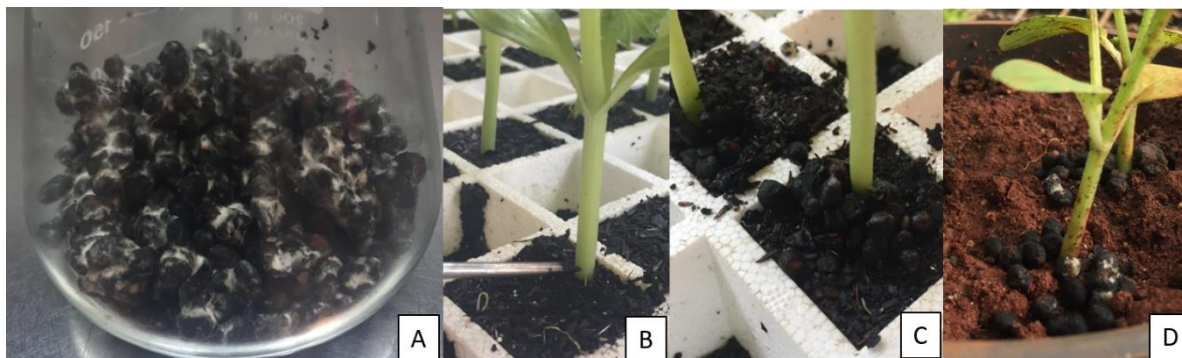


Figura 2. A) Sorgo colonizado por *Didymella bryoniae*; B) processo de ranhura no colo da plântula; C) inoculação do sorgo colonizado por *Didymella bryoniae* nas mudas em bandeja; D) inoculação do sorgo colonizado por *Didymella bryoniae* nas mudas em vaso.

3.5.2 Método do disco de papel

Discos de papel de filtro de 5 mm, foram previamente esterilizados por autoclavagem a 120°C e 1 ATM por 30 minutos. Após esse processo, esses discos de papel e discos de *D. bryoniae* obtidos da cultura pura do fungo foram depositados em placas de Petri contendo meio BDA. Em cada uma das placas, foram dispostos seis discos do fungo e 25 discos de papel (Figura 3 A). As placas foram mantidas em BOD, submetidas à temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas, por dez dias.

Em discos de papel, a presença do composto orgânico celulose pode explicar a ocorrência da formação de estruturas de reprodução de *D. bryoniae* no inóculo obtido (Figura 3 B). No método sem fermento, os discos de papel colonizados foram depositados sobre a superfície da haste das mudas (previamente borrifada com água), a um centímetro abaixo dos cotilédones, envolvidos por papel tipo filme, permitindo fixação do inóculo. O mesmo ocorreu para o tratamento com fermento, nesse caso foi feita ranhura em forma de “z” na haste das mudas, na mesma altura, e inoculado o disco de papel colonizado (Figura 4 C e D).

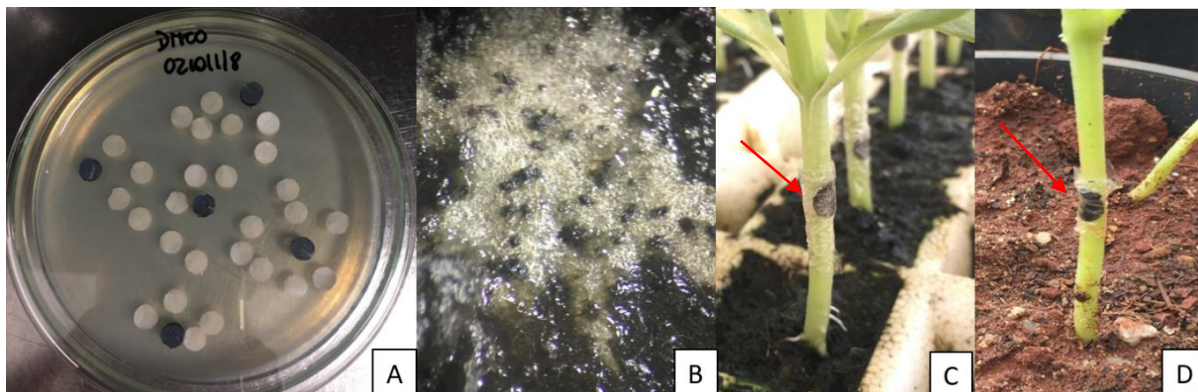


Figura 3. A) Produção do inóculo disco de papel colonizado; B) estruturas de reprodução do fungo formadas no desenvolvimento do inóculo (10 dias após repicagem); C) inoculação do disco de papel nas mudas em bandeja; D) inoculação do disco de papel nas mudas em vaso.

3.5.3 Método do palito colonizado

No método do palito colonizado adaptado (MELO, 2014; MEDEIROS et al., 2015), palitos de dente de madeira cortados com 1,5 cm de comprimento foram dispostos com a parte pontiaguda perfurando papéis de filtro. Os palitos de dente e papéis de filtro em conjunto passaram por processo de higienização em fervura com água durante 10 minutos, processo repetido por três vezes, a fim de retirar resíduos contidos no material. Após esse procedimento, os palitos foram acondicionados em placas de Petri e esterilizados por autoclavagem a 120°C e 1 ATM por 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado meio BDA, contendo o conjunto palito e papel de filtro e, após solidificação do meio, foram transferidos cinco discos de 5 mm do inóculo de *D. bryoniae*. Em seguida, foram submetidos à temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas em BOD, por dez dias (Figura 4 A).

Assim como no método do disco de papel, a presença de celulose pode explicar a formação de picnídios e peritécios nos palitos no processo de multiplicação do fungo (Figura 4 B). Para inoculação, os palitos colonizados foram inseridos na haste das plântulas a um centímetro dos cotilédones (Figura 4 C e D).

