



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

DEISY ALEXANDRA ROSERO ALPALA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E CONSEQUÊNCIAS FENOTÍPICAS INDUZIDAS POR
PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO E RAIOS GAMA ^{60}Co EM MELANCIA**

MOSSORÓ

2024

DEISY ALEXANDRA ROSERO ALPALA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E CONSEQUÊNCIAS FENOTÍPICAS INDUZIDAS
POR PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO E RAIOS GAMA ^{60}Co EM MELANCIA**

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

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Ioná Santos Araújo
Holanda

MOSSORÓ

2024

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)

RRose
rop Rosero Alpala, Deisy Alexandra .
Polimorfismos genéticos e consequências
fenotípicas induzidas por plasma frio atmosférico
e raios gama ⁶⁰Co em melancia / Deisy Alexandra
Rosero Alpala. - 2024.
91 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientadora: Glauber Henrique de Sousa Nunes.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-Árido, Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia, 2024.

1. Mutações. 2. variação morfológica. 3.
epigenético. 4. fixação. 5. pre-melhoramento. I.
Santos Araújo Holanda, Ioná, orient. II. de
Sousa Nunes, Glauber Henrique, co-orient. III.
Titulo.

Bibliotecário-Documentalista
Nome do profissional, Bib. Me. (CRB-15/10.000)

DEISY ALEXANDRA ROSERO ALPALA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E CONSEQUÊNCIAS FENOTÍPICAS INDUZIDAS
POR PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO E RAIOS GAMA 60 Co EM MELANCIA.**

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

Linha de Pesquisa: Biotecnologia vegetal

Defendida em: 29 / fevereiro/ 2024.

BANCA EXAMINADORA

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

Lindomar Maria da Silveira, Prof^a. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador



Yacenia Morillo Coronado, Prof^a. Dra. (UNAL)
Membro Examinador

Jussier de Oliveira Vitoriano, Dr. (UFRN)
Membro Examinador

Semiramis Rabelo Ramalho Ramos, Dra. (EMBRAPA)
Membro Examinador

A María Celida, por ser esa mujer que enseñó a ser valiente y fuerte en la adversidad (In Memoriam).

A Deus, quem tem permitido tudo este aprendizado. A minha família, pais, irmãos, sobrinhos e especialmente a meu filho Ezequiel, a pessoa mais importante da minha vida e meu companheiro desta aventura. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ioná Santos Araújo Holanda pela orientação, confiança depositada, e constante apoio durante a minha formação e a execução da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes pelo suporte e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Aos Profs Drs. Augusto Tulmann Neto e Clodomiro Alves pelas orientações no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof.º Dr. Rui Sales Junior pela disposição em ajudar e apoiar o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pela oportunidade da realização do doutorado.

A Jorge Alves, Carolina Ramirez, Hudson Martins, Eliabe de Carvalho, Abner Reurisson, Adriano Ferreira, Karem Souza, Daniela Almeida e Darcio Constante, colegas e amigos que o Laboratório da Biotecnologia Vegetal e a UFERSA, pelo apoio, dedicação e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A Juan Carlos Ortiz, amigo que a vida me deu, pelo apoio e ajuda mesmo a distância, o que fez possível o avanço desta pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Alianças para a Educação e Capacitação (PAEC) da Organização dos Estados Americanos (OEA) pela concessão da bolsa.

Agradeço, também, a Banca Examinadora pela disposição e paciência na realização das correções e observações pertinentes a este trabalho

Agradeço, ainda, aos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

ROSETO ALPALA, Deisy Alexandra. Polimorfismos genéticos e consequências fenotípicas induzidas por plasma frio atmosférico e raios gama ^{60}Co em melancia 2024. 91p. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2024.

A melancia é uma cultura de importância econômica no Brasil, com destaque para a região Nordeste. Todavia, diversificar e melhorar a produtividade é uma procura constante na produção. Neste sentido, este estudo avaliou os efeitos dos raios gama e do plasma frio atmosférico na germinação e desenvolvimento da melancia (variedade Sugar Baby) bem como associações dos mesmos nas variações genéticas e/ou fenotípicas e seu potencial uso. Para o plasma foi realizada uma aplicação direta (PFA) ou através da água ativada (AAP) e para os raios gama, além do controle não irradiado, foram utilizadas as doses de 100, 200, 300 e 400 Gy. Foram analisadas variáveis relacionadas à germinação, estrutura e morfologia das raízes, frequências de anomalias, variáveis morfológicas da planta no estado vegetativo e de floração até os 40 dias depois do tratamento, assim como análise de DNA por marcadores de inter sequencias simples repetidas (ISSR) e de sequencias simples repetidas (SSR) para o caso das plantas que foram tratadas com o plasma. Já para os raios gama foi considerado adicionalmente, o cálculo da LD50, o estado de frutificação e as análises com os marcadores de fragmentos polimórficos amplificados ao acaso (RAPD). Como resultados do tratamento por plasma, observou-se que tanto a PFA como a AAP não geraram mudanças significativas para os índices GRI e GR, associados à germinação, mas tem a capacidade de melhorar o potencial de germinação. Além disso, houve melhorias nos efeitos do comprimento da raiz, caule e comprimento total da planta, sendo que estas variáveis foram mudadas pelas condições menos energéticas dos processos PFA e AAP. A aplicação de plasma promoveu mudanças na morfologia e estrutura da raiz com variações para o número de raízes secundárias. Além disso, observou-se anomalias no desenvolvimento das plantas. Condições mais energéticas do plasma (níveis altos) geraram distúrbios fisiológicos em frequências de 24,5 até 30,5%. Com o tratamento com AAP e PFA obteve-se um grupo de indivíduos com características fenotípicas diferentes do controle. Os marcadores ISSR e SSR avaliados não permitiram identificar mudanças no DNA. A análise de variância mostrou que só as variáveis: número de pecíolos, número de anteras e largura da pétala não sofreram mudanças ocasionadas pelos raios gama. As variáveis avaliadas restantes evidenciaram também efeitos altamente significativos ($p < 0,001$) entre as quatro doses, com mudanças positivas no desenvolvimento para as doses 100 e 200 Gy e efeitos deletérios para as 300 e 400 Gy. O índice de Gower agrupou a diversidade fenotípica em 17 grupos. Os raios gama geraram mudanças fenotípicas e os marcadores RAPD: OPM 02, OPD08, os ISSR: DiCA3'YG, DiGA3'RC, DiGA5'CR, DiCA5'CY, TriGTG e o SSR BVWS00106 foram úteis em detectar alterações geradas no DNA. Condições menos energéticas do plasma (AAP 4 ml/min) e baixas exposições aos raios gama (100 Gy) otimizaram alguns parâmetros de germinação assim como o desenvolvimento das plantas em melancia. Efeitos nos fenótipos foram observados pelos tratamentos avaliados, com efetividade para os raios gama com amplo número de grupos fenotipicamente diferentes, e um LD50 de 325 Gy para Sugar Baby. Só poucos efeitos dos raios gama ao nível genético foram detectados por alguns marcadores. O plasma e os raios gama possuem a capacidade de gerar mudanças fenotípicas detectáveis e úteis, com uso potencial na cultura da melancia como promotor de desenvolvimento nas sementes e no pre-melhoramento.

Palavras-chave: Mutações, variação morfológica, epigenético, fixação, pre-melhoramento.

ABSTRACT

ROSERO ALPALA, Deisy Alexandra. Genetic polymorphism and phenotypic consequences caused by atmospheric cold plasma and ^{60}Co gamma rays in watermelon.

91p. Thesis (Doctorate in Agronomy: Plant Science) – Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró-RN, 2024.

Watermelon is a crop of economic importance in Brazil, especially in the Northeast region. However, diversifying and improving productivity is a constant demand in production. In this sense, this study evaluated the effects of gamma rays and atmospheric cold plasma on the germination and development of watermelon (Sugar Baby variety) as well as their associations with genetic and/or phenotypic variations and their potential use. For plasma, a direct application (PFA) or through activated water (AAP) was carried out and for gamma rays, doses of 100, 200, 300, and 400 Gy were used in addition to the non-irradiated control. Variables related to germination, root structure and morphology, frequencies of anomalies, morphological variables of the plant in the vegetative and flowering state up to 40 days after treatment were analyzed, as well as DNA analysis using inter sequence simple repeat (ISSR) markers and simple sequence repeats (SSR) for plants that were treated with plasma. For gamma rays, the calculation of LD50, the fruiting state and analyzes with random amplified polymorphic fragment (RAPD) markers were additionally considered. As a result of plasma treatment, it was observed that both PFA and AAP did not generate significant changes to the GRI and GR indices, associated with germination, but could improve germination potential. Furthermore, there were improvements in the effects of root length, stem length and total plant length, with these variables being changed by the less energetic conditions of the PFA and AAP processes. Plasma application promoted changes in root morphology and structure with variations in the number of secondary roots. Furthermore, anomalies were observed in the development of plants. More energetic plasma conditions (high levels) generated physiological disturbances at frequencies of 24.5 to 30.5%. With treatment with AAP and PFA, a group of individuals with phenotypic characteristics different from the control was obtained. The ISSR and SSR markers evaluated did not allow identifying changes in the DNA. The analysis of variance showed that only the variables: number of petioles, number of anthers and petal width did not undergo changes caused by gamma rays. The remaining variables evaluated also showed highly significant effects ($p < 0.001$) between the four doses, with positive changes in development for doses 100 and 200 Gy and deleterious effects for 300 and 400 Gy. The Gower index grouped phenotypic diversity into 17 groups. The gamma rays generated phenotypic changes and the RAPD markers: OPM 02, OPD08, the ISSR: DiCA3'YG, DiGA3'RC, DiGA5'CR, DiCA5'CY, TriGTG and the SSR BVWS00106 were useful in detecting changes generated in the DNA. Less energetic plasma conditions (AAP 4 ml/min) and low exposure to gamma rays (100 Gy) optimized some germination parameters as well as plant development in watermelon. Effects on phenotypes were observed by the evaluated treatments, with effectiveness for gamma rays with a large number of phenotypically different groups, and an LD50 of 325 Gy for Sugar Baby. Only a few effects of gamma rays at the genetic level have been detected by some markers. Plasma and gamma rays have the ability to generate detectable and useful phenotypic changes, with potential use in watermelon cultivation as a promoter of seed development and pre-breeding.

Keywords: Mutations, morphological variation, epigenetics, fixation, pre-improvement.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Procedimento de tratamento de sementes: a) diretamente aplicado PFA, em diferentes tempos de exposição a atmosfera 3,15,30 min e controle, b) ativação de água AAP em diferentes dosagens 4,2,1,0.5 min/ml para ser usada na germinação de sementes no estudo dos efeitos morfológicos em sementes de melancia.....26
- Figura 2.** Anomalias geradas pelo plasma frio e água ativada por plasma em plântulas de melancia34
- Figura 3.** Efeitos das altas doses de plasma na anatomia da raiz, a) controle, b) mudanças geradas pelos tratamentos com AAP, b1) bifurcações, b2) produção de raízes secundárias e b3) mudanças nos tecidos condutores, e b4) coifas largas; c) tratamento com PFA, c1 -c2) mudanças na superprodução de raízes secundárias, c3) crescimento truncado e coifas engrossada. Barra de escala: 500 μm35
- Figura 4.** Efeito dos tratamentos com plasma no tegumento das sementes de melancia. a) controle, b) plasma frio diretamente aplicado nas doses b1) 15min e b2) 30min, c) água ativada por plasma nas doses c1) 4, c2) 2 e c3) 0.5 ml/min. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM), barras de escala: 200 μm36
- Figura 5.** Análises de correlações de Person das variáveis de germinação e desenvolvimento de plântulas de melancia obtidas de sementes tratada com plasma. RL= Comprimento da raiz, SL=Comprimento do caule, TL=Comprimento total, RW=Peso seco da raiz, SW=Peso seco do caule, GRI= Índice de taxa de germinação, GP= Potencial de germinação, GR= Taxa de germinação, NRB= Número de raízes/basal seção, NRM=Número de raízes/seção média, NRT=Número de raízes/terminais, RCA=Área de contato da raiz, RA=Área da raiz, R=Redondeza.37
- Figura 6.** Efeitos do plasma frio no desenvolvimento de plantas de melancia, a-c) efeitos positivos dos tratamentos 2ml/min e 4ml/min, b-d) efeitos das doses altas, tratamento 0.5ml/min e 30 min. no desenvolvimento das plantas. Barra de escala: 5 cm.40
- Figura 7.** Correlações de Pearson entre as variáveis quantitativas avaliadas nos 50 dias após a semeadura na fase vegetativa em plantas de *C. lanatus*, obtidas a partir de sementes tratadas com plasma atmosférico frio. SL=comprimento do caule, SW=largura do caule, NC=número de cotilédones, FLL=comprimento da primeira folha, FLW=largura da primeira folha, NLFN=número de folhas no primeiro nó, NLo=número de lóbulos, NF=número de flores, NP=número de pétalas, NL=número de folhas, RW=largura da raiz, TL=comprimento da raiz principal, RA=área da raiz, P=perímetro, ARJ=proporção de aspecto, R=redondo, S=solidez.42
- Figura 8.** Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower para os indivíduos tratados com plasma nas diferentes doses. (T1=3, T2=15, T3=30min, T4=0.5, T5=1, T6=2, T7=4ml/min, C=controle) com as respectivas repetições= R.44
- Figura 9.** Imagens de géis de agarose contendo resultados de ampliações dos marcadores de DNA para a detecção dos efeitos do plasma. A figura (a) apresenta os padrões de amplificação com os marcadores ISSR (1-15) para T4 (0.5ml/min) e C (controle). A figura (b) apresenta os padrões de amplificação com os marcadores SSR BVWS00106 para os tratamentos 2 (15 min), 3 (30 min), 4 (0.5ml/min), 5 (1ml/min), 6 (2ml/min) e C (controle). M (marcador de peso 100pb).46

