

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

**METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae* E
RETROCRUZAMENTOS VISANDO INTROGRESSÃO DA
RESISTÊNCIA EM MELOEIRO RENDILHADO**

Marcos Cláudio da Silva Virtuoso
Engenheiro Agrônomo

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

**METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae* E
RETROCRUZAMENTOS VISANDO INTROGRESSÃO DA
RESISTÊNCIA EM MELOEIRO RENDILHADO**

Marcos Cláudio da Silva Virtuoso

Orientador: Prof. Dr. Pablo Forlan Vargas

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Rita de Cassia Panizzi

Prof^a. Dr^a. Leila Trevisan Braz

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Genética e Melhoramento de
Plantas)

V819m

Virtuoso, Marcos Cláudio da Silva

Metodologia de inoculação de *Didymella bryoniae* e retrocruzamentos visando introgressão da resistência em meloeiro rendilhado / Marcos Cláudio da Silva Virtuoso. -- Jaboticabal, 2022
94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Pablo Forlan Vargas

Coorientadora: Rita de Cássia Panizzi

1. Melhoramento Genético. 2. Fitopatologia. 3. Melão. 4. Interação
genótipo-ambiente. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

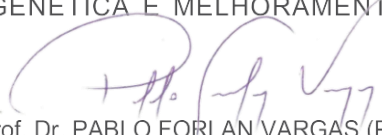
TÍTULO DA TESE: METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae* E RETROCRUZAMENTOS VISANDO INTROGRESSÃO DA RESISTÊNCIA EM MELOEIRO RENDILHADO.

AUTOR: MARCOS CLÁUDIO DA SILVA VIRTUOSO

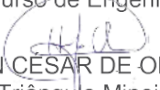
ORIENTADOR: PABLO FORLAN VARGAS

COORIENTADORA: RITA DE CÁSSIA PANIZZI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PABLO FORLAN VARGAS (Participação Virtual)
Coordenadoria de Curso de Engenharia Agrônoma / UNESP - Câmpus de Registro



Prof. Dr. HAMILTON CÉSAR DE OLIVEIRA CHARLO (Participação Virtual)
Instituto Federal do Triângulo Mineiro / IFTM - Uberaba/MG



Profa. Dra. FERNANDA DIAS PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. SEBASTIÃO MÁRCIO DE AZEVEDO (Participação Virtual)
Departamento de Agricultura / Universidade Federal de Lavras - UFLA



Profa. Dra. RENATA CASTOLDI (Participação Virtual)
Universidade Federal de Uberlândia / UFU - Câmpus Monte Carmelo, MG

Jaboticabal, 14 de junho de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCOS CLÁUDIO DA SILVA VIRTUOSO - nasceu em 23 de abril de 1993, na cidade de Carmo do Rio Verde – GO. Filho de Claudiomar Alvez Virtuoso e Lucimar Felix da Silva. Em 2011, ingressou no curso de Agronomia pelo Instituto Federal Goiano – Câmpus Ceres. No decorrer da graduação, foi bolsista de iniciação científica PIVIC/IFGoiano e PIBITI/IFGoiano, participando do projeto “Melhoramento genético de pimentas *Capsicum* adaptadas às condições edafoclimáticas do centro e norte Goiano” com a colaboração da Embrapa Hortaliças. Também participou de pesquisas na área de produção e tecnologia de sementes, na mesma instituição. Em março de 2016 ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal-SP. Foi bolsista CAPES no primeiro ano e FAPESP no segundo, trabalhando com melhoramento genético para tolerância de espécies florestais ao déficit hídrico, com enfoque na cultura do eucalipto e obteve o título de mestre em fevereiro de 2018. Em março de 2018 ingressou no curso de doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela mesma instituição, com bolsa da CAPES, tendo como desafio introduzir genes de resistência ao cretamento gomoso do caule em melão rendilhado. Em janeiro de 2022, iniciou um estágio na Universidade de Alberta – Canadá, no grupo de estudos Livestock Gentec, para aprimorar os conhecimentos nas áreas de Genômica, genética e bioinformática, com foco em avaliação de características quantitativas, seleção genômica e estudos de associação de genômica ampla.

“O mal de quase todos nós é que preferimos ser arruinados pelo elogio a ser salvos pelas críticas”

(Norman Vincent)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha vida, dando discernimento para enfrentar e superar as dificuldades.

Aos meus pais, Pedro Ramos da Cruz e Lucimar Felix da Silva, pelo exemplo de luta, determinação e companheirismo, e por sempre estarem presentes em minha vida.

A minha irmã Francielle Ramos da Silva, pelo apoio e carinho.

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 (Genética e Melhoramento de Plantas), pela oportunidade concedida para a realização do curso em nível de doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro concedido ao presente trabalho – Código de Financiamento 001.

Ao Prof. Dr. Pablo Forlan Vargas, pela orientação, apoio.

Às coorientadoras Prof^a. Dr^a. Leila Trevisan Braz e Prof^a. Dr^a. Rita de Cassia Panizzi pelas orientações, disponibilidade, dedicação, amizade, paciência, e principalmente pelos conselhos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), que muito contribuíram para minha formação.

Aos funcionários do Setor de Olericultura e Plantas Aromático Medicinais da FCAV/UNESP, Inauro, Reinaldo e Cláudio.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) da FCAV/UNESP: Rosane, Sidnéia e Wagner.

Aos amigos do grupo do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento – NEOM, pelos momentos de trabalho e descontração vividos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância socioeconômica	3
2.2 Origem e classificação.....	4
2.3 Melão rendilhado	6
2.4 Crestamento gomoso do caule	7
2.5 Metodologias de inoculação	9
2.6 Melhoramento genético do meloeiro.....	10
2.6.1 Retrocruzamento	11
3 REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 2 - PROVIDING INOCULUM FOR <i>Didymella bryoniae</i> STUDIES: THE EFFECT OF LIGHT SPECTRUM AND STORING AT LOW TEMPERATURE¹	19
ABSTRACT	19
RESUMO	20
1 INTRODUCTION.....	21
2 MATERIAL AND METHODS.....	22
2.1 Culture medium and light spectrum	23
2.2 Storing at -20°C	24
2.3 Statistical analysis.....	25
3 RESULTS	25
4 DISCUSSION.....	29
5 CONCLUSIONS.....	31
6 REFERENCES.....	32
CAPÍTULO 3 - IMPLICATIONS OF THE INOCULATION METHOD AND ENVIRONMENT IN THE SELECTION OF MELON GENOTYPES RESISTANT TO <i>Didymella bryoniae</i>¹	36
ABSTRACT	36
1 INTRODUCTION.....	37

2 MATERIAL AND METHODS.....	38
2.1 Inoculum preparation	39
2.3 Resistance evaluation.....	41
2.4 Statistical analysis.....	44
3 RESULTS	44
3.1 Inoculation methods and environmental conditions	45
3.2 Genotypes and inoculation methods.....	46
3.3 Genotypes and environmental conditions	47
3.4 Genotype classification	48
4 DISCUSSION.....	49
4.1 Inoculation method.....	50
4.2 Environmental conditions.....	51
4.3 Genotypes and screening condition interactions	52
5 CONCLUSIONS.....	54
6 REFERENCES.....	54
CAPÍTULO 4 – INTROGRESSÃO DE GENE DE RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO GOMOSO DO CAULE EM LINHAGENS DE MELÃO RENDILHADO	59
RESUMO	59
ABSTRACT	61
1 INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 Caracterização dos genótipos	64
2.2 Retrocruzamento e recuperação do parental recorrente	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1 Caracterização e análise de divergência	71
3.2 Retrocruzamento	81
3.2.1 Seleção para resistência.....	81
3.2.2 Recuperação do background do genótipo recorrente	82
4 CONCLUSÕES	86
5 REFERÊNCIAS.....	86
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Didymella bryoniae* E RETROCRUZAMENTOS VISANDO INTROGRESSÃO DA RESISTÊNCIA EM MELOEIRO RENDILHADO

RESUMO - Dos muitos grupos de melão produzidos no Brasil, os melões nobres, como o melão rendilhado tem ganhado destaque por seu alto valor agregado e pela preferência internacional, tornando seu cultivo atrativo. A desvantagem do cultivo do melão rendilhado, é que na maioria das vezes são necessárias técnicas mais refinadas, como cultivo em casa de vegetação, principalmente, se o local de produção não oferece condições climáticas favoráveis. É o caso das regiões sul e sudeste que apresentam pouca expressão na produção de melão, porém, com o emprego da produção em casa de vegetação e o cultivo na entressafra de outras regiões, o melão pode se tornar competitivo e ser vantajoso para o produtor. O grande desafio da produção nesses locais é o aparecimento de doenças como o crestamento gomoso do caule (CGC) causado pelo fungo *Didymella bryoniae*, trazendo grandes prejuízos aos produtores. Pensando nisso, objetivou obter linhagens de meloeiro rendilhado resistentes ao crestamento gomoso do caule introduzindo-se genes de resistência via retrocruzamento. Para isso o trabalho foi dividido em: (1) identificar a melhor condição para esporulação de *D. bryoniae* in vitro; (2) avaliar como diferentes condições de triagem influenciam a classificação de resistência e a ocorrência de efeitos ambientais em genótipos de meloeiro com locus de resistência monogênico dominante a *D. bryoniae*; (3) caracterizar e analisar a divergência genética de genótipos de meloeiro; (4) introduzir genes de resistência em linhagens elite de melão rendilhado por meio do retrocruzamento. Na primeira etapa, foram combinados diferentes espectros de luz (luz UV-A ou UV-B, luz branca e escuro contínuo) com distintos meios de cultura (BDA, V8, FM e BDAR). Em conclusão, a luz UV-B é essencial para a esporulação de *D. bryoniae* in vitro. Além disso, a composição do meio de cultura influencia o tipo de estrutura fúngica produzida, bem como o tamanho e a quantidade dos esporos. Nas condições de triagem, quatro experimentos em blocos casualizados foram utilizados para avaliar a reação de sete genótipos de melão, a saber, os acessos resistentes PI140471, PI420145 e PI157082, e seus respectivos cruzamentos. Esses genótipos foram inoculados por disco ou esporos de micélio-ágar e submetidos a duas condições ambientais (casa de vegetação ou ambiente controlado). Constatou-se que a seleção de genótipos de melão deve ser realizada considerando a ocorrência de interações genótipo-ambiente. Embora as condições oferecidas em casa de vegetação reflitam o ambiente natural, a avaliação e identificação de genótipos resistentes a *D. bryoniae* deve ser realizada em ambiente controlado com inoculação por esporos. Na etapa três, um experimento com delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, foi utilizado para caracterizar cinco genótipos do meloeiro, sendo eles o PI140471, PI420145, PI157082, Jab-11 e Jab-20. Durante o crescimento e desenvolvimento das plantas foi realizada a caracterização morfológica dispondo de 49 descritores. A análise resultou em três grupos distintos, obtidos pelo agrupamento hierárquico dos genótipos pelo método de UPGMA. Assim conclui-se que a

caracterização e a análise de divergência genética foram eficientes para a discriminação dos grupos, demonstrando que a análise simultânea de dados qualitativos e quantitativos é viável e pode permitir maior eficiência no conhecimento da divergência entre genótipos em bancos de germoplasma. E por fim, na última etapa, foram utilizadas como parental doador duas linhagens, o PI420145 e o PI140471 contendo os genes de resistência *Gsb-6* e o *Gsb-1* respectivamente, para serem introduzidos cada um em uma linhagem elite (Jab-11 e Jab-20). Desta forma, foram conduzidos dois retrocruzamentos em paralelo separadamente. Foram conduzidos dois ciclos de retrocruzamento, em cada ciclo foram feitas duas etapas, sendo a primeira, a seleção das plantas para a resistência ao CGC e a segunda etapa, consistiu na avaliação das características morfoagronômicas das plantas resistentes em casa de vegetação. Com os dados fenotípicos em mãos foi feita uma análise de similaridade genética com base no algoritmo de Gower para verificar quais plantas apresentavam maior recuperação do parental recorrente para seguirem para a próxima geração. O estudo levou a seleção de plantas que são resistentes ao CGC e que apresentam maior recuperação do parental recorrente no retrocruzamento por meio do uso da análise de distância genética.

Palavras – chave: Crestamento gomoso do caule, Caracterização, Interação GxA, Seleção

INOCULATION METHODOLOGY OF *Didymella bryoniae* AND BACKCROSSING AIMING FOR INTROGRESSION OF RESISTANCE IN NETTED MELON

ABSTRACT - Of the many groups of melons produced in Brazil, noble melons, such as the lace melon, have gained prominence due to their high added value and international preference, making their cultivation attractive. The disadvantage of growing lace melon is that most of the time, more refined techniques are needed, such as cultivation in a greenhouse, especially if the place of production does not offer favorable climatic conditions. This is the case of the south and southeast regions, which have little expression in melon production, however, with the use of production in a greenhouse and cultivation in the off-season in other regions, melon can become competitive and be advantageous for the producer. The great challenge of production in these places is the appearance of diseases such as gummy stem blight (GSB) caused by the fungus *Didymella bryoniae*, causing great losses to producers. The objective was to obtain tracery melon strains resistant to gummy stem blight by introducing resistance genes via backcross. For this, the work was divided into: (1) identifying the best condition for in vitro sporulation of *D. bryoniae*; (2) to evaluate how different screening conditions influence the classification of resistance and the occurrence of environmental effects in melon genotypes with a dominant monogenic locus of resistance to *D. bryoniae*; (3) to characterize and analyze the genetic divergence of melon genotypes; (4) to introduce resistance genes into elite lines of netted melon by means of backcrossing. In the first step, different light spectra (UV-A or UV-B light, white light and continuous dark) were combined with different culture media (PDA, V8, ML and PDAB). In conclusion, UV-B light is essential for sporulation of *D. bryoniae* in vitro. In addition, the composition of the culture medium influences the type of fungal structure produced, as well as the size and quantity of spores. Under the screening conditions, four experiments in randomized blocks were used to evaluate the reaction of seven melon genotypes, namely, the resistant accessions PI 140471, PI 420145 and PI 157082, and their respective crosses. These genotypes were inoculated by disc or mycelium-agar spores and submitted to two environmental conditions (greenhouse or controlled environment). It was found that the selection of melon genotypes should be performed considering the occurrence of genotype-environment interactions. Although the conditions offered in the greenhouse reflect the natural environment, the evaluation and identification of genotypes resistant to *D. bryoniae* must be carried out in a controlled environment with spore inoculation. In step three, an experiment with a randomized block design, with four replications, was used to characterize five melon genotypes, namely PI140471, PI420145, PI157082, Jab-11 and Jab-20. During plant growth and development, morphological characterization was performed using 49 descriptors. The analysis resulted in three distinct groups, obtained by hierarchical grouping of genotypes using the UPGMA method. Thus, it is concluded that the characterization and analysis of genetic divergence were efficient for the discrimination of groups, demonstrating that the simultaneous analysis of qualitative

and quantitative data is feasible and can allow greater efficiency in the knowledge of the divergence between genotypes in germplasm banks. Finally, in the last step, two strains were used as parental donors, PI420145 and PI140471 containing the resistance genes *Gsb-6* and *Gsb-1* respectively, to be introduced each one into an elite strain (Jab-11 and Jab-20). In this way, two backcrosses were carried out in parallel separately. Two backcrossing cycles were carried out, in each cycle two stages were carried out, the first being the selection of plants for resistance to GSB and the second stage consisting of the evaluation of the morphoagronomic characteristics of the resistant plants in a greenhouse. With the phenotypic data in hand, a genetic similarity analysis was performed based on the Gower algorithm to verify which plants showed greater recovery of the recurrent parent to move on to the next generation. The study led to the selection of plants that are resistant to GSB and that show greater recovery of the recurrent parent in backcross through the use of genetic distance analysis.

Keywords: Gummy stem blight, Description, GxE interaction, Selection

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Dos muitos grupos de meloeiro existentes, os mais cultivados no Brasil são àqueles do grupo inodorus, como amarelo e pele-de-sapo. O grupo dos melões nobres, como os melões rendilhados, apesar de apresentarem maior conteúdo de açúcar, superior aos melões amarelo e pele-de-sapo, além de aspecto visual mais atraente devido a presença de estrias na casca e polpa de coloração alaranjada, são produzidos em menor escala, tendo em vista que, a obtenção de frutos de melhor qualidade exige tratos culturais frequentes e também devido à limitada resistência dos frutos ao transporte e à reduzida conservação pós-colheita (Menezes et al., 1998; Maruyama et al., 2000; Vargas et al., 2021).

O melão rendilhado vinha sendo cultivado por pequenos produtores nos Estados de São Paulo e Paraná em ambiente protegido (Vargas et al., 2008; Charlo et al., 2011; Costa, 2017). Atualmente, devido à baixa produção, as informações acerca dos melões rendilhados na região sul e sudeste do país são escassas. Em contrapartida, os Estados do Nordeste têm aumentado sua área de produção, com cultivos em campo aberto, visando atender principalmente o mercado externo (HFBRASIL, 2019).

No início do cultivo do melão rendilhado, pouca ou nenhuma cultivar de alta performance existia para as condições brasileiras, sendo necessário a importação das sementes, o que apresentava-se como um entrave a ampliação do cultivo devido ao aumento nos custos de produção. Pensando nisso, em 1996, um programa de melhoramento do meloeiro, foi iniciado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal, com o intuito de desenvolver materiais superiores voltados principalmente aos pequenos produtores do estado de São Paulo. Inicialmente o programa teve como objetivo desenvolver genótipos mais produtivos e, atualmente, tem concentrado seus esforços em desenvolver genótipos resistentes a doenças.

Entre os focos do programa, escolheu-se desenvolver resistência ao crestamento gomoso do caule, doença que causa grandes prejuízos, sobretudo na

região sudeste, que apresenta condições propícias para o aparecimento do fungo, com temperaturas em torno de 25 °C e umidade de 95% durante parte considerável do ano.

O crestamento gomoso, causado pelo fungo *Didymella bryoniae*, é uma doença importante não só na cultura do melão, como também em várias outras espécies de cucurbitáceas. Os sintomas, caracterizam-se por damping-off, lesões foliares e cancro no colmo, comprometimento do desenvolvimento da planta, e redução da produtividade e qualidade dos frutos (Dalcin et al., 2017).

Algumas práticas agronômicas para o controle dessa doenças são indicadas como: práticas culturais, controle químico e controle genético com a utilização de genótipos tolerantes e/ou resistentes (Santos et al., 2011). Entretanto, das práticas citadas, a mais utilizada é o controle químico, principalmente pela sua facilidade. Porém, este, além de não ser totalmente eficiente, pode exercer pressão de seleção na população do patógeno, a qual pode contribuir para o aparecimento de variantes do fungo, resistentes aos fungicidas aplicados para o controle da doença. Há relatos do aparecimento de resistência do patógeno a alguns fungicidas sistêmicos à base de benzimidazol, utilizados contra *D. bryoniae* em várias cucurbitáceas, principalmente em melão e melancia (Santos et al., 2017).

Dessa forma, o uso de cultivares resistentes é considerado o método mais eficaz e menos danoso ao ambiente, além de ser economicamente mais rentável (Albuquerque et al., 2015). Várias fontes de resistência de melão ao cancro-da-haste são relatadas na literatura, sendo definidas como interação alélica do tipo dominância completa ou recessiva, com genes independentes (Frantz e Jahn, 2004; Wolukau et al., 2007; Hu et al., 2018). Muitos genes de resistência foram identificados, incluindo cinco loci dominantes Gsb-1, Gsb-2, Gsb-3, Gsb-4 e Gsb-6, e um locus monogênico recessivo (gsb-5), oriundo de seis PIs (PI140471, PI157082, PI511890, PI482398, PI420145, e PI482399) respectivamente (Hu et al., 2018). Entretanto, apesar de serem monogênicos, tem se verificado forte influência do ambiente e da metodologia de inoculação sobre a resistência desses genótipos (Zhang et al., 1997; Wako et al., 2000; Frantz & Jahn, 2004; Wolukau et al., 2007; Xu et al., 2014; Bi et al., 2015b; Hassan et al., 2018a), dificultando a seleção e sua utilização em programas de melhoramento.

Diante do exposto, tem-se a necessidade de se desenvolver materiais resistentes ao cretamento gomoso do caule, porém, existindo ainda dificuldades quanto a seleção para resistência e inserção de genes em cultivares elite. Este trabalho teve como objetivo (1) identificar a melhor condição para esporulação de *D. bryoniae* in vitro; (2) avaliar como diferentes condições de triagem influenciam a classificação de resistência e a ocorrência de efeitos ambientais em genótipos de meloeiro com locus de resistência monogênico dominante a *D. bryoniae*; (3) caracterizar e analisar a divergência genética de genótipos de meloeiro; (4) introduzir genes de resistência em linhagens elite de melão rendilhado por meio do retrocruzamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância socioeconômica

Amplamente difundido e cultivado, o melão é hoje uma das cucurbitáceas de grande importância econômica, principalmente pelos valores de produção alcançados mundialmente (Kesh e Kauchik, 2021). No Brasil sua introdução ocorreu na década de 60, iniciando sua produção nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. Entretanto, por conta das condições climáticas dos referidos estados, a produtividade e qualidade eram afetadas. Logo se passou a procurar novas regiões que pudessem dar condições ideais para o desenvolvimento do melão, sendo a região Nordeste propícia para o cultivo (Araujo e Vilela, 2003).

Dentro desta região, o Rio Grande do Norte teve início como estado produtor no cenário nacional no ano de 1980, surgindo um pólo de produção conhecido como Agropólo Mossoró-Assú. Atualmente, o Estado é o maior produtor e exportador brasileiro, sendo responsável por mais de 50% da produção nacional de melão (IBGE, 2020).

No mercado externo o melão brasileiro só ganhou destaque em 2008, quando o total de frutos exportados ultrapassou o valor da produção, isto graças ao processo de melhoria do cultivo e melhoramento genético que ajudaram a alavancar a produtividade (Bueno e Baccarin, 2012; Kesh e Kauchik, 2021). A partir desse

momento, a produção e exportação foram aumentando com o passar dos anos. Sendo beneficiada, principalmente, pela entressafra mundial que ocorre justamente nos picos de maior produção brasileira. Hoje o melão se destaca como o fruto mais exportado em volume, totalizando 251,641 mil toneladas e US\$ 160,389 milhões, com acréscimo de 27% em volume e de 17,92% em valor levando em consideração o ano de 2018 para 2019 (Carvalho et al., 2020).

Atualmente, os três maiores produtores mundiais são, China com produção estimada de 13.838.234 toneladas, seguida da Turquia (1.724.856 toneladas) e Índia (1.330.000 toneladas). O Brasil conquistou, em 2020, a nona colocação, com produção de 613 mil toneladas, posição não observada em anos anteriores (FAO, 2022).

Além da importância do ponto de vista das exportações e do agronegócio, a cultura do melão, também é importante no quesito socioeconômico, representando, antes de tudo, geração de renda e empregos, aquecendo a economia e melhorando as condições de vida das pessoas dentro da região em que se insere o cultivo (Guimarães, 2013).

2.2 Origem e classificação

Pertencente à família Cucurbitaceae, o melão (*Cucumis melo* L.) foi inicialmente descrito como espécie originária do continente africano (Diaz et al., 2003). Porém, através de estudos mais recentes por meio de sequenciamento genômico e comparação de sequências com espécies ancestrais, argumenta-se que possa ser oriundo da África, Austrália e Ásia. Contudo, o continente asiático, mais especificamente a Índia, seria o centro de origem do meloeiro partindo da espécie *Cucumis callosus* (Dwivedi et al., 2010; John et al., 2013; Lima et al., 2017).

O meloeiro é uma planta dicotiledônea, na natureza é considerado espécie perene, entretanto, é explorado como anual. Apresenta caule herbáceo de crescimento rasteiro ou prostrado, provido de nós com gemas, onde desenvolvem-se gavinhas, folhas e novas ramificações. As flores são amarelas e constituídas de cinco pétalas, e o fruto é uma baga carnuda de tamanho, aspecto e cores variados (Fontes e Puiatti, 2005).

Devido à grande variabilidade existente na espécie para características morfológicas e fisiológicas, a mesma foi subdividida em duas subespécies: *Cucumis melo* ssp. *Agrestis*, dividida em cinco grupos botânicos e *C. melo* L. ssp. *Melo*, com dez grupos botânicos, sendo três de maior importância econômica: *C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *inodorus* e *C. melo* var. *reticulatus* (Sousa et al., 1999; Leida et al., 2015, Hyun et al., 2021).

Mesmo com as divisões em grupos botânicos ainda hoje existe dificuldade em definir os grupos, principalmente, as variedades que apresentam características semelhantes como àquelas pertencentes aos grupos *reticulatus* e *cantalupensis* ou mesmo híbridos oriundos desse cruzamento. A maioria dos melões rendilhados provavelmente está no grupo *reticulatus*. Por outro lado, esses melões rendilhados são geralmente chamados de cantaloupes pelos produtores, transportadores e consumidores dos Estados Unidos, tornando-se um termo mais usual (Munger e Robinson, 1991).

No Brasil, com a dificuldade de definir corretamente os grupos varietais, os frutos foram então classificados em dois tipos/grupos maiores a fim de facilitar a comercialização. Compreende o grupo inodoro e o aromático, que são definidos por cultivares com características semelhantes, facilmente identificadas e diferenciadas das demais (Crisóstomo e Aragão, 2013).

O grupo inodoro reúne as variedades de melão sem aroma, não climatéricos, sem abscisão da base do pedúnculo quando maduro, casca lisa ou enrugada, polpa branca ou amarela. Já o grupo aromático engloba as variedades de melão cheirosas, com abscisão da base do pedúnculo quando bem maduras, com casca rugosa ou rendilhada com diferentes desenhos, polpas de diferentes colorações, com ou sem suturas e elevado teor de sólidos solúveis (Nunes et al., 2004; Ceagesp, 2016).

Desde 2016, tem se adotado a classificação com 9 tipos comerciais de melões: caipira, cantaloupe, charentais, gália, net melon, orange, amarelo, dino e pele de sapo (Figura 1) (Ceagesp, 2016).

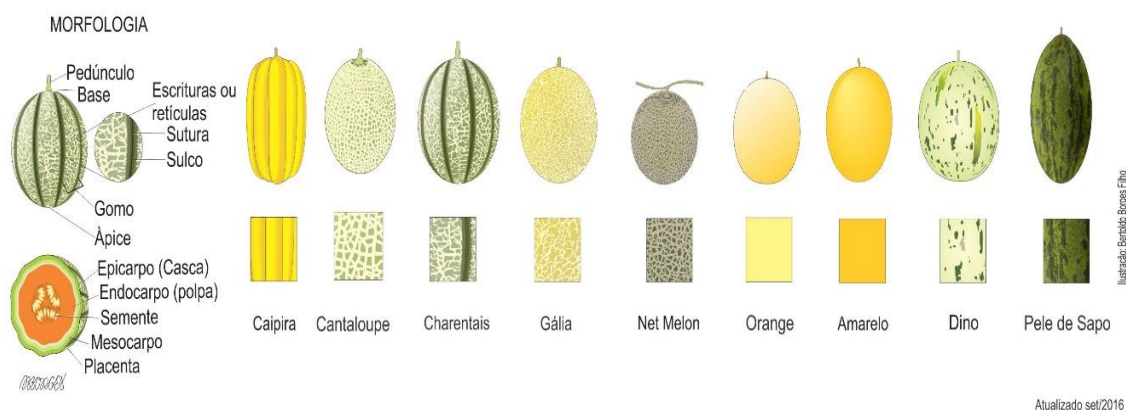


Figura 1: Principais tipos de melão comercializados no Ceagesp (Ceagesp, 2016).