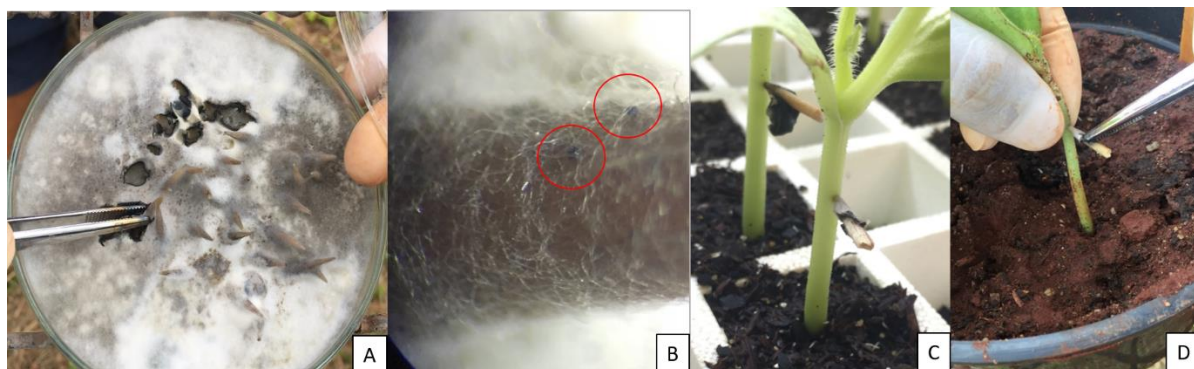


Figura 4. A) Palitos colonizados por *Didymella bryoniae*; B) estruturas de reprodução do fungo formadas no complexo; C) inoculação dos palitos colonizados na haste das plantas em bandeja; D) inoculação dos palitos colonizados na haste das plantas em vaso.

3.5.4 Método do palito de dente

No método do palito de dente (SIVIERO e MENTEN, 1995; VERZIGNASSI et al., 2004; SANTOS et al., 2013; SANTOS, 2016), palitos de madeira foram cortados ao meio e mantidas as pontas. Eles foram fervidos e esterilizados por autoclavagem nas mesmas condições do método citado anteriormente. Discos de fungo de 5 mm foram retirados de placas da cultura pura de *D. bryoniae* e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e submetidos à temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas em BOD, por oito dias (Figura 5 A).

No processo de inoculação, foi realizada inserção do palito de dente com o disco do fungo de 5 mm na haste das plântulas, a um centímetro abaixo das folhas cotiledonares (Figura 5 B e C).

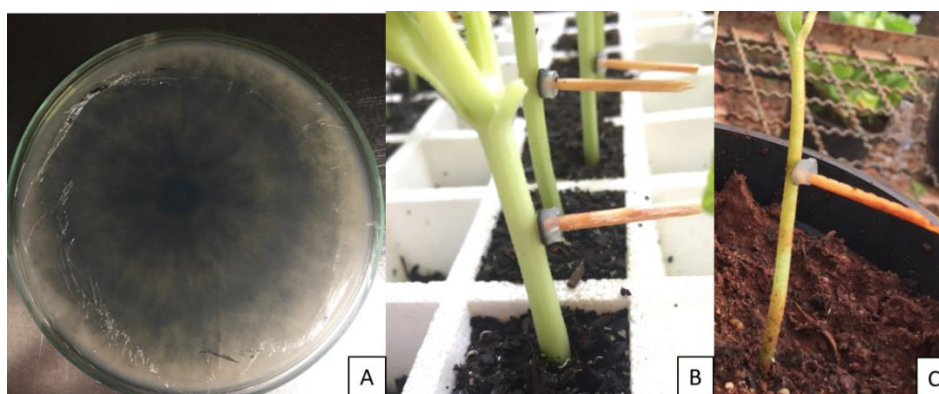


Figura 5. A) Placa de Petri contendo *Didymella bryoniae* em meio BDA; B) Inoculação do disco de *D. bryoniae* nas hastes das plântulas em bandeja; C) em vaso.

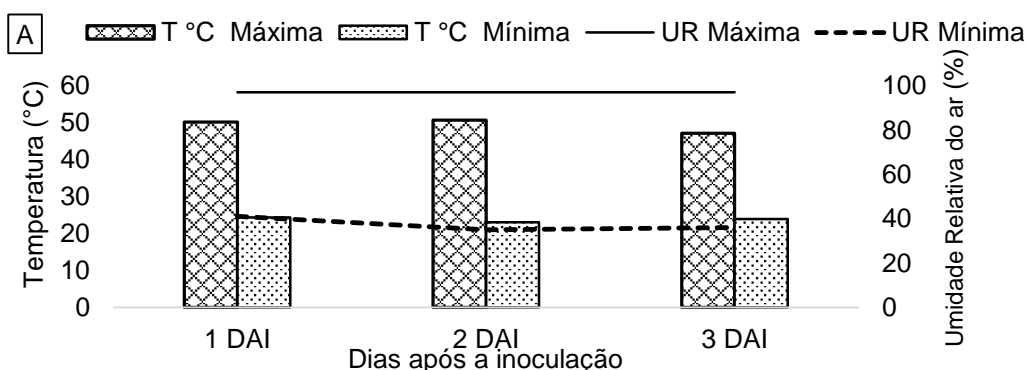
3.5.5 Testemunha sem inoculação e testemunha palito

As testemunhas que não envolveram a inoculação do fungo foram utilizadas para validar os testes, uma vez que o ambiente e materiais exógenos utilizados nos métodos de inoculação não devem interferir na ocorrência da doença. Na testemunha sem fermento, as mudas foram mantidas nas mesmas condições do restante dos tratamentos dos métodos de inoculação, porém sem inoculação do fungo, representando, assim, controle dos métodos sem fermento.