CAPÍTULO III

- Figura. 1.** Procedimento de avaliação das linhas M1 expostas às doses de raios gama e de obtenção de plantas M2 em melancia..... 58
- Figura. 2.** Efeitos das doses dos raios gama na germinação de mini melancia variedade Sugar Baby, a) controle, b) 100Gy, c) 200 Gy, d) 300 Gy e 400 Gy..... 59
- Figura. 3.** Relação da taxa de relativa de crescimento e as diferentes doses de raios gama Co-60 testadas para a variedade de melancia Sugar Baby. 62
- Figura. 4.** Influência das doses de raios gama na morfologia foliar da melancia variedade Sugar Baby. a) Diversidade de formas nas folhas, b) variações nas margens e b.1) graus de lobulação, c) mudanças no tipo da folha, d) folha com deformação lateral, d.1 - d.3) folha com deformação sem segmento do ápice, d.2-d3) variações na cor..... 65
- Figura. 5.** Anomalias nas flores geradas pelas doses de raios gama em melancia, variedade Sugar Baby. a) variações no número de pétalas e anteras Anomalias nas flores geradas pelas doses de raios gama em melancia, variedade Sugar Baby. a) variações no número de pétalas e anteras a.1) superior a cinco pétalas de forma alargadas, a.2) superior a cinco pétalas de forma arredondada, a.3) número inferior a cinco pétalas b) formação de flores siameses, b.1) flor masculinas e femininas fusionadas, b.2) das flores femininas fusionadas b.3) flor hermafrodita c) variações na forma e cor das pétalas, c.1) flores assimetrias, d) assimetria ou fusão das pétalas 66
- Figura. 6.** Influência dos raios gama na variação morfológica dos frutos. a) Variações na forma do fruto a- a1, b) redução do tamanho dos frutos, c) variações na epiderme do fruto, d) incremento de tamanho e mudanças na forma, e) variações na cor da polpa. 67
- Figura. 7.** Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower agrupando a diversidade fenotípica relacionada a mudanças morfológicas e distúrbios fisiológicos do tratamento 400Gy (Y4), agrupada em quatro grupos fenotípicos..... 71
- Figura. 8.** Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower agrupando a diversidade fenotípica relacionada às variações morfológicas causadas pelo tratamento 300Gy (Y3), agrupada em seis grupos fenotípicos. 73
- Figura. 9.** Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower demonstrando a diversidade fenotípica do tratamento 200Gy (Y2) em melancia, agrupada em cinco grupos fenotípicos 74
- Figura. 10.** Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower demonstrando a diversidade fenotípica do tratamento 100Gy (Y1) em melancia, agrupada em seis grupos fenotípicos. 75
- Figura. 11.** Gel de agarose contendo amplificações com os marcadores RAPD, ISSR e SSR visando a detecção dos efeitos dos raios gama ao nível molecular dos tratamentos com raios gama (Y) versus o controle(C). a) Primer OPM 02 para Y1e Y2 com duas repetições, b) Primer OPD08, c) primer ISSR 01-08 para os tratamentos Y4 (400Gy) versus C(Controle), d) Primer SSR BVWS00106 para os tratamentos Y4 versus C. A letra M corresponde ao marcador de peso..... 76

COMPLEMENTO

Figura, 1. Variações nos grãos de pólen. a) redução da quantidade de pólen nas anteras de individuo M2 a.1) controle, b) mudanças na estrutura de grão de pólen, c) problemas nos processos meióticos, com a geração de grãos de pólen jumbo ou polinucleados (c.1).78

Figura, 2. Variações dos frutos na geração de sementes, a) frutos sem sementes, b) frutos com sementes e baixa viabilidade, c) com sementes sem embrião.79

Figura, 3. Fixação de características na M2 provenientes da dosagem 400Gy em melancia.80

Figura, 4. Fixação de características na M2 na dosagem 300Gy ciclo 1 (I, II, III, IV), ciclo 2 (V, VI, VII, VIII).82

Figura, 5. Fixação de características na M2 na dosagem 100 e 200Gy para melancia.83

Figura, 6. Fixação das características na M3 das linhas 318.413e 495 em melancia Sugar Baby.85

Figura, 7. Variações no fruto, cor da polpa, largura do pericarpo, grau de lobulação e cor das folhas nas gerações M3 e M4 de melancia. a) linha 450MM34-10, b) linha441M34, c) linha MM75-5.86

Figura, 8. Variações no fruto, cor da casca da fruta, cor da polpa, largura do pericarpo, grau de lobulação e cor das folhas nas gerações M3 e M4 de melancia. a) linha MM86-17, b) linha 413MM32-1, c) linha 495MM37-8.87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Teor de nitratos, nitritos, pH e peróxido de hidrogênio da água ativada com as doses de plasma testadas. (tratamentos do T4 a T7 e controle).....26
- Tabela 2.** Influência dos tratamentos com plasma frio atmosférico e água ativada com31
- Tabela 3.** Influência dos tratamentos com plasma frio atmosférico e água ativada com plasma para algumas variáveis fenotípicas de melancia.....39
- Tabela 4.** Valores próprios, porcentagem da variância total e contribuição das variáveis quantitativas e de conformação dos sete componentes principais das variações fenotípicas encontradas pelo efeito do plasma frio.43

CAPÍTULO III

- Tabela. 1** Influência dos raios gama na germinação e desenvolvimento de plântulas de mini melancia variedade Sugar Baby. 60
- Tabela. 2.** Cálculo da LD50 para s raios gama ^{60}Co em melancia da variedade Sugar Baby.62
- Tabela. 3.** Influência dos raios gama no desenvolvimento e morfologia em cultivar de melancia Sugar Baby..... 64
- Tabela. 4.** Efeitos dos raios gama nas frequências de variáveis morfológicas na M1.....68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAP	Plasma frio atmosférico
AAP	Água ativada com plasma
DBD	descarga de barreira dielétrica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
NOS	Espécies reativas de nitrogênio
^{60}Co	Colobalto-60
Gy	Grays
M#	Geração mutante
M	Marcador de peso molecular
LD50	Doses letal média

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	16
INTRODUÇÃO GERAL	16
CAPÍTULO II.....	21
EFEITOS DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MELANCIA	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Material vegetal.....	25
2.2. Tratamento de sementes	25
2.3. Avaliação dos efeitos do plasma frio na germinação da melancia.....	26
2.3.1. Testes de germinação	26
2.4. Avaliação dos efeitos do plasma frio atmosférico no desenvolvimento das plântulas de melancia.	27
2.5. Avaliação de anomalias.....	27
2.6. Estabelecimento das linhas.....	28
2.7. Detecção do efeito do plasma mediante marcadores moleculares	28
2.7.1. Extração de DNA	28
2.8. Análise estatística	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1. Efeitos do plasma frio na germinação em melancia.....	30
3.2. Anomalias geradas pelo plasma frio atmosférico.....	33
3.3. Análises de correlações	37
3.4. Efeitos do plasma frio no desenvolvimento de plantas de melancia	38
3.5. Análises de correlações	41
3.6. Análise de Componentes Principais	42
3.7. Diversidade fenotípica gerada pelo plasma frio	44
3.8. Detecção dos efeitos do plasma mediante marcadores moleculares	46
4.0. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO III	52
VARIABILIDADE FENOTÍPICA NA POPULAÇÃO M1 DE MELANCIA IRRADIADA COM RAIOS GAMA ^{60}Co	52
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS	55

2.1.	Material vegetal.....	55
2.2.	Tratamento de sementes	55
2.3.	Testes de germinação	55
2.4.	Detecção de mutações mediante marcadores moleculares	56
2.5.	Avaliação do desenvolvimento das plantas.....	57
2.6.	Análise estatística	58
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1.	Efeitos dos raios gama na germinação e desenvolvimento de plântulas.....	58
3.2.	Variações fenotípicas associadas aos raios gama do Cobalto-60 em melancia	62
3.3.	Diversidade fenotípica gerada pelos raios gama	70
3.4.	Detecção de Mutações por Meio de Marcadores Moleculares.....	76
4.	CONCLUSÕES.....	77
1.	CONSIDERAÇÕES NO AVANÇO GERACIONAL DAS LINHAGENS	
	PROMISSORAS	78
1.1.	Linhasgens M2.....	78
1.2.	População 400Gy da M2	80
1.3.	População 300Gy da M2	81
1.4.	População 200 e 100Gy da M2	83
1.5.	Linhasgens M3 e M4	84
1.6.	Linhas M3 e M4	86
1.7.	Variações na cor da casca.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXOS.....	91

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Um dos pilares mais importantes da economia brasileira corresponde ao agronegócio. O Brasil é o maior exportador da América Latina e Caribe, e sua expansão está projetada em 1,8% para 2032 (OECD/FAO, 2023), onde a produção frutícola possui especial importância na produção agrícola. A produção frutícola é a garantia econômica, nutricional e dos meios de subsistência dos pequenos agricultores (OECD/FAO, 2023). Neste sentido, com uma produção de 102 milhões de toneladas em 2021, a melancia (*Citrullus lanatus* (Thunberg) Matsumura & Nakai) ocupou a segunda posição como a fruta mais produzida no mundo, dentro da frutícola global, só superada pela produção de banana. Neste mesmo ano, o Brasil teve uma produção que superou os 2.1 milhões de ton., em uma área de 91.922ha (FAO, 2021a, b).

Na região Nordeste tem ocorrido um incremento da área destinada ao cultivo da melancia, sendo esta a segunda cucurbitácea de interesse comercial. A importância desta cultura para a região Nordeste, está associada às particularidades da espécie, como, por exemplo, a adaptação a estações e ambientes quentes, o que permite o seu cultivo principalmente em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. (Behera, *et al.*, 2023). Com uma ampla distribuição e uma gama de cores de polpa, casca e tamanhos diversos dentro do acervo genético de *Citrullus* (Pandey, *et al.*, 2019).

A diversidade nas melancias é classificada em dois tipos comerciais, as diploides que possuem sementes e as triploides sem sementes. As variedades diferem em forma, cor da polpa, cor do epicarpo e tamanho. A “Melancia individual” refere-se a um tipo especial de melancia criada como uma mini variedade e vendida com este nome e de tamanho menor que das mini melancias (OECD, 2012). Dentro da categoria de mini melancia se tem a variedade Sugar Baby, é uma das mais conhecidas e comercializadas, que, além do tamanho reduzido do fruto, tem, alto conteúdo de açúcar acima de 12 graus brix e cor intensa da polpa como principais características que motivam o consumidor à compra (Chogou *et al.*, 2019).

O Brasil apresenta uma grande diversidade de culturas agrícolas, e para melancia se tem registro da conservação 369 acessos (FAO, 2017). A diversidade conservada pelo Brasil inclui diferentes espécies do gênero *Citrullus*, porém, o número de cultivares comerciais é baixo, sendo apenas dez, que foram desenvolvidos nos Estados Unidos e Japão. Além das

variedades comerciais introduzidas na década de 1950, as quais apresentam suscetibilidades à fatores biótico e abióticos, não se tem introduções significativas de germoplasma (Mariane *et al.*, 2009).

Assim, há uma necessidade crescente da produção de culturas de alto rendimento e resistentes a doenças (Levi *et al.*, 2017) e outros tipos de estresse, além de uma constante necessidade de enriquecimento de germoplasma. Além disso, tem-se objetivado a busca por novas coletas de germoplasma de melancia, assim como a conservação de acessos geneticamente e morfológicamente diversos (Levi *et al.*, 2017, Lu *et al.*, 2018). Nesse sentido, uma alternativa para o aumento da diversidade da espécie pode estar relacionada a processos de indução de tolerância e de variabilidade.

A indução de tolerância pode ser uma opção à obtenção de indivíduos superiores sem a necessidade de recorrer a extensos programas de melhoramento. Assim, o uso de métodos desenvolvidos pelo meio da utilização de plasma frio (Shelar, *et al.*, 2022, Zhang *et al.*, 2018) podem ser considerados uma alternativa promissória. O plasma é um estado da matéria em que gases fracamente ionizados são gerados no ar do ambiente, produzindo uma atmosfera carregada de espécies energéticas (Judée, *et al.*, 2018). Essas espécies podem gerar indivíduos com tolerância ao estresse, melhor capacidade de germinação das sementes, melhorar as sementes das culturas, aumentando a produção das culturas e apresentando alta qualidade (Zhang, *et al.*, 2018). Além disso, pode reduzir a altura da planta, aumentar o comprimento da raiz, aumentar o rendimento biológico e a capacidade de perfilhamento em trigo (Jiang, *et al.*, 2014) e em outras culturas como tomateiro (*Solanum lycopersicum* L), brócolis (*Brassica oleracea* var. *Itálica.*), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), pimenta (*Capsicum annuum* L.) e lentilha (*Lens culinaris* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr), rabanete (*Raphanus sativus* L), trigo (*Triticum aestivum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), em cucurbitáceas como pepino (*Cucumis sativus* L) e abobrinha (*Cucurbita pepo* L.) (Adhikari, *et al.*, 2019, Khatami, Ahmadinia, 2018, Seddighinia, *et al.*, 2020, Shelar, *et al.*, 2022)

Além disso, o tratamento com plasma também pode melhorar a fisiologia do metabolismo da planta e é considerado um método rápido, barato e livre de contaminação para melhorar a produção das sementes e colheitas (Li, *et al.*, 2014). Na cultura da melancia em particular tem-se objetivado desenvolver cultivares melhoradas com alto rendimento, maturidade precoce e atributos agrônômicos desejados, além de resistência a estresses bióticos e abióticos, utilizando genótipos de melancia cítrica como fonte de genes em processos de cruzamento (Ngwepe, *et al.*, 2019).

A melhoria por hibridação interespecífica é um procedimento longo, sendo que o melhoramento convencional de cultivares novas e melhoradas pode levar até 12 anos para safras anuais a partir do cruzamento dos genótipos parentais (Maluszynski, *et al.*, 2003). Além disso, os processos convencionais de melhoramento são limitados pela baixa diversidade genética das espécies cultivadas ou potenciais doadores de genes. Por esse motivo, desde 1927, opções como o uso dos raios gama tem sido exploradas para gerar variabilidade e acelerar processos de mutação em culturas de interesse. (Maluszynski, *et al.*, 2009).

O primeiro relato de cultivares de melancia obtida por mutação data de 1984, e foi registrado como Gibrid218, obtida a partir do tratamento com raios gama e dos parentais (híbrido Bykovskii22 x melitopolskii) e cruzamentos subsequentes com yubileinyi72.(FAO/IAEA, 1988). Estudos prévios mostram a eficiência dos raios gama para a variedade comercial Bojura na obtenção de linhagens mutantes (Velkov, *et al.*, 2016) e já foi estabelecida uma avaliação da escala dos efeitos dos tratamentos com e sem raios gama nesta espécie (YIN, HOU, *et al.*, 2023). evidenciando o sucesso da técnica.

Levando em consideração o potencial que o nordeste brasileiro possui como produtor e exportador de melancia, ampliar as oportunidades no mercado a partir de inovações como a geração novas variedades e tecnologias que possam ser usadas pelos produtores é promissor. Este estudo visou determinar as variações e/ou polimorfismos gerados em melancia pelo tratamento com plasma frio e raios gama, ao nível morfológico e genético, assim como avaliar o seu potencial na produção de mini melancias.