2.3 Melão rendilhado

Pertencente ao grupo dos melões aromáticos, o melão rendilhado, é uma hortaliça largamente cultivada no Japão, teve seu primeiro cultivo comercial no Brasil em 1986, pela Cooperativa Agrícola de Cotia (CAC), com sementes importadas do Japão (Rizzo e Braz, 2004). A partir de então veio ganhando importância econômica. O melão rendilhado apresenta algumas vantagens comerciais, tais como, preferência pelo consumidor, boa cotação comercial e cultivo em pequenas áreas, com boa lucratividade (Charlo et al., 2009). Além disso, esse tipo de melão tem grande procura no mercado externo, fazendo com que os produtores cada vez mais aumentem sua produção.

Esse tipo de melão apresenta superfície rendilhada, formato oval redondo, aroma marcante, sólidos solúveis em torno de 10° Brix e coloração da polpa variando de verde claro a salmão. A planta caracteriza-se por apresentar caule herbáceo muito ramificado e produzir frutos de aproximadamente 900g (Macedo et al, 2017). Apesar de possuírem frutos de alta qualidade, os melões do grupo aromático são pouco cultivados se comparado ao grupo inodorus, principalmente, porque, requerem técnicas mais refinadas de cultivo, e têm uma longevidade menor após a colheita (Pádua et al., 2003).

Outro fator que explica a baixa produção desse melão é a pouca quantidade de cultivares disponíveis no mercado interno adaptados para as condições brasileiras (Vargas et al., 2013). Porém, sabe-se que novas cultivares vem sendo desenvolvidas,

ampliando assim as opções para os produtores. A combinação de novas cultivares e o aumento da tecnificação do campo, tem contribuído cada vez mais para o aumento da produção desse melão também em condições de campo aberto.

2.4 Crestamento gomoso do caule

Os problemas fitossanitários apresentam-se como um grande entrave ao cultivo do meloeiro. Dentre esses problemas, o crestamento gomoso do caule (CGC) apresenta papel importante, uma vez que, infecta folhas, hastes e frutos. Seu agente causal é o fungo *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehn, parasita necrotrófico facultativo de plantas da família *Cucurbitaceae*, pertence a subdivisão *Ascomicotyna*, ordem *Dothiales* e classe *Coelomycetes*. Foi descrito pela primeira vez na França em 1891, na fase anamórfica, com o nome de *Ascochyta cucumis* Fautr & Roum, e mais tarde na fase teleomórfica como *Didymella melonis* Pass, e, atualmente, recebe o nome *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehn (Santos et al., 2011; Mao et al., 2020).

Plantas de cucurbitáceas podem ser infectadas com *D. bryoniae* em qualquer estágio vegetativo, desde plântulas até maturação dos frutos. Os sinais e sintomas de infecção podem ser vistos em todas as partes da planta, exceto nas raízes, apresentando sintomas como manchas nas folhas e nos caules, apodrecimento das plantas e podridão-negra dos frutos. As lesões no caule crescem longitudinal e transversalmente, ocorrendo exsudação de goma, e nos tecidos com sintomas mais velhos, formação de numerosos corpos de frutificação negros (peritécios/picnídios) (Paret et al., 2018).

A sobrevivência da *D. bryoniae* pode ocorrer sem a presença do meloeiro e/ou abaixo do solo, em restos culturais, em outras cucurbitáceas, plantas daninhas ou mesmo em sementes, podendo permanecer viável por dois anos no solo, sem a presença de hospedeiro. Sua disseminação pode ocorrer através da água de irrigação, ventos, água da chuva, bem como sementes provenientes de frutos infectados (Figura 2) (Singh e Afaque, 2021).

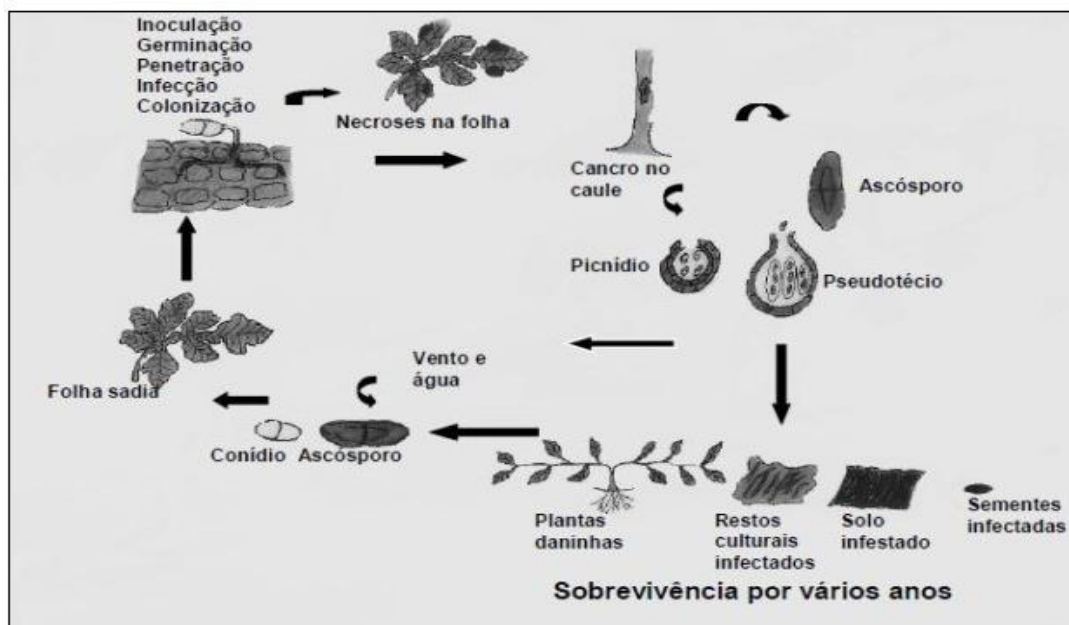


Figura 2. Ciclo primário e secundário do cretamento gomoso do caule causado por *Didymella bryoniae* (Fonte: Santos et al. (2011, p.99).

Temperaturas na faixa de 20 a 24°C favorecem o desenvolvimento da doença. Contudo, o patógeno pode devastar plantios em condições de clima quente e alta umidade, sendo a umidade mais importante do que a temperatura (Singh e Afaque, 2021). A presença de lâmina de água, durante algumas horas, nas folhas e nos ramos também é suficiente para que o fungo penetre por aberturas naturais e ferimentos provocados pelo homem, insetos ou que ocorram durante o desenvolvimento da planta, em razão do atrito do solo (Santos e Zambolim, 2011). Frequentemente as perdas de produção causadas por este fungo podem variar de 15 a 30%, e em casos onde as infecções são mais graves pode haver perda de até 80% (Liu et al., 2017).

Para o controle do cretamento gomoso do caule, recomenda-se a adoção de práticas de manejo integrado, como controle cultural, controle químico e controle genético. Atualmente, o controle químico é o principal método utilizado para a prevenção, porém, este método apresenta baixa eficiência, principalmente, em períodos de alta umidade, além de causar poluição ambiental e pressão de seleção na população de patógenos (Bi et al., 2015; Santos et al., 2017). A resistência genética tem sido bastante utilizada como forma de controle em murchas vasculares, como o CGC, a fim de reduzir o uso de fungicidas e os custos de produção (Agrios, 2005).

2.5 Metodologias de inoculação

Os progressos do melhoramento genético visando à resistência ao crestamento gomoso do caule têm sido dificultados pela expressividade da resistência genética e pelo emprego de métodos de inoculação, bem como pela influência do ambiente. Isso tem sido observado em diversos trabalhos onde os mesmos genótipos resistentes avaliados tem recebido diferentes classificações do seu nível de resistência (Zhang et al., 1997; Wako et al., 2000; Frantz e Jahn, 2004; Wolukau et al., 2007; Xu et al., 2014; Bi et al., 2015b; Hassan et al., 2018a).

No caso específico do patossistema *D. bryoniae* – meloeiro, alguns métodos de inoculação e avaliação têm sido utilizados para estudar o comportamento dessa interação planta-patógeno. Os principais estudos utilizavam a metodologia de inoculação à base de suspensão de esporos (Zuniga et al., 1999; Frantz e Jahn, 2004; Wolukau et al., 2007; Xu et al., 2014; Bi et al., 2015b; Hassan et al., 2018a). O método de inoculação por esporos possui como principal vantagem o fato de simular o processo natural de infecção do patógeno, e como principais desvantagens o fato de serem mais demorados e muitas vezes apresentarem escape de infecção e, com isso, supraestimarem os níveis de resistência das plantas avaliadas, principalmente, quando da realização de estudos visando à determinação da resistência é feita em condições de campo, onde as condições ambientais não são controladas (Claudino, 2013).

Outra metodologia adotada para inocular *D. bryoniae*, é o método do palito de dente com o micélio do fungo. Esse método foi adaptado por Verzignassi et al. (2004), que obtiveram resultados satisfatórios em melão rendilhado e pepino-japonês, com evolução rápida dos sintomas típicos da doença com fácil caracterização. Este método vem sendo utilizado com sucesso para avaliar a reação a *D. bryoniae* em diversas cucurbitáceas (Ito et al., 2009; Silva et al., 2012; Santos et al., 2017). A desvantagem deste método é o fato de não simular as condições naturais de infecção, provocarem estresse excessivo nas plantas e conseqüentemente, de modo geral, subestimarem os níveis de resistências dos genótipos avaliados (Claudino, 2013).

Juliatti et al. (2014), estudando métodos de avaliação de resistência com genótipos de soja a *Sclerotinia sclerotiorum*, observaram que o método de inoculação

utilizando fermento resultou em lesões maiores, quando comparado ao método de inoculação sem fermento. O que de certa forma, dependendo de como é feita a avaliação esses genótipos podem ser subestimados quanto a resistência. Segundo, Russel (1978), quando se tem condições ambientais controladas, geralmente os patógenos fúngicos penetram no hospedeiro por aberturas naturais ou por penetração direta através da cutícula. O que é uma opção caso não se queira usar métodos que causam ferimentos.

Ao se avaliar germoplasma em busca de fontes de resistência a doenças, métodos eficientes de infecção uniforme das plântulas com isolados patogênicos são requisitos essenciais. Nesse processo é fundamental o desenvolvimento e a padronização de metodologias que permitam a seleção segura dessas fontes de resistência e a determinação precisa da reação, de resistência ou suscetibilidade dos genótipos avaliados (Medeiros et al., 2015).

2.6 Melhoramento genético do meloeiro

As cucurbitáceas são consideradas espécies de reprodução mista, dada sua estrutura populacional, desenvolveram um balanço homozigótico, e por isso demonstram pouca depressão quando submetidas à endogamia (Allard, 1996). Assim, o meloeiro é uma planta que tanto pode ser considerada de polinização cruzada quanto de autofecundação, podendo ser submetida a métodos de melhoramento apropriados para ambos os tipos de planta. (Aragão, 2011).

No melhoramento genético do meloeiro, é relevante considerar os aspectos relacionados a resistência às doenças e tolerância às pragas, capacidade produtiva e à qualidade de fruto, vida útil pós-colheita e precocidade da planta (Kesh e kaushik, 2021). Genótipos precoces são desejáveis porque agregam valor econômico e agrônômico, ofertando o produto em menor prazo e proporcionando a chance de escape de infestação por pragas ou infecções provocadas por microrganismos patogênicos. Além disso, as plantas precisam ser altamente produtivas e prolíficas para garantir maiores ganhos ao produtor (Paiva et al, 2004).

Para obter todas essas características, além de frutos de excelente qualidade e resistentes aos principais patógenos, os programas de melhoramento, focam em

explorar a heterose ou vigor híbrido (Gusmini e Wehner, 2008), conseguindo dessa forma, atender as exigências e a preferência dos produtores que utilizam níveis elevados de tecnologia (Crisóstomo, 2000).

Em um programa, para obtenção de híbridos, a primeira etapa é a obtenção das linhagens. Para tanto, após o cruzamento biparental e obtenção de uma população, as plantas passam por autofecundações sucessivas até a geração F5, F6 ou F7. Durante esse processo, as plantas podem passar por seleções de características de interesse ou então serem selecionadas ao final do processo. Por fim, faz-se a avaliação *per se* da linhagem, por meio de *testecross* ou por cruzamentos dialélicos, sendo possível conhecer a capacidade de combinação das linhagens e obter o melhor híbrido (Borém et al., 2017).

Outros métodos de melhoramento podem ser utilizados, como melhoramento intrapopulacional ou recíproco, ou mesmo seleção recorrente, especialmente quando se tem a intenção de aumentar a frequência de alelos favoráveis e manter a variabilidade genética da população, porém esses métodos são menos usados. Outro método empregado é o retrocruzamento, principalmente para a introgressão de características condicionadas por um ou poucos genes (Guimarães, 2013).

2.6.1 Retrocruzamento

O cruzamento entre o híbrido F1 e um de seus pais é conhecido como retrocruzamento. Esse método permite a transferência de alelos em um ou mais loci do doador para um genótipo elite (Ye et al., 2009; Priyadarshan, 2019). Isto preserva o desempenho da cultivar, além de adicionar os benefícios das características introduzidas; porém, só é utilizada quando a introgressão é para um ou poucos genes (Jeong et al., 2015; Moeinizade et al., 2021).

As populações de retrocruzamento são obtidas da seguinte forma: primeiro cruza-se o parental recorrente (PR) (linhagem elite) com o parental doador (portador da característica de interesse) para produzir o híbrido F₁. Em seguida, cruza-se o F₁ com o PR para produzir a primeira geração de retrocruzamento (RC₁). Após a triagem fenotípica, a próxima geração de retrocruzamento é feita por meio do cruzamento de plantas RC₁ selecionadas (que foram selecionadas para a característica alvo) com o

PR para produzir o RC₂. As populações de retrocruzamento subsequentes são obtidas cruzando repetidamente as plantas de retrocruzamento (RC) selecionadas com o PR até que a recuperação do genoma da linhagem elite seja satisfatória (Hasan et al., 2015b).

Nos ciclos de retrocruzamentos são necessárias duas etapas "seleção em primeiro plano" (foreground selection) e "seleção de segundo plano" (background selection). A seleção em primeiro plano envolve a seleção de indivíduos que abrigam a característica-alvo na população de retrocruzamentos. A seleção de segundo plano é o processo que visa selecionar indivíduos com maior porcentagem de recuperação do parental recorrente (Jeong et al., 2015; Priyadarshan, 2019).

Teoricamente, recupera-se, em média, metade do genoma recorrente a cada ciclo de retrocruzamento, porém, na prática, existem alguns indivíduos que possuem mais ou menos recuperação do parental recorrente do que outros (Hasan et al., 2015).

3 REFERÊNCIAS

Agrios GN (2005) **Plant pathology**, 5th ed. New York: Academic Press, 635 p.

Albuquerque LB, Antônio RP, Sousa Nunes, GH, Medeiros RV, Silva Filho AJR (2015) Caracterização morfológica de fontes de resistência de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. **Revista Caatinga**, v 28, n 3, p 100–107.

Allard RW (1996) **Principles of plant breeding** New York: John Willey, 485p.

Aragão FAZ (2011) **Divergência genética de acessos e interação genótipo x ambiente de famílias de meloeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitotecnia/Melhoramento Genético) - Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA).

Araújo JLP; Vilela NJ (2003) **Aspectos econômicos** In: SILVA HR; COSTA ND Melão Produção: aspectos técnicos Brasília: Embrapa Informação Tecnológica p 15-18.

Bi Y, Xu B, Guo J, Zhang Y, Yi H, Qian C, Chen J (2015). Pyramiding disease resistance genes by marker-assisted selection in melon (*Cucumis melo* L.) and “Baipicui” breed improvement. **J. Nanjing Agric. Univ.** 38, 375-380.

Bueno G, Baccarin JG (2012) Participação das principais frutas brasileiras no comércio internacional: 1997 a 2008. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v 34, n 2, p 424-434.

Borém A, Miranda GV, Fritsche-Neto R (2017) **Melhoramento de plantas**. 7. ed. rev. e ampl. Viçosa: Editora UFV, 523 p.

Carvalho C et al (2020) "**Anuário Brasileiro de horti&fruti 2019**" Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz.

Charlo HCO, Castoldi R, Vargas PF, Braz LT (2009) Evaluation of net melon cultivars conducted with two and three fruits per plant **Horticultura Brasileira**, 27, 251-255.

Charlo HCO, Galatti FS, Braz LT, Barbosa JC (2011) Híbridos experimentais de melão rendilhado cultivados em solo e substrato. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v 33, n 1, p 144–156.

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.

Costa ND (2017) **Coleção plantar: A cultura do melão**. 3ed Brasília, DF: Embrapa, 202p.

Crisóstomo JR (2000) **Melhoramento do meloeiro para resistência a doenças e qualidade do fruto**. Fortaleza. 23p. Relatório final de projeto. Convênios: Embrapa Agroindústria Tropical / CNPq / ESAM / VALEFRUTAS.

Crisóstomo JR, Aragão FAS (2013) Melhoramento genético do meloeiro *Embrapa Agroindústria Tropical-Capítulo em livro científico (ALICE)*.

Dalcin MS, Tschoeke PH, Fidelis RR, Didonet J (2017) Severity of gummy stem blight on melon in relation to cultivars, use of fungicides and growing season **Horticultura brasileira**, v 35, n December, p 483–489.

Diaz A, Fergany M, Formisano G, Ziarsolo P, Blanca J, Fei Z, Staub JE, Zalapa JE, Cuevas HE, Dace G, Oliver, M; Boissot, NA (2011) Consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L) **BMC Plant Biology**.

FAO. **FAOSTAT** (2022) Disponível em<<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>: A Acesso em: 3 Abr 2022.

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**, v 108, n 6, p 1033–1038.

Guimarães IP (2013) **Seleção de linhagens de melão amarelo quanto a aspectos produtivos e qualitativos do fruto e resistentes a *Myrothecium roridum* e *Podosphaera xanthii***. 74p Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN.

Gusmini G, Wehner TC (2008) Fifty-five years of yield improvement for cucumber, melon, and watermelon in the United States **HortTechnology**, v 18, n 1, p 9-12.

Hassan, M.Z., Rahim, M.A., Natarajan, S., Robin, A.H.K., Kim, H.T., Park, J.I. and Nou, I.S. (2018a) Gummy stem blight resistance in melon: Inheritance pattern and development of molecular markers. **Int. J. Mol. Sci.** 19.

Hasan MM, Rafii MY, Ismail MR, Mahmood M, Harun A (2015b) Marker-assisted backcrossing: A useful method for rice improvement **Biotechnology & Biotechnological Equipment**.

HFBRASIL (2019) **Melão /CEPEA: Safra 2019/20 Aumenta disponibilidade de nobres Além do mercado externo, parte das frutas também fica no interno**. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/melao-cepea-safra-2019-20-aumenta-disponibilidade-denobres.aspx> Acesso em: 28 jan 2020.

Hyun DY, Sebastin R, Lee GA, Lee KJ, Kim SH, Yoo E, Cho GT (2021) Genome-wide SNP markers for genotypic and phenotypic differentiation of melon (*Cucumis melo* L) Varieties Using Genotyping-by-Sequencing. **International journal of molecular sciences**, 22(13), 6722.

Hu J, Wang P, Su Y, Wang R, Li Q, Sun K (2015) Microsatellite diversity, population structure, and core collection formation in melon germplasm. **Plant Molecular Biology Reporter**, v 33, n 3, p 439–447.

Hu Z, Deng G, Mou H, Xu Y, Chen L, Yang J, Zhang MA (2018) Re-sequencing-based ultra-dense genetic map reveals a gummy stemblight resistance-associated gene in *Cucumis melo*. **DNA Research**, v 25, n September 2017, p 1–10.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA** (2020) disponível em: <<https://sidraibge.gov.br/tabela/1618>> Acesso em: 17 Mar 2022.

Ito LA, Braz LT, Castoldi R, Charlo HCO (2009) Camargo M. Seleção de portas enxertos resistentes ao Cancro-da-haste e seus efeitos na produtividade de melão ‘Bônus 2’. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 262-267.

Jeong HS, Jang S, Han K, Kwon JK, Kang BC (2015) Marker-assisted backcross breeding for development of pepper varieties (*Capsicum annuum*) containing capsinoids. **Mol Breed** 35, 1–10.

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.

Kesh H, Kaushik P (2021) Advances in melon (*Cucumis melo* L) breeding: An update. **Scientia Horticulturae**, v 282, p 110045.

Leida, C., Moser, C., Esteras, C., Sulpice, R., Lunn, J.E., de Langen, F., Monforte, A.J., Picó, B., 2015. Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Genet.** 16, 1–17.

Lima, CEP, Fontenelle MR, Ligoski GR, Madeira NR, Oliveira VR, Pinheiro JB, Gondim RS, Lima MF (2017) Productivity and quality of melon cultivated in a protected environment under different soil managements. **Horticultura brasileira**, v 35, n December, p 576–582.

Liu S, Shi Y, Miao H, Wang M, Li B, Gu X, Zhang S (2017) Genetic Analysis and QTL Mapping of resistance to gummy stem blight in *Cucumis sativus* seedling stage. **Plant Disease**, p 1–8.

Macedo AC, Amaro ACE, Ramos ARP Ono EO, Rodrigues JD (2017) Strobilurin and boscalid in the quality of net melon fruits *Semina: Ciências Agrárias*, 38(2), 543-550.

Mao X, Wu Z, Bi C, Wang J, Zhao F, Gao J, Hou Y, Zhou M (2020) Molecular and biochemical characterization of pydiflumetofen-resistant mutants of *Didymella bryoniae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol 68, no 34, pp 9120–9130.

Maruyama WI, Braz LT, Cecílio Filho AB (2000) Condução de melão rendilhado sob cultivo protegido **Horticultura brasileira**, v 18, n 3, p 175–178.

Medeiros AC, Melo DRM, Ambrósio MMQ, Nunes GHS, Costa JM (2015) Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.281-286.

Menezes, JB, Chitarra AB, Chitarra MIF, Bicalho UO (1998) Qualidade do melão tipo Gália durante o armazenamento refrigerado. **Horticultura Brasileira**, 16: 159 – 164.

Munger HN, Robinson RW (1991) Nomenclature of *Cucumis melo* L. **Curcubits Genetic Cooperative**, Madison, v14, p 43-44.

Pádua JG, Braz LT, Banzatto DA, Gusmão SAL, Gusmão MTA (2003) Net melon cultivars productivity under different cultivation systems, during summer and winter. In **IX International Symposium on Timing of Field Production in Vegetable Crops 607**, p 83-89.

Paiva WO, Sabry Neto H, Lopes AGS (2000) Avaliação de linhagens de melão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v18 n2, p109-113.

Paiva WO et al. (2004) Melhoramento genético do melão Cantaloupe na Embrapa Agroindústria Tropical- Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**.

Paret ML Dufault NS, Newark M, Freeman J H (2018) **Management of Gummy Stem Blight (Black Rot) on Cucurbits in Florida** p 1–5.

Pereira L, Santo Domingo M, Argyris J, Mayobre C, Valverde L, Martín-Hernández AM, Pujol M, Garcia-Mas JA (2021) Novel introgression line collection to unravel the genetics of climacteric ripening and fruit quality in melon. **Sci Rep** 11, 1–13.

Priyadarshan, PM (2019) **Plant Breeding: classical to modern**. Springer.

Rizzo AADN, Braz LT (2004) Desempenho de linhagens de melão rendilhado em casa de vegetação. **Horticultura Brasileira**, 22(4), 784-788.

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

Santos GR, Leão EU, Castro HG, Nascimento IR, Sarmento RA, Sarmento-Brum RBC (2011) Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v 2, n 2, p 52–58.

Santos LS, Cândido WS, Rabelo HDO, Marin MV, Gaion LA, Gomes RF, Camargo M, Braz LT (2017) Reaction of melon genotypes to *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. **Chilean Journal of Agricultural Research**.

Santos GR, Zambolim L (2011) Doenças fúngicas, bacterianas e abióticas In: **Tecnologias para produção sustentável da melancia no Brasil**. Gurupi-TO: Editora UFV, p 95-150.

Singh D, Afaque MP (2021) Diseases of Cucurbitaceous Fruits and Their Management In: **Postharvest Handling and Diseases of Horticultural Produce**. CRC Press, p 363-380.

Sousa VF et al. (1999) Frequência de irrigação em meloeiro cultivado em solo arenoso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v34, n4, p659-664.

Vargas PF Galatti FS, Souza JO, Castoldi R, Charlo HCO, Braz, LT (2010) Avaliação de parentais e híbridos experimentais de melão rendilhado. **Ciencia e Agrotecnologia**, v 34, n 5, p 1102–1108.

Vargas PF, Galatti FDS, Souza JDO, Castoldi R, Charlo HCO, Braz, LT (2013) Physicochemical characteristics of experimental net melon hybrids developed in Brazil. **Horticultura Brasileira**, 31(3), 351-355.

Wako, T., Ohara, T., Ishiuchi, D. and Kojima, A. (2000) Petiole-mediated inoculation method for seedling test for gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) resistance in melon. **Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants Tea**, 71–80.

Wolukau, J.N., Zhou, X.H., Li, Y., Zhang, Y. Bin and Chen, J.F. (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.

Xu, B., Qian, C., Wang, H., Bi, Y., Lou, Q., Zhang, Y., Yi, H. and Chen, J. (2014) The expression analysis of defense genes in the genes pyramided melon (*Cucumis melo* L.) resistance to gummy stem blight. **J. Nanjing Agric. Univ.** 37, 63–68.

Ye G, Ogbonnaya F, Ginkel MV (2009). Marker-Assisted Recurrent Backcrossing in Cultivar Development **Molecular Plant Breeding: Principle, Method and Application**, p 295–319.

Zhang, Y., Kyle, M., Anagnostou, K. and Zitter, T.A. (1997) Screening melon (*Cucumis melo*) for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field. **HortScience** 32, 117–121.