Por sua vez, a testemunha palito também seguiu o mesmo manejo, porém palitos esterilizados, seguindo o mesmo processo de esterilização citado no item 3.5.3, foram inseridos com discos de meio BDA de 5 mm na haste das mudas, a fim de simular a inoculação, representando testemunha para os métodos com fermento. Para cada testemunha correspondente aos métodos “com” e “sem” fermento na planta, foi utilizada uma parcela em cada bloco para ambos os experimentos.

3.6 Condições ambientais, avaliação e análises estatísticas

Após inoculação, todas as plantas dos tratamentos foram submetidas à câmara úmida por 72 horas e, logo depois, transferidas para casa de vegetação, na qual permaneceram até o fim do experimento. Considerando as mesmas condições ambientais nos dois experimentos, na repetição I, as médias de temperatura e umidade relativa do ar (UR) máxima e mínima da câmara úmida foram de 49,3°C e 23,7°C, e 97% e 34%, respectivamente, e no interior da casa de vegetação, 42,3°C e 20,8°C, e 95% e 25%, respectivamente. Na repetição II, a média da temperatura máxima foi de 49,9°C e mínima de 25,4°C; a média da UR máxima foi de 96% e mínima, de 35%; da casa de vegetação foi de 39,7°C e 18,9°C e 95% e 25%, respectivamente.



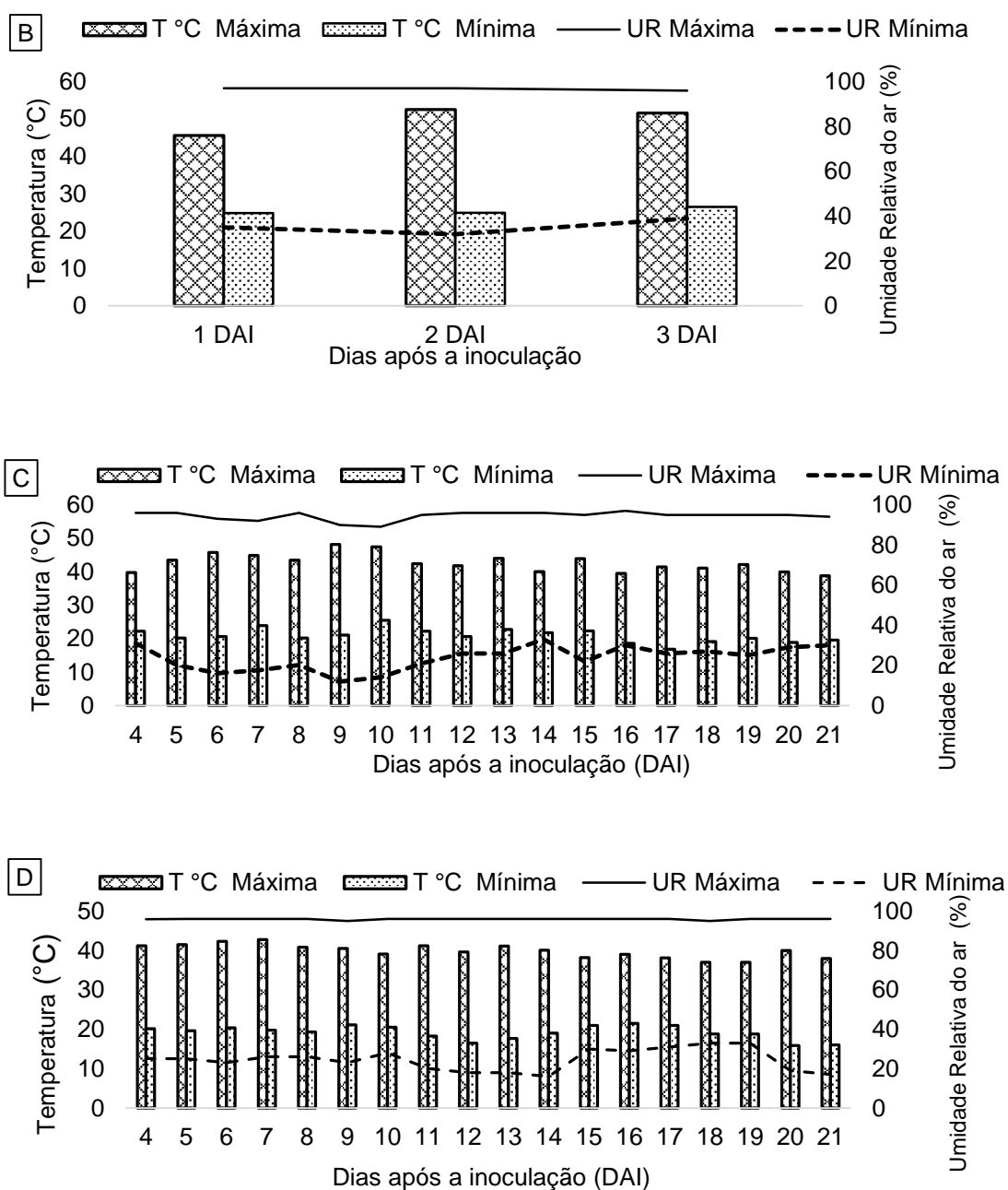


Figura 6. A) Médias das temperaturas e umidades relativas do ar máxima e mínima no interior da câmara úmida – repetição I; B) repetição II; C) Médias das temperaturas e umidades relativas do ar máxima e mínima no interior da casa de vegetação – repetição I; D) repetição II.

As avaliações foram realizadas aos 3, 7, 14 e 21 dias após inoculação (DAI), de acordo com a escala diagramática de Dusi et al. (1994), com notas variando de 0 a 4 (0 = ausência de sintomas visíveis; 1= lesão encharcada na haste da planta até 1 cm de diâmetro; 2 = lesão encharcada na haste da planta com mais de 1 cm de

diâmetro; 3 = lesão parcialmente necrosada na haste com murcha parcial da planta e 4 = necrose da haste com murcha total e morte da planta).