REFERENCIAS

- ADHIKARI, B., ADHIKARI, M., GHIMIRE, B., *et al.* "Cold Atmospheric Plasma-Activated Water Irrigation Induces Defense Hormone and Gene expression in Tomato seedlings", **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-52646-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-52646-z>.
- BEHERA, S. R., PANDEY, R., DHATHRI, M., "Watermelon". **Production technology of vegetable crops**, Daya Publi ed. New Delhi, Astral, 2023. p. 373.
- CHOGOUE, S. K., ASSOGBA, R., DEGBEY, H., *et al.* "Market structure and performance of watermelon (*Citrullus lanatus*)in Benin", **Scientific African**, v. 3, p. e00048, 2019. DOI: 10.1016/j.sciaf.2019.e00048. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00048>.
- FAO/IAEA. **Mutation Breeding Newsletter**. . Vienna, Austria, [s.n.], 1988. Disponível em:https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/33/031/33031223.pdf?r=1&r=1.

- FAO. "Agricultural production statistics 2000–2021", **Agricultural production statistics 2000-2021**, v. 1, n. 1, p. 1–17, 2021a. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc3751en/cc3751en.pdf>.
- FAO. **Guidelines for the preparation of the Country Reports for The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture**. Roma, FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/CA3513EN/ca3513en.pdf>.
- FAO. **World Food and Agriculture**. Roma, FAO, 2021b. v. 1. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cb4477en/cb4477en.pdf>.
- JIANG, J., LU, Y., LI, J., *et al.* "Effect of seed treatment by cold plasma on the resistance of tomato to *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt)", **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–6, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0097753. .
- JUDÉE, F., SIMON, S., BAILLY, C., *et al.* "Plasma-activation of tap water using DBD for agronomy applications: Identification and quantification of long lifetime chemical species and production/consumption mechanisms", **Water Research**, v. 133, p. 47–59, 2018. DOI: 10.1016/j.watres.2017.12.035. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135417310308>.
- KHATAMI, S., AHMADINIA, A. "Increased germination and growth rates of pea and Zucchini seed by FSG plasma", **Journal of Theoretical and Applied Physics**, v. 12, n. 1, p. 33–38, 2018. DOI: 10.1007/s40094-018-0280-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40094-018-0280-5>.
- LEVI, A., JARRET, R., KOUSIK, S., *et al.* "Genetic Resources of Watermelon", p. 87–110, 2017. DOI: 10.1007/7397_2016_34. .
- LI, L., JIANG, J., LI, J., *et al.* "Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean", **Scientific Reports**, v. 4, n. 5859, p. 1–7, 2014. DOI: 10.1038/srep05859. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep05859>.
- LU, X., ADEDZE, Y. M. N., CHOFONG, G. N., *et al.* "Identification of high-efficiency SSR markers for assessing watermelon genetic purity", **Journal of Genetics**, v. 97, n. 5, p. 1295–1306, 2018. DOI: 10.1007/s12041-018-1027-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12041-018-1027-4>.
- MALUSZYNSKI, M, KASHA, K. J., FORSTER, B. P., *et al.* **Doubled Haploid Production in Crop Plants**. Springer s ed. New York, SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MÉDIA, LLC, 2003. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-1293-4_47.
- (Maluszynski, I., BHATIA, C. R., *et al.*, "Methodologies for generating variability Part 4: Mutation techniques". In: CECCARELLI, S., GUIMARÃES, E. P., WELTZIEN, E. (Org.), **Plant breeding and farmer participation**, FAO ed. Roma. Italia, ICRISAT, ICARDA, FAO, 2009. p. 1–671. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1070e/i1070e00.htm>.
- MARIANTE, A. da S., SAMPAIO, M. J. A., INGLIS, M. C. V. "State of the Brazil's plant genetic resources", v. 7, p. 1–163, 2009. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i1500e/Brazil.pdf>.
- NGWEPE, R. M., MASHILO, J., SHIMELIS, H. "Progress in genetic improvement of citron watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*): a review", **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 66, n. 3, p. 735–758, 2019. DOI: 10.1007/s10722-018-0724-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0724-4>.

- OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032**. Paris, OECD, 2023. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/08801ab7-en.pdf?expires=1707209974&id=id&accname=guest&checksum=875361C9EEBC3DB0891A7B1A5A91BE95>.
- OECD. **International standards for Fruit and Vegetables normas**. (OECD, Org.). Paris, [s.n.], 2012. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264178960-en-fr.pdf?expires=1707209957&id=id&accname=guest&checksum=E1DF250996F03C4480A20F7D4F510FB0>.
- SEDDIGHINIA, F. S., IRANBAKHS, A., ORAGHI ARDEBILI, Z., *et al.* "Seed Priming with Cold Plasma and Multi-walled Carbon Nanotubes Modified Growth, Tissue Differentiation, Anatomy, and Yield in Bitter Melon (*Momordica charantia*)", **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 87–98, 2020. DOI: 10.1007/s00344-019-09965-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09965-2>.
- SHELAR, A., SINGH, A. V., DIETRICH, P., *et al.* "Emerging cold plasma treatment and machine learning prospects for seed priming: a step towards sustainable food production", **RSC Advances**, v. 12, n. 17, p. 10467–10488, 2022. DOI: 10.1039/d2ra00809b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35425017/>.
- VELKOV, N., TOMLEKOVA, N., SARSU, F. "Sensitivity of watermelon variety Bojura to mutant agents 60 Co and EMS", **Article in Journal of BioScience and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 105–110, 2016. Disponível em: <https://doaj.org/article/8f99b35df76e46e09112a70b412eccc8>.
- YIN, L., HOU, Y., CHEN, X., *et al.* "Construction of Watermelon Mutant Library Based on 60Co γ -ray Irradiation and EMS Treatment for Germplasm Innovation", **Horticulturae**, v. 9, n. 10, 2023. DOI: 10.3390/horticulturae9101133. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-7524/9/10/1133>.
- ZHANG, B., LI, R., YAN, J. "Study on activation and improvement of crop seeds by the application of plasma treating seeds equipment", **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 655, n. April, p. 37–42, 2018. DOI: 10.1016/j.abb.2018.08.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.08.004>.

CAPÍTULO II

EFEITOS DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MELANCIA

RESUMO

O plasma frio atmosférico (PFA) vem sendo amplamente usado como uma nova técnica para melhorar o crescimento das plantas e a resistência a estresses bióticos e abióticos. O PFA foi investigado na aplicação direta ou através da água ativada por plasma (AAP) na germinação e morfologia da variedade Sugar Baby de melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum e Nakai), na avaliação dos efeitos e usos potenciais no tratamento de sementes. Foi realizado um teste de germinação com sementes expostas ao PFA em diferentes tempos de exposição (T1=3, T2=15 e T3=30 minutos) com tensão de 15 kV, ou em AAP em diferentes tempos de ativação (T4=0.5, T5=1, T6=2, T7=4 mL/min) com uma tensão de 10 kV em uma frequência de 500 Hz e o C=controle. Foram analisadas 14 variáveis relacionadas à germinação, estrutura e morfologia das raízes. Após 40 dias do tratamento, as plantas em floração foram avaliadas morfológicamente com 20 variáveis qualitativas e quantitativas, além da avaliação genética com marcadores ISSR e SSR. Foram realizadas análises de variância com teste de SNK e análise multivariada de correlações e componentes principais. Calculou-se ainda o coeficiente de dissimilaridade de Gower para gerar um fenograma. Como resultados, observou-se que, em melancia, o plasma possui a capacidade de melhorar o potencial de germinação para alguns níveis de AAP (0,5 e 4 ml/min). Além disso, PFA e AAP, geraram efeitos no comprimento da raiz, caule e comprimento total da planta, sendo que estas variáveis foram notavelmente favorecidas, nos tratamentos 3, 15 min (PFA) e 4ml/min (AAP). Outro efeito do plasma foi a mudança na morfologia e estrutura da raiz com variações para o número de raízes secundárias. O número de raízes da seção basal e média apresentou diferenças significativas. O plasma gerou mudanças na área circundante da raiz, área da raiz e na circularidade, tendo efeito superior nos tratamentos com AAP na dose 4ml/min. No entanto, também se observou anomalias no desenvolvimento das plantas. Altas doses ou tempos de exposição ao plasma (0,5 ml/ min de AAP ou 30 min de CAP), foram capazes de gerar alterações fisiológicas em frequências de 24,5 até 30,5%. As alterações foram observadas geralmente no crescimento da raiz (69%). As variações morfológicas geradas pelo plasma, permitiram mediante o índice de Gower, agrupar a diversidade fenotípica em quatro grupos, onde um deles foi totalmente diferente do controle. As plantas com características fenotípicas distintas não estavam associadas a um tratamento em particular ou a uma dosagem específica. Os marcadores avaliados não permitiram identificar mudanças ao nível de DNA. O plasma melhorou o potencial de germinação e promoveu o desenvolvimento das plântulas em baixas doses, além de mudanças fenotípicas aleatórias. O uso do plasma representa um grande potencial na cultura da melancia em dosagens baixas e representa uma alternativa de promotor de desenvolvimento em melancia.

Palavras-chave: Ionização, promotor, sementes, diversidade fenotípica, epigenético.

CHAPTER II
EFFECTS OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA ON WATERMELON
GERMINATION AND DEVELOPMENT

ABSTRACT

Atmospheric cold plasma (PFA) has been widely used as a new technique to improve plant growth and resistance to biotic and abiotic stresses. PFA was investigated in direct application or through plasma-activated water (AAP) on the germination and morphology of the Sugar Baby variety of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai), in the evaluation of the effects and potential uses in seed treatment. A germination test was carried out with seeds exposed to PFA at different exposure times (T1=3, T2=15 and T3=30 minutes) with a voltage of 15 kV, or in AAP at different activation times (T4=0.5, T5 =1, T6=2, T7=4 mL/min) with a voltage of 10 kV at a frequency of 500 Hz and C=control. Fourteen variables related to germination, root structure, and morphology were analyzed. After 40 days of treatment, the flowering plants were morphologically evaluated with 20 qualitative and quantitative variables, in addition to genetic assessment using ISSR and SSR markers. Analysis of variance was performed with the SNK test and multivariate analysis of correlations and principal components. The Gower dissimilarity coefficient was also calculated to generate a phenogram. As a result, it was observed that, in watermelon, plasma could improve the germination potential for some AAP levels (0.5 and 4 ml/min). Furthermore, PFA and AAP generated effects on the length of the root, stem and total length of the plant, with these variables being notably favored in treatments 3, 15 min (PFA) and 4ml/min (AAP). Another effect of plasma was the change in root morphology and structure with variations in the number of secondary roots. The number of roots in the basal and middle sections showed significant differences. The plasma generated changes in the surrounding area of the root, root area and circularity, having a superior effect in treatments with AAP at a dose of 4ml/min. However, anomalies in plant development were also observed. High doses or exposure times to plasma (0.5 ml/min of AAP or 30 min of CAP) could generate physiological changes at frequencies of 24.5 to 30.5%. Changes were generally observed in root growth (69%). The morphological variations generated by the plasma made it possible, using the Gower index, to group the phenotypic diversity into four groups, one of which was completely different from the control. Plants with distinct phenotypic characteristics were not associated with a particular treatment or specific dosage. The markers evaluated did not allow us to identify changes at the DNA level. Plasma improved germination potential and promoted seedling development at low doses, in addition to random phenotypic changes. The use of plasma represents great potential in watermelon cultivation at low doses and represents an alternative to promote watermelon development.

Keywords: Ionization, promoter, seeds, phenotypic diversity, epigenetics.

1. INTRODUÇÃO

A sociedade moderna está cada vez mais preocupada com os produtos que consome, com a segurança alimentar e a qualidade dos alimentos, buscando alternativas mais saudáveis e mais sustentáveis, quando comparadas àquelas provenientes da agricultura convencional (Campos, *et al.*, 2022, Rao, *et al.*, 2023). Por isso, existe uma grande demanda pela obtenção de novas tecnologias que substituam, mesmo que parcialmente, os produtos e práticas danosas ao meio ambiente e à saúde. Atualmente existem diversas alternativas em desenvolvimento, como, por exemplo, a utilização de microrganismos, o desenvolvimento de novas variedades de vegetais, o uso de biochar e o uso de tecnologias não térmicas (Rajput, *et al.*, 2022, Tyśkiewicz, *et al.*, 2022, Xiang, *et al.*, 2022)

Dentro das tecnologias não térmicas, o uso de plasmas-frios vem sendo estudado como uma tecnologia barata, não-térmica, livre de resíduos, de fácil aplicação e com resultados satisfatórios (Misra, *et al.*, 2016, Pańka, *et al.*, 2022). O plasma frio é um gás fracamente ionizado que pode ser gerado no ar do ambiente. O fornecimento de energia a um gás neutro provoca a excitação de moléculas e átomos gasosos e pelo menos a dissociação e ionização parcial. No caso o plasma de Descarga de Barreira Dielétrica (DBD), a ionização acontece quando a descarga numa tensão é aplicada a um ou ambos os eletrodos feitos de placas de metal e isolados. O isolador funciona da mesma forma que um capacitor. (Starič, *et al.*, 2020). A descarga de barreira dielétrica, gera como resultado uma fina camada de plasma difuso com alta densidade de potência no ar (CUI. *et al.*, 2023). E no caso da aplicação do plasma para ativação de água, é feito mediante o tratamento com pressão atmosférica e uma descarga elétrica acima e na água simultaneamente o que produz espécies reativas por difusão e interação direta com a água (Wong, *et al.*, 2023).

Trabalhos recentes comprovam a efetividade dessa tecnologia em diversas áreas, como na medicina, na ciência dos materiais, na eletrônica, e mais especificamente nas áreas da ciência dos alimentos, onde vem sendo utilizada na descontaminação de pesticidas nos vegetais (Gavahian, *et al.*, 2021, Sarangapani, *et al.*, 2016) , são muito efetivos também na inativação de enzimas (Gu, *et al.*, 2021, Misra, *et al.*, 2016, Surowsky, *et al.*, 2013) , na modificação de propriedades dos vegetais (Pankaj, *et al.*, 2013, Rajan, *et al.*, 2023, Surowsky, *et al.*, 2013) e na inativação microbiológica (Attri *et al.*, 2020; Rao, *et al.*, 2023). Na agricultura, remediação do solo (Aggelopoulos, 2022) como agentes inseticidas (Ten Bosch, *et al.*, 2017, Ziuzina, *et al.*, 2021) e na melhoria nos processos de crescimento das plantas e de germinação (Li, *et al.*, 2018, Yan, *et al.*, 2022). Resultados positivos foram obtidos para

aboborinha, o plasma gerou resistência à seca e aumentou a germinação das plântulas após a aplicação de plasma nas sementes na dose 30 s. (Khatamy, *et al.*, 2018).