CAPÍTULO 2 - PROVIDING INOCULUM FOR *Didymella bryoniae* STUDIES: THE EFFECT OF LIGHT SPECTRUM AND STORING AT LOW TEMPERATURE¹

ABSTRACT - The in vitro sporulation of *Didymella bryoniae* is of great importance for studies that require pure inoculum and in large quantities. Thus, the objectives of this study were to identify the best condition for *D. bryoniae* sporulation combining different light spectra (UV-A or UV-B light, white light, and continuous dark), with distinct culture media (PDA, V8, ML, and PDAB) and, to evaluate fungus' survivability stored at -20°C for five months. The fungus samples were only able to sporulate when subjected to the UV-B light treatment, regardless of the culture medium. The highest appearance of spores conidium type was observed in the PDAB medium, and the lowest production occurred in the ML medium. Reproductive structures, such as perithecia and pycnidia, were observed in all culture media. However, there was considerable variation in the amount of each structure between the different culture media. The ML and V8 media showed a greater number of perithecia and the PDA and PDAB media presented a greater proportion of pycnidia compared to perithecia. The storage duration at -20°C did not affect mycelial growth or mycelial growth rate. In conclusion, the UV-B light is essential for *D. bryoniae* in vitro sporulation. Moreover, the culture medium composition influences the type of fungal structure produced, as well as spores' size and quantity. Freezing at -20°C is an efficient technique that can be used to store *D. bryoniae* for at least five months without loss of viability.

Keywords: fungi preservation, gummy stem blight, sporulation, UV-B light

¹ Esse capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Brazilian Journal of Biology, vol. 84, e253436

RESUMO - A esporulação de *Didymella bryoniae* in vitro é de grande importância para estudos que requerem inóculo puro e em grandes quantidades. Assim, os objetivos deste estudo foram identificar a melhor condição para esporulação de *D. bryoniae* combinando diferentes espectros de luz (luz UV-A ou UV-B, luz branca e escuro contínuo) com distintos meios de cultura (BDA, V8, FM e BDAR) e, avaliar a sobrevivência do fungo armazenado a -20°C por cinco meses. As amostras de fungo só esporularam quando submetidas ao tratamento com luz UV-B, independentemente do meio de cultura. Maior aparecimento de esporos do tipo conídio foi observado no meio BDAR, e a menor produção ocorreu no meio FM. Estruturas reprodutivas, como peritécios e picnídeos, foram observadas em todos os meios de cultura. No entanto, houve variação considerável na quantidade de cada estrutura entre os diferentes meios de cultura. Os meios ML e V8 apresentaram maior número de peritécios e os meios BDA e BDAR apresentaram maior proporção de picnídeos em relação aos peritécios. A duração do armazenamento a -20°C não afetou o crescimento micelial ou a taxa de crescimento micelial. Em conclusão, a luz UV-B é essencial para a esporulação de *D. bryoniae* in vitro. Além disso, a composição do meio de cultura influencia o tipo de estrutura fúngica produzida, bem como o tamanho e a quantidade dos esporos. O congelamento a -20°C é uma técnica eficiente que pode ser usada para armazenar *D. bryoniae* por pelo menos cinco meses sem perda de viabilidade.

Palavras-chave: Preservação de fungos, crestamento gomoso do caule, esporulação, Luz UV-B

¹Esse capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Brazilian Journal of Biology, vol. 84, e253436

1 INTRODUCTION

The *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm, synonym *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (Fr.) [anamorph *Phoma cucurbitacearum* (Fr.) Sacc (=Ascochyta *21ucumis* Fautrey & Roum)] (Mao et al., 2020), is an ascomycete that causes the gummy stem blight (GSB) in several cucurbits. When present in cucurbits cultures this fungus might negatively impact yield with direct consequent economic revenue decreases for growers (Liu et al., 2017). Given the importance of *D. bryoniae*, studies involving in vitro cultivation and sporulation are relevant, especially when a large amount of pure inoculum is needed. For example, screening for resistant plants requires a high number of spores to guarantee the intensity of the disease. Moreover, GSB-related studies often require the combination of inoculations in a greenhouse and subsequent field tests (Gusmini et al., 2003).

To date, several studies evaluating the best condition for *D. bryoniae* sporulation in vitro have been reported, testing different culture medium (CM) combinations (Gusmini et al., 2003; Hassan et al., 2018; Leão et al., 2012; Nga et al., 2010; Skarshaug, 1981; Somai et al., 2002), ultraviolet (UV) light (Kwon et al., 1997; Lee, 1982; Tsay et al., 1990; Tsutsumi and Da Silva, 2004; Wolukau et al., 2007; Zhang et al., 2017), and temperature and pH (Bhat et al., 2009). However, despite the vast literature on the subject, there is still no consensus among researchers on the main factors influencing in vitro *D. bryoniae* sporulation, with frequent disagreement between studies.

According to Keinath et al. (1995) and Wiant (1945), some isolates do not sporulate in any CM. On the other hand, Leão et al. (2012) observed that the CM can influence *D. bryoniae* sporulation. In addition, Choi et al. (2010) and Kwon et al. (1997) concluded that the presence of UV light is important to promote the sporulation of this fungus. Despite the direct effect that UV light may have on *D. bryoniae* sporulation, many studies do not classify the type of UV used, hampering the use of a similar methodology. Such information is important because UV lights can be classified according to the emitted wavelength, being UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm), or UV-C (100–280 nm) (Braga et al., 2015).

In addition to the CM and the type of light, the storage time is also important for the development of research with *D. bryoniae*. Properly stored samples serve as quick-access natural resources banks, which can be used for the development of studies on biodiversity, systematics, phytopathology, and related areas, such as plant breeding for resistance to diseases (Aparecido et al., 2018; Hawksworth and Colwell 1992; Sakr, 2019). The most used methods for fungi preservation are submersion in sterile water, mineral oil, or glycerol, use of filter paper discs, wood, soil, and silica gel (Al-Bedak et al., 2019). Also, cryopreservation, lyophilization, and preservation under liquid nitrogen can be employed (Zermeño et al., 2017).

Freezing at -20°C has also been shown to be a safe method for storing various microorganisms and, unlike cryopreservation and preservation under liquid nitrogen, which requires more sophisticated equipment, storing at -20°C is simple and of low cost (Tortora et al., 2011). To the best of our knowledge, only Grube et al. (2011) used freezing at -20°C for the storage of *D. bryoniae* isolates. However, these authors did not carry out systematic evaluations to verify the preservation and survival of the fungus over time, nor of its structures. Thus, little is known about the survival capacity of *D. bryoniae* stored at low temperatures.

Based on the above considerations, there is a need to establish the ideal condition for in vitro *D. bryoniae* sporulation, as well as to evaluate the survival capacity of this fungus when stored at low temperature. Thus, the objectives of the present study were to establish the best condition for *D. bryoniae* sporulation combining different light spectra and culture media, and to evaluate the fungus' ability to survive over time when submitted to the -20°C storage.

2 MATERIAL AND METHODS

The present study was carried out at the São Paulo State University, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal Campus (21°15'19"S, 48°19'21" O), São Paulo - Brazil. Melon plants (*Cucumis melo* L.) with symptoms of GSB, collected in a greenhouse, such as the presence of viscous exudate and fruiting bodies of the fungus, were used to obtain the *D. bryoniae* isolate. The pycnidia/perithecia were directly removed from lesions on the stem was performed with the aid of a

magnifying glass. These structures were placed in Petri dishes containing PDA (potato-dextrose-agar) medium, subsequently closed with PVC film, and incubated in growth chambers, with a constant temperature of 24°C and a 12-hour photoperiod for 4 consecutive days. After obtaining the fungal culture, a subculture was carried out to purify the fungus, transferring 5 mm diameter discs with mycelium to new plates and conditioning them for 10 days, forming the stock cultures.

The study was conducted in two stages to assess the ability of *in vitro* sporulation and survival after freezing. In the first phase of the study, a completely randomized design was used in a 4 x 4 factorial scheme with 10 repetitions, the factors being represented by the different culture media and types of light. In the second phase, the growth capacity was evaluated after different periods of freezing at -20°C.

2.1 Culture medium and light spectrum

To evaluate the sporulation capacity of *D. bryoniae*, four culture media were used, namely: *i*) potato-dextrose-agar (PDA), *ii*) concentrated vegetable juice (V8, commercial product), *iii*) melon leaf extract (ML), and *iv*) potato-dextrose-agar + melon branches (PDAB). In addition, four light spectra were used, being: *i*) white fluorescent light 440-740 nm/10W, *ii*) UV-A white fluorescent light, 350-400 nm/8W, *iii*) UV-B white fluorescent light, 280-360 nm/8W, and *iv*) control group in continuous dark.

PDA and PDAB culture media were prepared with 200g of potatoes chopped into small cubes and placed in 1.0 L of deionized water and cooked at 100°C for 20 minutes. To the potato extract, 20 g of dextrose and 20 g of agar were added, completing the volume with deionized water to 1.0 L. For the preparation of the V8 medium, 20 g of agar was added to 200 mL of concentrated vegetable juice, then the volume was adjusted to 1.0 L, and finally, 3.2 g of CaCO₃ was added to raise the pH to 7.0. For the ML medium, 200g of melon leaves were washed in running water and then processed in a blender with 500mL of deionized water, then sieved twice in non-woven fabrics (TNT) and then added with 20g of agar and 20g of dextrose, completing the process volume to 1.0 L. The pH of all culture media was assessed and, when necessary, adjusted to standardize at 7.0.

After preparation, all culture media were sterilized by autoclaving for 20 minutes at 121°C, then 200 mg of antibiotic (streptomycin) was added. Subsequently, 5 mL of each medium was poured into test tubes (14.5 x 2.5 cm). In this step, three pieces of 5 cm melon branches were added to the PDAB medium, previously disinfected in 1% bleach, and dried on filter paper. Finally, the tubes were covered with cotton, sealed with aluminum foil, and again autoclaved.

At the beginning of the experiment, 5 mm diameter discs with mycelium of the fungus were removed from the stock plates and transferred to the center of each test tube. Subsequently, the tubes were incubated in a growth chamber with a constant temperature of 24°C and subjected to a photoperiod of 16 hours of light, except for the continuous dark treatment, for 20 consecutive days. During this photoperiod, all tubes were placed 20 cm away from the lamps allowing maximum possible radiation.

The spore concentration was determined for all treatments after 20 days of incubation, using a hemacytometer. For the solution preparation, the culture medium was removed from the tube and placed in a crucible with 20 mL of sterile water, then macerated to release the spores. After maceration, filtration in voile tissue was carried out to remove remnants of the culture medium and mycelium, followed by the addition of 0.2% Tween 20. The results were expressed as number of spores per mL. In addition, the mycelium staining, type of sexual structures (perithecia and pycnidia), and the spore morphology were visually evaluated with the aid of an optical microscope with an attached camera (Olympus cellSens standard 2.3). The morphological classification of spores followed the methodology proposed by Chiu and Walker (1949).

2.2 Storing at -20°C

To verify fungal survivability after different periods of storing at -20°C, a completely randomized design was employed, considering the storage time (in months) as treatment, with five repetitions. Following the aforementioned methodology, PDAB tubes were prepared and then conditioned in the growth chamber under UV-B light to sporulate. After the fungus had sporulated, tubes were taken to a freezer (-20°C) and stored for up to five consecutive months.

A tube of PDAB medium was removed from the freezer every 30 days of storage to obtain *D. bryoniae* fungal structures. These samples were transferred to five Petri dishes containing PDA medium, which were sealed with plastic film and incubated in a growth chamber at a constant temperature of 24°C, with a 12-hour photoperiod and white fluorescent light regime.

In this phase, daily evaluations of mycelial growth were performed, measuring two diametrically opposite points of the colony perimeter, discounting 10.0 mm corresponding to the initial inoculum of the fungus, for five consecutive days. The data were used to calculate the average mycelial growth at five days and to obtain the mycelial growth rate index (MGRI), using the method proposed by Maia et al. (2011), as follow:

$$MGRI = \frac{\sum(D - D_a)}{N} \quad (1)$$

where D is the current average diameter of the colony, D_a is the average diameter of the colony of the previous day, and N is the number of days of evaluation.

2.3 Statistical analysis

The spore concentration data were transformed to root(x) and subjected to analysis of variance and comparison of means by the Tukey test (1953). The data relating to AG and MGRI were submitted to analysis of variance. The analyzes were performed using software R (R Development Core Team, 2018).

3 RESULTS

There was no significant interaction between the culture medium and the type of light used to promote in vitro sporulation of *D. bryoniae*. The fungus samples were only able to sporulate when subjected to the UV-B light treatment, regardless of the culture medium. The other light conditions did not cause any stimulus to sporulation, or even traces of reproductive structures. As a result, comparisons using the mean test were only performed between different culture media under UV-B light treatment and,

a significant difference was observed for the number of spores among the four culture medium evaluated ($P<0.001$). The highest appearance of spores conidium type was observed in the PDAB medium, and the lowest production occurred in the ML medium (Figure 1).

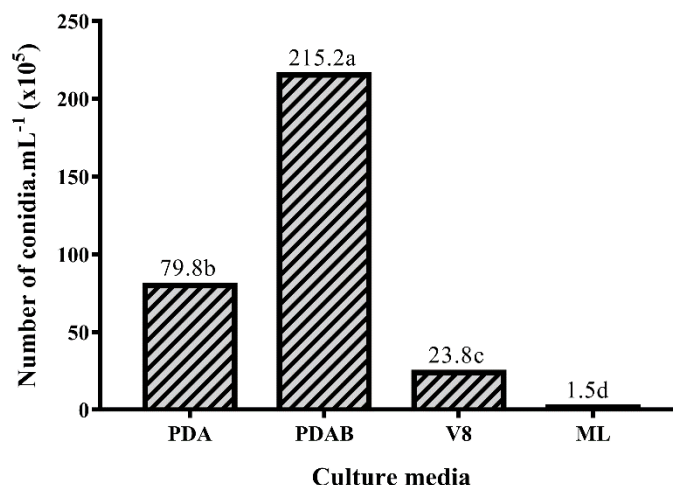


Figure 1. Average conidia concentration of *Didymella bryoniae* produced in different culture media under UV-B light. PDA = potato-dextrose-agar; PDAB = potato-dextrose-agar + melon branches; V8 = concentrated vegetable juice (commercial); ML = melon leaf extract.

Reproductive structures, such as perithecia and pycnidia, were observed in all culture media. However, there was considerable variation in the amount of each structure between the different culture media used as shown in Table 1. The ML and V8 media showed a greater number of perithecia in relation to the pycnidia. This variation might have influenced the final spore count since, despite a large number of structures the ascospores are difficult to visualize on the hemacytometer, resulting in reduced total spores' count. In contrast, the PDA and PDAB media presented a greater proportion of pycnidia compared to perithecia, resulting in a higher conidia appearance (Figure 1). It worth mentioning the importance of PDAB medium to promote pycnidia production since most of the formed structures were present in the melon branches.

Table 1. Spores of *Didymella bryoniae* produced in different media under UV-B light.

Culture media ^a	Perithecia	Pycnidia
PDAB	++	++++
PDA	++	+++
V8	+++	++
ML	++++	+

+ = scarce; ++ = moderate; +++ = good; ++++ = abundant. ^aPDAB = potato-dextrose-agar + melon branches; PDA = potato-dextrose-agar; V8 = concentrated vegetable juice (commercial); ML = melon leaf extract.

The visual analysis employed for mycelium characterization indicated that the light type is an important factor affecting both the appearance and color of the fungus' structures. When submitted to growth in UV-B light, the mycelium showed a darker color (dark gray) compared to all other evaluated light conditions. Samples subjected to continuous dark, or UV-A light presented white color, and those under fluorescent light were greyish-white. In addition, it was observed that the mycelium volume is smaller when subjected to UV-B light but with a larger number of perithecia and pycnidia (Figure 2).

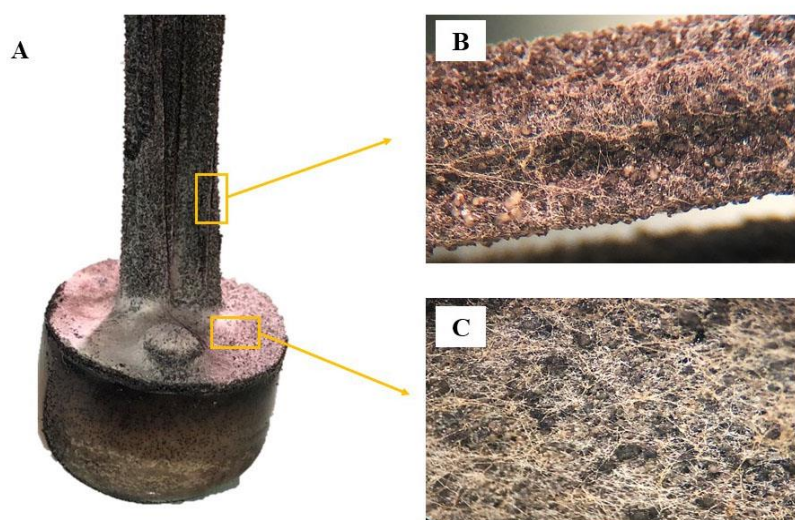


Figure 2. Characteristics of *Didymella bryoniae* reproductive structures in vitro. A) PDAB medium = potato-dextrose-agar + melon branches, B) on the branch; and C) on the medium.

Regarding morphological aspects evaluated, the appearance of septate and non-septate conidia was observed in all culture media under UV-B light as shown in Figure 3A. However, an important size variation was observed in which the largest microconidium production occurred in the V8 medium, with structure size ranging from

3 to 5 μm . In the other culture media, there were a higher proportion of macroconidia, ranging from 6 to 10 μm in length according to the classification proposed by Chiu and Walker (1949). Moreover, in all assessed media the asci's size ranged from 35 to 50 μm and the ascospores from 6.5 to 12 μm in length (Figure 3B).

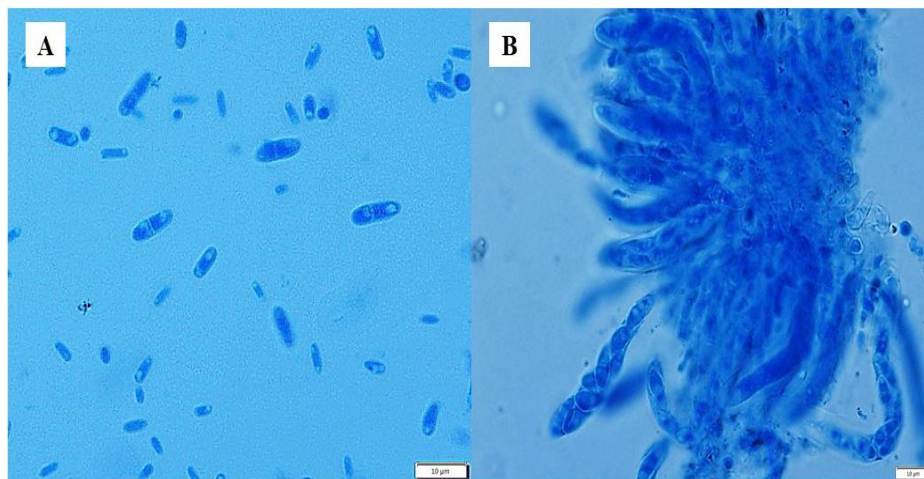


Figure 3. A) Conidia of the imperfect form of *Didymella bryoniae*; B) Asci and ascospores of the perfect form of *Didymella bryoniae* (100x amplification, scale = 10 μm).

As greater *D. bryoniae* sporulation was observed in samples submitted to PDAB medium and under UV-B light, this treatment was used to produce biological material for further freezing. At this stage of the experiment, the fungus survivability was evaluated after different storage periods at -20°C . However, there was no significant difference ($P>0.05$) between the freezing times on mycelial growth and the mycelial growth rate index (Figure 4). This result indicates that when subjected to a combination of PDAB medium with UV-B light, the fungus can survive, and biological functions are preserved after freezing at -20°C for up to five months.

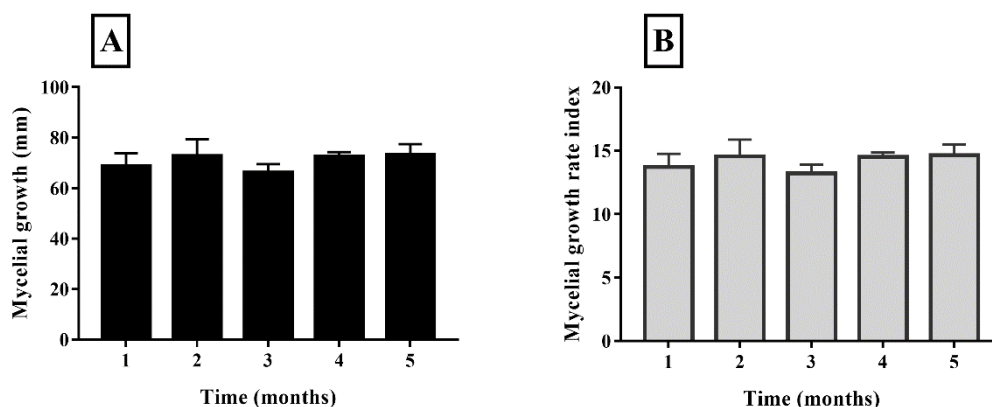


Figure 4. Average values of mycelial growth (A) and mycelial growth rate index (B) for the *Didymella bryoniae* fungus stored over five consecutive months at -20°C.

4 DISCUSSION

The results obtained in our study showed that regardless of the culture medium, the in vitro sporulation of *Didymella bryoniae* isolate occurs only in the presence of ultraviolet radiation, more specifically, the light spectrum in the wavelength between 280-360 nm (peaking at 315nm). According to Sepúlveda et al. (2009), some photoreceptors are only activated when stimulated by light with specific wavelengths. In addition, other authors reported that in several species the light has a regulatory effect on the development and behavior of fungi (Corrochano, 2007; Pulz and Massola Jr., 2009).

The quality and intensity of light are also important aspects to promote in vitro sporulation of *D. bryoniae*. During preliminary tests (*unpublished data*), it was possible to stimulate the formation of reproductive structures when using a 12-hour photoperiod with tubes placed 25 cm away from the lights, however, sporogenesis or spore maturation did not occur. Chiu and Walker (1949) also observed the formation of reproductive structures without the presence of spores. However, these authors report that the absence of sporulation on the material used occurred due to specific nutritional requirements by the different isolates of *D. bryoniae*. Considering that in the natural environment the fungus receives appropriate quality and amount of light to sporulate, these factors (number of light hours, intensity, and spectrum) are key elements that need to be considered under laboratory conditions to promote satisfactory sporulation of this fungi.

During the first phase of the experiment, the appearance of reproductive structures occurred both on the surface and also submerged in the culture medium, which is why maceration was defined as the best method for obtaining the spores produced. Similar behavior was observed by Leach (1962) when working with the sporulation of the fungus *Ascochyta pisi*. In preliminary evaluations, it was observed that the sporulation induction occurred in young mycelia only, soon after their exposure to UV-B light. On the other hand, there was no induction when mature mycelia were placed under UV-B light (*personal communication*). Similar results were observed by Leach (1962) who reported young mycelium is more sensitive to UV light radiation acting as a receptor compared to mature mycelium.

The fungal structure type formed varied among the four media used (Table 1). The ML medium showed higher production of perithecia than pycnidia, indicating that there is a higher occurrence of sexual reproduction in this medium caused by the greater availability of essential substances for fungus development. The greater appearance of perithecia might be explained by the fact that sexual reproduction has higher physiological requirements and energy costs compared with asexual reproduction (Chamberlain and Ingram, 1997). Conversely, in other media (PDA, PDAB, and V8) there is less availability of nutritional resources with consequently increased occurrence of asexual reproduction. These results partially corroborate Lee (1982), who obtained different sexual structures of *D. bryoniae* when submitted to PDA, V8, and plant extracts. However, this author attributed the observed differences to the origin of their isolates. In practical terms, the PDAB medium is more suitable to be used when screening to identify resistant plants, since the pycnidiospores produced are more easily visualized and quantified on a hemacytometer. On the other hand, the ML medium is mainly indicated to study genetic aspects of this fungus.

In addition to the influence on the development of reproductive structures, the medium composition also proved to be a determining factor for the size of pycnidiospores. In the V8 medium, there was a higher proportion of microconidia compared to all other media. In this case, the carbon source may be responsible for the variation observed in spore size, given that the V8 medium is the only that dextrose was not added. Similar results were observed by Chiu and Walker (1949) and Lee (1982) who associated the conidia size to the type of medium and isolate used.

Regarding the fungus' ability to survive after freezing at -20°C , there was no significant difference in average mycelial growth and mycelial growth rate index among the five different periods of freezing as presented in Figure 4 ($P>0.05$). This result indicates that the *D. bryoniae* can be stored at low temperatures, maintaining a high ability of survival and growth rate over time. According to Zermeño et al. (2017), freezing significantly reduces cellular metabolism, keeping the fungus viable for long periods. Thus, the high viability in the last month of evaluation (Figure 4) suggests that the fungus can remain viable for longer periods than those evaluated in the present study, without significant damage. It is important to highlight that, because of the experimental design it was not possible to systematically assess survivability after five months and, thus, further studies are required to improve our knowledge on this behalf.

Another important aspect that should be highlighted is the fact that the freezing was carried out using the PDAB medium, which biological material contains a high concentration of fungal spores. According to Meryman (1966) and Sakr (2019) spores, sclerotia, and dormant mycelium are the most resistant fungal structures to freezing because their cells have less moisture content. On the other hand, cellular structures with a higher moisture content tend to be more susceptible to damage caused by low temperatures.

To the best of our knowledge, to date, no studies have been developed to identify the main factors related to in vitro sporulation of *D. bryoniae* neither its ability to survive after freezing. Our results showed that it is possible to stimulate the sporulation of this fungus in vitro and that approachable techniques can be used for the storage and conservation of biological material.

5 CONCLUSIONS

This is the first study identifying key elements of light and culture medium affecting the *Didymella bryoniae* in vitro sporulation and the consequences of freezing during five consecutive months. The spectrum emitted by UV-B light is the main factor promoting in vitro sporulation. Moreover, the culture medium composition influences the type of fungal structure produced, as well as spores' size and quantity. Freezing at

-20°C is an efficient technique that can be used to store *D. bryoniae* for at least five months without loss of viability.

6 REFERENCES

Al-Bedak, O.A., Sayed, R.M., Hassan, S.H.A., 2019. A new low-cost method for long-term preservation of filamentous fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 22, no. 11, pp.101417.

Aparecido, C.C., Rosa, E.C., Costa, I.A.M., Jorge, C.M., 2018. Avaliação de diferentes métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Biologico**, vol. 80, no. 1, pp. 1–7.

Zermeño, M.A.A., Gallou, A., Padilla, A.M.B., Michel, G.Y.M., Rodríguez, J.C.R., Bernal, H.C.A., Matías, R.M., 2017. Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, vol. 121, no. 11, pp. 920–928.

Bhat, Z., Dar, G., Bhat, M., Anhangar, M., 2009. Effect of Media, Temperature and pH on growth and fructification of *Didymella bryoniae* (Auresw.) Rehm. causing blight in ridge gourd. **Applied Biological Research**, vol. 11, no. 5, pp. 70–72.

Braga, G.U.L., Rangel, D.E.N., Fernandes, É.K.K., Flint, S.D., Roberts, D.W., 2015. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, vol. 61, no. 3, pp. 405–425.