As avaliações foram encerradas assim que uma das parcelas apresentasse nota máxima na avaliação. Foi obtida média de notas de cada parcela e realizado o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), conforme Shaner e Finney (1997):

$$\text{AACPD} = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [X_{i+1} - X_i]$$

Em que:

Y_i : severidade da doença (nota por parcela) na i -ésima observação;

Y_{i+1} : severidade da doença na época da avaliação $i+1$;

X_i : tempo (dias) na i -ésima observação;

X_{i+1} : tempo (dias) da avaliação $i+1$;

n : número total de observações.

Para avaliação dos métodos de inoculação, foram utilizados valores de AACPD dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância e estudados de acordo com análise conjunta das repetições I e II dos experimentos. Os dados dos genótipos foram analisados de forma individual a fim de garantir a sua integridade, na medida em que se trata de materiais contrastantes quanto à reação de resistência a *D. bryoniae*.

Na ocorrência de diferenças significativas pelo teste F, procedeu-se à análise das médias, sendo agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A análise conjunta seguiu recomendação de Banzatto e Kronka (1992) pela ordem de grandeza dos quadrados médios residuais das análises individuais, de forma que a relação entre os quadrados médios residuais não ultrapassasse a relação 7:1. Também foi realizada correção linear entre os experimentos em bandeja e vaso. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* estatístico AgroEstat (BARBOSA e MALDONADO, 2015).

As testemunhas, devido à ausência de inoculação do fungo *Didymella bryoniae*, não foram analisadas estatisticamente, uma vez que não haveria evolução da doença, sendo impossibilitado o cálculo de AACPD.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação dos métodos de inoculação, foram utilizados dados do cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), que constitui o grau de severidade da doença nas plantas, incluindo notas médias em virtude dos tempos de avaliação, englobando todos os dados avaliados nos experimentos 1 (bandeja) e experimento 2 (vaso).

Na análise de variância conjunta das repetições I e II do experimento 1 (Tabela 1), de acordo com teste F, não houve significância entre as repetições, apresentando ainda relação de quadrados médios residuais de 4,02 e 1,94 para Eldorado 300 e PI 420145, respectivamente, atendendo critérios de agrupamento de repetições segundo a relação inferior a 7:1 (BANZATTO e KRONKA, 1992).

Além disso, na comparação de médias de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, estas não diferiram e apresentaram valores aproximados, 34,11 e 34,07, para o genótipo Eldorado 300, e médias de 17,23 e 17,14 para PI 420145, mostrando similaridade entre as repetições I e II do experimento.

Verificou-se também que a interação entre métodos de inoculação e repetições foi não significativa ($p > 0,05$). Os coeficientes de variação mostraram boa precisão, 13,44% e 6,07%, para o genótipo Eldorado 300 e, 8,81% e 6,29% para PI 420145, considerando que a escala de notas envolvendo tempos de avaliação progredem de forma exponencial com a doença, a variação dos dados segue esse pressuposto (SANTOS e CAFÉ-FILHO, 2005).

Tabela 1. Análise de variância para análise conjunta das repetições (I) e (II) do experimento 1 (bandeja) de avaliação de dois genótipos de melão para resistência a *Didymella bryoniae* - Comparação de médias de AACPD das repetições. UNESP-FCAV, Jaboticabal - SP, 2018.

| Repetições (R) | Eldorado 300 | PI 420145 |
|-----------------------------------|----------------------|--------------------|
| Média R1 | 34,11 a ¹ | 17,23 a |
| Média R2 | 34,07 a | 17,14 a |
| Teste F (R) | 0,00 ^{NS} | 0,04 ^{NS} |
| Rel. Maior/menor QM Resíduo | 4,02 | 1,94 |
| Métodos de inoculação (MI) | AACPD | AACPD |
| Palito disco do fungo | 38,53 a ¹ | 20,09 a |
| Disco de papel (com ferimento) | 36,32 a | 18,93 a |
| Grão de sorgo (com ferimento) | 35,44 a | 20,09 a |
| Palito colonizado | 35,43 a | 17,18 a |
| Grão de sorgo (sem ferimento) | 30,22 b | 11,49 a |
| Disco de papel (sem ferimento) | 28,64 b | 15,33 a |
| P | <0,0140 | <0,0006 |
| Teste F (MI) | 9,40* | 37,05** |
| Interação MI X R | 0,71 ^{NS} | 1,04 ^{NS} |
| CV (%) R1 | 13,44 | 8,81 |
| CV (%) R2 | 6,07 | 6,29 |
| Testemunha (sem inoculação) | 0,00 | 0,00 |
| Testemunha palito | 0,00 | 0,00 |

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{NS}: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p > 0,05$); *: Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p < 0,05$); **: Significativo ao nível de 1% pelo teste F ($p < 0,01$).

Na aplicação do teste F para cada um dos genótipos, observou-se diferença significativa entre os métodos de inoculação ao nível de 5% de probabilidade para o genótipo Eldorado 300 e a 1% de probabilidade para o PI420145. Para o genótipo Eldorado 300, destacaram-se os métodos com ferimento, sendo agrupados com médias de AACPD variando de 38,53 a 35,43, seguidos pelos métodos sem ferimento, com médias de 30,22 e 28,64.

Os maiores valores de severidade do primeiro agrupamento (com ferimento) permitem observar maior agressividade dos métodos quando comparado ao segundo grupo estatístico (sem ferimento). Além disso, é possível inferir que apesar de serem menos severos que os métodos que utilizam ferimento, esse segundo agrupamento foi também capaz de mostrar sintomas da doença, permitindo, assim,

explorar a resistência de materiais à penetração do fungo nas plantas (TAKADA, 1980; DUSI et al., 1994).

Quando utilizado o método com ferimento, o inóculo foi colocado (nesse caso, disco de fungo, grão de sorgo e disco de papel colonizado) em contato direto com células internas do tecido do hospedeiro. Os organismos capazes de colonizar essas células podem suprimir os mecanismos de defesa da planta, o que viabiliza a infecção e evolução da doença (STANGARLIN et al., 2011).