Na produção das culturas, o tratamento com o plasma é capaz de induzir mudanças desejáveis nos processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas. Pode melhorar a resistência das sementes ao estresse e às doenças, modificando as estruturas das coberturas de sementes, aumentando a permeabilidade das coberturas das plantas, e estimulando a germinação das sementes e o crescimento (Bourke, *et al.*, 2018, Chen, *et al.*, 2005, Li, *et al.*, 2014). Os efeitos do plasma nos processos de germinação vem sendo amplamente estudados (Attri, *et al.*, 2020, Pańka, *et al.*, 2022, Song, *et al.*, 2020, Thirumdas, *et al.*, 2018), em diversas culturas, como quinoa (Gómez-Ramirez, *et al.*, 2017), mulungu (Alves Junior, *et al.*, 2016), trigo (Los, *et al.*, 2019). Já foram reportadas mudanças positivas em diversos parâmetros agrônômicos como floração e produtividade (Abedi, *et al.*, 2020, Pérez-Pizá, *et al.*, 2019), e exibindo alta qualidade, tolerância ao estresse e outras características benéficas (Zhang, *et al.*, 2018).

Os efeitos do plasma sobre a diferenciação de tecidos e a morfologia das plantas tem sido comprovados com mudanças positivas a nível histológico no tecido vascular e em outras estruturas importantes para o desenvolvimento dessas plantas (Seddighinia, *et al.*, 2020). Sugerem-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) criadas pelo plasma, são responsáveis pelas mudanças ao nível histológico e morfológico (Adhikari, *et al.*, 2019, Bourke, *et al.*, 2018).

Assim, os efeitos do plasma nas plantas estariam ligadas as alterações morfológicas e nas reações biológicas das sementes, pela alteração nos metabólitos funcionais internos, pela alteração na estrutura de proteínas e pelo estímulo do sinal natural (Mildaziene, *et al.*, 2021), pois os ROS participam dos processos de desenvolvimento de plantas atuando como moléculas sinalizadoras para proliferação e diferenciação celular, morte celular programada, germinação de sementes, gravitropismo, crescimento de pelos radiculares, senescência desenvolvimento do tubo polínico (Bourke, *et al.*, 2018).

Estudos feitos *in vitro* asseguram que as soluções ativadas por plasma possuem potencial mutagênico com o uso de exposição a longo prazo (Boehm, *et al.*, 2016). Recentemente descobriu-se que o plasma frio pode gerar mudanças fenotípicas pelos efeitos dos processos de metilação e desmetilação do DNA e que as desmetilações e metilações podem acontecer em loci específicos (Pérez-Pizá, *et al.*, 2021) e podem gerar danos ao DNA, na expressão gênica, na atividade enzimática, nas alterações morfológicas e químicas, na

germinação e resistência ao estresse em resposta ao tratamento com plasma (Starič, *et al.*, 2020). Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do plasma frio na germinação, desenvolvimento e variações fenotípicas em melancia, visando a seleção de dosagem eficaz na produção da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Das mil sementes de melancia comercial do tipo Ice Box, variedade Sugar Baby (polinização aberta) da marca Top Seed com 85% de germinação e 99% de pureza. A variedade sugar baby se caracteriza por ser precoce, com tipo de fruto redondo, casca verde intensa, polpa vermelha e sabor muito adocicado, também as sementes são pequenas e pouco numerosas. Sementes desta variedade foram levadas ao Laboratório de Processamento de Materiais de Plasma do Departamento de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, Brasil, onde foram aplicados os tratamentos de plasma.

2.2. Tratamento de sementes

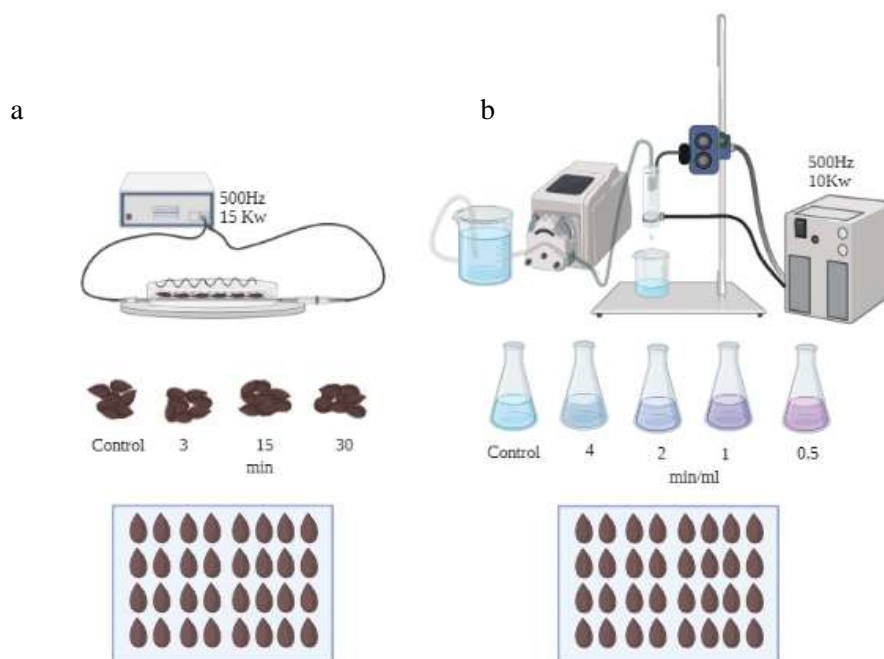
As sementes de melancia foram tratadas diretamente com plasma ou, de forma indireta, com água ativada por plasma. Para o tratamento direto das sementes (PFA), foi utilizada uma descarga de barreira dielétrica coplanar de superfície, produzida entre eletrodos coplanares, através de uma tensão pulsada de 15 kV e frequência de 500 Hz, em diferentes tempos de exposição: 3, 15, 30 minutos no ar atmosférico. Para o tratamento indireto, gotas de água foram ativadas por plasma (AAP) por um sistema de gotejamento, com descarga de barreira dielétrica coplanar de volume, já descrito em outros trabalhos (Alves, *et al.*, 2019). Utilizou-se tensão pulsada de 10 kV, frequência de 500 Hz, para ativação de gotas em taxas de 0,5, 1, 2 e 4 mL/min (Tabela 1.). Utilizou-se como controle, sementes sem tratamento. As condições da água foram avaliadas para as concentrações de nitrato, nitrito, pH e peróxido de hidrogênio (Figura 1.)

Tabela 1. Teor de nitratos, nitritos, pH e peróxido de hidrogênio da água ativada com as doses de plasma testadas. (tratamentos do T4 a T7 e controle).

ml/min	Nitrato Conc [ug/L]	Nitrito Conc [ug/L]	pH	Peróxido de hidrogênio.			
0.5	1.03	0.47	5.28	196.78			
1	0.48	0.28	5.52	87.46			
2	0.18	0.67	6.05	87.46			
4	0.12	2.30	6.19	87.46			
Controle	0.11	0.19	7.09	87.46			
T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
3	15	30 min	0.5	1	2	4ml/min	Controle

Fonte: Rosero (2024)

Figura 1. Procedimento de tratamento de sementes: a) diretamente aplicado PFA, em diferentes tempos de exposição a atmosfera 3,15,30 min e controle, b) ativação de água AAP em diferentes dosagens 4,2,1,0.5 min/ml para ser usada na germinação de sementes no estudo dos efeitos morfológicos em sementes de melancia.



2.3. Avaliação dos efeitos do plasma frio na germinação da melancia.

2.3.1. Testes de germinação

Cada tratamento teve quatro repetições de 50 sementes dispostas em papel germitest, a uma temperatura média de 25°C em câmara de crescimento (BOD). As observações do processo de germinação foram feitas a cada 24 horas até 14 dias conforme preconizado pelas normas para análise de sementes (Brasil, 2009). Sementes com radículas maiores que a metade do seu tamanho foram consideradas sementes germinadas.

Também foram considerados os seguintes parâmetros associados à germinação propostos por Ling et al. (2014) e adaptado às características de germinação da melancia:

Potencial de germinação (%) = (Número de sementes germinadas em 7 dias / número total de sementes) * 100%

Taxa de germinação (%) = (Número de sementes germinadas em 14 dias / número total de sementes) * 100%

Índice de velocidade de germinação = $\sum (Gt / Dt)$

Onde:

Gt representa o número de sementes germinadas no dia t.

Dt representa os dias de germinação.

2.4. Avaliação dos efeitos do plasma frio atmosférico no desenvolvimento das plântulas de melancia.

A avaliação morfológica foi realizada usando ferramentas de fenotipagem e análise de imagens. Pelo anterior, após os 14 dias da germinação, as plântulas foram avaliadas morfolologicamente e fotografados para a obtenção das variáveis: RL=Comprimento da raiz, SL=Comprimento do caule, TL=Comprimento total, RW=Peso seco da raiz, SW=Peso seco do caule, NRB=Número de raízes/basal seção, NRM=Número de raízes/seção média, NRT=Número de raízes/terminais, RCA=Área de contato da raiz, RA=Área da raiz, R=Redondeza. As variáveis associadas a morfologia de raiz foram obtidas mediante o software image J, com ajuda da ferramenta color threshold e o processo binary, onde foram testados e standardizados pra threshold color (Hue=96, Saturation =255, Brightnes= 195) (Tajima, 2011).

2.5. Avaliação de anomalias

A avaliação das anomalias foi feita visualmente e foram realizadas observações no microscópio ótico, onde as plântulas foram selecionadas e observadas ao microscópio estereoscópio e posteriormente foram realizados cortes longitudinais e transversais de 1 e 0.5 mm para serem observadas em 5 e 10X, o número de variações identificadas por tratamento e repetição foi quantificada e registrada de acordo com a mudança. Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para observar as mudanças na morfologia física da superfície das sementes tratadas com plasma frio e água ativada por plasma. As amostras foram colocadas em um porta-amostras de metal usando uma fita condutora de carbono (PELCO Tabs™, Ted Pella, Inc., Redding, CA, EUA) e pulverizadas (Q150R ES, Quorum Technologies Ltd., Laughton, East Sussex, Reino Unido) com uma camada de ouro de 9 nm

de espessura. As imagens foram capturadas com um detector de elétrons secundário (SE) em SEM (VEGA 3 LMU, Tescan, República Tcheca), operando com um feixe de elétrons de 20 kV.

2.6. Estabelecimento das linhas

A fenotipagem das plantas foi realizada de forma contínua, utilizando câmeras digitais e análise de imagens (Tsaftaris, Noutsos, 2009), sendo, portanto, uma metodologia não destrutiva. Sementes obtidas nos tratamentos em diferentes concentrações e tempo de exposição foram semeados em vasos de mudas, com capacidade de 1 Kg, com substrato na proporção 1:1 de areia e substrato comercial para hortaliças (Tropstrato). Foram selecionadas dez mudas de cada tratamento (T1=3, T2=15, T3=30min, T4=0.5, T5=1, T6=2, T7=4ml/min, C=controle) para avaliação.

As mudas foram dispostas num delineamento inteiramente ao acaso e foram consideradas as seguintes variáveis de desenvolvimento, 50 dias após semeadura, na etapa de floração: SL=Comprimento do caule, SW=Largura do caule, NC=Número de cotilédones, FLL=Comprimento da primeira folha, FLW=Largura da primeira folha, NLFN=Número de folhas no primeiro nó, NL=Número de lóbulos, NF=Número de flores, NP=Número de pétalas, NL=Número de folhas, RW=Largura da raiz, TL=Comprimento da raiz principal, RA=Área da raiz, P=Perímetro da raiz, ARJ=Proporção de aspecto, R=Redondeza, S=Solidez, GH=Hábito de crescimento, LT=Tipo de lobulação, P=Pubescência F=Floração. Os dados foram obtidos mediante ao processamento de imagens no software image J, com os ajustes já mencionados.

2.7. Detecção do efeito do plasma mediante marcadores moleculares

2.7.1. Extração de DNA

Plantas de 40 dias depois da semeadura e após as avaliações morfológicas foram selecionadas plantas que apresentaram mudanças consideráveis por tratamento, folhas novas e saudáveis foram coletadas por tratamento, e o DNA foi extraído a partir do protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1990). A quantificação de DNA foi realizada em géis de agarose a 1% (p/v), comparando-se visualmente a intensidade das bandas do DNA, com bandas de peso molecular conhecido de 1 kb (cellco). $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para utilização em reações de PCR.

2.7.2. Seleção de primers ISSR e SSR na caracterização de melancia após tratamento com plasma.

As reações de amplificação para os marcadores ISSR e SSR foram realizadas utilizando volumes finais de 12 μ L, contendo 10 ng do DNA; 0.2 μ M dos primers ISSR e 5 μ M de cada um dos marcadores (forward e reverse) do marcador SSR; 2 mM de cada dNTP; solução tampão 1X (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 mM de $MgCl_2$; 5 μ g de BSA e 1 U de Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação para os marcadores ISSR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 40s para temperatura de anelamento 48-55 °C por 40s e 72°C por 1min e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 minutos. Para os marcadores SSR foi realizada uma etapa inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 1 minuto para o anelamento em temperatura específica para cada marcador e 2 minutos a 72 °C para a extensão e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 2 % para os ISSR e 3% para os SSR, corados com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão TBE 1X a 120 V por 2-3 h e posteriormente, visualizados sob luz UV, usando o sistema de fotodocumentação em gel (Proteinsimple). O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com o padrão de peso molecular de 100 pb “DNA Ladder Plus” (Cellco).

Os resultados das amplificações com os iniciadores ISSR nos tratamentos foram analisados em sistema binário para a presença de bandas “1” ou ausência “0”, sendo consideradas somente bandas nítidas e reproduzíveis.