Chamberlain, M. and Ingram, D. S. 1997. The balance and interplay between asexual and sexual reproduction in fungi. **Advances in botanical research**, vol. 24, pp. 71-87.

Chiu, W.F. And Walker, J., 1949. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. **Journal of Agriculture Research**, vol. 78, no.5, pp. 81–102.

Choi, I.Y., Choi, J.N., Choi, D.C., Sharma, P.K., Lee, W.H., 2010. Identification and characterization of the causal organism of gummy stem blight in the muskmelon (*Cucumis melo* L.) . **Mycobiology**, vol. 38, no. 3, pp. 166.

Corrochano, L.M., 2007. Fungal photoreceptors: Sensory molecules for fungal development and behaviour. **Photochemical and Photobiological Sciences**, vol. 6, no. 7, pp. 725–736.

Grube, M., Fürnkranz, M., Zitzenbacher, S., Huss, H., Berg, G., 2011. Emerging multi-pathogen disease caused by *Didymella bryoniae* and pathogenic bacteria on Styrian oil pumpkin. **European Journal of Plant Pathology**, vol. 131, no. 3, pp. 539–548.

Gusmini, G., Ellington, T.L., Wehner, T.C., 2003. Mass production of gummy stem blight spores for resistance screening. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, vol. 26, pp. 26–30.

Hassan, M.Z., Robin, A.H.K., Rahim, M.A., Natarajan, S., Kim, H.T., Park, J.I., Nou, I.S., 2018. Screening of melon genotypes identifies gummy stem blight resistance associated with Gsb1 resistant loci. **Journal of Plant Biotechnology**, vol. 45, no. 3, pp. 217–227.

Hawksworth, D.L., Colwell, R.R., 1992. Microbial diversity: biodiversity amongst microorganisms and its relevance. **Biodiversity and Conservation**, vol. 1, pp. 221–226.

Keinath, A.P., Farnham, M.W., Zitter, T.A., 1995. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbits. **Phytopathology**, vol. 85, no. 3, pp. 364–369.

Kwon, M.K., Hong, J.R., Sun, K.Y., Cho, B., Kim, K.C., 1997. Standardization of a mass-production technique for pycnidiospores of *Didymella bryoniae*, gummy stem blight fungus of cucurbits. **Korean J. Plant Pathol**, vol. 13, no. 2, pp. 105–112.

Leach, C.M., 1962. The quantitative and qualitative relationship of ultraviolet and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*. **Canadian Journal of Botany**, vol. 40, no. 12, pp. 1577–1602. <https://doi.org/10.1139/b62-154>.

Leão, E.U., Santos, G.R., Sarmiento, R.A., Reis, M.R., Chagas Junior, A.F., 2012. Crescimento micelial e produção de conídios de *Ascochyta cucumis* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Bioscience Journal**, vol. 28, no. 2, pp. 325–331.

Lee, D.H., 1982. Morphological and cultural characters of *Didymella bryoniae* on seeds and culture media. **Kor J Mycol** 10, 7–13.

Liu, S., Shi, Y., Miao, H., Wang, M., Li, B., Gu, X. And Zhang, S. 2017. Genetic analysis and qtl mapping of resistance to gummy stem blight in *Cucumis sativus* seedling stage. **Plant Disease**, vol. 101, no. 1, pp. 1–8.

Maia, F.G.M., Armesto, C., Zancan, W.L.A., Maia, J.B., De Abreu, M.S., 2011. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, vol. 27, no. 2, pp. 205–210.

Mao, X., Wu, Z., Bi, C., Wang, J., Zhao, F., Gao, J., Hou, Y., Zhou, M., 2020. Molecular and biochemical characterization of pydiflumetofen-resistant mutants of *Didymella bryoniae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 68, no. 34, pp. 9120–9130.

Meryman, H. T., 1966. *Cryobiology*. London and New York : Academic Press.
 Nga, N.T.T., Giau, N.T., Long, N.T., Lübeck, M., Shetty, N.P., De Neergaard, E., Thuy, T.T.T., Kim, P. V., Jørgensen, H.J.L., 2010. Rhizobacterially induced protection of watermelon against *Didymella bryoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, vol.109, no. 2, pp. 567–582.

Pulz, P., Massola, J.N.S., 2009. Effect of culture media and physical factors on growth and sporulation of *Alternaria dauci* and *A. solani*. **Summa Phytopathol**, vol. 35, no. 2, pp.121–126.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing, **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria.

Sakr, N., 2019. Long term storage for five important cereal phytopathogenic species. Pakistan **Journal of Phytopathology**, vol. 31, no. 2, pp. 155–162.

Sepúlveda, L., Vásquez, L.E., Paniagua, C.I., Echeverry, D., Hernández, C.A., Rodríguez, E., Restrepo, L.F., 2009. The presence and spectrum of light influences the in vitro conidia production of *Mycosphaerella fijiensis* causal agent of black sigatoka. **Australasian Plant Pathology**, vol. 38, pp. 514–517.

Skarshaug, A.J., 1981. Centrum development in *Didymella bryoniae*. **American Journal of Botany**, vol. 68, no. 8, pp. 1096–1103.

Somai, B.M., Keinath, A.P., Dean, R.A., 2002. Development of PCR-ELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from related *Phoma* species. **Plant Disease**, vol. 86, no. 7, pp. 710–716.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., 2011. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 964.

Tsay, J.G., Tzen, S.L., Tung, B.K., 1990. Enhancement of sporulation of *Didymella bryoniae* by near-ultraviolet irradiation. **Plant Protection Bulletin**, vol. 32, pp. 229–232.

Tsutsumi, C.Y., Da Silva, N., 2004. Screening of melon populations for resistance to *Didymella bryoniae* in greenhouse and plastic tunnel conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 47, no. 2, pp. 171–177.

Tukey, J. W., 1953 **The problem of multiple comparisons**. Unpublished memorandum in private circulation.

Wiant, J.S., 1945. Mycosphaerella black rot of cucurbits. **Journal of Agriculture Research**, vol. 71, no. 5, pp. 193–214.

Wolukau, J.N., Zhou, X.H., Li, Y., Zhang, Y. Bin, Chen, J.F., 2007. Resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm and inheritance of resistance from plant introductions 157076, 420145, and 323498. **HortScience**, vol. 42, no. 2, pp. 215–221.

Zhang, N., Xu, B.H., Bi, Y.F., Lou, Q.F., Chen, J.F., Qian, C.T., Zhang, Y.B., Yi, H.P., 2017. Development of a muskmelon cultivar with improved resistance to gummy stem blight and desired agronomic traits using gene pyramiding. **Journal of Genetics and Plant Breeding**, vol. 53, no. 1, pp. 23–29.

CAPÍTULO 3 - IMPLICATIONS OF THE INOCULATION METHOD AND ENVIRONMENT IN THE SELECTION OF MELON GENOTYPES RESISTANT TO *Didymella bryoniae*¹

ABSTRACT - The use of resistant melon cultivars is considered the most effective method to control gummy stem blight, caused by *Didymella bryoniae*. However, the selection of genotypes is influenced by environmental conditions and the inoculation method. This study aimed to assess how different screening conditions influences resistance classification and the occurrence of environmental effects on melon genotypes with monogenic dominant resistance locus to *D. bryoniae*. Four experiments with a randomized block design were used to evaluate the reaction of seven melon genotypes, namely the resistant accessions PI 140471, PI 420145, and PI 157082, and their respective crosses. These genotypes were inoculated by mycelial-agar disc or spores and submitted to two environmental conditions (greenhouse or controlled environment). The data from the experiments were initially submitted to an analysis of variance. Subsequently, a joint analysis was performed. The combination of controlled environment with the disc inoculation proved to be more aggressive to all genotypes whereas inoculation via spore was less harmful and allowed a better characterization of the resistance level. Regardless of the inoculation method, differences between genotypes were smaller under greenhouse. Selection of melon genotypes must be carried out considering the occurrence of genotype-environment interactions. Although the conditions provided in the greenhouse reflects the natural environment, the evaluation and identification of resistant genotypes to *D. bryoniae* should be undertaken in a controlled environment with inoculation by spores.

Keywords: *Cucumis melo* L., gummy stem blight, genotype-environment interaction, inoculation

¹ Esse capítulo corresponde ao artigo científico submetido a revista Scientia Horticulturae e encontra-se em avaliação para publicação.

1 INTRODUCTION

Gummy stem blight (GSB), caused by the fungus *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm, is a disease with a significant impact on melon and several other cucurbit species (Santos et al., 2017). The melon yield loss due to *D. bryoniae* infection often ranges from 15 to 30% and in more severe infection cases, can reach up to 80% (Liu et al., 2017).

GSB is widely distributed in tropical countries and is also reported in temperate climate areas (Bhat et al., 2018). The disease occurrence is favored by temperatures around 25°C and relative humidity of 95% (Santos et al., 2011). This disease is characterized by yellowing of the leaf margins that advance to light to dark brown spots (necrosis) across the entire leaf surface and a canker of the cortical stem tissue that produces brown viscous exudate. In susceptible plants, these lesions can expand to cover the stem, leading the plant to wilt and death. The GSB disease can also occur in the fruit, however, it does not reach the roots (Hassan et al., 2018a).

Currently, the use of synthetic chemical pesticides is the main method used to prevent and control GSB. This method has low efficiency, is time-consuming and laborious, presents high potential of environmental pollution, and causes increased selection pressure for the pathogen's population leading to direct contribution to the evolution of new *D. bryoniae* variants (Bi et al., 2015a; Santos et al., 2017). To reduce the use of fungicides and the cost of production, genetic resistance has been widely used as a control strategy of vascular wilts (Agrios, 2005; Kimati et al., 2005).

Several sources of melon resistance to GSB are reported in the literature, including five monogenic dominant resistance loci (*Gsb-1*, *Gsb-2*, *Gsb-3*, *Gsb-4*, and *Gsb-6*), and one monogenic recessive locus (*gsb-5*) from the six PI accessions PI 140471, PI 157082, PI 511890, PI 482398, PI 420145, and PI 482399, respectively (Hu et al., 2018). Although these sources are monogenic, studies evaluating resistance to GSB reported that inoculation methodologies and environmental conditions influenced their resistance level. Wako et al. (2000) reported that different inoculation methodologies (spraying, needle-prickling, and petiole-mediated inoculation) resulted in distinct resistance level of evaluated genotypes. Xu et al. (2014) and Bi et al. (2015b)

tested different spore concentrations for inoculation and reported different genotype responses.

Environmental conditions play an important role for melon-resistance assessment. Sowel et al. (1981) and Zhang et al. (1997) reported an increase in resistance level of PIs evaluated under open field compared to greenhouse conditions. Similarly, Frantz & Jahn, (2004) reported that the resistant:susceptible ratio was affected by environmental conditions that resulted in a greater number of susceptible individuals, which differed from the expected Mendelian inheritance pattern. More recently, Hassan et al. (2018b) reported that environmental conditions affected PIs resistance to *D. bryoniae*. Thus, screening conditions (inoculation method and environmental condition) can significantly influence the response of GSB-resistant genotypes, i.e., resistant genotypes can be dismissed, or even susceptible genotypes can be selected in a melon breeding program if evaluation conditions are not well established.

There is no consensus in the scientific literature regarding the most appropriate screening condition to evaluate the resistance level of genotypes carrying genes of monogenic inheritance. It is imperative to develop studies that better characterize how the environment, inoculation methodology, and their interactions can influence genotypes' response to improve selection efficiency and to further understand the differences between GSB-resistance levels. The objective of this study was to evaluate how different screening conditions influences melon genotypes resistance classification as well as to access the occurrence of environmental effects on genotypes with monogenic dominant resistance locus to *Didymella bryoniae*.

2 MATERIAL AND METHODS

The present study was developed in the Sector of Vegetables and Aromatic-Medicinal Plants, São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal. Four experiments were carried out to evaluate the response of melon genotypes to *Didymella bryoniae*.

This study was conducted in two stages in March 2020 (Stage 1) and January 2021 (Stage 2). In Stage 1, the effect of inoculation using mycelium-agar discs on

melon seedlings was evaluated in two environment conditions: greenhouse (experiment 1) and controlled environment (experiment 2). In Stage 2, the effect of inoculation via spore of *D. bryoniae* on melon seedlings was evaluated in the same two environments: greenhouse (experiment 3) and controlled environment (experiment 4). Each trial was conducted in a randomized block design, consisting of seven treatments (genotypes) with four replications. The evaluated melon genotypes were PI 140471 (71 - *Gsb-1*), PI 420145 (45 - *Gsb-6*), and PI 157082 (82 - *Gsb-2*) obtained from the US Department of Agriculture, and their crosses (F_1 s) (PI 140471 x PI 420145, PI 140471 x PI 157082, and PI 157082 x PI 420145). The F_1 s were assigned as 7145, 7182, and 8245 respectively. The Jab-11 line, developed by the Unesp Melon Breeding Program, was used as a control.

The plot consisted of six seedlings in each replication, totaling 24 plants per genotype in each experiment. The seedlings were arranged in alternate rows into a 128-cell expanded polystyrene tray, containing commercial substrate previously autoclaved at 120°C and 1 ATM, for one hour. For the evaluation, the central seedlings of the plot were considered, leaving the two external ones as borders.

2.1 Inoculum preparation

The *D. bryoniae* isolate was obtained from melon plants that were grown in a greenhouse from which the pycnidial/perithecia were removed from stems that showed typical GSB symptoms. The fungal structures were placed in Petri dishes containing PDA culture medium (potato-dextrose-agar) and were subsequently incubated in growth chambers at 24°C, with a 12-hour photoperiod under fluorescent light for four consecutive days. After obtaining the culture, two subcultures were carried out to promote fungus purification. The new plates were stored in a chamber for 20 days to obtain the disc-type inoculum used in experiments 1 and 2.

In Experiments 3 and 4, the spore inoculum was prepared by combining PDA medium, pieces of melon branches and the fungus *D. bryoniae* in test tubes. The inoculum was transferred to a growth chamber, maintained at 24°C and 16h photoperiod under UV-B ultraviolet light (280-360 nm) for 15 consecutive days to obtain the spores. To prepare the spore solution, the culture medium was removed

from the test tube and placed in a lab crucible containing 20 mL of sterile water, which permitted the maceration of this material for spore release (Virtuoso et al., 2021). After maceration, 0.2% Tween 20 was added, and a solution filtration was completed in voile tissue. The inoculum suspension was then adjusted to 5×10^5 spores mL^{-1} with the addition of 0.1% sucrose and 0.1% agar to the final volume.

2.2 Fungal inoculation

Melon seedlings that were 25 days of age were used in all four experiments. In experiments 1 and 2, mycelium-agar discs 5 mm in diameter were fixed to the seedling stem by using a grafting clip. In experiments 3 and 4, a spray bottle containing spore solution was used to inoculate the seedling leaves until reaching the point of runoff (the spores' solution was prepared immediately before applying on melon seedlings).

After inoculation, the seedlings were incubated in a humid chamber for three days at a temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and humidity ranging from 80 to 100% to promote pathogen infection. For the first 24 hours, there was an absolute absence of light in the chamber (Fig. 1S). After the three days, the plants were transferred to either to a greenhouse with temperatures ranging from 17°C to 40°C and humidity between 15 and 98% or a chamber with controlled environmental conditions, where temperatures ranged from 22°C to 26°C and humidity from 70 to 99% (Fig. 1S).

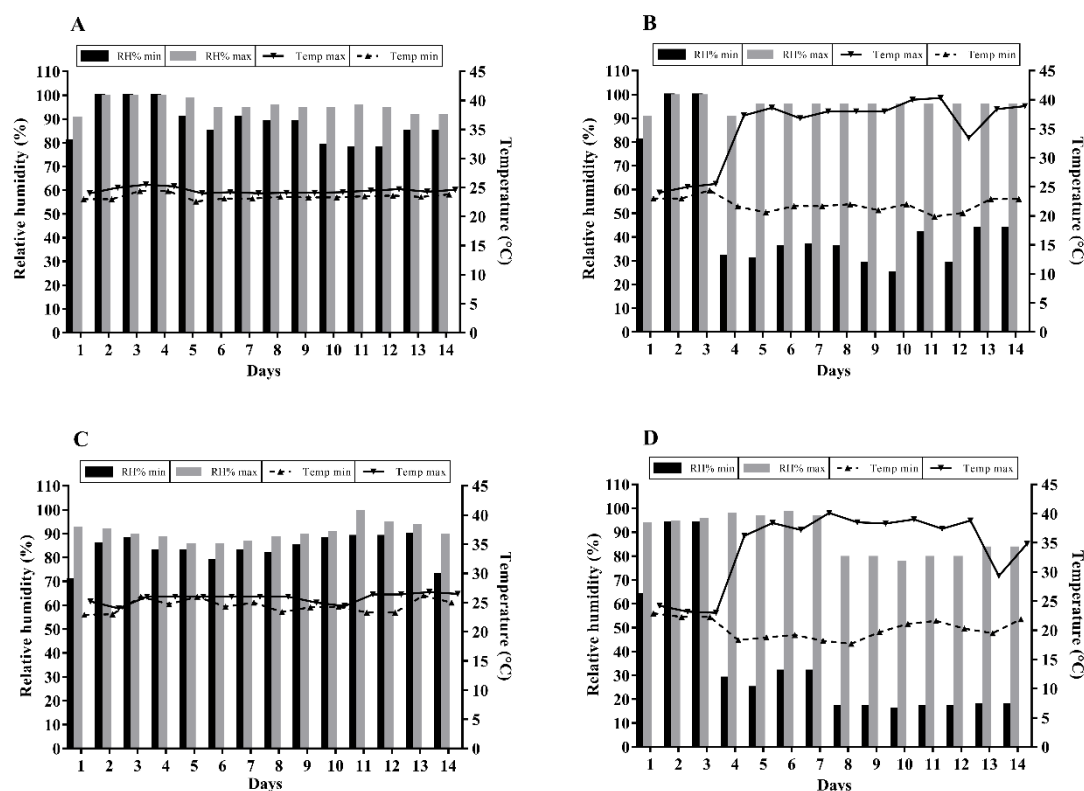


Fig. 1S. Maximum and minimum temperatures and maximum and minimum humidity collected during the experiments. A: spore inoculation in controlled environment; B: spore inoculation in greenhouse; C: disk inoculation in controlled environment; D: disk inoculation in greenhouse. The averages of days 1, 2, and 3 refer to the humid chamber.

2.3 Resistance evaluation

The gummy stem blight (GSB) symptoms were assessed on day 3, 7, 10, and 14 after *D. bryoniae* inoculation. The first disease symptoms evaluation was carried out immediately after plants were removed from the humid chamber. All evaluations were performed using the same grading scale that allowed for direct comparisons between the symptoms presented in the stem (inoculation by mycelium disc) and in the leaf (inoculation by spores).

In experiment 1 and 2 (disc inoculation), disease symptoms were assessed by the stem lesion length. The plants were classified according to a 5-point grading scale adapted from the methodology proposed by Dusi et al. (1994), in which: 0 = no visible

symptoms; 1 = soaked lesion on the plant stem up to 1 cm in length; 2 = soaked lesion on the plant stem with more than 1 cm in length; 3 = partially necrotic lesion on the stem with partial plant wilt; and 4 = stem necrosis with total wilt and plant death (Fig. 2S).

In experiments 3 and 4 (spore inoculation), the GSB symptoms were quantified based on the percentage of leaf area affected, using the methodology adapted from Hassan et al. (2018b). The area of infection was measured on the first two true leaves of each seedling and assigned a score from 0 to 4 (0 = 0% of leaf area affected; 1 = 1–15% of leaf area affected; 2 = 16–35% of leaf area affected or a completely withered leaf; 3 = 36–65% of leaf area affected, two withered leaves or stem symptom; and 4 = 65–100% of leaf area affected or plant death) (Fig. 3S). The seven genotypes were classified according to mean disease symptom scores (MDSs) by screening condition, based on the methodology adapted from Xu et al. (2014) and classified as Highly resistant: MDSs <0.5; Resistant: $0.5 \leq \text{MDSs} < 1.5$; Moderately resistant: $1.5 \leq \text{MDSs} < 2.5$; Susceptible: $2.5 \leq \text{MDSs} < 3.5$; and Highly susceptible: MDSs ≥ 3.5 .

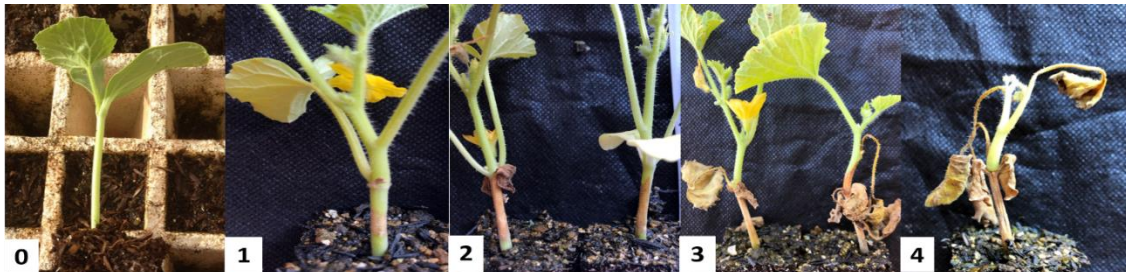


Fig. 2S: Evolution of disease symptoms caused by *Didimella bryoniae* as described in the grading scale adapted from Dusi et al. (1994). Scores: 0 = no visible symptoms; 1= soaked lesion on the plant stem up to 1 cm in length; 2 = soaked lesion on the plant stem with more than 1 cm in length; 3 = partially necrotic lesion on the stem with partial plant wilt; and 4 = stem necrosis with total wilt and plant death.

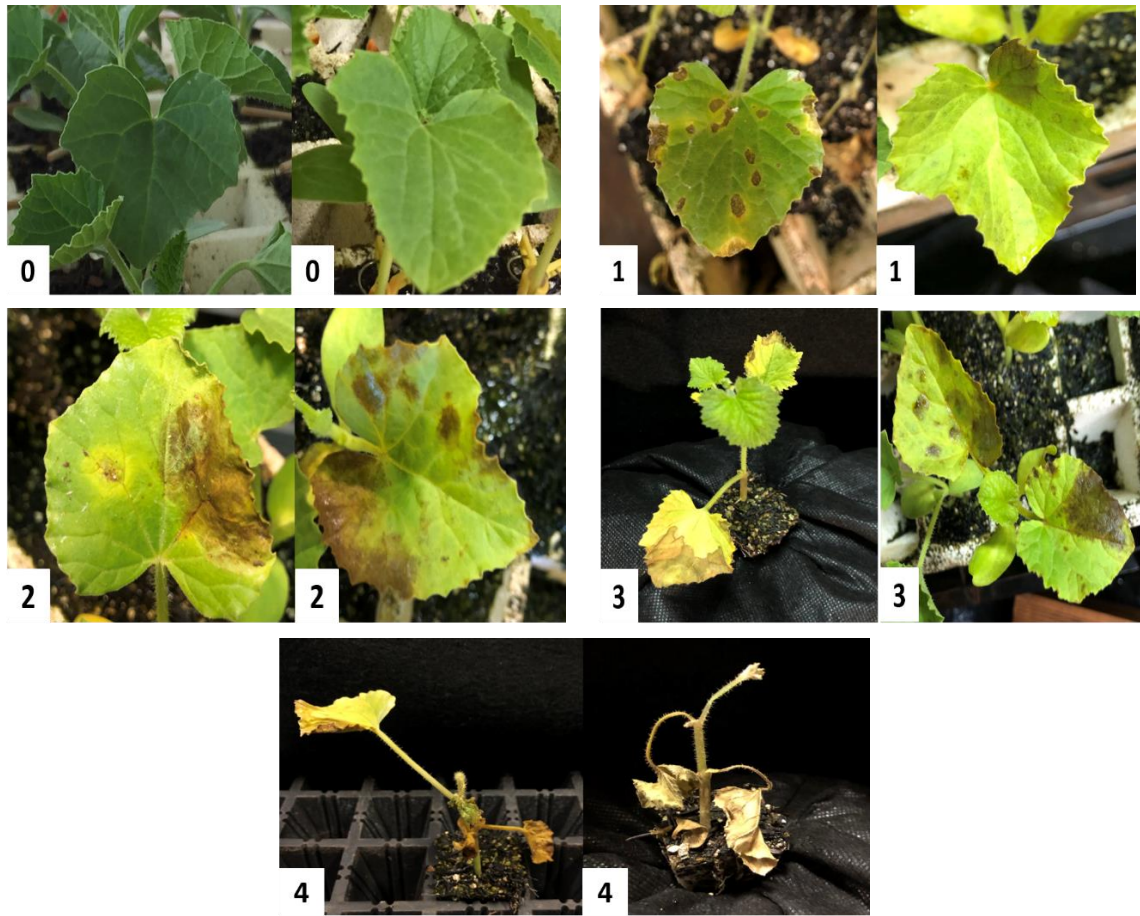


Fig. 3S: Evolution of disease symptoms caused by *Didymella bryoniae* as described in the grading scale adapted from Hassan et al. (2018). Scores: 0 = 0% of leaf area affected; 1 = 1–15% of leaf area affected; 2 = 16–35% of leaf area affected or a completely withered leaf; 3 = 36–65% of leaf area affected, two withered leaves or stem symptom; and 4 = 65–100% of leaf area affected or plant death.

At the end of 14 days of evaluation, the average of GSB disease symptom scores (DSS) and the values of the area under the disease progress curve (AUDPC) were obtained for each plot. The AUDPC was calculated using the formula proposed by Shaner & Finney (1977), as follows:

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

where: Y_i and Y_{i+1} is the disease severity (score per plot) in the i -th observation; X_i and X_{i+1} is the time (in days) in the i -th observation; n is the total number of observations.

2.4 Statistical analysis

Data from the four experiments were transformed by $\sqrt{(x + 1)}$ and submitted to a preliminary analysis of variance. Based on the conclusion of Pimentel Gomes (2009) that tests in different environments can be grouped in a single analysis of variance if the ratio between the largest and smallest mean square of the residue is less than seven, a joint analysis was performed.

In the event of significant differences were obtained by the F test, a comparison analysis of means was carried out using the LSD (Least standard deviation) test. Fisher's exact test (Fisher, 1922) was also applied to verify whether the number of resistant and susceptible plants differed between the types of inoculation (disc vs. spore). All statistical analyzes were performed using the R software (R Development Core Team, 2018) considering the significance level of $p < 0.05$.

3 RESULTS

The results of the joint analysis of variance, including data from the four experiments that evaluated the effects of environmental conditions and inoculation methodologies on the response of seven melon genotypes to *Didymella bryoniae* are shown in Table 1. All genotypes were classified for resistance level according to the mean disease symptom scores (MDSs), as illustrated in Fig. 1. The inoculation method, environmental condition, and genotype had significant effects ($p < 0.01$) on both disease symptom scores (DSs) and the values of the area under the disease progress curve (AUDPC). Significant interactions between genotype and inoculation method (GxI) and of genotype with environmental condition (GxE) were observed. When AUDPC values were analyzed, a significant interaction between inoculation method and environmental conditions was observed (Table 1).