Em contrapartida, nos métodos sem ferimento, o inóculo foi depositado em contato com a superfície do hospedeiro, ocorrendo a entrada do patógeno por meio da sua superfície íntegra, fazendo com que a infecção ocorresse de forma mais lenta e branda, o que mais se aproxima do que ocorre no campo, quando a planta é infectada de forma natural. Chiu e Walker (1949) no estudo com *D. bryoniae* observaram que a penetração do fungo em plântulas de melão, melancia e abóbora ocorreu quando o micélio foi colocado em contato próximo com a superfície do hipocótilo ou haste e fornecida umidade suficiente sem necessidade de ferimento, o que corrobora com os resultados dessa pesquisa.

Além disso, é necessário destacar a importância da praticidade do método de inoculação, bem como a obtenção do inóculo. Dentre os métodos sem ferimento, o método grão de sorgo apresentou maior facilidade no processo de preparo do inóculo e também a forma de inoculação no momento da aplicação do método.

Analisando os métodos de inoculação para o genótipo PI 420145, apesar de classificado como material resistente (WOLUKAU et al., 2007; BI et al. 2015; SANTOS, 2017), este ainda não se apresentou totalmente imune a *D. bryoniae*. Reação observada também por Zhang et al. (2017) em estudo de piramidação de genes para resistência a *D. bryoniae*, afirmando que é necessário mais de um gene para controle de resistência a essa doença em melão. Além disso, é importante lembrar que a resistência horizontal é atribuída a diferentes níveis de resistência do hospedeiro, o que permite explicar a reação do material frente ao patógeno (CAMARGO, 2018).

Para o genótipo PI 420145, os valores médios de AACPD apresentaram comportamento semelhante para todos os métodos de inoculação pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Em outras palavras, o genótipo apresentou resistência ao

patógeno independentemente do método utilizado, validando sua utilização no experimento. As testemunhas não apresentaram sintomas de doença, sendo avaliadas com nota zero em todas as avaliações.

No experimento 2, segundo dados da análise conjunta das repetições, não houve diferença significativa do teste F ao nível de 5% de probabilidade entre as repetições do experimento. Verificou-se relação de quadrados médios (maior/menor) de 1,67 e 1,14, para Eldorado 300 e PI 420145, respectivamente, adequadas à análise conjunta (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância para análise conjunta das repetições (I) e (II) do experimento 2 (vaso) de avaliação de dois genótipos de melão para resistência a *Didymella bryoniae* - Comparação de médias de AACPD das repetições. UNESP-FCAV, Jaboticabal - SP, 2018.

| Repetições (R) | Eldorado 300 | PI 420145 |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|
| Média R1 | 48,98 a | 23,09 a |
| Média R2 | 47,94 a | 22,61 a |
| Teste F (R) | 1,94 ^{NS} | 1,24 ^{NS} |
| Rel. Maior/menor QM Resíduo | 1,67 | 1,14 |
| Métodos de inoculação (MI) | AACPD | AACPD |
| Palito colonizado | 58,47 a ¹ | 20,28 b |
| Palito disco do fungo | 49,92 b | 26,38 a |
| Grão de sorgo (com fermento) | 48,78 b | 27,25 a |
| Disco de papel (com fermento) | 45,35 c | 25,82 b |
| Grão de sorgo (sem fermento) | 45,00 c | 20,05 b |
| Disco de papel (sem fermento) | 43,22 c | 19,73 b |
| P | <0,0006 | <0,0002 |
| Teste F (MI) | 36,35 ^{**} | 63,18 ^{**} |
| Interação MI X R | 0,43 ^{NS} | 0,13 ^{NS} |
| CV (%) R1 | 7,77 | 12,52 |
| CV (%) R2 | 6,14 | 14,11 |
| Testemunha (sem inoculação) | 0,00 | 0,00 |
| Testemunha palito | 0,00 | 0,00 |

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{NS}: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p>0,05$); *: Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p<0,05$); **: Significativo ao nível de 1% pelo teste F ($p<0,01$).

A análise de variância apresentou médias de AACPD de 48,98 e 47,94 para Eldorado 300, indicando valores maiores do que os obtidos no experimento 1. O mesmo ocorreu para o genótipo PI 420145 (AACPD 23,09 e 22,61), porém em

menor proporção, como já esperado com base no comportamento do material no experimento em bandeja.

Essa diferença entre a severidade da doença nos experimentos 1 (bandeja) e 2 (vaso) pode ser explicada principalmente em virtude da variação de microclimas entre suas condições. Observou-se que, apesar de os experimentos serem mantidos sob condições idênticas, no experimento 2 o solo foi capaz de reter água por mais tempo quando comparado ao substrato, permitindo manter umidade mais favorável para evolução da doença. Além disso, as plantas em vaso têm maior capacidade de desenvolvimento e espaço, favorecendo ainda mais esse microclima, o que não ocorreu nas plantas em bandeja do experimento 1.

Para os métodos de inoculação, a interação entre métodos de inoculação e repetições não foi significativa ($p > 0,05$). Os coeficientes de variação para o material suscetível foram de 7,77 e 6,14, ao passo que para o resistente foram 12,52 e 14,11, esses dois últimos maiores do que no experimento 1, porém adequados ao experimento.

Na análise de variância para métodos de inoculação, tanto o genótipo Eldorado 300 quanto o PI 420145 apresentaram F significativo ao nível de 1% de probabilidade. Para o genótipo suscetível, foi destaque o método do palito colonizado, com média de 58,47 para AACPD, acima de todos os outros tratamentos. De acordo com a Figura 4B do item 3.5.2, a presença de estruturas de reprodução (picnídios e peritécios) quando inoculados, favorecidos pelas condições de umidade e ferimento na planta, colaborou para esse resultado. O mesmo foi observado por Medeiros et al. (2015), os quais verificaram que o método do palito colonizado proporcionou maior severidade do patógeno quando comparado ao método substrato areno-orgânico para *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro.