2.8. Análise estatística

As anomalias (variações morfológicas diferentes do esperado de uma plântula normal) e alterações fisiológicas foram quantificadas e foi feito uma análise de frequências por tratamento. Os dados quantitativos, foram submetidos a análise estatística composta com Teste -F e um teste de comparações múltiplas de médias de Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de 95% de probabilidade, seguido pela análise de correlação de Pearson utilizando o software genes (Cruz, 2013), para avaliar as relações entre as variáveis e uma análise de componentes principais (PCA). Calculou-se o coeficiente de dissimilaridade de Gower para a construção de um fenograma no software R (versão 3.0.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeitos do plasma frio na germinação em melancia

O plasma frio atmosférico (PFA) e a água tratada com plasma (AAP) geraram efeitos no desenvolvimento das plântulas de melancia. Em algumas ocasiões observou-se uma resposta diferencial para os níveis testados. Algumas variáveis como comprimentos de raiz, caule e comprimento total foram notavelmente afetadas (Tabela 2). Os tratamentos 3, 15 min (PFA) e 4ml/min (AAP) apresentaram os valores mais altos para comprimento de raiz (9.67-9.1 e 9.39 cm), caule (8.5-8.23 e 8.73 cm) e total (18.2-17.65 e 18.12 cm). O estímulo do crescimento pelo plasma no comprimento médio do caule e do comprimento da raiz foi previamente relatado em espécies como *Brassica oleracea* e *Lepidium sativum* (Motrescu, *et al.*, 2023).

De modo geral, os melhores resultados foram obtidos pela aplicação direta do plasma com a obtenção de plântulas com comprimentos de raiz e comprimentos totais superiores (9.67-18.2 cm) em relação à água tratada com plasma (9.39-18,12 cm), com um contraste significativo ($p < 0.01$) entre os dois tipos de aplicação. Os efeitos da aplicação de plasma no desenvolvimento das plântulas também foram evidenciados no contraste significativo da aplicação do plasma versus o controle ($p < 0.001$) para comprimento de raiz, de ramo e total. A massa seca da raiz mostrou-se ligeiramente afetada pelo tipo de aplicação do plasma com valores superiores para PFA em relação a AAP, evidenciado num contraste significativo ($p < 0,01$), onde constatou-se uma média superior para PFA (0.0311g) em relação a AAP (0.026g), ao contrário da massa do caule, que não foi afetada pelos tratamentos com plasma (Tabela 2). Em *Eremochloa ophiuroides* os comprimentos totais da raiz e peso seco das raízes foram significativamente melhorados pelos tratamentos com plasma frio (Li, *et al.*, 2019), convergindo como o que foi encontrado neste estudo.

Tabela 2. Influência dos tratamentos com plasma frio atmosférico e água ativada com plasma nos diferentes parâmetros de germinação e desenvolvimento em melancia.

	RL (cm)		SL (cm)		TL (cm)		RW (gr)		SW (gr)	
Tratamentos	1100***		3.000*		7.00***		1.160ns		0.740ns	
PFA	3.400*		1.100ns		2.510*		0.780ns		1.850ns	
3 min	9.675	a	8.523	a	18.2	a	0.035	a	0.148	a
15 min	9.418	ab	8.230	a	17.65	ab	0.03	b	0.395	a
30 min	9.035	b	7.808	a	16.84	b	0.03	b	0.150	a
Dms	0.517		1.016		1.279		0		0.310	
AAP	10.810***		3.510*		7.560***		0.190ns		0.0003ns	
0,5 ml/min	8.445	bc	7.390	b	15.835	b	0.025	b	0.135	a
1ml/min	8.870	ab	7.680	ab	16.547	b	0.025	b	0.1325	a
2ml/min	8.055	c	7.375	b	15.432	b	0.0275	a	0.1375	a
4ml/ min	9.390	a	8.732	a	18.120	a	0.0275	a	0.135	a
Dms	0.572		1.413		1.779		0		0.431	
PFA vs AAP	26.540	**	2.250	ns	10.77	**	4.71	*	0.004	ns
Plasma vs controle	13.650	***	6.430	**	12.32	**	1.26	ns	0.090	ns
	GRI%		GP%		GR%		NRB (ud)		NRM (ud)	
Tratamentos	1.520ns		2.120ns		0.048ns		2.0ns		2.370ns	
PFA	0.380ns		0.020ns		0.070ns		3.830*		3.910*	
3 min	15.963	a	97.0	a	99.0	a	13.841	a	4.615	b
15 min	15.708	a	96.50	a	98.50	a	11.022	b	6.067	a
30 min	15.795	a	97.0	a	98.50	a	11.314	b	4.722	ab
Dms	0.620		16.510		9.784		7.432		1.409	
AAP	2.220ns		3.290*		0.050ns		0.610ns		1.350ns	
0,5 ml/min	15.812	a	96.50	a	99.0	a	13.112	a	5.943	a
1ml/min	15.432	a	89.50	b	98.50	a	13.311	a	5.489	a
2ml/min	15.225	a	94.0	ab	98.50	a	12.750	a	5.400	a
4ml/ min	15.877	a	96.0	a	98.50	a	11.908	a	4.614	a
Dms	0.862		22.964		13.608		10.338		1.959	
PFA vs AAP	2.170	ns	4.450	*	0.002	ns	1.380	ns	0.39	ns
Plasma vs controle	1.060	ns	0.460	ns	0.009	ns	6.250	**	1.46	ns
	NRT(ud)		ARj (cm)		AR (cm ²)		R(ISO)			
Tratamentos	1.00ns		5.00**		2.00ns		9.00***			
PFA	1.20ns		0.970ns		1.490ns		9.980***			
3 min	4.529	a	27.651	a	3.083	a	0.219	b		
15 min	3.772	a	24.617	a	2.551	a	0.251	b		
30 min	3.147	a	29.813	a	2.696	a	0.301	a		
Dms	5.890		24.793		0.859		0.051			
AAP	0.220ns		8.760***		1.940ns		4.130*			
0,5 ml/min	3.193	a	24.154	b	2.206	a	0.253	a		
1ml/min	3.755	a	28.304	b	2.352	a	0.235	ab		
2ml/min	3.850	a	23.707	b	2.201	a	0.213	ab		
4ml/ min	3.719	a	40.458	a	2.863	a	0.192	b		
Dms	8.193		34.487		0.927		0.055			
PFA vs AAP	0.150	ns	0.790	ns	4.670	*	11.340	**		
Plasma vs controle	3.670	*	3.270	*	2.040	*	16.110	***		

RL= Comprimento da raiz, SL=Comprimento do caule, TL=Comprimento total, RW=Peso seco da raiz, SW=Peso seco do caule, GRI= Índice de taxa de germinação, GP= Potencial de germinação, GR= Taxa de germinação, NRB= Número de raízes/basal seção, NRM=Número de raízes/seção média, NRT=Número de raízes/terminais, ARj=Área de contato da raiz, AR=Área da raiz, R=Redondeza. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, para um parâmetro, conforme o teste de múltiplo de médias de SNK a 95% de confiança. *, **, *** Significado ao nível de probabilidade 0,05, 0,01, 0,001 respectivamente e ns – não significativo nas análises de variância. Fonte: Rosero (2024)

O PFA assim como o AAP, não geraram mudanças significativas (ns) para as variáveis, índice e taxa de germinação, o ótimo estado das sementes de melancia comerciais com um 85% de germinação não permitiu observar variações contundentes. Estudos realizados com híbridos de milho também não mostraram diferenças significativas, que pode ter sido devido à taxa de germinação alta, próxima ao 100% (Ahn, *et al.*, 2019). A germinação Da variedade comercial usada para este estudo (85%) poderia ter influenciado nos resultados não significativos para germinação. Mesmo assim, o plasma mostrou ter a capacidade de aumentar o potencial de germinação para os tratamentos de AAP. Trabalhos em leguminosas mostraram esse poder estimulador do plasma frio (NTP) em sementes (Šerá, *et al.*, 2021) por quanto AAP

Os tratamentos com 0,5 e 4 ml/min de água ativada com plasma (AAP) evidenciaram uma melhor resposta com potenciais de germinação média de 96.5 e 96% respectivamente. Alguns estudos prévios mostraram como a água ativada por plasma (AAP) aumentou a taxa de germinação (Lo Porto, *et al.*, 2018). Neste estudo, se obteve um contraste significativo ($p < 0,05$) entre PFA e AAP, com médias superiores para AAP (94%) em relação ao PFA (86.83%) evidenciando a sua superioridade. Em geral, o poder estimulador nos processos de germinação, e mudanças nos parâmetros de germinação são conhecidas e reportadas em diversas culturas Bormashenko, *et al.*, 2015, Mildaziene, *et al.*, 2021, Starek-Wójcicka, *et al.*, 2020, Yan, *et al.*, 2022).

A aplicação de plasma gerou mudanças na morfologia e estrutura da raiz com variações no número de raízes secundárias. A secção basal e média foi afetada, apresentando contrastes significativos entre plasma versus controle ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) para a secção basal e terminal. Houve um aumento de 13.84 para número de raízes basais no tempo 3 min, em comparação com a média 11.16 dos tratamentos de 15 e 30 min para CAP. O tratamento 1 ml/min de AAP apresentou o valor mais alto com 13.31 para número de raízes, na secção basal o tratamento de 15 min de PFA foi superior com 6 raízes e na secção média, enquanto o tratamento de AAP a 0.5ml/min com 5.9 raízes. Para a secção terminal, os tratamentos 3min e 2 ml/min apresentaram valores superiores para número de raízes secundárias com 4.5 e 3.8, respectivamente. Variações na raiz foram reportadas previamente em uso do plasma no pré-tratamento na propagação vegetativa, onde, o número de raízes adventícias foi significativamente melhorados pelos tratamentos com plasma frio (Li, *et al.*, 2019). Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho, com melancia.

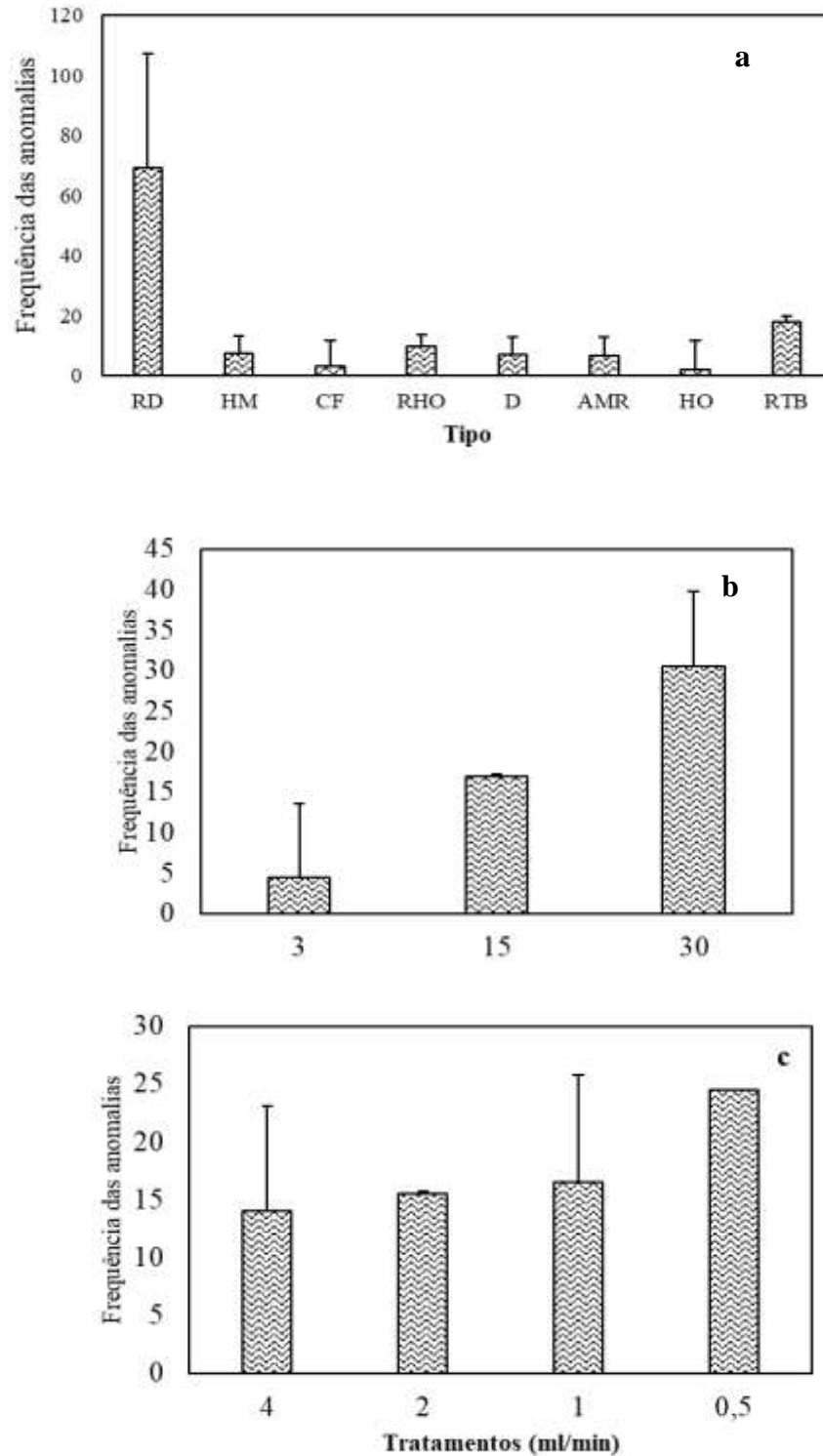
As mudanças na morfologia e estrutura geradas pelo plasma em melancia também foram evidenciadas na região circundante de raiz, a área da raiz e circularidade, onde os contrastes de plasma versus controle foram significativos para as três variáveis. O plasma afetou significativamente a área circundante da raiz ($p < 0,01$), onde o efeito foi superior nos tratamentos com AAP ($p < 0,001$) que nos tratamentos com CAP, sendo a dose de menor exposição (4ml/min), superior, com 40.45 cm. A circularidade mudou significativamente para os diferentes tratamentos ($p < 0,001$), e especialmente para PFA foi significativo ($p < 0,001$), o tratamento de 30 min que apresentou raízes com áreas mais redondas IR 0, 301. Li *et al.* (2019) também reportaram sobre a capacidade do plasma em gerar mudanças na área total da superfície, volume total e no diâmetro médio da raiz.

3.2. Anomalias geradas pelo plasma frio atmosférico

Neste estudo conseguimos observar como o plasma possui a capacidade de gerar mudanças na morfologia das plântulas de melancia, algumas podendo ser consideradas mudanças leves e até positivas, mas também podem se apresentar com anomalias no desenvolvimento (variações morfológicas diferentes do esperado em plântulas de melancia). Altas doses ou tempos de exposição ao plasma frio atmosférico (30 min de PFA ou 0,5 ml/min de AAP), geraram distúrbios fisiológicos e anomalias que afetaram o desenvolvimento das plântulas em diferentes frequências. Estas alterações podem estar relacionadas com a influência do tratamento com plasma em danos ao DNA, expressão gênica, atividade enzimática, alterações morfológicas e químicas, que tem sido reportadas, além de efeitos positivos, como germinação e resistência ao estresses, sendo um efeito amplamente conhecido (Starič, *et al.*, 2020).