Table 1. Analysis of variance with F values for disease symptom scores (DSs) and area under the disease progress curve (AUDPC) of seven melon genotypes (*Cucumis melo*) inoculated with *Didymella bryoniae* using two methods (discs and spores) and evaluated under two environmental conditions (greenhouse and controlled environment).

Source of variation	Degrees of freedom	F	
		DSs	AUDPC
Blocks	3	2.366	3.647
Inoculation (I)	1	15.337**	73.358**
Environment (E)	1	130.919**	91.125**
Genotypes (G)	6	45.231**	53.701**
I x E	1	1.682 ^{ns}	4.752*
G x I	6	4.909**	5.096**
G x E	6	4.068**	3.548**
I x E x G	6	1.650 ^{ns}	1.546 ^{ns}
Residue	81		
Coefficient of variation (%)		9.47	16.96

** = significant at 1% probability; * = significant at 5% probability; ^{ns} = not significant

3.1 Inoculation methods and environmental conditions

Regardless of the inoculation method, the controlled environment increased the disease advance rate compared to the greenhouse, as demonstrated by the AUDPC. Higher values of AUDPC were observed when inoculated with mycelium-agar discs and, the association of controlled environment with inoculation by disc was more aggressive for all genotypes (Table 2).

Table 2. Mean values for the area under the disease progress curve (AUDPC) from melon plants after inoculation of *Didymella bryoniae* submitted to different screening conditions.

Inoculation	AUDPC	
	Controlled environment	Greenhouse
Disc	20.05 Aa	10.79 Ba
Spore	11.27 Ab	6.20 Bb

Means followed by the same uppercase letter in the line or the same lowercase letter in the column do not differ according to the LSD test ($p < 0.05$).

The aggressiveness of the inoculation method was also confirmed by comparing the number of resistant and susceptible plants within each environmental condition. When disc inoculation method was used under controlled environment, the number of susceptible plants was higher than using spore inoculations. However, the number of

susceptible plants was not different (p -value = 0.20) between inoculation methods when growing in greenhouse (Table 3).

Table 3. Comparison between the number of melon plants considered resistant (0, 1, and 2^a) and susceptible (3 and 4^a) to *Didymella bryoniae* using Fisher's exact test.

* Resistance classes	Number of plants			
	Controlled environment		Greenhouse	
	Disc	Spore	Disc	Spore
Resistant	86	113	143	151
Susceptible	80	50	16	11
Total	166	163	159	162
Fisher's test	p -value = 0.0008		p -value = 0.1964	

^aScores used for plant resistance classification; Disc (0 = no visible symptoms; 1= soaked lesion on the plant stem up to 1 cm in length; 2 = soaked lesion on the plant stem with more than 1 cm in length; 3 = partially necrotic lesion on the stem with partial plant wilt, and 4 = stem necrosis with total wilt and plant death). Spore (0 = 0% of leaf area affected; 1 = 1–15% of leaf area affected; 2 = 16–35% of leaf area affected or a completely withered leaf; 3 = 36–65% of leaf area affected, two withered leaves or stem symptom; 4 = 65–100% of leaf area affected or plant death).

3.2 Genotypes and inoculation methods

As expected, the Jab-11 genotype (susceptible control) displayed the greatest disease symptoms average and disease advance rate regardless of the inoculation method, differing to the other evaluated genotypes (Table 4). Comparing the two inoculation methodologies, the highest DSs were observed for PI 82 and F₁s 4582 and 4571 when inoculated by disc. The other genotypes showed similar resistance level irrespective of inoculation methods used, as demonstrated by the DSs. When disc inoculation method was used, PI 45, PI 71 and F₁ 8271 presented the lowest DSs values. Whereas, when inoculated by spores, F₁s 4582, 4571, and 8271 presented the lowest DSs indicating the highest resistance level (Table 4, Fig. 1).

Table 4. Disease symptom scores (DSs) and area under the disease progress curve (AUDPC) values of seven melon genotypes inoculated with *Didymella bryoniae*, using two methodologies.

Genotypes	DSs		AUDPC	
	Disc	Spore	Disc	Spore
Jab-11	3.52 Aa	3.25 Aa	35.14 Aa	25.80 Ba
PI 45	1.01 Ad	1.08 Abc	8.58 Ade	6.26 Abc
PI 71	1.07 Ad	1.44 Ab	8.09 Ae	7.49 Abc
PI 82	2.08 Ab	1.52 Bb	19.49 Ab	9.38 Bb
F ₁ 4571	1.57 Ac	0.74 Bc	12.78 Acd	3.98 Bc
F ₁ 4582	1.82 Abc	0.82 Bc	15.19 Abc	3.83 Bc
F ₁ 8271	1.02 Ad	0.79 Ac	8.67 Ade	4.40 Ac

Means followed by the same uppercase letter in the line or the same lowercase letter in the column do not differ according to the LSD test ($p < 0.05$).

Similar to the DSs results presented above, the disease progress (AUDPC) was higher for PI 82, and F₁s 4582 and 4571 when inoculated by disc comparing to inoculation with spores. No significant differences were detected for AUDPC between inoculation methods among the remaining genotypes. The lowest AUDPC value was observed for PI 71 followed by PI 45 and F₁ 8271 respectively, when disc inoculation was used. Under spore inoculations, F₁s presented the lowest AUDPC values and were to PIs 45 and 71 (Table 4).

3.3 Genotypes and environmental conditions

Disease symptoms were more severe in controlled environment for all evaluated genotypes, except F₁ 4582, which showed similar behavior in both environments (Table 5, Fig. 1). The Jab-11 showed the highest values for DSs and AUDPC in both environments, which was significantly different from the other evaluated genotypes. The PI 71 and F₁ 8271 showed the highest level of resistance in the greenhouse compared to PI 82 and F₁ 4582, as measured by the disease symptom scores. In controlled environment, PI 82 was the least resistant genotype with the highest DSs among the genotypes (Table 5, Fig.1).

The AUDPC value was similar for F₁ 4582 under both environmental conditions, whereas all other genotypes showed higher disease progression values under controlled environment. Under controlled environment, PI 82 had a higher value of

AUDPC compared to the other resistant genotypes. However, in the greenhouse this genotype differed only from PI 71 and F₁ 8271 (Table 5).

Table 5. Disease symptom scores (DSs) and area under the disease progress curve (AUDPC) values of seven melon genotypes inoculated with *Didymella bryoniae* evaluated under two environmental conditions.

Genotypes	DSs		AUDPC	
	Greenhouse	Controlled environment	Greenhouse	Controlled environment
Jab-11	2.77 Ba	4.00 Aa	25.31 Ba	35.63 Aa
PI 45	0.72 Bbc	1.38 Ad	4.92 Bbc	9.92 Ac
PI 71	0.49 Bc	1.88 Ac	3.55 Bc	12.33 Ac
PI 82	1.00 Bb	2.60 Ab	8.43 Bb	20.44 Ab
F ₁ 4571	0.73 Bbc	1.58 Acd	5.31 Bbc	11.45 Ac
F ₁ 4582	1.18 Ab	1.46 Ad	9.03 Ab	9.98 Ac
F ₁ 8271	0.43 Bc	1.37 Ad	2.90 Bc	10.17 Ac

Means followed by the same uppercase letter in the line or the same lowercase letter in the column do not differ according to the LSD test ($p < 0.05$).

3.4 Genotype classification

There was a clear and consistent difference in genotypes' resistance classification, as demonstrated by the mean of disease symptom scores (MDSs) after 14 days of inoculation (Fig. 1). Regardless of the inoculation method, the MDSs of Jab-11 was 2.77 in the greenhouse and 4.00 under controlled environment, being classified as susceptible and highly susceptible, respectively (Table 5, Fig. 1).

The PI 45 genotype remained classified as resistant regardless of the screening condition (Fig. 1). PI 71 was classified as highly resistant (MDSs = 0.25) and resistant (MDSs = 0.73) when inoculated by disc and spores in the greenhouse, respectively. However, under controlled environment PI 71 was classified as moderately resistant irrespective of the inoculation method (Fig. 1). Among all evaluated genotypes, PI 82 presented the highest variation on resistance classification. With the disc inoculation, PI 82 was classified as resistant (MDSs = 1.34) and susceptible (MDSs = 2.83) under greenhouse and controlled environment, respectively. On the other hand, when inoculated by spores, the genotype was classified as resistant (MDSs = 0.67 - greenhouse) and moderately resistant (MDSs = 2.38 - controlled environment).

Under both environmental conditions, the evaluated F₁ genotypes were classified as resistant when inoculated by spore, except for F₁ 8271 which was classified as highly resistant (MDSs = 0.33) under greenhouse (Fig. 1). Conversely, the F₁s inoculated by disc showed different behaviors depending on the environment. The F₁s 4571 and 8271 changed from resistant (MDSs = 0.81 and 0.54) to moderately resistant (MDSs = 2.34 and 1.51) under greenhouse and controlled environment, respectively. F₁ 4582 was classified as moderately resistant regardless of the environment, as shown in Fig. 1.

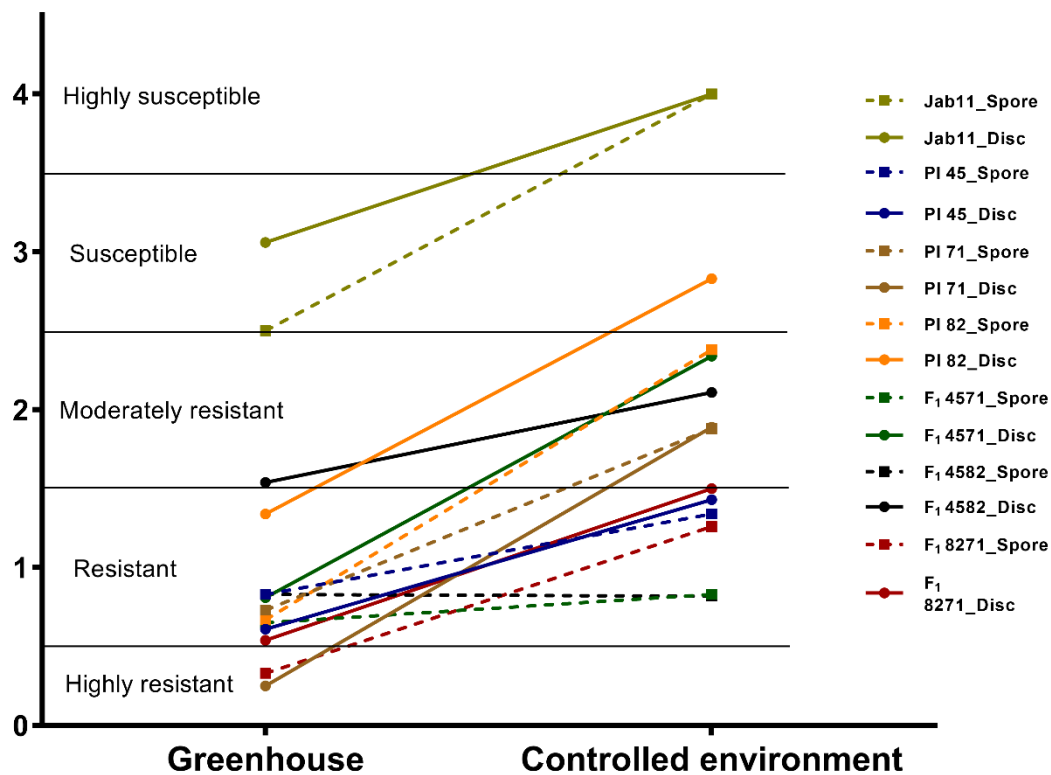


Fig. 1. Genotypes' resistance classification in each screening condition according to mean disease symptom scores (MDSs): Highly resistant: MDSs <0.5; Resistant: $0.5 \leq \text{MDSs} < 1.5$; Moderately resistant: $1.5 \leq \text{MDSs} < 2.5$; Susceptible: $2.5 \leq \text{MDSs} < 3.5$, and; Highly susceptible: MDSs ≥ 3.5 .

4 DISCUSSION

The results of the present study demonstrate that high variability exists in the resistance of melon genotypes to *D. bryoniae*. The observed resistance to the fungus

is directly influenced by both the growing environment to which the plants are submitted and the inoculation method. As expected, the Jab-11 genotype was susceptible to the pathogen in all evaluated conditions. Furthermore, some genotypes classified as resistant to the fungus showed a considerable variation under the screening conditions evaluated, as shown in Fig. 1.

In all screening conditions the DSs and AUDPC values were similar, corroborating the resistance level of each melon genotype across distinct evaluation scenarios. The AUDPC analysis determined the speed at which disease evolves on the plant as measured by the time from the application of treatments to the time of infection and/or development of the pathogen, which is not possible to measure using the disease symptom scores. Thus, both evaluation methods (DSs and AUDPC) are indicated to better characterize the effect of *D. bryoniae* on melon genotypes' resistance.

4.1 Inoculation method

In the case of *D. bryoniae*, spore inoculation has the advantage of portraying the pathogen's natural form of infection and as observed, enabled improved detection of genotypes' resistance level. This method is more practical when there is the need to inoculate a large number of plants. The disc method is commonly used as an alternative to the spore method (Santos et al, 2017) because this fungus presents difficulties to sporulate under laboratory conditions and is influenced by the growing environment and the pathogen isolate (Keinath et al., 1995; Choi et al., 2010; Virtuoso et al., 2021).

The mycelium disc proved to be more severe than inoculation with spores (Table 2 and 3). Previous studies reported that the concentration of available spores and the used inoculation method influences the response of genotypes' resistance. Thus, the greater the amount of inoculum present, the greater the damage caused to the plants (McGrath et al., 1993; Wako et al., 2000; Xu et al., 2014; Bi et al., 2015b). When the mycelium disc inoculation method is adopted, the hyphae are readily active providing faster stem infection. However, when there is foliar application, it is observed a slower infection progress since the spores need to germinate first and then infect the

plant. During this period, the germination of spores is directly influenced by environmental factors, depending on the optimal conditions to promote plant infection (Takada, 1982).

In addition, the infected structure might also explain the results obtained in the present study since the stem is the supporting organ and damage in this region affects the entire plant quickly. Conversely, a slower disease progress is observed when the pathogen infection starts in the leaves (secondary organs). As shown in Tables 2 and 4, the higher AUDPC values obtained by mycelium disc inoculation method indicates that there is a faster disease progress, highlighting the effect of this methodology and of plant's organ where the fungus was inoculated.

Regarding the evaluated genotypes, PI 82, F₁ 4582 and F₁ 4571 presented more severe symptoms when inoculated by discs compared to the same genotype responses when inoculated by spores (Table 4). These three genotypes showed lower stem resistance than in the leaves, differing to the remaining genotypes that did not show significant differences between inoculation methods (Table 4). Zhang et al. (1997) and Wolukau et al. (2007) also observed higher leaf resistance in genotypes showing intermediate or low stem's resistance. Since the stem is the most GSB affected organ, our results reinforce the importance of identification and selection of broad genetic resistant materials, presenting better responses to *D. bryoniae* in the stem and leaves simultaneously.

4.2 Environmental conditions

GSB disease progress rate and symptoms are greater in plants submitted to growth under controlled environment that is characterized by high humidity and low temperature (Fig. 1S). Fungal development is favored in these conditions and causes significant damage to the plants. The most stable genotypes were PI 45 and F₁ 4582 (Table 5, Fig. 1). Although F₁ 4582 is more stable across the two environmental conditions used, its resistance level is more influenced by inoculation method (Table 4).

Controlled environments should be used by breeding programs focused on GSB resistance improvement, as this condition allow better disease development and

differentiation of genotypes' resistance level. However, given faster disease advance rate (Table 2) it is important to adjust the assessment time-point because the damage caused may influence the results or even prevent later use of plants to carry out crossings. In the greenhouse, environmental conditions are more similar to the natural environment leading to a lower rate of disease progression. Although, under greenhouse it is difficult to properly identify the different resistance levels of melon genotypes.

4.3 Genotypes and screening condition interactions

In general, F₁ genotypes showed a higher resistance level compared to parental individuals. Nevertheless, significant differences between PIs and F₁s genotypes were only observed when the spore inoculation method was used (Table 4, Fig. 1). Besides resistance level variability showed in the present study, different responses have also been reported in the scientific literature for the evaluated melon genotypes.

Zhang et al. (1997) evaluated PIs 82 and 71 by using the spore inoculation method (solution at 5×10^5 spores mL⁻¹) under both an open field and greenhouse conditions. These authors classified the two genotypes as highly resistant and resistant, respectively. Frantz & Jahn (2004) and Wolukau et al. (2007) considered PI 82 as resistant when inoculated by spores under controlled environment. In a study where the disc inoculation method was employed under greenhouse, PI 82 was considered moderately resistant, and PIs 71 and 45 as resistant (Santos et al, 2019). Hassan et al. (2018b) working with spores' inoculation under controlled environment also classified these two PIs as resistant, however, PI 82 as susceptible. Conversely, Bi et al. (2015a) found that PIs 71 and 45 became susceptible with higher spores' concentration (5×10^9 spores mL⁻¹) and evaluated under controlled environment.

Xu et al. (2014) evaluated F₁s 4571 and 4582 by using different spore concentrations under controlled environment and observed that F₁ 4571 was highly resistant at a concentration of 5×10^9 spores mL⁻¹. However, F₁ 4582 showed a moderate level of resistance, with the resistance level average equal to their parental lines. At lower concentration level (5×10^5 spores mL⁻¹), these authors classified F₁ 4582 as highly resistant. Bi et al. (2015b) evaluated F₁s at a concentration level of

5×10^9 spores mL^{-1} and two time-points of the year (spring and autumn) classifying F₁ 4571 and 8271 as highly resistant and resistant respectively, regardless of the season. Conversely, the authors classified F₁ 4582 as resistant at spring and moderately resistant at autumn. In addition, Bi et al. (2015b) showed that independently of season all F₁ genotypes were more resistant than their parents.

As discussed above, the variation observed within and between studies can be explained by the differences in screening conditions and the amount of inoculum used, which significantly affect genotype responses. These results highlight the importance of establishing an adequate screening methodology, which clearly discriminates the resistance levels of each genotype, without dismissing from the selection those carrying one or more resistance gene.

In theory, the combination of two dominant genes aims to increase the resistance level and range of protection, especially when environmental conditions are conducive to the development of diseases (Zuniga et al., 1999; Xu et al., 2014). Thus, when the effects of two or more genes are considered simultaneously with respect to resistance expression, it is expected that both genotype-environment interactions and epistasis effects will influence F₁ responses (Zhang et al., 2017).

According to Kemal et al. (2017), biotic-abiotic interactions play an important role in diseases control and breeding strategies as the interaction might influence the host and the effectiveness of genes' resistance. Our findings emphasize the importance of assessing genotype–environment interaction not only for polygenic traits but also when the target phenotype is considered monogenic.

The presence of interaction between inoculation method and environmental conditions may be related to genes of small additive effect, which contribute to increase the resistance of one genotype compared to the other. However, they have the disadvantage of being highly influenced by the environment (Camargo, 2018). Recent studies, assessing the resistance of watermelon PIs (initially considered monogenic) to GSB showed that this trait is influenced by multiple genes and environmental factors, reporting QTLs of major effect (Gimode et al., 2021; Gusmini et al., 2017; Lee et al., 2021; Ren et al., 2020). Thus, further studies to verify whether there are multiple genes affecting disease resistance of melon genotypes are required. If these genes are

identified, it is essential to describe their molecular functions allowing precise plant breeding aiming to increase melon resistance while reducing crop related costs.

The present study provides valuable information about the selection of resistant genotypes to *D. bryoniae* and the potential to apply this information in future studies of resistance in other plant diseases. Overall, among evaluated parental genotypes, PI 45 and 71 showed the highest resistance level, which is an important outcome especially under circumstances where there are great pathogen's pressure and its ideal developing conditions. Among F₁s, the 8271 was the most resistant genotype under the screening conditions implemented indicating that not all combinations of genes generate more resistant and stable individuals. Regardless of genotypes and environmental conditions, it is important to start future studies by implementing crossbreeding strategies and selection of F₁ genotypes presenting the desirable combination of genes from different parents.

5 CONCLUSIONS

Although monogenic resistant locus is present, the selection of melon genotypes must be carried out considering the occurrence of genotype-environment interactions. The use of a controlled environment associated with spore's inoculation method provides the best condition to implement selection of genotypes resistant to *Didymella bryoniae*. This screening condition allows for both the differentiation of genotypes and the identification of their resistance level. More severe symptoms are induced when the disc inoculation methodology is associated with controlled environment, not being indicated for the screening of melon genotypes' resistance level.

6 REFERENCES

Arny, C.J., Rowe, R.C., 1991. Effects of temperature and duration of surface wetness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. **Phytopathol.** 81, 206-209.

Agrios, G. N., 2005. **Plant pathology**, 5th ed. New York: Academic Press, 635 p.

Bhat, Z.A., Bhat, M.A., Ahangar, Z.A., Badri, G., Mir, H. and Mohi-u-Din, F., 2018. Survival of *Didymella bryoniae* incitant of ridge gourd blight under temperate conditions. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.** 7, 2632-2638.

Bi, Y., Xu, B., Guo, J., Zhang, Y., Yi, H., Qian, C. and Chen, J., 2015a. Pyramiding disease resistance genes by marker-assisted selection in melon (*Cucumis melo* L.) and “Baipicui” breed improvement. **J. Nanjing Agric. Univ.** 38, 375-380.

Bi, Y., Xu, B., Qian, C., Gao, J., Zhang, Y., Yi, H. and Chen, J., 2015b. Pyramiding disease resistance genes and variety improvement by molecular marker-assisted selection in melon (*Cucumis melon* L.). **Sci. Agric. Sin.** 48, 523-533.

Camargo, L. E. A., 2018. Controle genético. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. (Orgs.) Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. (5. ed). Piracicaba: **Agronômica Ceres**, pp. 119-132.

Choi, I.Y., Choi, J.N., Choi, D.C., Sharma, P.K., Lee, W.H., 2010. Identification and characterization of the causal organism of gummy stem blight in the muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Mycobiology.** 38, 166-170.

Dusi, A.N., Tasaki, S. and Vieira, J.V., 1994. Methodology of evaluation for resistance to *Didymella bryoniae* in melon. **Hortic. Bras.** 12, 43-44.

Fisher, R. A., 1922. **On the mathematical foundations of theoretical statistics**. Phil. Trans. R. Soc. Lond. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character. 222, 309-368.

Frantz, J.D. and Jahn, M.M., 2004. Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.). **Theor. Appl. Genet.** 108, 1033-1038.

Gimode, W., Bao, K., Fei, Z., McGregor, C., 2021. QTL associated with gummy stem blight resistance in watermelon. **Theor. Appl. Genet.** 134, 573-584.

Gusmini, G., Rivera-Burgos, L.A., Wehner, T.C., 2017. Inheritance of resistance to gummy stem blight in watermelon. **HortScience** 52, 1477-1482.

Hassan, M.Z., Rahim, M.A., Natarajan, S., Robin, A.H.K., Kim, H.T., Park, J.I. and Nou, I.S., 2018a. Gummy stem blight resistance in melon: Inheritance pattern and development of molecular markers. **Int. J. Mol. Sci.** 19.

Hassan, M.Z., Robin, A.H.K., Rahim, M.A., Natarajan, S., Kim, H.T., Park, J.I. and Nou, I.S., 2018b. Screening of melon genotypes identifies gummy stem blight resistance associated with *Gsb1* resistant loci. **J. Plant Biotechnol.** 45, 217-227.

Hu, Z., Deng, G., Mou, H., Xu, Y., Chen, L., Yang, J. and Zhang, M., 2018. A re-sequencing-based ultra-dense genetic map reveals a gummy stemblight resistance-associated gene in *Cucumis melo*. **DNA Res.** 25, 1-10.

Keinath, A.P., Farnham, M.W., Zitter, T.A., 1995 Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbits. **Phytopathology.** 85, 364-369.

Kemal, S.A., Bencheqroun, S.K., Hamwieh, A. and Imtiaz, M., 2017. Effects of temperature stresses on the resistance of chickpea genotypes and aggressiveness of *Didymella rabiei* isolates. **Front. Plant Sci.** 8, 1-11.

Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamim Filho, A., Camargo, L.E.A., 2005. (Ed). **Manual de Fitopatologia.** Doença das plantas cultivadas. São Paulo: v. 2, p. 435-443.

Lee, E.S., Kim, D.S., Kim, S.G., Huh, Y.C., Back, C.G., Lee, Y.R., Siddique, M.I., Han, K., Lee, H.E., Lee, J., 2021. QTL mapping for gummy stem blight resistance in watermelon (*Citrullus* spp.). **Plants.** 10, 1-17.

Liu, S., Shi, Y., Miao, H., Wang, M., Li, B., Gu, X. and Zhang, S., 2017. Genetic analysis and QTL mapping of resistance to gummy stem blight in *Cucumis sativus* seedling stage. **Plant Dis.** 101, 1-8.

McGrath, D.J., Vawdrey, L. and Walker, I.O., 1993. Resistance to gummy stem blight in muskmelon. **HortScience.** 28, 930-931.

Pimentel Gomes, F., 2009. **Curso de estatística experimental.** (15. ed). Piracicaba: FEALQ.

R Development Core Team, 2018. R: **A Language and Environment for Statistical Computing**, *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.

Ren, R., Xu, J., Zhang, M., Liu, G., Yao, X., Zhu, L., Hou, Q., 2020. Identification and molecular mapping of a gummy stem blight resistance gene in wild watermelon (*Citrullus amarus*) Germplasm PI 189225. **Plant Dis.** 104, 16-24.

Santos, G.R., Leão, E.U., Castro, H.G., Nascimento, I.R., Sarmento, R.A. and Sarmento-Brum, R.B.C., 2011. Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **J. Biotecnol. Biodivers.** 2, 52-58.

Santos, L.S., Cândido, W.S., Rabelo, H.D.O., Marin, M. V, Gaion, L.A., Gomes, R.F., Camargo, M., Braz, L.T., 2017. Reaction of melon genotypes to *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. Chil. **J. Agric. Res.** 77, 71-77.

Santos, L.S., Diniz, G.M.M., Gomes, R.F., Silva, E.H.C., Silva, A.J. da and Braz, L.T., 2019. Selection of melon genotypes with resistance to *Didymella bryoniae* using a diallel approach. **Acta Sci., Agron.** 41, 1-8.

Shaner, G. and Finney, R.E., 1977. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathol.** 77, 1051.

Takada, K., 1982. Breeding methods for disease-resistance of melon, and development of new lines with combined resistance. **Jarq.** 16, 94-104.

Virtuoso, M.C.S., Silva, E.H.C., Silva, E.M., Valente, T.S., Vargas, P.F., Braz, L.T., Panizzi, R.C., 2021. Providing inoculum for *Didymella bryoniae* studies: the effect of light spectrum and storing at low temperature. **Braz. J. Biol.** 84.