A distribuição dos métodos de inoculação seguiu o comportamento do experimento 1, considerando os métodos com ferimento na planta. Somente o método do disco de papel com ferimento apresentou novo agrupamento (45,35) junto aos tratamentos grão de sorgo e disco de papel sem ferimento (45,35 e 43,22, respectivamente).

Para o genótipo PI 420145, as maiores médias de AACPD foram obtidas nos métodos grão de sorgo com fermento (27,25), palito com disco do fungo (26,38) e disco de papel com fermento (25,82), diferindo-se dos outros métodos que não apresentaram diferença significativa entre si. Esse resultado pode ser explicado por serem métodos de inoculação mais drásticos. Embora tenham se destacado, mantiveram médias aproximadas do restante dos tratamentos, o que valida a utilização do material padrão de resistência. Somente o método palito colonizado apresentou comportamento semelhante aos métodos sem fermento na planta. Considerando experimentos envolvendo patógenos, é possível observar, em alguns casos, comportamentos independentes de organismos vivos.

As testemunhas apresentaram nota zero do início ao fim das avaliações, assim como ocorreu no experimento 1.

Em virtude da praticidade e das questões já levantadas anteriormente, realizou-se correlação entre métodos de inoculação utilizados em bandeja e em vaso para cada um dos genótipos. De acordo com análise, ao nível de 1% de probabilidade, verificou-se alto nível e positiva correlação entre os experimentos, apontando coeficiente de correlação (r) 0,96 e 0,87, para o genótipo Eldorado 300 e PI 420145, respectivamente (Tabela 3).

Uma correlação positiva indica que as duas variáveis se movem juntas, e a relação é forte quanto mais o coeficiente de correlação se aproxima de um (BERTOLO, 2002). Isso implica que os métodos se comportaram de forma semelhante nos experimentos 1 e 2. Nesse caso, o experimento 1 (bandeja) apresenta vantagens por ser menos trabalhoso, ocupando menor espaço, quando comparado ao experimento 2 (vaso).

Tabela 3. Correlação entre experimentos 1 e 2 de avaliação de dois genótipos de melão para resistência a *Didymella bryoniae*. UNESP-FCAV, Jaboticabal - SP, 2018.

| Correlação | Eldorado 300 | PI420145 |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Bandeja x Vaso | $r = 0,96^{**}$ ($p < 0,0001$) | $r = 0,87^{**}$ ($p < 0,0001$) |

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade pela análise de correlação entre variáveis.

Em destaque aos métodos, dentre os tratamentos que não utilizam ferimento, o método grão de sorgo sem ferimento é uma boa opção para avaliação de cultivares resistentes, o qual se mostrou tão eficaz quanto os utilizados em pesquisas anteriores (VERZIGNASSI et al., 2004; ITO et al., 2009; SILVA et al., 2012; SANTOS, 2016), e capazes de distinguir materiais resistentes.

5 CONCLUSÕES

- Não é necessária utilização de ferimentos nos métodos de inoculação para a seleção de genótipos resistentes visando ao cancro-da-haste em melão;
- Os métodos de inoculação em bandeja são mais práticos do que os métodos em vaso e ambos garantem a mesma eficiência;
- O método do grão de sorgo sem ferimento na planta é adequado para avaliação de genótipos resistentes a *Didymella bryoniae*, sendo capaz de discriminar materiais resistentes de suscetíveis, além de ser uma metodologia rápida e menos trabalhosa.

6 REFERÊNCIAS

BALA G, HOSEIN F (1986) Studies on gummy stem blight disease of cucurbits in Trinidad. **Tropical Agriculture** 63:195-197.

BANZATTO DA, KRONKA SN (1992) **Experimentação agrícola**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 231 p.

BARBOSA JC, MALDONADO JW (2015) **Experimentação Agronômica & AgroEstat**: Sistema para Análises Estatísticas de Repetições Agronômicas. Jaboticabal: FUNEP, 396 p.

BARBOSA RNT, HALFELD-VIEIRA BA, NECHET KL, SOUZA GR (2010) Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro. **Revista Agroambiente**, 4:49-52.

BATES DM, ROBINSON RN (1995) Cucumber, melons and watermelons, *Cucumis* and *Citrullus* (*Cucurbitaceae*). In: Smartt J & Simmonds NW (Eds.) **Evolution of Crop Plants** p. 89-111.

BERTOLO LA (2002). **Correlação e análise linear**. Administração financeira e análise de investimentos. FACICA - Faculdade de Ciências e Tecnologias de Campos Gerais. Disponível em: <<http://www.bertolo.pro.br/AdminFin/index.htm>>. Acesso em: 1º mai., 2018.

BI YF, XU B, QIAN C, GUO J, ZHANG Y, YI H. (2015) Pyramiding disease resistance genes and variety improvement by molecular marker-assisted selection in melon (*Cucumis melon* L.). **Scientia Agricultura Sinica** 48:523-533.

BONETTI JA, ZANUZO MR, MACHADO RA, CONSTANTINO EJ, CACHO RC, FERNANDO A (2011) Influência do parcelamento de potássio (K) nas características do melão utilizando sistema tutorado em Sinop-MT. **Revista Uniara** 14:110-117.

BRANDÃO-FILHO JUT, VASCONCELLOS MAS (1998) A cultura do meloeiro. In: GOTO R, TIVELLI SW (Eds.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido**: condições subtropicais. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, p.161-193.

BURGER Y, PARIS HS, COHEN R, KATZIR N, TADMOR Y, LEWINSOHN E, SCHAFFER AA (2010) Genetic diversity of *Cucumis melo*. **Horticulture Reviews** 36:165-198.