As anomalias mais comuns foram as mudanças no crescimento radicular (69%), morfologia do hipocótilo (7.5%), formação de cotilédones (3%), superprodução de pelos radiculares (9.5%), nanismo (7%), ausência de raiz principal (6,5%), supercrescimento do hipocótilo (2%) e raízes com protuberâncias (18%) (Figura 2). Efeitos negativos das longas exposições nas sementes e na água com descargas de plasma, foram reportadas para plantas *Raphanus sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*. Para sementes tratadas com plasma e regadas com AAP -30, o crescimento e a vitalidade da planta diminuíram (Sivachandiran, Khacef, 2017).

Figura 2. Anomalias geradas pelo plasma frio e água ativada por plasma em plântulas de melancia, a) frequências dos diferentes tipos de mudanças morfológicas e anomalias geradas pela aplicação de plasma, b) frequência das anomalias geradas pelo plasma frio nas doses de PFA, c) frequência das anomalias nas doses de AAP. RD=Desenvolvimento radicular, HM=Morfologia do hipocótilo, CF=Formação de cotilédones, RHO=Superprodução de pelos radiculares, D=Nanismo, AMR=Ausência de raiz principal, HO=Crescimento excessivo do hipocótilo, RTB=Abaulamento das pontas das raízes



As anomalias foram diretamente proporcionais à dose em PFA e AAP, os tratamentos com doses menores (3min e 4ml/min) apresentaram as frequências mais baixas (4.5% e 14%) em comparação com os níveis dos tipos de aplicação de plasma. Em contraste, à medida que as doses foram sendo aumentadas, essas frequências observadas chegaram até 30.5% na dose 30 min de PA e 24.5 % na dose 0,5ml/min (Figura 2b-c). As variações observadas nas plântulas podem ter relação com os efeitos genotóxicos do plasma. Assim é descrito em trabalhos em cevada que mostraram como as exposições mais longas tiveram efeitos genotóxicos (Pet'ková *et al.*, 2021). Que poderia estar relacionado com o comportamento anômalo das raízes de melancia.

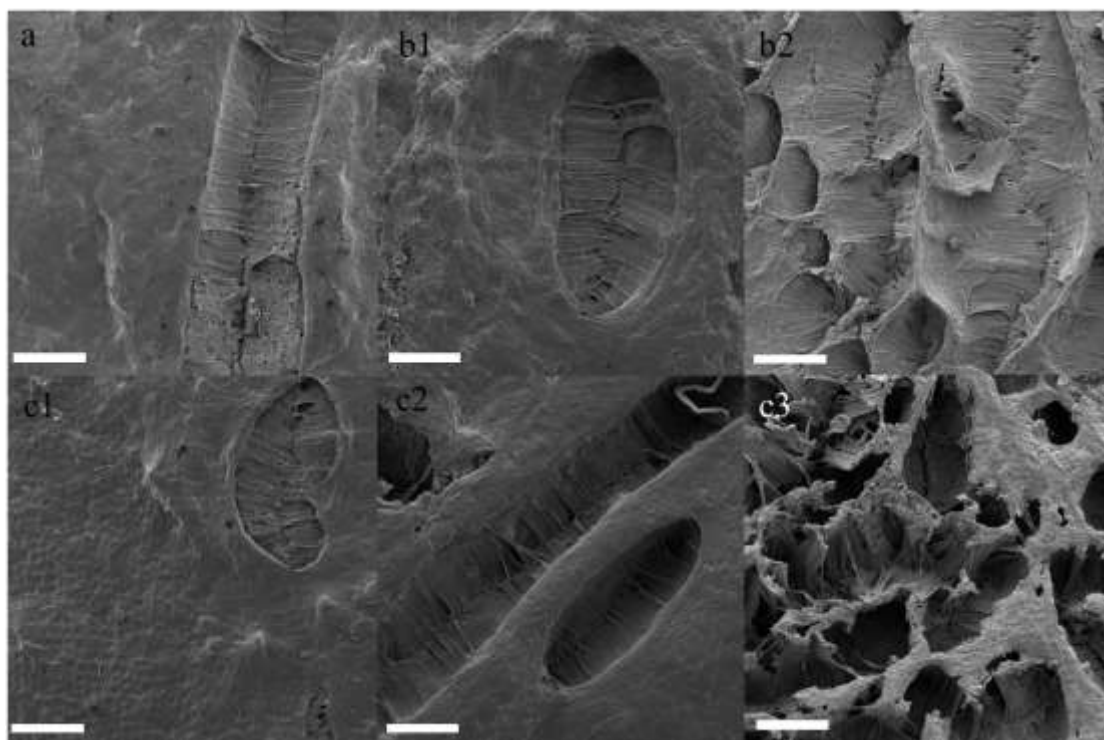
Os efeitos gerados pelo tratamento com plasma em altas doses foram observados no crescimento radicular, apresentando, principalmente em mudanças estruturais do meristema apical da raiz, onde observou-se uma redução do pro-meristema (Figura 3b1, b2, b3, b4e c3) área na qual foi possível observar a formação não usual de raízes secundárias (Figura 3b2, b4, c1). A Figura 3c2, do tratamento 15 min de PFA, mostra uma alta produção de raízes secundárias. Observou-se também, mudanças no pro-câmbio e um incremento na largura, e algumas áreas de vácuo. As mudanças mencionadas afetaram o desenvolvimento da raiz principal, e em alguns casos apresentou bifurcações da raiz principal em duas raízes (Figura3b1) principalmente em tratamentos com AAP.

Figura 3. Efeitos das altas doses de plasma na anatomia da raiz, a) controle, b) mudanças geradas pelos tratamentos com AAP, b1) bifurcações, b2) produção de raízes secundárias e b3) mudanças nos tecidos condutores, e b4) coifas largas; c) tratamento com PFA, c1 -c2) mudanças na superprodução de raízes secundárias, c3) crescimento truncado e coifas engrossada. Barra de escala: 500 μm .



Efeitos gerados pelos tratamentos foram observados nos tegumentos das sementes, os quais sofreram uma abrasão que gerou muitas aberturas ou superfícies menos lisas nas doses altas, sendo este efeito comumente achado nas doses de 30 min e 0,5ml/min (Figura 4b2 e c3). O poder de abrasão da parede das sementes já foi previamente demonstrado, evidenciando os efeitos do plasma nos processos de escarificação, em trabalhos feitos em *Arabidopsis thaliana*, onde o plasma gerou efeitos significativos nas rupturas do tegumento e endosperma durante a fase de germinação para o plasma de ar, devido à sua maior energia e eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio (Bafoil, *et al.*, 2018).

Figura 4. Efeito dos tratamentos com plasma no tegumento das sementes de melancia. a) controle, b) plasma frio diretamente aplicado nas doses b1) 15min e b2) 30min, c) água ativada por plasma nas doses c1) 4, c2) 2 e c3) 0.5 ml/min. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM), barras de escala: 200 μ m.



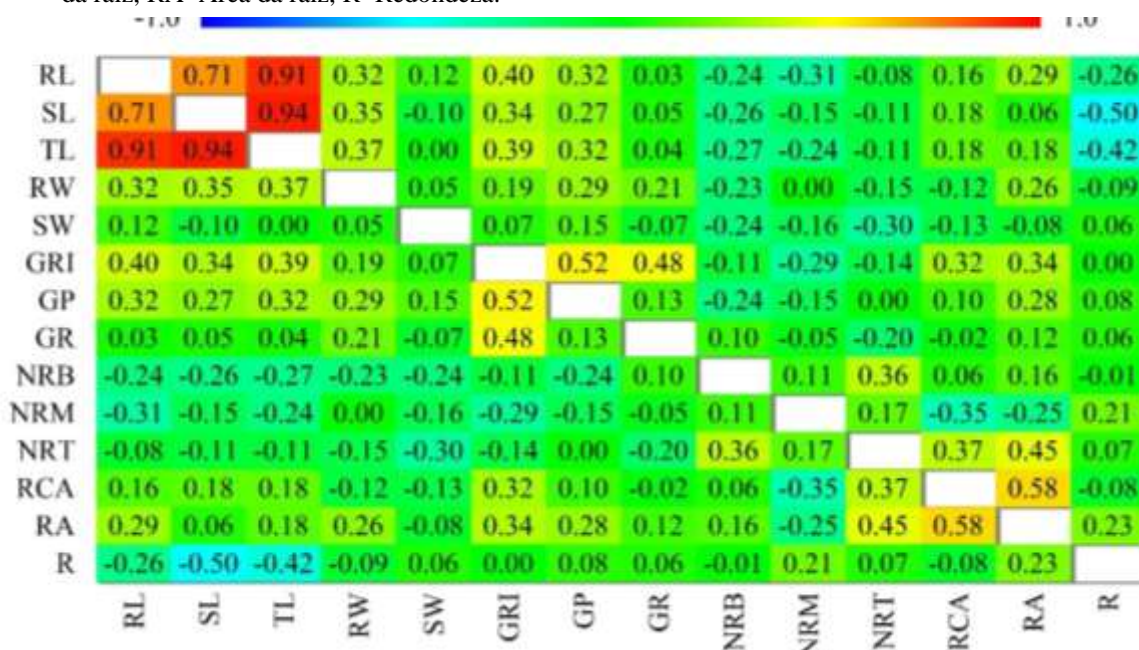
O observado nos tegumentos das sementes esteve relacionado com as modificadas das propriedades da água pelo plasma, verificando-se um incremento principalmente nas concentrações de nitrato (1.031 μ g/L) para o tratamento 0.5ml/min com pH 5.28 e nas concentrações de nitrito (2.302 μ g/L) na dose 4ml/min com pH 6.19. O tratamento PFA mostrou a formação de canais superficiais e estendidos em todo o tegumento (Figura 4b2), enquanto na melancia o tratamento com AAP, na dose 0,5ml/min, gerou canais menores e profundos (Figura 4c3). No caso do feijão, a descarga de ar na aplicação de plasma gerou um ambiente ácido na água que pode promover o escurecimento das rachaduras das sementes (Zhou, *et al.*, 2016), o que ajudaria a permeabilidade da semente e poderia estar relacionado

com a melhora no potencial de germinação obtido (Tabela 2). Os efeitos de diferentes tipos de tratamentos com plasma nas superfícies das sementes em processos de escarificação e inativação de patógenos foram reportados anteriormente (Song, *et al.*, 2020).

3.3. Análises de correlações

As análises de correlações mostraram que 11 das 14 variáveis analisadas possuem correlação acima do $p < 0.05$ (Figura 5). As variáveis morfológicas de comprimentos da raiz, caule e o comprimento total estão altamente correlacionados ($r=0.71, 0.91$ e 0.94^{***}). Além disso, a massa seca da raiz está ligada ao comprimento de colo e comprimento total ($r=0.35, 0.37^*$), com correlações significativas. Observou-se também se observou correlações entre número de raízes da região terminal e o número de raízes basais ($r=0,36^*$). A área circundante se correlacionou significativamente com número de raízes na parte média e número de raízes da secção terminal ($r=0.35, 0.37^*$), o que demonstra que a área circundante da raiz foi incrementada pela quantidade de raízes secundárias na parte média e terminal.

Figura 5. Análises de correlações de Person das variáveis de germinação e desenvolvimento de plântulas de melancia obtidas de sementes tratada com plasma. RL= Comprimento da raiz, SL=Comprimento do caule, TL=Comprimento total, RW=Peso seco da raiz, SW=Peso seco do caule, GRI= Índice de taxa de germinação, GP= Potencial de germinação, GR= Taxa de germinação, NRB= Número de raízes/basal seção, NRM=Número de raízes/seção média, NRT=Número de raízes/terminais, RCA=Área de contato da raiz, RA=Área da raiz, R=Redondeza.



A área da raiz se correlacionou positivamente com índice de germinação($r=0.34^*$), número de raízes terminais ($r=0,45^{**}$) e área circundante da raiz (0.58^{***}). A circularidade

da raiz apresentou uma correlação positiva com comprimento do colo ($r=0.49^{***}$) e uma correlação negativa com comprimento total e comprimento de raiz ($r=-0.42^{***}$), demonstrando que, plantas com raízes pequenas geralmente possuem raízes arredondadas. O índice de germinação está correlacionado positivamente com comprimento da raiz, do colo e comprimento total ($r=0.40, 0.34, 0.39^*$), já o potencial de germinação está correlacionado com o comprimento da raiz, comprimento total e índice de germinação ($r=0.32, 0.32, 0.52^{**}$).

3.4. Efeitos do plasma frio no desenvolvimento de plantas de melancia

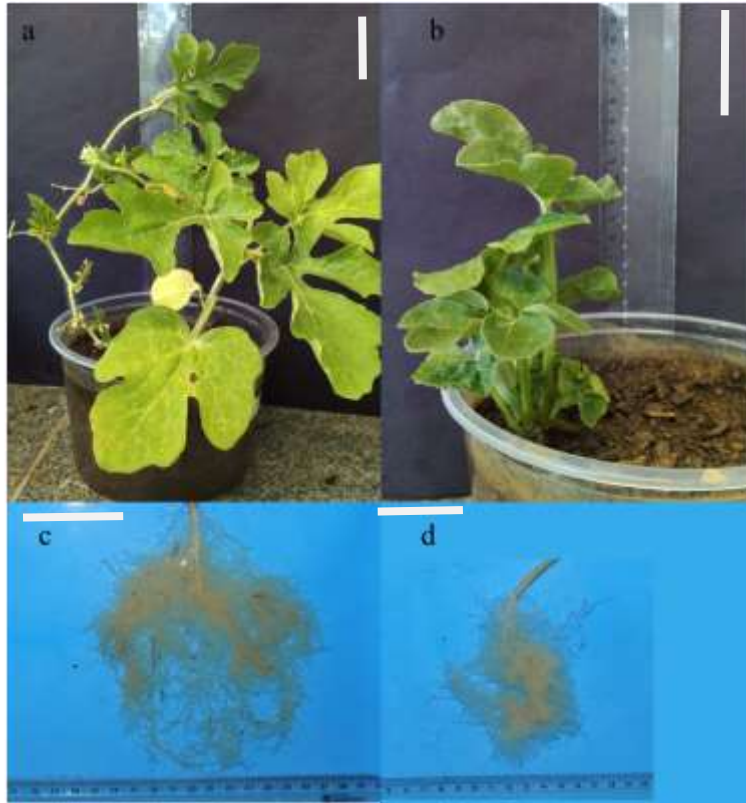
A aplicação do plasma frio, diretamente e na água ativada com plasma, possui a capacidade de gerar mudanças na morfologia e no desenvolvimento das plantas de melancia. As mudanças podem ser perceptíveis entre os tratamentos com diferenças significativas em variáveis morfológicas como: comprimento de caule (SL), largura de caule (SW), perímetro da raiz (RP), relação de aspecto da raiz (ARj), solidez (S) e redondeza da raiz (R) (Tabela 3). Assim, plantas provenientes de sementes tratadas com plasma dos tratamentos de 30 e 15 min PFA e, 2ml/min AAP, apresentaram ramos compridos e caules largos, com a presença na maioria das vezes de folhas verdes vigorosas (Figura 6a). Neste sentido, resultados positivos para os tratamentos com AAP como, por exemplo, o tratamento 2ml/min, já foram relatados, com incremento nos comprimentos das mudas de plantas de lentilha, evidenciando o aumento de até 34,0% e 128,4% após 3 dias e 6 dias de ativação (Judée, *et al.*, 2018), e também quando AAP é usada na irrigação, modulando o crescimento das plantas (Adhikari, *et al.*, 2019).