Wako, T., Ohara, T., Ishiuchi, D. and Kojima, A., 2000. Petiole-mediated inoculation method for seedling test for gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) resistance in melon. **Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plant. Tea.** 71-80.

Wolukau, J.N., Zhou, X.H., Li, Y., Zhang, Y. Bin and Chen, J.F., 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.

Xu, B., Qian, C., Wang, H., Bi, Y., Lou, Q., Zhang, Y., Yi, H. and Chen, J., 2014. The expression analysis of defense genes in the genes pyramided melon (*Cucumis melo* L.) resistance to gummy stem blight. **J. Nanjing Agric. Univ.** 37, 63-68.

Zhang, N., Xu, B.H., Bi, Y.F., Lou, Q.F., Chen, J.F., Qian, C.T., Zhang, Y.B. and Yi, H.P., 2017. Development of a muskmelon cultivar with improved resistance to gummy stem blight and desired agronomic traits using gene pyramiding. **Czech J. Genet. Plant Breed.** 53, 23-29.

Zhang, Y., Kyle, M., Anagnostou, K. and Zitter, T.A., 1997. Screening melon (*Cucumis melo*) for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field. **HortScience** 32, 117-121.

Zuniga, T.L., Jantz, J.P., Zitter, T. a. and Jahn, M.K., 1999. Monogenic dominant resistance to gummy stem blight in two melon (*Cucumis melo*) Accessions. **Plant Dis.** 83, 1105-1107.

CAPÍTULO 4 – INTROGRESSÃO DE GENE DE RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO GOMOSO DO CAULE EM LINHAGENS DE MELÃO RENDILHADO

RESUMO - O crestamento gomoso do caule (CGC) causado por *Didymella bryoniae* é uma doença que traz grandes prejuízos aos produtores de melão em todo o mundo. Diversas fontes de resistência já foram encontradas e podem ser utilizadas para resolver esse problema. Uma das formas de inserir essa resistência em cultivares elites é por meio do retrocruzamento, pois a resistência é condicionada por um único gene, tornando o processo mais simples e fácil. A parte mais difícil, está em recuperar as características do parental recorrente de forma eficiente e rápida, demandando conhecimento dos genótipos escolhidos. Dessa forma, objetivou-se nesse estudo, caracterizar e analisar a divergência genética de genótipos de meloeiro e b) introduzir genes de resistência em linhagens elite de melão rendilhado por meio do retrocruzamento. Um experimento com delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, foi utilizado para caracterizar cinco genótipos do meloeiro, sendo eles o PI 140471 (71), PI 420145 (45), PI 157082 (82), Jab-11 e Jab-20. Durante o crescimento e desenvolvimento das plantas foi realizada a caracterização morfológica dispondo de 47 descritores. Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância univariada e uma análise de componentes principais para verificar a importância de cada variável. A estimação da matriz de distância genética foi realizada por meio da análise conjunta das variáveis quantitativas e qualitativas obtidas com base no algoritmo de Gower. Para a parte do retrocruzamento, foram utilizadas como parental doador duas linhagens, PI45 e PI71 que contém os genes de resistência *Gsb-6* e o *Gsb-1* respectivamente, para serem introduzidos cada um em uma linhagem elite (Jab-11 e Jab-20). Desta forma, foram conduzidos dois retrocruzamentos em paralelo, separadamente, um para o cruzamento Jab-11 x PI45 e outro para Jab-20 x PI71. Foram conduzidos dois ciclos de retrocruzamento, e em cada ciclo foram feitas duas etapas, sendo a primeira, a seleção das plantas para a resistência ao CGC e a segunda etapa, consistiu na avaliação das características morfoagronômicas das plantas resistentes em casa de vegetação. Realizou-se análise de similaridade genética com base no algoritmo de Gower para verificar quais plantas apresentavam maior recuperação do parental recorrente para seguirem para a próxima geração. Como resultado da caracterização, foi obtido três grupos distintos, obtidos pelo agrupamento hierárquico dos genótipos pelo método de UPGMA. Sendo que os coeficientes de similaridade entre os genótipos variaram de 0,30 a 0,90. O maior valor de coeficiente de similaridade (0,90) foi observado entre a Jab-11 e Jab-20, seguido de 0,67 entre o PI45 e PI82. O menor valor de coeficiente de similaridade (0,30) foi observado entre a Jab-11 e o PI71. No retrocruzamento 1 (RC₁), cinco plantas com base na maior proximidade com o parental recorrente foram selecionadas como mais promissoras para serem genitoras de próximos cruzamentos (4, 15, 53, 58 e 87) e no RC_{1_20}, também foram selecionadas cinco plantas selecionadas (10, 29, 51, 55 e 67). A média de similaridade das cinco plantas selecionadas em RC_{1_11} foi de 0,80 e em RC_{1_20} foi de 0,75. No RC_{2_11}, foram selecionadas as plantas 6, 36, 46, 58 e 78 e no RC_{2_20} as plantas selecionadas foram 12, 24, 32, 54 e 68. A média de similaridade das cinco plantas selecionadas em RC_{2_11} foi de 0,79 e em RC_{2_20} foi de 0,78. A caracterização foi importante na discriminação a avaliação da variabilidade dos

genótipos, definindo três grupos distintos. A introdução da resistência ao crestamento gomoso do caule nas linhagens se mostrou uma técnica eficiente e possível de ser realizada graças ao tipo de herança da característica.

Palavras-chave: Análise de Gower, background, caracterização, diversidade genética, *Cucumis melo*

INTROGRESSION OF THE GUMMY STEM BLIGHT RESISTANCE GENE IN NETTED MELON LINES

ABSTRACT - Gummy stem blight (GSB) caused by *Didymella bryoniae* is a disease that causes great harm to melon producers worldwide. Several sources of resistance have already been found and can be used to solve this problem. One of the ways to introduce this resistance in elite cultivars is through backcrossing, as the resistance is conditioned by a single gene, making the process simpler and easier. The most difficult part is to recover the characteristics of the recurrent parent efficiently and quickly, demanding knowledge of the chosen genotypes. Thus, the objective of this study was to characterize and analyze the genetic divergence of melon genotypes and b) to introduce resistance genes into elite strains of lace melon by means of backcrossing. A randomized block design experiment with four replications was used to characterize five melon genotypes, namely PI 140471 (71), PI 420145 (45), PI 157082 (82), Jab-11 and Jab-20. During plant growth and development, morphological characterization was performed using 47 descriptors. Quantitative data were subjected to univariate analysis of variance and principal components analysis to verify the importance of each variable. The estimation of the genetic distance matrix was performed through the joint analysis of the quantitative and qualitative variables obtained based on the Gower algorithm. For the backcross part, two strains, PI45 and PI71, which contain the resistance genes *Gsb-6* and *Gsb-1* respectively, were used as donor parental, to be introduced each one into an elite strain (Jab-11 and Jab-20). In this way, two backcrosses were carried out in parallel, separately, one for the cross Jab-11 x PI45 and another for Jab-20 x PI71. Two backcrossing cycles were carried out, and in each cycle two stages were carried out, the first being the selection of plants for resistance to GSB and the second stage consisting of the evaluation of the morphoagronomic characteristics of the resistant plants in a greenhouse. Genetic similarity analysis was performed based on Gower's algorithm to verify which plants showed greater recovery of the recurrent parent to move on to the next generation. As a result of the characterization, three distinct groups were obtained, obtained by the hierarchical grouping of genotypes by the UPGMA method. The similarity coefficients between the genotypes ranged from 0.30 to 0.90. The highest similarity coefficient value (0.90) was observed between Jab-11 and Jab-20, followed by 0.67 between PI45 and PI82. The lowest similarity coefficient value (0.30) was observed between Jab-11 and PI71. In backcross 1 (RC₁), five plants based on the closest proximity to the recurrent parent were selected as most promising to be parents of next crosses (4, 15, 53, 58 and 87) and in RC_{1_20}, five selected plants were also selected (10, 29, 51, 55 and 67). The average similarity of the five plants selected in RC_{1_11} was 0.80 and in RC_{1_20} it was 0.75. In RC_{2_11}, plants 6, 36, 46, 58 and 78 were selected and in RC_{2_20} the selected plants were 12, 24, 32, 54 and 68. The average similarity of the five plants selected in RC_{2_11} was 0.79 and in RC_{2_20} was 0.78. Characterization was important in discriminating and evaluating the variability of genotypes, defining three distinct groups. The introduction of resistance to stem blight in the lines proved to be an efficient technique and possible to be performed thanks to the type of inheritance of the trait.

Keywords: Gower analysis, background, characterization, genetic diversity, *Cucumis melo*

1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma espécie de cucúrbita com alta importância agrônômica e econômica em todo o mundo. Devido a sua importância no cenário mundial, o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas é sempre necessário para satisfazer as novas demandas tanto do produtor como do mercado consumidor (Castro et al., 2019).

Um dos problemas ainda hoje enfrentados pelos produtores nas mais diversas culturas são as doenças, cujos patógenos infectam as plantas e ocasionam grandes perdas econômicas. Na cultura do melão, isso não é diferente, em especial nos chamados melões nobres, cultivados em casa de vegetação, que veem sofrendo com o cretamento gomoso do caule (CGC). Tal doença é causada pelo fungo *Didymella bryoniae*, cujos sintomas, caracterizam-se por damping-off, lesões foliares, cancro no colmo e comprometimento do desenvolvimento da planta (Dalcin et al., 2017), ocasionando redução de produtividade na ordem de 15 a 30%, e em casos mais severos em até 80% (Liu et al., 2017).

Diversas fontes de resistência para essa doença já foram identificadas e podem ser utilizadas em programas de melhoramento genético, dentre as mais difundidas estão cinco *loci* dominantes *Gsb-1*, *Gsb-2*, *Gsb-3*, *Gsb-4* e *Gsb-6*, e um locus monogênico recessivo (*gsb-5*), oriundo de seis PIs, PI140471, PI157082, PI511890, PI482398, PI420145, e PI482399, respectivamente (Hu et al., 2018). Como essa resistência é condicionada por um único locus, a metodologia mais comumente empregada nesse caso é o retrocruzamento, pois visa a introgressão de um ou alguns genes em uma cultivar elite, preservando o seu desempenho e adicionando os benefícios das características introduzidas (Jeong et al., 2015 ;Moeinizade et al., 2021).

Apesar de parecer simples, o retrocruzamento demanda tempo, pois são necessárias duas etapas “seleção em primeiro plano” que envolve a seleção de indivíduos que abrigam a característica-alvo e a seleção de segundo plano, que é o processo que visa selecionar indivíduos com maior porcentagem de recuperação do parental recorrente (Jeong et al., 2015; Priyadarshan, 2019). Principalmente, para seleção em segundo plano, é de grande importância conhecer bem a estrutura da

população e as características dos genótipos para melhor condução e seleção nos retrocruzamentos.

Uma das maneiras de avaliar a base genética da população é fazendo a caracterização morfoagronômica das plantas, pois por meio desta, é possível conhecer as diferenças genéticas do conjunto de germoplasma (Elias et al 2007). Diferentes métodos estatísticos exploram a variabilidade e as diferenças existentes e auxiliam na seleção e combinações das gerações (Ali-Shtayeh et al., 2017). Entre as técnicas disponíveis para o estudo de diversidade, a análise por métodos aglomerativos tem sido um dos mais adotados. Este método utiliza as medidas de dissimilaridade provenientes de variáveis quantitativas e qualitativas, alocando os genótipos em grupos, de tal forma que haja homogeneidade dentro destes e heterogeneidade entre os mesmos (Rocha et al., 2010).

Conhecendo a problemática na produção do meleiro, quanto as perdas provocadas pelo fungo *D. bryoniae* e a importância de se desenvolver materiais resistentes, este trabalho teve o objetivo de a) caracterizar e analisar a divergência genética de genótipos de meloeiro e b) introduzir genes de resistência em linhagens elite de melão rendilhado por meio do retrocruzamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos separadamente, um para a caracterização e análise de divergência genética e outro para os retrocruzamentos. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais, pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP-FCAV), Câmpus de Jaboticabal-SP, cujas coordenadas são 21° 14' S e longitude de 48° 17' W. O clima da região é do tipo Cwa, de acordo com a classificação de Köppen.

2.1 Caracterização dos genótipos

A caracterização morfológica foi realizada em cinco genótipos de meloeiro (Tabela 1), sendo duas linhagens desenvolvidas pelo programa de melhoramento

genético da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal e três genótipos introduzidos (PI), contendo diferentes genes de resistência à *Didymella bryoniae*, obtidos junto ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

Os genótipos foram semeados em março de 2020, em bandejas de poliestireno expandido com 128 células, utilizando substrato comercial na densidade de uma semente por célula. Aos 25 dias, quando as plântulas apresentaram duas folhas definitivas, foram transplantadas individualmente para vasos plásticos com capacidade de 5 L, preenchidos com solo, esterco bovino curtido e areia na proporção de 3:1:1, respectivamente. Em seguida foram acondicionados em casa de vegetação e distribuídos de maneira aleatória no delineamento em blocos ao acaso, perfazendo cinco tratamentos com quatro repetições. Cada parcela continha seis plantas espaçadas em 0,5 m entre plantas e 0,7 m entrelinhas, sendo avaliadas as quatro plantas centrais.

Tabela 1. Genótipos de meloeiro utilizados na caracterização morfológica.

Genótipos	Sigla	Origem
Linhagem Jab 11	Jab-11	UNESP-FCAV
Linhagem Jab 20	Jab-20	UNESP-FCAV
PI 140471	PI71	USDA
PI 420145	PI45	USDA
PI 157082	PI82	USDA

Durante todo o desenvolvimento da planta, a irrigação diária foi feita por gotejamento com água acrescida de solução nutritiva, como recomendado para a cultura por Castellane e Araújo (1994).

As plantas foram tutoradas na vertical, presas por fitilhos instalados transversalmente aos fios de arame, sendo conduzidas com haste única, retirando-se todos os brotos laterais, até o 11º entrenó. A orientação do crescimento das plantas foi realizada semanalmente, por meio de desbrotas e uso da estrutura condutora até a altura de dois metros.

Com o início do florescimento, por segurança, para garantir o número de frutos suficiente para serem avaliados, foram realizadas polinizações manuais, uma vez que, havia baixa incidência de insetos polinizadores dentro casa de vegetação, diminuindo

a taxa de pegamento. Com o crescimento dos frutos, estes foram sustentados por redes plásticas para evitar a quebra de ramos e a queda antes da maturação.

A caracterização morfológica ocorreu durante todo o crescimento e desenvolvimento da planta que perfizeram 86 dias, desde o transplante até a colheita. Foram utilizados 49 descritores, sendo 22 qualitativos e 25 quantitativos. Os descritores utilizados foram baseados no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008) e no Bioversity International (IPGRI, 2003) (Tabela 2, Apêndice: Tabela 1). Para as aferições das variáveis quantitativas utilizou-se os seguintes equipamentos: refratômetro digital para aferição de sólidos solúveis, pHmetro, paquímetro digital (mm), régua graduada (cm) e balança digital (g).

Tabela 2. Descritores morfológicos.

Características				
Qualitativas*	Sigla	Quantitativas	Sigla	Unidade
Tipo de pelo no caule	TPC	Diâmetro do caule	DC	mm
Comprimento do internó	CIN	Comprimento do lóbulo terminal	CLTF	cm
Desenvolvimento dos lóbulos	DLF	Comprimento da folha	CMPFO	cm
Forma da folha	FF	Comprimento do ovário	COV	mm
Expressão do sexo	EXS	Diâmetro do ovário	DO	mm
Pilosidade do ovário	PO	Comprimento total da flor feminina	CFLF	cm
Pilosidade da flor masculina	PFM	Comprimento total da flor masculina	CFLM	cm
Listras no ovário	LO	Comprimento da pétala da flor feminina	CPFF	cm
Intensidade da cor verde da casca fruto jovem	ICFJ	Comprimento da pétala da flor masculina	CMPFM	cm
Mudança de cor depois da maturação	MC	Diâmetro das pétalas da flor feminina	DPFLF	cm
Época de mudança da coloração da casca do fruto jovem para o fruto maduro	EMCF	Diâmetro das pétalas da flor masculina	DPFLM	cm
Tonalidade da cor da casca maduro	TCFM	Razão comprimento/diâmetro do ovário	RCDO	
Posição do diâmetro máximo	PDM	Diâmetro do pedúnculo do fruto jovem	DPFJ	mm
Forma da seção longitudinal	FSL	Comprimento do fruto	CF	cm
Densidade das manchas	DM	Diâmetro do fruto	DF	cm
Forma da base	FB	Razão comprimento/diâmetro do fruto	RCDF	
Forma do ápice	FA	Sólidos solúveis Totais	SS	°Brix
Tamanho da cicatriz do pistilo	TCP	Massa do fruto	MS	g
Sulcos	SU	Comprimento da cavidade interna	CC	cm
Rugosidade da superfície	RS	Diâmetro da cavidade	DCV	cm
Rendilhamento da casca	RM	Espessura da casca	EPC	mm
Cor principal da polpa	CPF	pH	pH	
		Comprimento da semente	CS	mm
		Diâmetro da semente	DS	mm
		Peso de 100 sementes	PCS	g

* Código e identificação de cada característica qualitativa estão apresentados em apêndice na Tabela 1.

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott. A estimação da matriz de distância genética foi realizada por meio da análise conjunta das variáveis

quantitativas e qualitativas obtidas com base no algoritmo de Gower (1971), expresso por:

$$S_{ijk} = \frac{\sum_{k=1}^P W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{k=1}^P W_{ijk}}$$

em que: k = número de variáveis ($k = 1, 2, \dots, p$); i e j = genótipos; W_{ijk} é o peso para a comparação ijk ; sendo $W_{ijk} = 1$ para comparações válidas e $W_{ijk} = 0$ para comparações inválidas (caso o valor da variável esteja faltando em um ou ambos os genótipos); S_{ijk} = contribuição da variável k na similaridade entre os genótipos i e j , com valores variando de 0 a 1. Para variáveis qualitativas, se o valor de k for o mesmo para ambos os genótipos (i e j) então $S_{ijk} = 1$, caso contrário será 0. Para variável quantitativa:

$$S_{ijk} = 1 - \frac{|X_{ik} - X_{jk}|}{R_k}$$

Onde X_{ik} e X_{jk} são k valores para os genótipos i e j , respectivamente, e R_k é o intervalo da variável k . Após a divisão por R_k , as variáveis têm a mesma escala e pesos iguais, e variam de 0 a 1.

Com o coeficiente de dissimilaridade de Gower, obtido pela conversão da matriz de similaridade entre os indivíduos, por meio de seus complementos aritméticos ($d = 1 - S$), foi realizado o agrupamento hierárquico dos genótipos pelo método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average). Assim, o programa R (R Development core team, 2018) foi utilizado para as análises estatísticas, análise de distância genética e posterior desenvolvimento do dendrograma. Ao final, também foi aplicado uma análise de componentes principais para verificar a importância de cada variável quantitativa.

2.2 Retrocruzamento e recuperação do parental recorrente

A geração F_1 e os ciclos de retrocruzamento foram obtidos no setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais na Faculdade de Ciências Agrárias (Unesp/FCAV). A semeadura e a condução do cultivo seguiram os mesmos processos apresentadas anteriormente na caracterização.

As linhagens de melão rendilhado escolhidas como parentais recorrentes foram Jab-11 e Jab-20, que apresentam alta produtividade e massa de fruto e características organolépticas desejadas, com derivação de híbridos com bom desempenho agrônômico e qualidade de fruto com grande potencial para ser lançado como nova cultivar, porém não apresentam resistência ao crestamento gomoso do caule. As linhagens utilizadas como parentais doadores do gene de resistência, foram o PI420145 (45) e o PI140471 (71) que contém os genes de resistência *Gsb-6* e *Gsb-1*, respectivamente, para serem introduzidos cada um em uma das Jabs por meio do retrocruzamento. Desta forma, foram conduzidos dois retrocruzamentos em paralelo, separadamente, um para a Jab-11 x PI45 (Jab1145) e outra para a Jab-20 x PI71 (Jab2071) (Figura1).

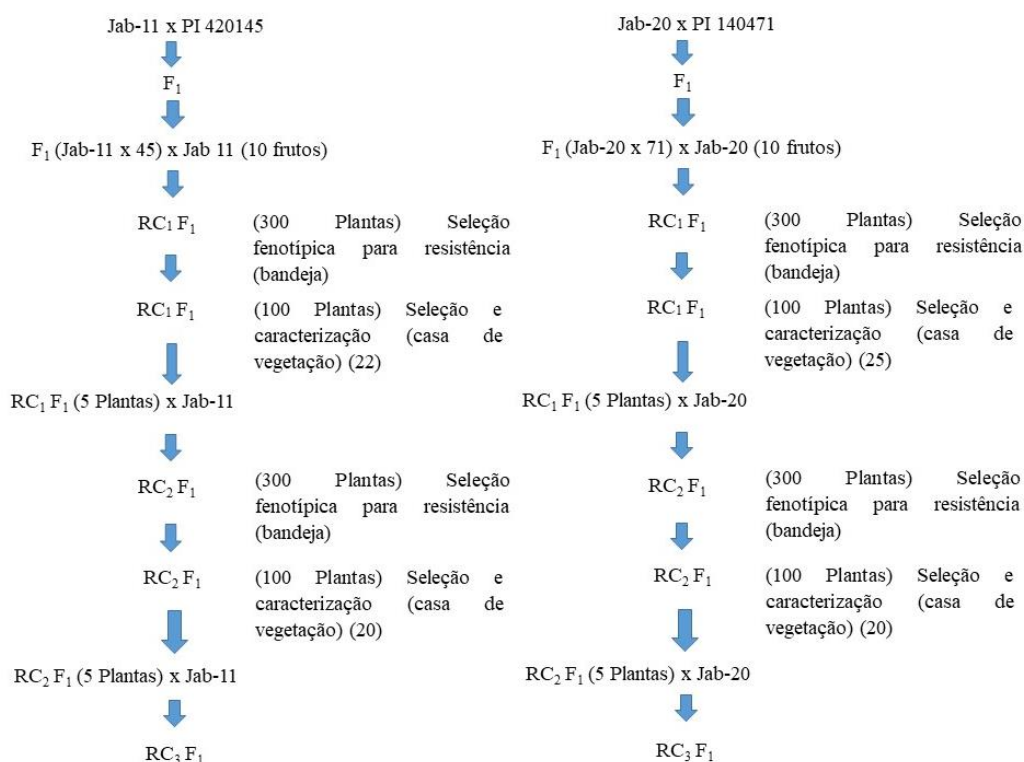


Figura 1. Esquemas de retrocruzamentos conduzidos em duas linhagens diferentes em paralelo.

Os cruzamentos da geração F_1 já haviam sido obtidos anteriormente e as sementes estavam armazenados em câmara fria. As sementes foram então coletadas e cultivadas como descrito anteriormente. Quando as plantas atingiram a idade de floração, deu-se início aos retrocruzamentos, onde as plantas F_{1s} (Jab1145) foram retrocruzadas com a Jab-11 e as F_{1s} (Jab2071), com a Jab-20, usando sempre as Jabs como planta mãe. Para esse processo, na tarde do dia anterior quando as flores ainda estavam na fase de botão floral, fez-se a emasculação das flores hermafroditas e a proteção, para evitar contaminação com pólen estranho. Na manhã seguinte, essas flores foram então polinizadas utilizando o pólen dos parentais doadores e novamente protegidas e identificadas. Ao final do ciclo foram colhidos dez frutos de cada retrocruzamento, para a obtenção das sementes.

Depois de obtidas as sementes do retrocruzamento 1 (RC_1), 300 sementes oriundas de cada uma das linhas de retrocruzamento e 20 sementes das suas respectivas linhagens recorrentes foram semeadas, a fim de obter um novo ciclo. Aos 25 dias após a germinação, antes do transplântio para os vasos, as mudas passaram por seleção para resistência ao crestamento gomoso.

Para selecionar as plantas resistentes, o fungo foi inoculado aplicando uma solução na concentração de 5×10^5 esporos/mL sobre as plântulas, até o ponto de escorrimento e posteriormente foram levadas para câmara úmida com temperatura variando de 22 a 24 °C e umidade acima de 90%, por sete dias. Para a verificação da eficiência da inoculação, uma bandeja com a linhagem Jab-11 (Suscetível) também foi inoculada.

Após os sete dias, foi feita a avaliação dos sintomas com base na porcentagem de área foliar afetada, seguindo a metodologia ajustada de Hassan et al. (2018), com notas variando de 0 a 4, sendo: 0 = 0% da área foliar afetada; 1 = 1–15% da área foliar afetada; 2 = 16–30% da área foliar afetada ou uma folha completamente murcha; 3 = 36–65% da área foliar afetada, duas folhas murchas ou sintoma no caule; 4 = 65–100% da área foliar afetada ou morte da planta. Um total de 100 plantas (33%) de cada RC_1 foram selecionadas e transplantadas para vasos individuais, além das 20 plantas do respectivo parental recorrente.

Em casa de vegetação, as plantas do RC_1 foram dispostas em quatro linhas de gotejo, sendo duas linhas para o retrocruzamento Jab-11 e duas para o

retrocruzamento Jab-20. Os vasos foram enumerados de 1 a 100, e esses números serviram de identificação dos genótipos. As 20 plantas do parental recorrente foram dispostas no centro de cada linha a fim de facilitar os cruzamentos. A fertirrigação e os demais tratos culturais, foram os mesmos descritos anteriormente.

A partir da população do RC₁, foram selecionadas, de forma visual, antes da floração, 22 plantas RC₁ com Jab-11 e 25 plantas do RC₁ com Jab-20. Ao longo do ciclo, as plantas selecionadas visualmente passaram por um processo de caracterização. Para essa etapa foram utilizados os mesmos descritores utilizados na parte de caracterização, exceto as características relacionadas as sementes, CS, DS e PCS (Tabela 2).

Os genótipos selecionados, foram usados como doadores de pólen para a obtenção das sementes do retrocruzamento 2 (RC₂). Porém, só as sementes oriundas dos cinco genótipos mais próximos geneticamente das linhagens recorrentes com base na caracterização, foram utilizados para o próximo ciclo. Para tanto, foi feita análise conjunta dos dados qualitativos e quantitativos a fim de se determinar a distância genética, com base no algoritmo de Gower (1971).

Por fim, para obtenção das sementes RC₃, seguiu-se os mesmos procedimentos anteriores, contudo, para a caracterização, foram selecionados visualmente 20 genótipos de cada uma das linhas de retrocruzamento (Figura 1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização e análise de divergência

As médias dos descritores quantitativos evidenciam a existência de variabilidade genética entre os 5 genótipos avaliados. No entanto, os genótipos não apresentaram diferença para as características CFLM, DPFLF, SS, EPC (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios para características quantitativas de cinco genótipos de meloeiro.