CAMARGO LEA (2018) Controle genético. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; E BERGAMIN-FILHO, A. **Manual de fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 229-23.

CÉSAR NS, SANTOS GR (2001) Doenças da cultura da melancia no Projeto Formoso, Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, 411 p. Suplemento.

COSTA ND, DIAS RCS, FARIA CMB, TAVARES SCCH, TERAÓ D (2000) **Cultivo do melão**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido. (Circular Técnica n. 59), 67 p.

CHIU WF, WALKER J C (1949) Physiology and pathogenicity of cucurbit black-rot fungus. **Journal of Agricultural Research** 78:589-615.

CHOI IY, CHOI JN, CHOI DC, SHARMA PK, LEE WH (2010) Identification and characterization of the causal organism of gummy stem blight in the muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Mycobiology** 38:166-170.

CLAUDINO MR (2013) **Métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira visando à seleção de genótipos resistentes**. 29f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba. Embrapa Algodão.

DAVIDS C, HOLTSLAG J, DIMOCK JRV (1988) Competitive exclusion, harem behavior and host specificity of the water mite *Unionicola Ypsilophora* (Hydrachnellae, Acari) inhabiting *Anodonta Cygnea* (Unionidae). **Internationale Revuegesamten Hydrobiologie**, 73:651–657.

DUSINA, TASAKI S, VIEIRA SV (1994) Metodologia para avaliação de resistência à *Didymella bryoniae* em melão. **Horticultura Brasileira** 12:43-44.

FAOSTAT - database collections. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**(2016).Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 26 abr., 2018.

FRANTZ JD, JAHN MM (2004) Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 108:1033-1038.

GASPAROTTO F, VIDA JB, TESSMANN DJ, ALVES TCA (2011) Infecção latente de *Didymella bryoniae* em meloeiro nobre. **Summa Phytopathologica**, 37:62-64.

GASPAROTTO F, VIDA JB, TESSMANN DJ, BONALDO SM, AGUIAR RL, PENHARBEL MP (2009) Eficiência de métodos para detecção de *Didymella bryoniae* associado a sementes de híbridos de meloeiros nobres. **Acta Scientiarum Agronomy**, 31:397-402.

GROSSENBACHER JGA (1909) *Mycosphaerella* wilt of melons. N. Y. (Geneva) **Agricultural Experiment. Station Technical Bulletin**, 9:199-229.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (2016) Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>>. Acesso em: 26 abr., 2018.

ITO LA, BRAZ LT, CASTOLDI R, CHARLO HCO, CAMARGO M (2009) Seleção de portas enxertos resistentes ao Cancro-da-haste e seus efeitos na produtividade de melão 'Bônus 2'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31:262-267.

JULIATTI FC, SAGATA E, JACCOUD FILHO DS, JULIATTI BCM (2014) Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal** 30:958-968.

JEFFREY C (1980) A review of the *Cucurbitaceae*. **Botanical Journal of the Linnean Society** 81:233-247.

KEINATH AP (2015) Baseline sensitivity of *Didymella bryoniae* to cyprodinil and fludioxonil and field efficacy of these fungicides against isolates resistant to pyraclostrobin and boscalid. **Plant Disease** 99:815-822.

KEINATH AP (2011) From native plants in Central Europe to cultivated crops worldwide: the emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. **HortScience** 46:532-535.

KEINATH AP (1995) Fungicide timing for optimum management of gummy stem blight epidemics on watermelon. **Plant Disease** 79:354-358.

KÖPPEN W (1948) **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra.** Fondo de Cultura Econômica, México, 479p.

LUAN F, SHENG Y, WANG Y, STAUB JE (2010) Performance of melon hybrids derived from parents of diverse geographic Origins. **Euphytica** 173:1-16.

MAHMOUDI SB, GHASHGHAIE S (2012) Reaction of sugar beet S1 lines and cultivars to different isolates of *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. **Euphytica** 175:10-16.

MEDEIROS RD, MOREIRA MAB, LUZ FJF, OLIVEIRA JÚNIOR JOL (2000) Controle de plantas daninhas na cultura da melancia em Roraima. **Horticultura Brasileira** 18:450-451.

MEDEIROS AC, AMBRÓSIO MMQ, NUNES GHS, COSTAJM (2015) Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica** 41:281-286.

MELO DRM (2014) **Métodos de inoculação, reação de acessos, e herança de resistência do meloeiro a *Rhizoctonia solani*.** 91f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró-RN.

NEERGAARD P (1973) Detection of seed-borne pathogens by culture tests. **Seed Science and Technology** 1:217-254.

PARET ML, DUFAULT NS, OLSON SM (2011) **Management of Gummy Stem Blight (Black Rot) on Cucurbits in Florida.** University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences. p. 1-9. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pp280>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

PEREIRA RB, PINHEIRO JB, CARVALHO ADF (2012). **Identificação e manejo das principais doenças fúngicas do meloeiro.** Brasília, DF, EMBRAPA Hortaliças, ed. 1, n. 112, p. 1-5.

PITRAT M (2008) Melon. In: PROHENS J, NUEZ F. **Handbook of plant breeding,** New York: Springer. p. 283-315.

PITRAT M, HANELT P, HAMMER K (2000). Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. In: VII Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. **Proceedings...** p. 29-36.

RABELO HO, SANTOS LS, DINIZ GMM, MARIN MV, BRAZ LT, McCREIGHT JD (2017) Cucurbits powdery mildew race identity and reaction of melon genotypes. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 47:440-447.

ROBINSON RW, DECKER-WALTERS DS (1997) **Cucurbits Crop Production Science in Horticulture Series**, Cucurbits. Cab International, New York.

RUSSEL GE (1978) **Plant breeding for pest and disease resistance**. Department of Agricultural Biology. University of Newcastle upon Tyne. London- Boston, 485 p.