Tabela 3. Influência dos tratamentos com plasma frio atmosférico e água ativada com plasma para algumas variáveis fenotípicas de melancia.

	SL(cm)	±SD		SW(cm)	±SD		RP(mm²)	±SD	
3 min	38.62	1.74	ab	0.42	0.01	a	86.25	6.02	ab
15min	43.37	5.10	ab	0.46	0.02	ab	81.00	9.73	a
30min	56.56	14.43	b	0.55	0.08	b	84.40	7.33	ab
0,5ml/min	28.98	5.08	ab	0.44	0.00	a	109.0	10.07	b
1ml/min	31.36	3.39	ab	0.39	0.03	a	108.8	9.93	b
2ml/min	40.93	3.37	ab	0.48	0.03	ab	100.1	3.75	ab
4ml/min	31.46	3.32	ab	0.41	0.02	a	94.37	0.28	ab
Controle	17.99	12.85	a	0.36	0.06	a	94.20	0.40	ab
Média	36.16			0.44			94.76		
NS	2.40	*		3.26	**		3.61	**	
CV	29.85			18.5			13.26		
PFA vs AAP	10.43	***		5.16	**		9.91	***	
Plasma vs Controle	18.52	***		10.33	***		0.01	ns	
	ARj(cm)	±SD		S	±SD		R	±SD	
3 min	48.20	5.60	b	0.93	0.23	b	1.32	0.42	a
15min	44.60	3.06	ab	0.83	0.16	b	1.00	0.65	a
30min	37.00	2.32	ab	0.88	0.20	b	1.00	0.65	a
0,5ml/min	39.00	0.90	ab	0.44	0.11	a	2.20	0.20	b
1ml/min	35.20	3.59	a	0.47	0.09	a	2.20	0.20	b
2ml/min	38.20	1.47	ab	0.42	0.13	a	2.60	0.48	b
4ml/min	41.40	0.80	ab	0.39	0.15	a	2.60	0.48	b
Controle	38.60	1.18	ab	0.43	0.12	a	2.40	0.34	b
Média	40.28			0.60			1.92		
NS	2.43	*		26.74	***		9.33	***	
CV	15.20			16.9			26.00		
PFA vs AAP	2.44	ns		94.13	***		31.10	***	
Plasma vs Controle	0.43	ns		16.56	***		5.02	*	

*, **, *** Significado ao nível de probabilidade 0,05, 0,01, 0,001 respectivamente. SL=comprimento do caule, SW=largura do caule, RP=perímetro da raiz, ARj=proporção de aspecto, S=solidez, R=redondeza. Fonte: Rosero (2024)

Figura 6. Efeitos do plasma frio no desenvolvimento de plantas de melancia, a-c) efeitos positivos dos tratamentos 2ml/min e 4ml/min, b-d) efeitos das doses altas, tratamento 0.5ml/min e 30 min. no desenvolvimento das plantas. Barra de escala: 5 cm.



Os três tratamentos com médias superiores para comprimento, foram superiores ao controle e a média geral (Tabela 3), mostraram os efeitos positivos da aplicação do plasma no desenvolvimento das plantas de melancia. Há registros de outras pesquisas com plasma atmosférico de barreira dielétrica mostrando alta qualidade e melhorias significativas em características fisiológicas (Abarghuei, *et al.*, 2021, Zhang, *et al.*, 2018). Estas melhorias podem ter influenciado o desenvolvimento superior para os tratamentos avaliados de PFA e AAP e teria relação com as espécies reativas geradas pelo plasma. Para *Vigna radiata* L., as interações entre as espécies reativas, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e compostos nitrogenados, melhoraram a germinação e levaram a um aumento do comprimento das plântulas (Zhou, *et al.*, 2016), o que poderia explicar o desenvolvimento de caule e raiz em alguns tratamentos com plasma.

As variações das doses altas geraram uma diminuição no crescimento e mudanças na forma das folhas (Figura 6b). Estas mudanças correspondem a possíveis alterações a nível fenotípico e epigenético, as quais são mais evidentes no crescimento das plantas (Pérez-Pizá,

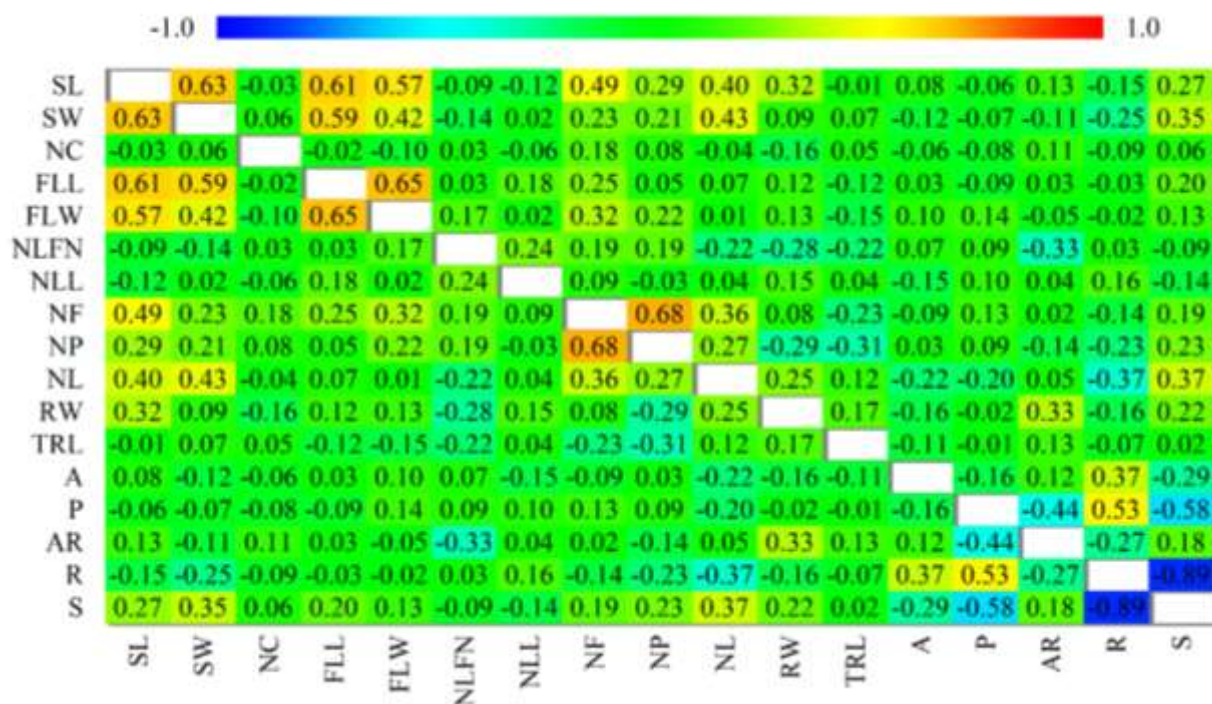
et al., 2021). As variações também foram visíveis nas raízes e algumas plantas apresentaram raízes secundárias largas e expandidas para os tratamentos 0.5 e 1 ml/min, com valores superiores de perímetro da raiz (RP) acima do controle e da média geral. Em outras plantas, houve um incremento significativo na área circundante da raiz (ARj) para os tratamentos 3min, 15min e 4ml/min, conferiu-se com raízes mais expandidas (com maior amplitude nos radiovetores) densas e com alta solidez para o tratamento com 30 min, (Tabela 3).

Este tratamento se distinguiu pela geração de raízes secundárias abundantes e curtas (Figura 6d), em contraste, com os tratamentos 2 e 4 ml/min, com raízes médias, mas compridas e com solidez baixa, ou seja, baixa densidade de raízes secundárias e uma estrutura mais arredondada, cujas morfocoordenadas se aproximam de uma circunferência (Figura 6c). As mudanças nos pelos radiculares encontradas neste estudo, estariam relacionadas com os efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) criadas pelo plasma que podem estar influenciado o crescimento de pelos radiculares (Bourke, *et al.*, 2018). Para as variáveis fenotípicas: número de cotilédones (NC), comprimento da primeira folha (FLL), largura da folha (FLW), número de folhas no primeiro nó (NLFN), número de folhas (NL), número de flores (NF), número de pétalas (NP), largura da raiz (RW), os efeitos não foram significativos entre os tratamentos.

3.5. Análises de correlações

Verificou-se uma alta associação entre as características avaliadas (Figura 7), com 64.06% dos coeficientes de correlação foram estatisticamente significativos. As correlações mais altas correspondem aos pares de variáveis comprimento e largura da primeira folha (FLL-FLW, com $r= 0.65^{***}$), assim como de número de flores e pétalas (NF-NP, com $r= 0,68^{***}$). A correlação de FLL e FLW já era esperada, mas a correlação NF-NP é alta e positiva, o que evidência como estas duas características de floração estão associadas. As plantas cuja floração foi induzida pelo plasma podem apresentar flores com variações no número de pétalas; também se destacaram as correlações comprimento e largura de caule (SL -SW, com $r= 0.63^{***}$), e comprimento de caule e folha (SL -FLL, com $r= 0.61^{***}$) mostra como as plantas com ramos compridos possuem geralmente caules largos e por sua vez apresentam folhas mais compridas e largas (SL-FLW com $r= 0.57^{***}$) e um maior número de folhas por planta (SL, SW-NL= 0.40 e 0.43** respectivamente).

Figura 7. Correlações de Pearson entre as variáveis quantitativas avaliadas nos 50 dias após a sementeira na fase vegetativa em plantas de *C. lanatus*, obtidas a partir de sementes tratadas com plasma atmosférico frio. SL=comprimento do caule, SW=largura do caule, NC=número de cotilédones, FLL=comprimento da primeira folha, FLW=largura da primeira folha, NLFN=número de folhas no primeiro nó, NLo=número de lóbulos, NF=número de flores, NP=número de pétalas, NL=número de folhas, RW=largura da raiz, TL=comprimento da raiz principal, RA=área da raiz, P=perímetro, ARJ=proporção de aspecto, R=redondo, S=solidez.



O SL e SW, também apresentaram correlações fracas para as variáveis da raiz P e S ($r=0.23^*$, 0.27^* , 0.35^{**}), o que significa que variáveis fenotípicas da parte aérea não estão fortemente correlacionadas com as variáveis da morfologia da raiz, mas sim com estrutura como se observou com as correlações para RW-SL ($r= 0.32^{**}$), a variável da raiz S, apresentou correlações com as variáveis NP ($r=0.23^*$), NF ($r=0.19$), NL (0.37^*), A ($r=-0.58^{***}$) e P ($r= 0.18$). Assim, plantas que apresentam mudanças na morfologia de flores ou indução de floração podem apresentar raízes curtas e densas.

3.6. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais mostrou que a variabilidade encontrada na população pode ser explicada por sete Componentes Principais. O primeiro recebeu aportes das variáveis principalmente das SL, SW, FLL, FLW, NF e NL, que explicaram o 21.058% da variabilidade. Essas variáveis poderiam ser estudadas a profundidade com o fim de detectar indivíduos que apresentaram mudanças morfológicas favoráveis na seleção de doses

de aplicação de plasma e que correspondem a variáveis da parte aérea. O componente dois, recebeu aportes das variáveis NLNF, RW, TRL, P e ARJ que explicaram 13.964% da variabilidade, as quais estão associadas a variáveis de colo e raiz; o componente três que explicou 10.039%, foi composto pela variável NP, quatro com 8.9%, tem a variável RA, para o quinto componente os maiores aportes foram feitos pelas variáveis R e S, e para o componente seis a variável NLo. Finalmente, o componente sete recebeu aportes da variável NC que explicou 6.240%.

Tabela 4. Valores próprios, porcentagem da variância total e contribuição das variáveis quantitativas e de conformação dos sete componentes principais das variações fenotípicas encontradas pelo efeito do plasma frio.