Variáveis*	Jab-11	Jab-20	PI45	PI71	PI82	CV (%)
CFLM	2.20a	2.21a	2.02a	1.61a	2.48a	20.6
CMPFM	1.77a	1.72a	1.58a	1.24b	1.58a	9.2
DPFLM	1.28a	1.24a	1.13b	0.88d	1.04c	5.87
CPFF	2.12a	2.16a	2.12a	1.13b	2.28a	7.9
DPFLF	1.62a	1.56a	1.61a	1.21a	1.46a	22.3
COV	12.72b	13.36b	14.12b	9.31c	17.52a	6.9
DO	8.16a	8.36a	8.10a	5.43c	7.31b	6.5
CFLF	4.06b	4.18b	4.12b	2.50c	4.59a	5.3
CMPFO	12.18b	12.23b	13.43a	10.67c	14.23a	6.8
CLTF	6.55b	6.83b	8.38a	4.24c	7.99a	9.7
DC	10.43a	10.93a	6.18c	8.16b	6.66c	5.2
DPFJ	6.41a	5.95b	5.72b	3.12d	4.50c	5.2
MS	752.19a	611.72a	635.47a	134.06c	336.66b	17.2
SS	9.01a	8.09a	10.46a	6.47a	9.14a	30.2
EPC	2.03a	1.87a	2.05a	1.60a	2.44a	18.6
CF	12.39a	11.17b	11.59b	7.01c	13.16a	7.1
DF	10.87a	10.05b	9.65b	6.06d	7.53c	5.8
CC	7.62b	7.14b	8.04b	5.08c	10.94a	10.2
DCV	5.17a	5.09a	5.33a	4.06b	5.14a	6.9
PH	6.49a	6.45a	5.99c	4.56d	6.16b	1.6
RCDO	1.56c	1.60c	1.74b	1.71b	2.40a	3.2
RCDF	1.14b	1.11b	1.20b	1.16b	1.75a	4.8
CS	10.25a	9.43a	6.58b	5.42b	6.75b	7.2
DS	3.69a	3.70a	3.09b	2.47c	3.09b	2.2
PCS	1.64a	1.41b	1.11c	0.79d	1.15c	10.1

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, foram agrupadas segundo o teste de Scott-knott ($p < 0,05$).

*Para as siglas, consulte a Tabela 2.

Para as características relacionadas às flores (CFLF, CMPFO e COV), o PI71 apresentou os menores valores. O PI82 apresenta ovário mais alongado, porém com diâmetro mais reduzido que os demais genótipos, como se observa nos valores de RCDO. Flores maiores facilitam o manuseio, principalmente quando é necessário fazer emasculação, para cruzamentos posteriores. Os genótipos Jab-11 e Jab-20 para todas as características referentes as medições nas flores foram similares (Tabela 3, Figura 1), isso está relacionado ao fato desse material ser oriundo do mesmo programa de melhoramento.

Quanto a classificação das plantas pelo tipo de sistema reprodutivo, também houve variação entre os genótipos. O genótipo PI71 é uma planta monóica, apresentando flores femininas e masculinas, enquanto os demais são andromonóicas, com flores hermafroditas e masculinas na mesma planta. Essa característica é de extrema importância, principalmente para o melhorista, que devem conhecer a biologia floral da espécie para então conduzir os cruzamentos (Abreu et al., 2008). O genótipo PI45 foi o único que apresentou listras no ovário. Quanto a pilosidade das flores, as duas linhagens Jab foram as que tiveram maior tamanho de pelos (Tabela 4, Figura 1, Apêndice: Tabela 1).

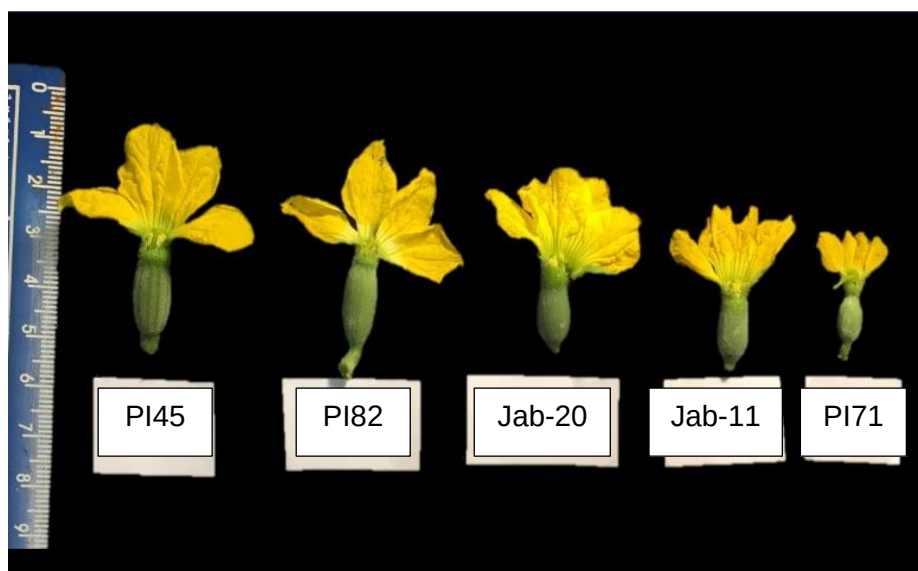


Figura 1. Representação dos tipos de flores apresentadas pelos cinco genótipos de meloeiro estudados (régua = cm).

Para as características das folhas, o CMPFO e o CLTF, seguiram as mesmas proporções, com o PI71 apresentando os menores valores de comprimento e os PI45 e PI82 os maiores valores para tais características (Tabela 3). Para as características qualitativas, a forma da folha mostrou-se diferente apenas para o PI71, que apresentou formato de folha inteira e os demais apresentaram folhas pentalobadas. Para o DLF, o PI45 apresentou os lóbulos mais definidos e como era de se esperar o PI71, que tem folha inteira, apresentou definição fraca (Tabela 4, Figura 2, Apêndice: Tabela 1).

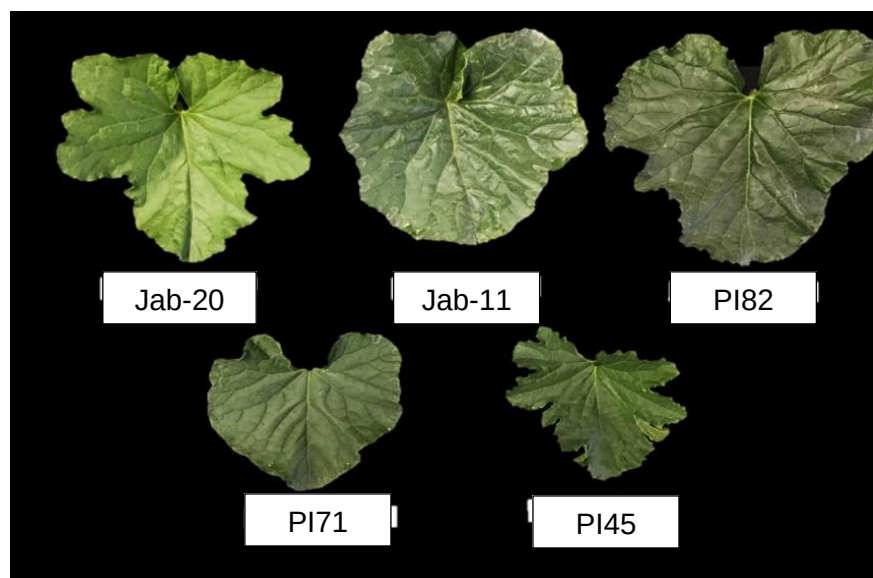


Figura 2. Representação dos tipos de folhas e formato de lóbulos dos cinco genótipos de meloeiro avaliados.

As características DC e DPFJ, apresentaram variação entre os genótipos. Para o primeiro descritor as linhagens Jabs apresentaram maior valor que os demais e para o DPFJ a Jab-11 apresentou maior valor, diferindo até mesmo da Jab-20 (Tabela 3).

Com relação as características de frutos, verifica-se diferença entre o CF, DF e MF de todos os genótipos. A Jab-11 apresentou maiores valores de CF e DF, consequentemente frutos mais pesados. O PI71 por possuir menor CF e DF que os demais, apresentou menor massa. Para RCDF, o PI82 apresentou maior valor (Tabela 3). Esse descritor é importante indicador do formato dos frutos, já que valores próximos a um indicam frutos mais redondos e valores maiores que um, frutos mais alongados. De acordo com Paduan et al. (2007) frutos redondos são mais fáceis de serem acondicionados em caixas de comercialização do que frutos mais alongados.

Com relação as características qualitativas apresentadas na tabela 4, as Jabs apresentaram frutos altamente rendilhados, sem manchas ou sulcos, com frutos circulares arredondados com polpa cor alaranjada. Sua casca devido ao rendilhamento apresentou tonalidade esbranquiçada (Figura 3, Apêndice: Tabela 1). As diferenças entre a Jab-11e a Jab-20 foi em relação a tonalidade de cor verde do fruto jovem, onde a Jab-11 apresentou cor verde escuro em comparação a Jab-20 (Tabela 4, Apêndice: Tabela 1).

Tabela 4. Notas para as características qualitativas dos cinco genótipos de meloeiro.

*Variáveis	Jab-11	Jab-20	PI 45	PI 71	PI 82
TPC	5	5	7	7	7
CIN	3	3	3	4	4
FF	3	3	3	1	3
PO	5	5	3	3	3
LO	1	1	2	1	1
PFM	5	5	3	3	3
EXS	2	2	2	1	2
DLF	5	5	7	3	5
ICFJ	9	3	5	5	7
TCFM	2	2	6	3	6
DM	1	1	1	1	7
TCP	7	7	5	3	5
SU	1	1	3	1	2
RS	1	1	3	1	3
MC	1	1	1	2	1
RM	9	9	1	1	1
EMCF	1	1	1	4	1
PDM	2	2	2	2	1
FSL	4	4	3	3	1
FB	2	2	2	2	1
FA	2	2	3	3	3
CPF	5	5	3	1	3
RD	2	2	1	1	1
RO	1	1	2	2	2

* Para as siglas, consulte a Tabela 2. E para os códigos e identificação de cada característica qualitativa estão apresentados em apêndice na Tabela 1.

O PI71 e o PI45 apresentaram frutos elípticos alargados e o PI82 frutos ovalados com posição máxima do diâmetro na direção do pedúnculo. O PI45 e PI82 apresentaram polpa esverdeada enquanto o PI71 apresentou polpa esbranquiçada (Tabela 4). Em relação a casca, os PIs 45 e 82 apresentaram presença de sulcos e rugosidade já no PI71 foi ausente (Tabela 4, Figura 3, Apêndice: Tabela 1). Somente o PI71 apresentou mudança de coloração após a maturação (Tabela 4, Apêndice: Tabela 1). Os caracteres qualitativos expressam variações discretas e estáveis que geralmente não são influenciadas pelo ambiente e, portanto, servem como uma fonte confiável para descritores (Garnepudi et al., 2020).

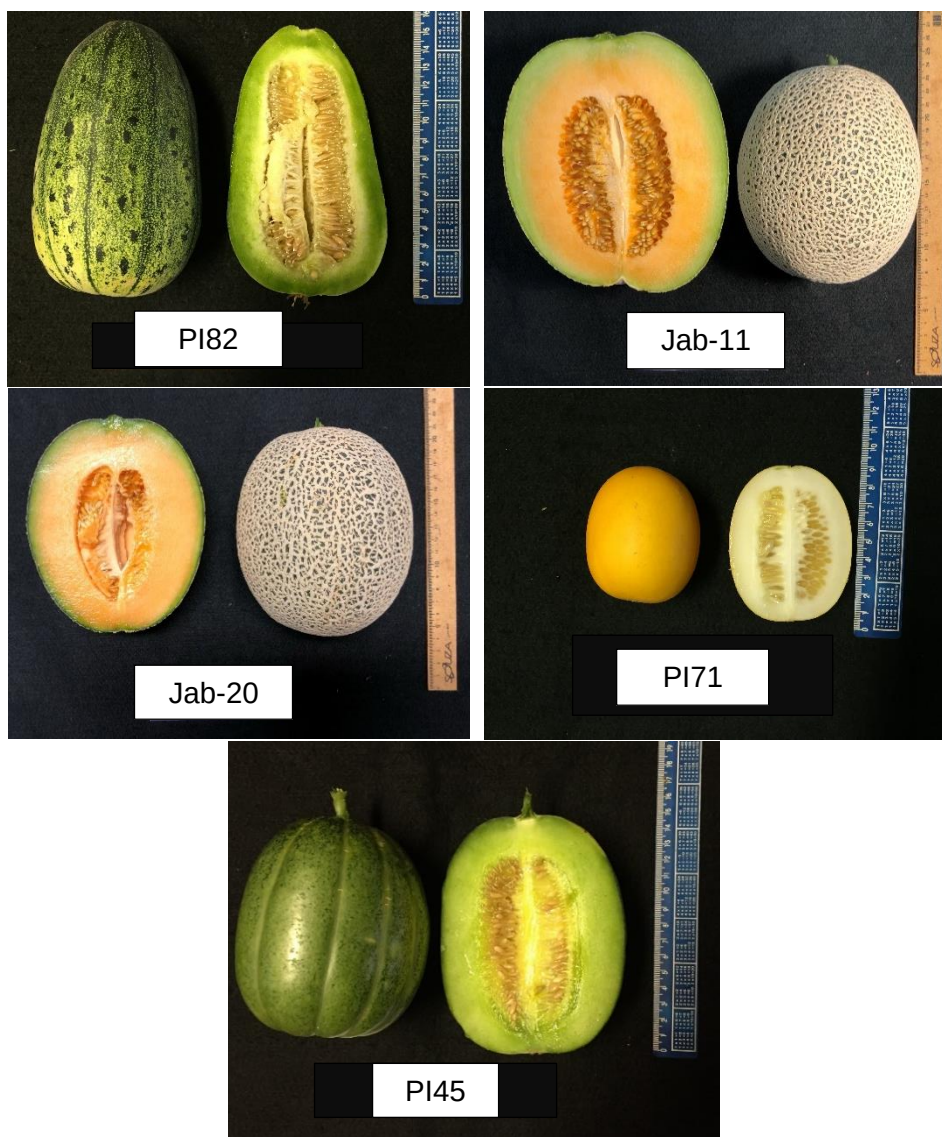


Figura 3. Representação dos tipos de frutos apresentados pelos cinco genótipos de melão estudados. (régua = cm).

Para as sementes foram considerados três caracteres: comprimento (CS), diâmetro (DS), e peso de 100 sementes (PCS). Para essas características, as linhagens Jabs foram as que apresentaram maiores valores comparativamente aos genótipos PI (Tabela 3, Figura 4).

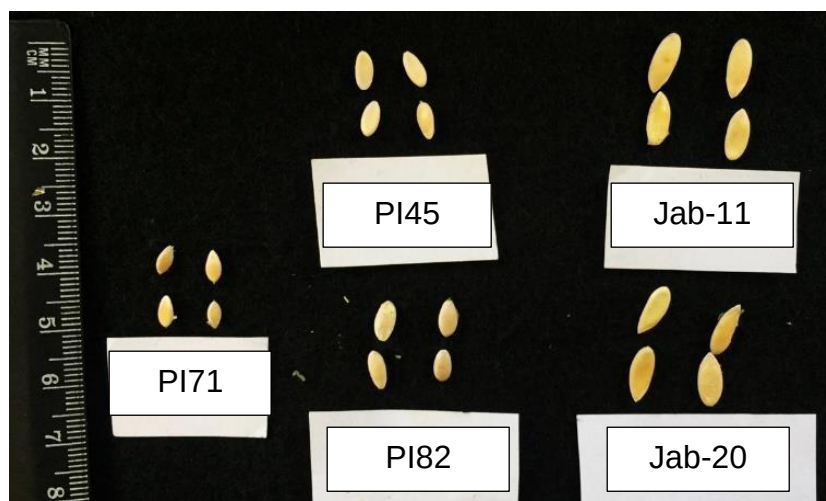


Figura 4. Representação das sementes dos cinco genótipos de melão avaliados (régua = cm).

Com base nos caracteres quantitativos e qualitativos, o coeficiente de similaridade de Gower foi estimado para os cinco genótipos. Os coeficientes de similaridade variaram de 0,30 a 0,90 (Tabela 5). O maior valor de coeficiente de similaridade (0,90) foi observado entre Jab-11 e Jab-20, seguido de 0,67 entre o PI45 e PI82. O menor valor de coeficiente de similaridade foi observado entre a Jab-11 e o PI71.

Tabela 5. Matriz de similaridade entre cinco genótipos de meloeiro, calculadas com base no algoritmo de Gower, utilizando-se 49 descritores morfológicos.

Genótipos	Jab-11	Jab-20	PI45	PI71	PI82
Jab-11	-				
Jab-20	0.90	-			
PI45	0.55	0.54	-		
PI71	0.30	0.31	0.44	-	
PI82	0.40	0.40	0.67	0.34	-

O dendrograma baseado no coeficiente de dissimilaridade de Gower (Figura 5) mostrou alta correlação cofenética 0,77 ($p < 0,05$), valor que evidencia a elevada confiabilidade entre a matriz de distâncias original e a matriz gerada pelo agrupamento UPGMA (Cruz e Carneiro, 2014). Em nível de fenômeno a 40% (considerando 40% de dissimilaridade), os genótipos foram divididos em três grupos. O primeiro agrupamento compreendeu os genótipos PI45 e o PI82, o segundo grupo compreendeu Jab-11 e Jab-20 e um terceiro grupo onde foi alocado o PI71.

Com a análise conjunta dos dados foi possível alocar os genótipos em um único dendrograma utilizando-se diferentes tipos de variáveis. Isso permitiu melhor análise e uso dos dados qualitativos que, em geral, são analisados apenas por estatística descritiva. Em alguns casos, os dados qualitativos são transformados em multicategóricos e ficam, então, sujeitos a uma análise de agrupamento (Moura et al, 2010). A análise conjunta dos dados quantitativos e qualitativos permitiu a unificação de todas as informações em uma figura, resultando em mais eficiência na determinação da divergência genética entre os genótipos de uma coleção e constituindo-se em alternativa viável e ferramenta importante para o conhecimento do germoplasma (Rocha et al., 2010).

A caracterização permitiu fazer uma análise mais detalhada dos genótipos. Essa análise gerou dados e informações que são úteis em um programa de melhoramento, pois possibilita a predição da heterose, e alguns cruzamentos podem ser sugeridos, seguindo-se o princípio de se cruzar os genótipos mais distantes e com melhores características agrônômicas (Rocha et al., 2010)

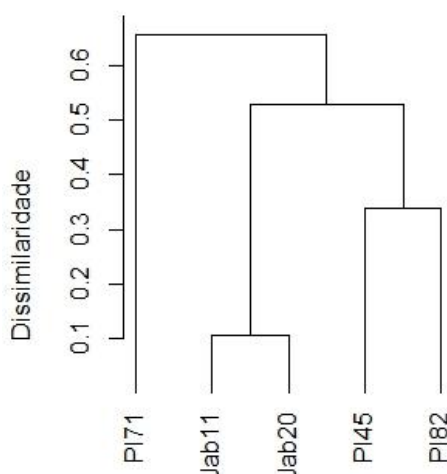


Figura 5. Dendrograma UPGMA (baseado em distância de Gower) de cinco genótipos de meloeiro baseado em 49 caracteres morfológicos.

A análise de PCA determinou os valores próprios de 26 variáveis quantitativas (características da planta) de cinco genótipos juntos com sua % de variabilidade e variâncias explicadas cumulativas (%) (Tabela 6). Os valores próprios medem a

importância e o impacto de cada componente para a variância total (Nuruzzaman et al., 2019). Observou-se que os primeiros dois componentes principais (PCs) foram responsáveis por mais de 90% da variância total. Essa análise tem a vantagem de reduzir o número de variáveis globais em alguns poucos componentes principais (Silva e Sbrissia, 2010).

Tabela 6. Variâncias cumulativas e valores próprios para os quatro primeiros componentes principais (PCs)

	*PC1	PC2	PC3	PC4
Autovalores	16,20	6,98	1,58	0,22
Variância (%)	64,83	27,92	6,34	0,89
Variância cumulativa	64,83	92,75	99,10	100,00

*PC= componente principal

O PC1 explicou a maior variância (64,83%) com o maior autovalor (16,20) que foi dominado por pH (0,982), CMPFF (0,978), DCV (0,970), CF (0,950), CFLF (0,947) e CMPFM (0,946) (Tabela 07). Dentro de PC2, as características RCDO, RCDF, DC e CC, exibiram mais variabilidade, contribuindo com 27,9% da variação total. O terceiro componente principal explicou 6,3% da variação total, sendo governada por SS, DC e CFLM (Tabela 7).

Tabela 7. Contribuição das variáveis na variabilidade total (PC1 a PC4) de genótipos de melão.

^a Variáveis	^b PC1	PC2	PC3	PC4
CFLM	0.857833	0.355425	0.368745	-0.04269
CMPFM	0.946848	-0.29365	0.131169	0.006534
DPFLM	0.853933	-0.51956	0.029301	0.000969
CMPFF	0.978242	0.179931	0.025666	-0.10005
DPFLF	0.938052	-0.23072	-0.25729	0.025029
COV	0.735567	0.661338	0.104142	-0.10357
DO	0.946656	-0.2442	-0.14372	-0.15347
CFLF	0.947434	0.291784	0.066161	-0.11337
CMPFO	0.721611	0.677046	-0.13461	-0.0526
CLTF	0.830121	0.428093	-0.33204	-0.13184
DC	0.158259	-0.82755	0.530189	-0.09493
DPFJ	0.878191	-0.45289	-0.15183	0.024883
MS	0.830658	-0.49126	-0.24363	0.096509
SS	0.789487	0.272425	-0.53298	0.135755
EPC	0.707015	0.676776	0.123365	0.163966
CF	0.950183	0.274146	0.085184	0.121408
DF	0.819956	-0.54579	-0.16533	0.049463
CC	0.682038	0.712134	0.153553	0.064114
DCV	0.970532	0.093231	-0.21987	-0.03218
PH	0.982533	-0.12021	0.129877	-0.05754
RCDO	0.100957	0.959441	0.263167	0.004913
RCDF	0.195579	0.923409	0.320253	0.08064
CS	0.689333	-0.63247	0.343323	0.083228
DS	0.849607	-0.46697	0.232054	-0.0791
PCS	0.813932	-0.48041	0.268152	0.186594

^a Para as siglas, consulte a Tabela 2. ^b PC= componente principal

As variáveis que foram sobrepostas como vetores são representadas no componente principal biplot (Figura 6) onde o comprimento relativo das variáveis representou a proporção relativa da variabilidade em cada variável, assim como o biplot, proporcionou a comparação visual entre os genótipos com base nas características estudadas (Islam et al., 2020). Verifica-se expressiva variabilidade entre os genótipos e características avaliadas (Figura 6). Assim como ocorreu quando se fez a análise de cluster, utilizando análise conjunta das variáveis quantitativas e qualitativas, a análise de PCA, com características quantitativas também permitiu a distinção de três grupos, sendo o grupo Jab-11 e Jab-20, PI 45 e PI82 e mais distante o PI71 em outro grupo.

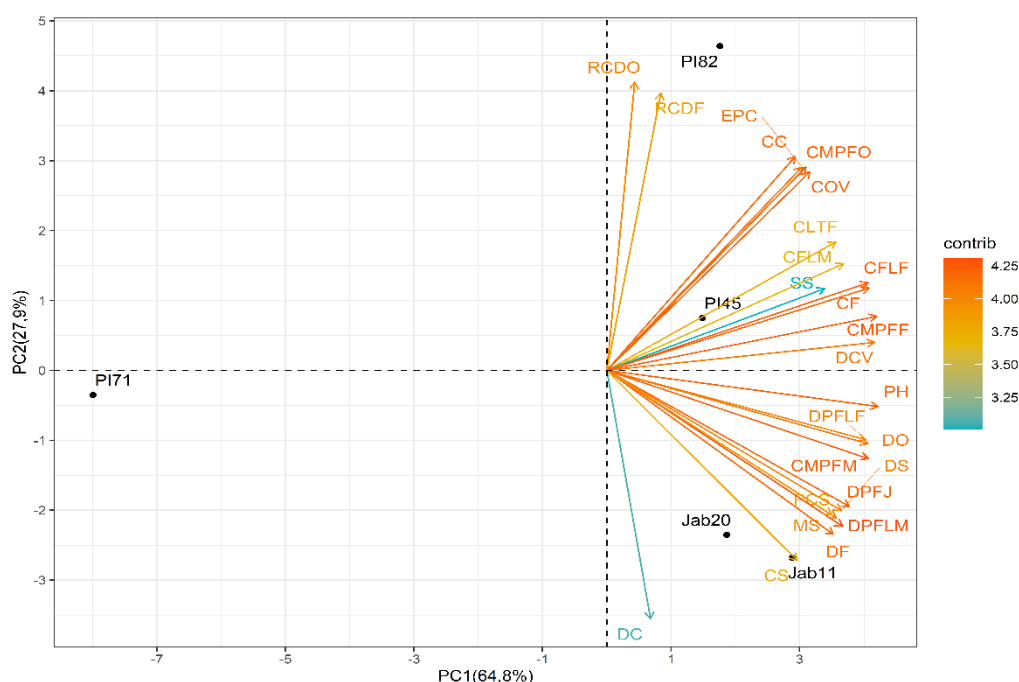


Figura 6. Biplot de componente principal: orientações bidimensionais de genótipos de meloeiro para diferentes características de planta para os dois primeiros componentes, PC1 e PC2. Para as siglas, consulte a Tabela 2.

O biplot também revelou a correlação entre as características, onde as características com menor ângulo entre uma e outra são mais correlacionadas estatisticamente. No PC1 todas as variáveis apresentaram correlação positiva com variância (64,8%), mas com relação ao PC2, algumas variáveis foram carregadas na região positiva e outras na região negativa, com variação de 27,9% (Figura 6).

Portanto, a análise de PCA revelou a contribuição diferencial de diferentes características na variação total. Além disso, explicou a inter-relação entre as características e genótipos que contribuem para a distinção das plantas. Apresentando alta diversidade entre os genótipos estudados. Essa diversidade e variabilidade são fontes de melhoria de germoplasma na respectiva característica.

3.2 Retrocruzamento

3.2.1 Seleção para resistência

Para a seleção das plantas do retrocruzamento que contém o gene de resistência, foram selecionadas as plântulas que apresentavam notas variando de zero a dois, segundo a escala de notas adotada. De um total de 300, foram selecionadas 100 plântulas para dar continuidade nos retrocruzamentos.

Quando se aborda o retrocruzamento com característica dominante como no caso em estudo, espera-se a proporção de 1:1 de segregação, sendo plantas resistentes (Rr) e suscetíveis (rr) (Priyadarshan, 2019). Por essa razão há necessidade de se fazer essa pré-seleção em todas as gerações do retrocruzamento, a fim de eliminar as plantas suscetíveis. Apesar da característica ser dominante e de fácil fixação, a seleção nesse tipo de doença tem apresentado algumas dificuldades, uma delas é que a avaliação das plantas é feita por escala de notas, exigindo precisão do melhorista ou avaliador para não selecionar plantas suscetíveis para as próximas gerações. Outro fator importante que também deve ser levado em consideração é o efeito do ambiente, que também tem apresentado forte influência na avaliação dos genótipos.