SANTOSLS (2016) **Seleção de genótipos de meloeiro para obtenção de linhagens com resistência *Didymella bryoniae***. 91f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

SANTOS AA, CRISÓSTOMO JR, CARDOSO JW (2004) **Avaliação de híbridos de melão quanto às principais doenças nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte**. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n. 16), Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 14 p.

SANTOS LS, CÂNDIDO WS, RABELO HO, MARIN MV, GAIONLA, GOMES RF, CAMARGO M, BRAZ LT (2017) Reaction of melon genotypes to *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. **Chilean Journal of Agricultural Research** 1:71-77.

SANTOS GR, CAFÉ-FILHO AC (2005) Reação de genótipos de melancia ao crestamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira** 23:945-950.

SANTOS GR, LEÃO EU, GARCIA MMV, MALUF WR, CARDON CH, GONÇALVES CG, NASCIMENTO IR (2013) Reação de genótipos experimentais de melancia ao crestamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira** 31:540-548.

SCHENCK NC (1968) Epidemiology of gummy stem blight (*Mycosphaerella citrulina*) on watermelon: ascospore incidence and disease development. **Phytopathology** 58:1420-1422.

SEBASTIAN P, SCHAEFERB H, TELFORD IRH, RENNER SS (2010) *Cucumber (Cucumis sativus) and melon (C. melo) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. Proceedings National Academy Science* 107:14269-14273.

SEAGRI. **Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura**. A abertura de novos mercados compradores no exterior para o melão nacional tem impulsionado o crescimento regular da produção no Brasil. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/PDF%20Fruticultura_2017.pdf>. Acesso em: 8 mai. 2018.

SENAR - **Serviço Nacional de Aprendizagem Rural**. (2007) Cultivo de melão: manejo, colheita, pós-colheita e comercialização. Brasília: SENAR, 104 p.

SHANER G, FINNEY RE (1997) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology** 67:1051-1056.

SILVA AS (2011) **Seleção de metodologias para inoculação da fusariose do maracujazeiro causada por *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Passiflorae***. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura), 20 p.

SILVA ES, PALANGANA FC, GOTO R, FURTADO EL, FERNANDES DM (2012) Net melon resistance to *Didymella bryoniae* according to grafting and potassium levels. **Summa Phytopathologica** 38:139-143.

SILVA PSL, MARIGUELE KH, SILVA PIB (2003) Produtividade do meloeiro em função de cultivares e épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Fruticultura** 25:552-554.

SITTERLYRW, KEINATH AP (1996) Gummy stem blight. In: ZITTER TA; HOPKINS DL; THOMAS C (Eds). Compendium of Cucurbit Diseases. **American Phytopathological Society Press**, p. 27-28.

SIVIERO A, MENTEN JOM (1995) Uso do método do palito para inoculação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em soja. **Summa Pytopathologica** 21:259-260.

STANGARLIN JR, KUHN OJ, TOLEDO MV, PORTZ RL, SCHWAN-ESTRADA KRF, PASCHOLATI SF (2011) A Defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**10:18-46.

TAKADA K (1980) Studies on the breeding of melon resistant to gummy stem blight – II. Evaluation of inoculation methods and post-inoculation environments for screening breeding materials. **Bulletin of Vegetable and Ornamental Crops Research** 7:11-12.

TANAKA MAS, PASSOS FA, BETTI JA, PIRES CMP (2001) Inoculation methods of *Colletotrichum fragariae* on strawberry. **Scientia Agricola** 58:725-729.

TSUTSUMI CY (1995) **Triagem de populações de melão (*Cucumis melo* L.) para resistência a *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP.

TSUTSUMI CY, SILVA N (2004) Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions. **Brazilian archives of Biology and technology** 47:171-177.

VAN STEEKELENBURG NAM (1986) ***Didymella bryoniae* on glasshouse cucumber**. Wageningen University & Research, Laboratory of Phytopathology, 105 p.

VERZIGNASSI JR, VIDA JB, GASPAROTTO F, CORTEZ GLS, LORENZETTI ER, FARIA GSF, TESSMANN DJ, SEVERINO JJ (2004) Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão-nobre e pepino-“japonês”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, 154 p. Suplemento.

VIANA FMP, SANTOS AA, FREIRE FCO, CARDOSO JE, VIDAL JC (2001) **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na Região Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, (Circular Técnica n. 12), 22 p.

VIDA JB (1995) Manejo de doenças em cultivo protegido. In: BRANDÃO-FILHO JUT, CONTIERORL, ANDRADE JMB (org.). **Cultivo protegido**. Maringá: Imprensa Universitária/UEM, p. 25-34.

VIDA JB, TESSMANN DJ, ZAMBOLIM L, VERZIGNASSI JR, BRANDÃO-FILHO JUT (2004) Controle da podridão gomosa em melão rendilhado por sanitização de ferramenta de poda. **Fitopatologia Brasileira** 29:626-631.

WALTERS TW (1989) Historical overview of domesticated plants in China with special emphasis on the Cucurbitaceae. **Economic Botany** 43:297-313.

WHITAKER TW, DAVIS GN (1962) **Cucurbits: botany, cultivation and utilization**. London: London Hill. 250 p.

WOLUKAU JN, ZHOU X, CHEN J (2009) Identification of amplified fragment length polymorphism markers linked to gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) resistance in melon (*Cucumis melo* L.) PI 420145. **HortScience** 44:32-34.

WOLUKAU JN, ZHOU XH, LI Y, ZHANG YB, CHEN JF (2007) Resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm and inheritance of resistance from Plant Introductions 157076, 420145, and 323498. **HortScience** 42:215-221.

ZHANG N, XU B, BI Y, LOU Q, CHEN J, QIAN C, ZHANG Y, YI H (2017) Development of a Muskmelon Cultivar with Improved Resistance to Gummy Stem Blight and Desired Agronomic Traits Using Gene Pyramiding. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding** 53:23-29.