3.2.2 Recuperação do background do genótipo recorrente

A partir da caracterização das plantas oriundas dos retrocruzamentos conseguiu-se determinar a distância genética entre os indivíduos, permitindo assim selecionar as plantas que tiveram maior recuperação do background do parental recorrente.

A similaridade genética entre as plantas RC_1 e seu parental recorrente variaram entre 0,61 e 0,85 para o RC_{1_11} (Jab-11 x PI 45) e 0,61 e 0,77 para o RC_{1_20} (Jab-20 x PI71) (Figuras 2 e 3). O menor valor de similaridade genética foi obtido entre os parentais Jab-11 e PI45 (0,58) e entre Jab-20 e PI71 (0,32), evidenciando a grande distância genética das linhagens elite e silvestre. Para o novo ciclo de RC, cinco plantas com maior proximidade com o parental recorrente foram selecionadas, como mais promissoras para serem genitoras nos próximos cruzamentos, sendo as plantas 4, 15, 53, 58 e 87 do RC_{1_11} (Figura 2, Apêndice: Tabela 2) e; no RC_{1_20} as plantas selecionadas foram 10, 29, 51, 55 e 67 (Figura 3, Apêndice: Tabela 3). A média de similaridade das cinco plantas selecionadas em RC_{1_11} foi de 0,80 e em RC_{1_20} foi

de 0,75. Nos dois casos se observa aproximação maior das plantas com o parental recorrente em relação ao parental doador (Figuras 2 e 3).

A recuperação média do parental recorrente esperada na geração RC_1F_1 é de 75% (Vogel, 2009). Entretanto, como esse valor é uma média, há sempre indivíduos que irão recuperar mais ou menos de 75%. Sendo assim, a utilização dessa metodologia visa selecionar as plantas que recuperaram valores acima de 75%, aumentando as taxas de recuperação por geração.

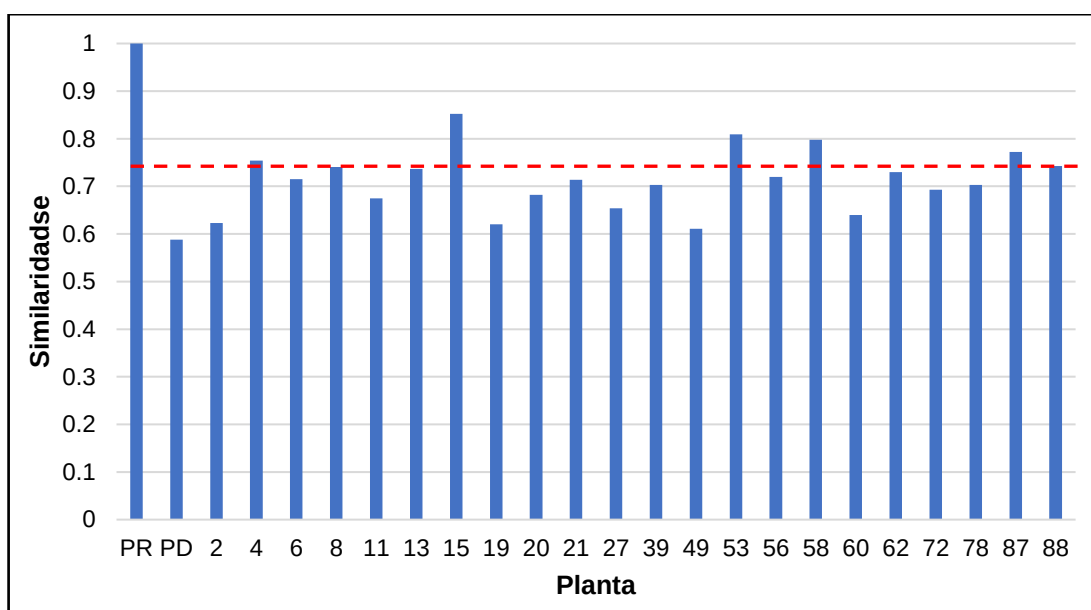


Figura 2. Similaridade genética de 22 plantas RC_1 e do Parental doador- PD (PI 420145) em relação ao parental recorrente – PR (Jab-11) com base no algoritmo de Gower.

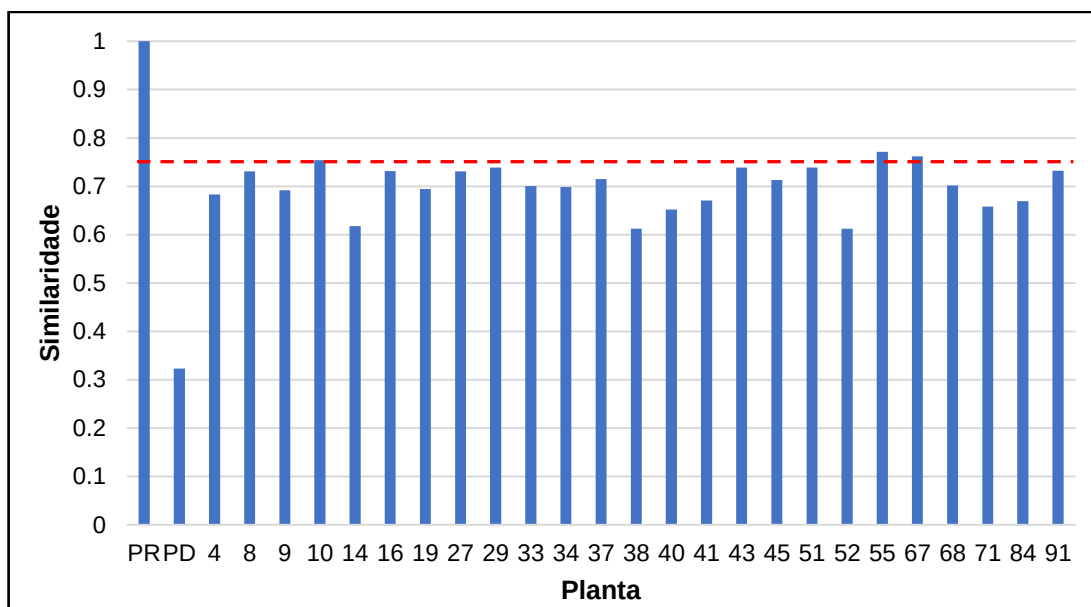


Figura 3. Similaridade genética de 25 plantas RC₁ e do Parental doador- PD (PI 140471) em relação ao parental recorrente – PR (Jab-20) com base no algoritmo de Gower.

No RC₂, a similaridade genética entre as plantas e seu parental recorrente variaram entre 0,57 a 0,83 para o RC₂_11 (Jab-11 x PI45) e 0,65 a 0,81 para o RC₂_20 (Jab-20 x PI71) (Figuras 4 e 5). O menor valor de similaridade genética foi obtido entre os parentais Jab-11 e PI45 (0,41) e entre Jab-20 e PI71 (0,25). É possível ver que nesse ciclo, a distância entre os parentais aumentou em relação ao anterior, isso acontece, pois, a similaridade das populações do retrocruzamento com seus parentais doadores diminuiu, influenciando assim a distância dos pais (Tabelas 2 e 3). Além disso, a variação entre a similaridade dos parentais entre os dois ciclos, advém da influência do ambiente sobre as características quantitativas.

Como foi feito anteriormente, cinco plantas com base na maior proximidade com o parental recorrente também foram selecionadas para acelerar a recuperação do background por ciclo. No RC₂, foram selecionadas as plantas 6, 36, 46, 58 e 78 do RC₂_11 (Figura 4, Tabela 2) e no RC₂_20 as plantas selecionadas foram 12, 24, 32, 54 e 68 (Figura 5, Tabela 3). A média de similaridade das cinco plantas selecionadas em RC₂_11 foi de 0,79 e em RC₂_20 foi de 0,78. A recuperação média do parental recorrente esperada na geração RC₂F₁ é de 87,5% (Mesquita et al., 2005). Assim, a seleção permitiu aumentar as taxas de recuperação do parental.

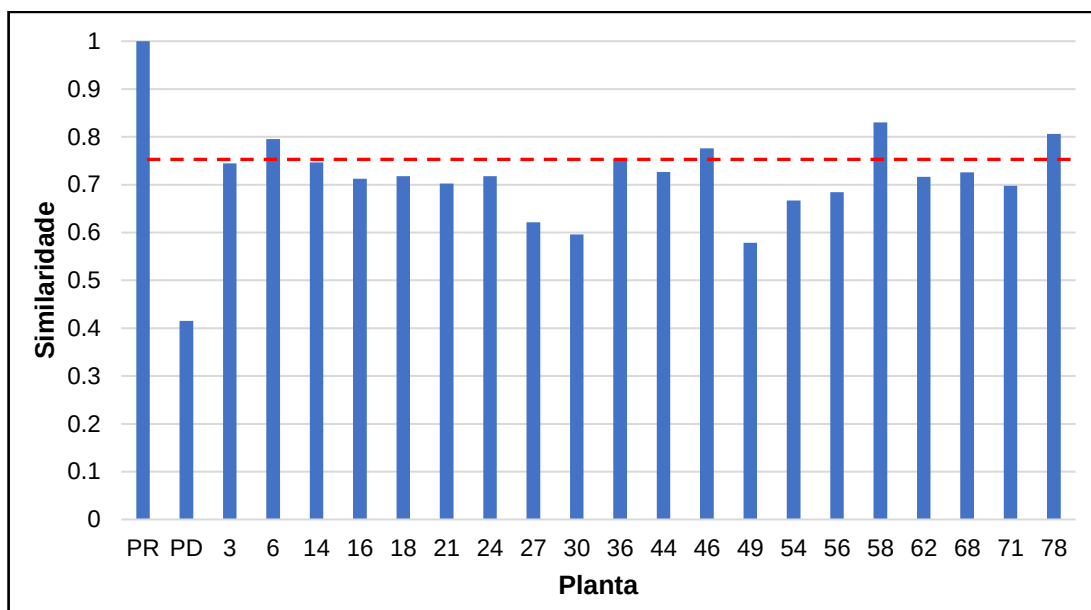


Figura 4. Similaridade genética de 20 plantas RC₂ e do Parental doador- PD (PI 420145) em relação ao parental recorrente – PR (Jab-11) com base no algoritmo de Gower.

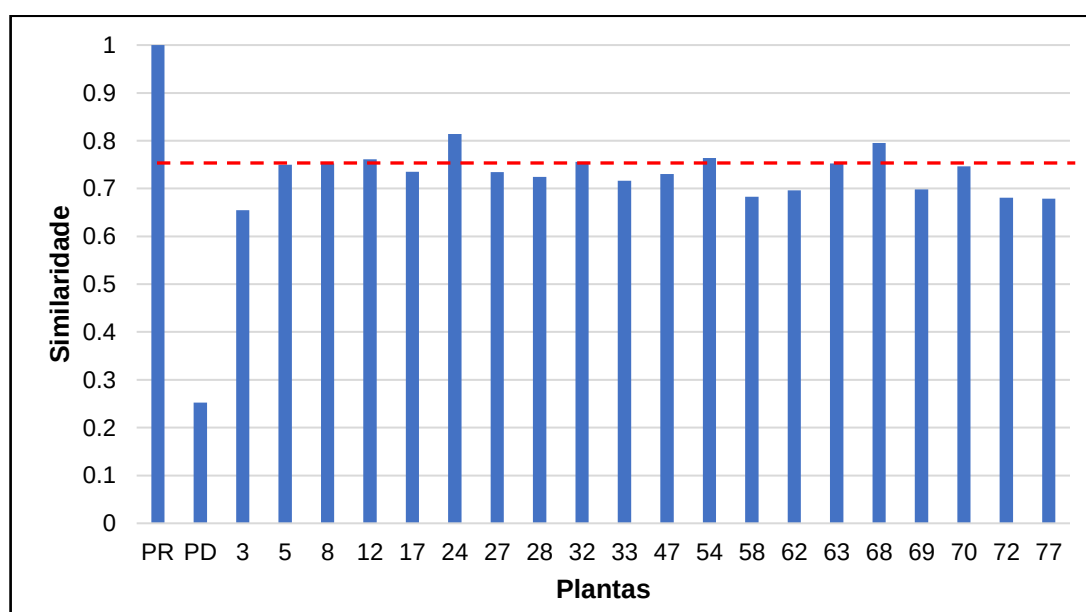


Figura 5. Similaridade genética de 20 plantas RC₂ e do Parental doador- PD (PI 140471) em relação ao parental recorrente – PR (Jab-20) com base no algoritmo de Gower.

A quantidade de ciclos necessários para uma boa recuperação do parental recorrente pode variar entre 6 e 8, sendo influenciada pela metodologia adotada, além da distância entre os parentais, ou seja, quanto mais distantes geneticamente mais

ciclos serão necessários (Priyadarshan, 2019). No estudo essa diferença fica nítida quando observamos a similaridade das populações. Por exemplo, no retrocruzamento Jab-11 houve maior recuperação do parental recorrente quando comparado a recuperação da Jab-20, resultado que provavelmente advém da maior distância da Jab-20 com o PI71, que é maior do que a Jab-11 com o PI45.

Apesar da similaridade média entre o parental recorrente não variar tanto entre uma geração e outra, é possível ver grande perda do background do parental doador (Apêndice: Tabelas 2 e 3). No RC₁ as plantas apresentam uma média de similaridade de 0,60, e no RC₂ essa similaridade reduziu para 0,32 no retrocruzamento da Jab-11 (Apêndice: Tabela 2). No RC₁ da Jab-20, a similaridade média das plantas com o parental doador foi de 0,45 e no RC₂ foi de 0,38 (Apêndice: Tabela 3), deixando mais claro o ganho que essa metodologia proporcionou na recuperação de parental recorrente por tempo.

4 CONCLUSÕES

As características avaliadas foram importantes na discriminação e avaliação da variabilidade dos genótipos, definindo três grupos distintos.

A introdução da resistência ao crestamento gomoso do caule nas linhagens se mostrou uma técnica eficiente e possível de ser realizada graças ao tipo de herança da característica.

A aplicação da análise de distância genética se mostrou eficiente para selecionar os indivíduos mais próximos do parental recorrente e com isso aumentar os ganhos por ciclo.

5 REFERÊNCIAS

Abreu, T.B., Nunes, G.H. de S., Dantas, M.S.M., Costa Filho, J.H., Costa, G.G., Aragão, F.A.S. de, 2008. Fenologia floral, viabilidade do grão de pólen e receptividade do estigma do meloeiro. Proc. Interamer. Soc. **Trop. Hort. Veg. / Hortalizas** 52, 43–46.

Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Shtaya, M.J., Mallah, O.B., Eid, I.S., Zaitoun, S.Y.A., 2017. Morphological characterization of snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus*) populations from Palestine. **Genet. Resour. Crop Evol.** 64, 7–22. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0329-0>

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de melão (*Cucumis melo* L.)**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, nº 222, 14 nov. 2008. Seção 1, p. 40-41.

Castellane, P. D.; Araújo, J. A. C. 1994. **Cultivo sem solo: hidroponia**. Jaboticabal: Funep,. 43 p.

Castro, G., Perpiñá, G., Monforte, A.J., Picó, B., Esteras, C., 2019. New melon introgression lines in a Piel de Sapo genetic background with desirable agronomical traits from dudaim melons. **Euphytica** 215.

Cruz, C. D.; Carneiro, P. C. S. 2014. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3 ed. Viçosa: UFV, 585 p.

Dalcin MS, Tschoeke PH, Fidelis RR, Didonet J (2017) Severity of gummy stem blight on melon in relation to cultivars, use of fungicides and growing season **Horticultura brasileira**, v 35, n December, p 483–489.

Diaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J.E., Zalapa, J.E., Cuevas, H.E., Dace, G., Oliver, M., Boissot, N., 2011. A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L .). **BMC Plant Biol.** 11.

ELIAS, H. T.; VIDIGAL, M. C. G; GONELA, A.; VOGT, G. A., 2007. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p. 1443-1449.

FAO. 2021. **FAOSTAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/S>. [Acessado em 18 de março de 2021].

Frantz, J.D. and Jahn, M.M. 2004. Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.). **Theor. Appl. Genet.** 108, 1033–1038.

Garnepudi, S.L., Arunkumar, R., Swaminathan, V., Siva Kumar, T., 2020. Morphological characterization and clustering of cucumber (*Cucumis sativus*) **Genotypes. Res. Crop.** 21, 568–573.

Gower, J.C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics** 27: 857-874.

Hassan, M.Z., Rahim, M.A., Natarajan, S., Robin, A.H.K., Kim, H.T., Park, J.I., Nou, I.S., 2018. Gummy stem blight resistance in melon: Inheritance pattern and development of molecular markers. **Int. J. Mol. Sci.** 19.

Hu, Z., Deng, G., Mou, H., Xu, Y., Chen, L., Yang, J., Zhang, M., 2018. A re-sequencing-based ultra-dense genetic map reveals a gummy stemblight resistance-associated gene in *Cucumis melo*. **DNA Res.** 25, 1–10.

IPGRI. 2003. **Descriptors for Melon (*Cucumis melo* L.)**. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Islam, S., Ferdausi, A., Sweety, A.Y., Das, A., Ferdoush, A., Haque, M.A., 2020. Morphological characterization and genetic diversity analyses of plant traits contributed to grain yield in maize (*Zea mays* L.). **J. Biosci. Agric. Res.** 25, 2047–2059.

Jeong, H.S., Jang, S., Han, K., Kwon, J.K., Kang, B.C., 2015. Marker-assisted backcross breeding for development of pepper varieties (*Capsicum annuum*) containing capsinoids. **Mol. Breed.** 35, 1–10.

Liu, S., Shi, Y., Miao, H., Wang, M., Li, B., Gu, X., Zhang, S., 2017. Genetic Analysis and QTL Mapping of Resistance to Gummy Stem Blight in *Cucumis sativus* Seedling Stage. **Plant Dis.** 101, 1–8.

Mesquita, A.G.G., Guimarães, C.T., Parentoni, S.N., Paiva, E., 2005. Recuperação do Genitor Recorrente em Milho Utilizando Retrocruzamento Assistido por Marcadores Microsatélites. **Rev. Bras. Milho e Sorgo** 4, 275–285.

Moeinizade, S., Han, Y., Pham, H., Hu, G., Wang, L., 2021. A look-ahead Monte Carlo simulation method for improving parental selection in trait introgression. **Sci. Rep.** 11, 1–12.

Moura, M.C.L., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Pereira, T.N.S. 2010. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. **Horticultura Brasileira** 28: 155-161.

Nuruzzaman, M., Rana, M. S., Ferdausi, A., Huda, M. M., Hassan, L. and Begum, S. N., 2019. Clustering and Principal Component Analysis of Nerica Mutant Rice Lines Growing Under Rainfed Condition. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, 7(3), 327-334.

Oumouloud, A., Arnedo-Andrés, M.S., González-Torres, R., Álvarez, J.M., 2009. Morphological and molecular characterization of melon accessions resistant to *Fusarium* wilts. **Euphytica** 169, 69–79.

Paduan, M.T., Campos, R., Clemente, E., 2007. Qualidade dos frutos de tipos de melão, produzidos em ambiente protegido. **Rev. Bras. Frutic** 29, 535–539.

Priyadarshan, P. M. **Plant Breeding: classical to modern**. Springer, 2019.

R Development Core Team, 2018, **R: A Language and Environment for Statistical Computing**, *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.

Rocha, M.C., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., da Silva, P.R.A., do Carmo, M.G.F., de Souza Abboud, A.C., 2010. Uso do algoritmo de Gower na determinação da divergência genética entre genótipos de tomateiro do grupo cereja. **Acta Sci. - Agron.** 32, 423–431.

Silva, S.C., Sbrissia, A.F., 2010. Análise de componentes principais entre características morfogênicas e estruturais em capim-marandu sob lotação contínua. **Ciência Rural** 40, 690–693.

Vogel, Karla E. "Backcross breeding." *Transgenic Maize*. 2009. **Humana Press**, Totowa, NJ,. 161-169.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do meloeiro tem se expandido cada vez mais por regiões que outrora não se produziam, bem como, em diferentes ambientes de cultivo. Em grande parte, essa expansão só é possível graças ao melhoramento genético que investe seus esforços para desenvolver materiais adaptados as mais variadas condições ambientais.

Os melões rendilhados são considerados nobres por possuírem frutos de melhor qualidade, com aroma e sabor característicos, e de melhor apresentação. Esses melões exigem técnicas mais refinadas para sua produção para atender principalmente o mercado externo. A produção desse melão nas regiões sul e sudeste tem a vantagem de estar próximo de um grande centro consumidor e assim baratear os custos para o consumidor final. Porém, as temperaturas amenas e a alta umidade incidentes nessas regiões favorecem o aparecimento de algumas doenças, com destaque para o crestamento gomoso do caule.

Os resultados do presente trabalho contribuem para o avanço do melhoramento genético do meloeiro com resistência a *D. bryoniae*, pois através desse estudo, pode-se encontrar a melhor condição de esporulação do fungo *D. bryoniae*. Além disso, pode-se demonstrar o efeito do ambiente sobre os genótipos resistentes, o que muitas vezes dificulta a seleção, devido à falta de informações na literatura e suposições sobre o envolvimento de mais genes de resistência envolvidos. Por fim, a caracterização e os retrocruzamentos permitem introduzir genes de resistência à *D. bryoniae* em linhagens elites e caracterizá-las com relação às características qualitativas e quantitativas, com posterior registro de cultivares.

De maneira geral, os resultados deste estudo podem impactar direta ou indiretamente no trabalho dos melhoristas e produtores. A disponibilização de cultivares mais produtivas e adaptadas potencialmente aumentará a área de produção, bem como a rentabilidades dos produtores.

APÊNDICE

Tabela 1. Descritores de qualitativos do melão.

Características	Código e identificação de cada característica							
(TPC)	3=macio	5=médio	7=duro					
(CIN)	1=muito próximo	2=próximo	3=próximo intermediário	4=intermediário	5=distante			
(DLF)	3=fraco	5=médio	7=forte					
(FF)	1=inteira	2=trilobada	3=pentalobada	4=3-lóbulos divididos	5=5-lóbulos divididos			
(EXS)	1=monóica	2=andromonóica	3=ginóica	4=ginomonóica				
(PO)	3=curto	5=médio	7=longo					
(PFM)	3=curto	5=médio	7=longo					
(LO)	1=ausente	2=presente						
(ICFJ)	1=muito clara	3=clara	5=média	7=escura	9=muito escura			
(MC)	1=ausente	2=presente						
(EMCF)	1= ausente	2=no início do desenvolvimento	3=no final do desenvolvimento do fruto	4=muito no final do desenvolvimento				
(TCFM)	1=ausente ou muito fraca	2=esbranquiçada	3=amarelada	4=alaranjada	5=ocre	6=esverdeada	7=acinzentada	
(PDM)	1=na direção da flor	2=no centro	3=na direção do pedúnculo					
(FSL)	1=ovalada	2=elíptica média	3=elíptica alargada	4=circular	5=quadrangular	6=oblada	7=obovada	8=alongada

Continuação Tabela 1. Descritores de qualitativos do melão.

Características	Código e identificação de cada característica					
(DM)	1=ausente ou muito esparsa	3=esparsa	5=média	7=densa	9=muito densa	
(FB)	1=pontiaguda	2=arredondada	3=plana			
(FA)	1=pontiaguda	2=arredondada	3=plana			
(TCP)	3=pequeno	5=médio	7=grande			
(SU)	1=ausentes ou muito fracamente expressos	2=fracamente expressos		3=fortemente expressos		
(RS)	1=ausente ou muito fraca	3=fraca	5=média	7=forte	9=muito forte	
(RM)	1=ausente ou muito fraca	3=fraca	5=média	7=forte	9=muito forte	
(CPF)	1=branca	2=branca esverdeada	3=esverdeada	4=branca amarelada	5=laranja	6=laranja avermelhada

Tabela 2. Matriz de similaridade entre 22 plantas RC₁ e 20 plantas RC₂ e seus genitores Jab-11 e PI 45, calculadas com base no algoritmo de Gower.

Nº	RC ₁		Nº	RC ₂	
	Jab-11	PI 45		Jab-11	PI 45
Jab-11	1	0,588	Jab-11	1	0,415
PI 45	0,588	1	PI 45	0,415	1
2	0,623	1,000	3	0,745	0,389
4	0,754	0,544	6	0,796	0,353
6	0,715	0,694	14	0,747	0,360
8	0,741	0,584	16	0,713	0,374
11	0,675	0,706	18	0,718	0,342
13	0,737	0,696	21	0,702	0,383
15	0,852	0,704	24	0,718	0,356
19	0,620	0,599	27	0,622	0,306
20	0,682	0,616	30	0,596	0,341
21	0,714	0,669	36	0,754	0,388
27	0,654	0,574	44	0,726	0,391
39	0,703	0,587	46	0,776	0,379
49	0,611	0,524	49	0,578	0,305
53	0,809	0,634	54	0,667	0,390
56	0,720	0,618	56	0,684	0,325
58	0,798	0,575	58	0,830	0,396
60	0,640	0,551	62	0,716	0,377
62	0,730	0,509	68	0,726	0,397
72	0,693	0,584	71	0,698	0,410
78	0,703	0,578	78	0,806	0,383
87	0,772	0,619	Média	0,716	0,367
88	0,743	0,525			
Média	0,713	0,605			

Tabela 3. Matriz de similaridade entre 25 plantas RC₁ e 20 plantas RC₂ e seus genitores Jab-20 e PI 71, calculadas com base no algoritmo de Gower.

Nº	RC ₁		Nº	RC ₂	
	Jab-20	PI 71		Jab-20	PI 71
Jab-20	1	0,323	Jab-20	1	0,252
PI 71	0,323	1	PI 71	0,252	1
4	0,683	0,498	3	0,654	0,504
8	0,731	0,474	5	0,749	0,363
9	0,692	0,486	8	0,752	0,408
10	0,754	0,349	12	0,761	0,289
14	0,617	0,399	17	0,735	0,348
16	0,731	0,479	24	0,814	0,303
19	0,695	0,518	27	0,734	0,420
27	0,731	0,501	28	0,724	0,393
29	0,739	0,441	32	0,756	0,377
33	0,701	0,491	33	0,716	0,388
34	0,699	0,386	47	0,731	0,331
37	0,715	0,432	54	0,764	0,343
38	0,612	0,517	58	0,683	0,428
40	0,652	0,391	62	0,696	0,372
41	0,670	0,461	63	0,753	0,411
43	0,739	0,500	68	0,795	0,354
45	0,713	0,475	69	0,698	0,426
51	0,739	0,451	70	0,746	0,400
52	0,613	0,450	72	0,681	0,482
55	0,771	0,375	77	0,679	0,371
67	0,762	0,456	Média	0,731	0,385
68	0,702	0,371			
71	0,658	0,530			
84	0,669	0,500			
91	0,732	0,458			
Média	0,701	0,456			