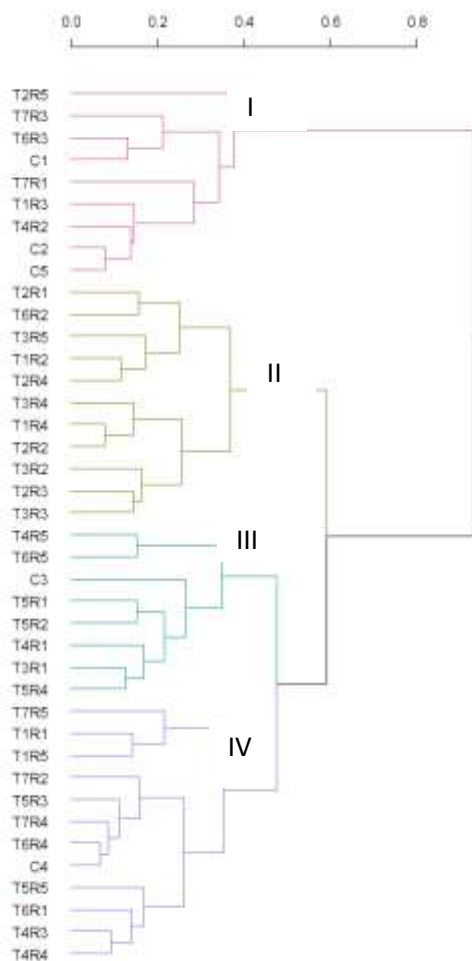
Componentes principais	1	2	3	4	5	6	7
Autovalores	3.580	2.374	1.707	1.523	1.337	1.219	1.061
Variância total (%)	21.058	13.964	10.039	8.960	7.862	7.174	6.240
Variância acumulada (%)	21.058	35.023	45.062	54.023	61.885	69.058	75.299
Matrix de componentes							
SL	0.859	-0.024	-0.177	-0.140	-0.150	0.169	-0.057
SW	0.737	-0.025	-0.201	0.114	0.370	0.254	-0.154
NC	0.034	0.005	0.387	-0.028	0.163	-0.122	-0.825
FLL	0.695	0.110	-0.438	-0.241	0.113	-0.122	-0.144
FLW	0.638	0.325	-0.415	-0.235	0.007	-0.010	-0.014
NLFN	-0.056	0.642	0.052	-0.037	0.207	-0.448	0.048
NLo	0.023	0.114	-0.295	0.358	-0.074	-0.734	-0.037
NF	0.643	0.353	0.341	0.167	-0.292	-0.176	-0.067
NP	0.476	0.487	0.559	0.061	-0.132	0.049	0.095
NL	0.557	-0.301	0.282	0.402	-0.087	0.127	0.176
RW	0.280	-0.514	-0.393	0.218	-0.186	-0.211	0.189
TRL	-0.098	-0.485	-0.209	0.289	-0.014	0.148	-0.397
RA	-0.101	0.148	-0.090	-0.756	-0.142	0.093	0.024
P	-0.164	0.550	-0.362	0.463	-0.329	0.269	-0.144
ARJ	0.113	-0.622	0.093	-0.359	-0.321	-0.377	-0.133
R	0.208	-0.128	0.209	-0.088	-0.702	0.041	-0.049
S	0.523	-0.390	0.365	0.018	0.469	-0.124	0.221
Variância explicada	3.580	2.374	1.707	1.523	1.337	1.219	1.061
Prp.Totais	0.211	0.140	0.100	0.090	0.079	0.072	0.062

SL=comprimento do caule, SW=largura do caule, NC=número de cotilédones, FLL=comprimento da primeira folha, FLW=largura da primeira folha, NLFN=número de folhas no primeiro nó, NLo=número de lóbulos, NF=número de flores, NP=número de pétalas, NL=número de folhas, RW=largura da raiz, TRL=comprimento da raiz principal, RA=área da raiz, P=perímetro da raiz, ARJ=proporção de aspecto, R=redondeza, S=solidez.

3.7. Diversidade fenotípica gerada pelo plasma frio

O plasma gerou mudanças morfológicas, que permitiram agrupar indivíduos em um grupo novo com características fenotípicas distintas (Figura 8). A variabilidade morfológica gerada pelas diferentes doses de plasma frio aplicado diretamente e a água ativada por plasma formaram quatro grupos. Estudos anteriores têm mostrado como o plasma frio gera variações fenotípicas nas plantas, o que pode ser explicado pelas mudanças nos níveis de metilação do DNA, que operam em *loci* específicos em resposta aos tratamentos com plasma (Pérez-Pizá, *et al.*, 2021). O grupo I se caracterizou por ter 39.72cm comprimentos médios de ramos, folhas medianas (6.77 ± 2.54), com variações no número de folhas no primeiro nó, ocasiões em que esteve composto por uma folha, com pouca produção de flores ou nenhuma e o número mais baixo de folhas, de tipo levemente lobulada, raiz comprida com AR, P, ARJ, R com os valores mais altos, o grupo sendo composto pelos controles e algumas repetições dos tratamentos T1, T2, T4, T6, T7 e C.

Figura 8. Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower para os indivíduos tratados com plasma nas diferentes doses. (T1=3, T2=15, T3=30min, T4=0.5, T5=1, T6=2, T7=4ml/min, C=controle) com as respectivas repetições= R.



O grupo II se destacou por possuir plantas com porte (2.96 cm) e folhas pequenas (2.44 cm), primeiro nó composto por mais de duas folhas, sendo estas com mais de três lóbulos. Este grupo obteve os valores mais baixos de ARJ o que quer dizer que são plantas com raízes pequenas. O tipo de lobulação foi 5, de tipo intermédio, possuindo flores numa média de 2.86, este grupo foi composto por repetições dos tratamentos T3, T4, T5, T6. O grupo III foi formado por plantas que apresentaram um desenvolvimento de ramo superior (83.67 cm), caules largos (0.74 cm) e folhas grandes (14.47 cm), de tipo levemente lobulada, apresentando ou não folhas no primeiro nó, e geralmente as folhas possuem três lóbulos. São plantas com flores, e podem ter mudanças no número de pétalas com um incremento acima de cinco pétalas. Possuem um alto número de folhas da população e raiz principal comprida, além disso, possuem um R baixo, sendo composto por algumas das repetições dos tratamentos T1, T2, T3, T6 e um C. Melhorias no desenvolvimento e no estímulo do crescimento vegetal são conhecidos efeitos do plasma (PAŇKA *et al.*, 2022), que gera mudanças positivas na taxa de germinação, e conseqüentemente no crescimento da planta (LO PORTO *et al.*, 2018).

O grupo IV foi caracterizado por plantas de porte médio com um incremento no número de cotilédones superior a dois, folhas curtas, mais largas e com três lóbulos, de tipo levemente lobulada. Podem apresentar menos de duas folhas no primeiro nó, e alta produção de flores da população avaliada, com variações no número de pétalas usualmente superior a cinco, raízes curtas com AR, R baixo. Este grupo foi composto pelo maior número de indivíduos e contém todos os tratamentos de plasma PFA e AAP, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e só um indivíduo do C (Figura 8). O agrupamento dos indivíduos avaliados dos materiais avaliados não teve relação com as dosagens ou tratamentos, portanto a geração de mudanças na morfologia foi aleatória. No entanto, o efeito do plasma no desenvolvimento das plantas foi constatado, vide as médias superiores no grupo III e a indução de floração, que pode ser observada nos grupos II, III e IV. A indução de floração já foi reportada em *Cichorium intybus*, onde mudas tratadas com plasma produziram maior número de flores (média = 41,5%)(ABEDI *et al.*, 2020); outras mudanças na morfologia floral foram observadas para os grupos III e IV, além de mudanças na morfologia da folha no grupo II.

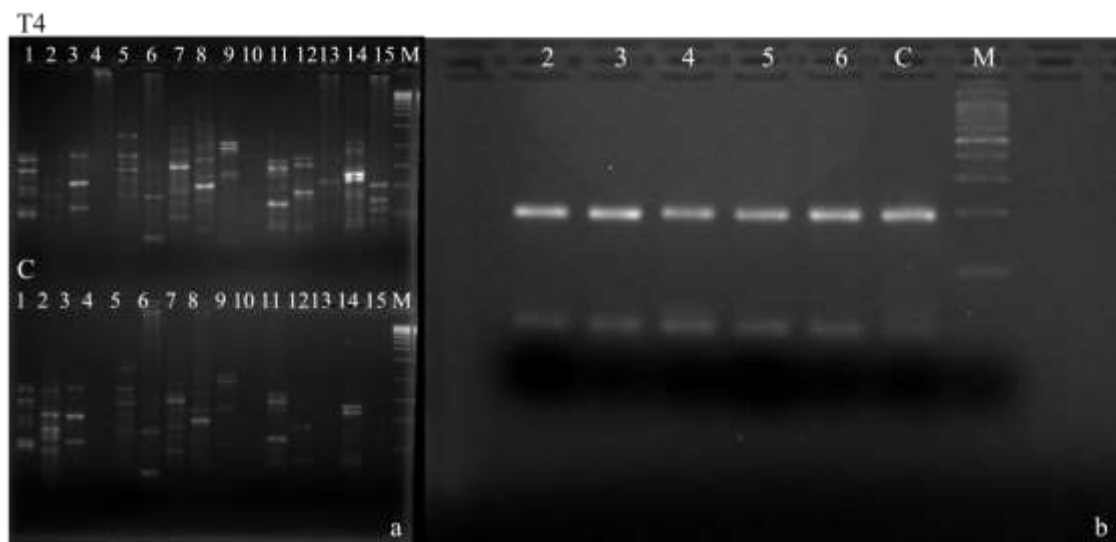
Mesmo que as variações morfológicas mais facilmente identificáveis sejam aquelas associadas ao baixo desenvolvimento das plantas, com caules curtos, folhas pequenas e hábito de crescimento arbustivo, são evidências da capacidade do plasma em gerar mudanças morfológicas em plantas de melancia, efeitos semelhantes já foram reportados para *Stevia*

rebaudiana, onde a diminuição de massa seca da folha e a altura da planta tiveram uma tendência geral dependente da duração da exposição ao plasma frio (Judickaitė *et al.*, 2023).

3.8. Detecção dos efeitos do plasma mediante marcadores moleculares

Os tratamentos comparados entre si, assim como a comparação do tratamento T4 versus o controle não apresentaram variações nas regiões amplificadas (Figura 9) com os marcadores utilizados neste estudo. As variações morfológicas observadas nos tratamentos não correspondem a variações associadas a mudanças no genoma. Além disso, os processos pelos quais acontecem as variações morfológicas podem não interferir na amplificação das regiões dos marcadores avaliados. Portanto, os marcadores moleculares ISSR e SSR avaliados foram ineficientes para este estudo. O plasma pode gerar variações fenotípicas em plantas e estas podem estar relacionadas a mudanças na metilação do DNA (Pérez-Pizá, *et al.*, 2021). No entanto, o plasma pode gerar variações fenotípicas, mas não gerar mudanças nas bases do DNA, mas pode ter mudanças epigenéticas, os efeitos do plasma no DNA poderiam ser testados mediante técnicas de polimorfismos amplificados sensível à metilação (MSAP).

Figura 9. Imagens de géis de agarose contendo resultados de amplificações dos marcadores de DNA para a detecção dos efeitos do plasma. A figura (a) apresenta os padrões de amplificação com os marcadores ISSR (1-15) para T4 (0.5ml/min) e C (controle). A figura (b) apresenta os padrões de amplificação com os marcadores SSR BVWS00106 para os tratamentos 2 (15 min), 3 (30 min), 4 (0.5ml/min), 5 (1ml/min), 6 (2ml/min) e C (controle). M (marcador de peso 100pb).



4.0. CONCLUSÕES

Em melancia, o plasma frio diretamente aplicado ou mediante a água tratada por plasma possui a capacidade de mudar o comportamento e desenvolvimento das plântulas. Doses como 0,5 ml/min e 4ml/min de AAP podem melhorar o potencial de germinação, além de gerar mudanças na morfologia das raízes e em características associadas a estrutura de raiz, mudanças no desenvolvimento vegetal e variações fenotípicas positivas em dosagens específicas 2ml/min e 3min. As mudanças fenotípicas associadas a desenvolvimento não puderam ser detectadas pelos marcadores moleculares ISSR e SSR utilizados no estudo.

REFERÊNCIAS

- ABEDI, S., IRANBAKHS, A., ORAGHI ARDEBILI, Z., *et al.* "Seed priming with cold plasma improved early growth, flowering, and protection of *Cichorium intybus* against selenium nanoparticle", **Journal of Theoretical and Applied Physics**, v. 14, n. 2, p. 113–119, 2020. DOI: 10.1007/s40094-020-00371-8. .
- ADHIKARI, B., ADHIKARI, M., GHIMIRE, B., *et al.* "Cold Atmospheric Plasma-Activated Water Irrigation Induces Defense Hormone and Gene expression in Tomato seedlings", **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-52646-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-52646-z>.
- AGGELOPOULOS, C. A. **Recent advances of cold plasma technology for water and soil remediation: A critical review. Chemical Engineering Journal**. [S.l.], Elsevier B.V. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131657>. , 2022
- ALVES JUNIOR, C., DE OLIVEIRA VITORIANO, J., DA SILVA, D. L. S., *et al.* "Water uptake mechanism and germination of *Erythrina velutina* seeds treated with atmospheric plasma", **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1038/srep33722. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep33722>.
- ATTRI, P., ISHIKAWA, K., OKUMURA, T., *et al.* "Plasma agriculture from laboratory to farm: A review", **Processes**, v. 8, n. 8, 2020. DOI: 10.3390/PR8081002. .
- BOEHM, D., HESLIN, C., CULLEN, P. J., *et al.* "Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma", **Nature Publishing Group**, v. 6, n. 21464, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1038/srep21464. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21464>.
- BOURKE, P., ZIUZINA, D., BOEHM, D., *et al.* "The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production", **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 615–626, 2018. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.11.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>.
- CAMPOS, I. N. De, YAGO, J., MARTINS, B., "Percepção Pública dos Alimentos Transgênicos no Brasil: Uma Revisão da Literatura". **Percepção Pública dos Alimentos Transgênicos no Brasil**, [S.l.: s.n.], 2022. p. 239–254. Disponível em: <https://portal.epitaya.com.br/index.php/ebooks/article/view/453>.
- CHEN, G. L., FAN, S. H., LI, C. L., *et al.* "A Novel Atmospheric Pressure Plasma Fluidized Bed and Its Application in Mutation of Plant Seeds", **Chinese Physics Letters**, v. 22, n. 8, p. 1980–1983, 2005. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0256-307X/22/8/044>.
- GAVAHIAN, M., SARANGAPANI, C., MISRA, N. N. "Cold plasma for mitigating agrochemical and pesticide residue in food and water: Similarities with ozone and ultraviolet technologies", **Food Research International**, v. 141, n. January, p. 110138, 2021. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110138. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110138>.
- GÓMEZ-RAMÍREZ, A., LÓPEZ-SANTOS, C., CANTOS, M., *et al.* "Surface chemistry and germination improvement of Quinoa seeds subjected to plasma activation", **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-06164-5. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41598-017-06164-5>.

- GU, Y., SHI, W., LIU, R., *et al.* "Cold plasma enzyme inactivation on dielectric properties and freshness quality in bananas", **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 69, n. February, p. 102649, 2021. DOI: 10.1016/j.ifset.2021.102649. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102649>.
- LI, L., JIANG, J., LI, J., *et al.* "Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean", **Scientific Reports**, v. 4, n. 5859, p. 1–7, 2014. DOI: 10.1038/srep05859. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep05859>.
- LI, L., LI, J., SHAO, H., *et al.* "Effects of low-vacuum helium cold plasma treatment on seed germination, plant growth and yield of oilseed rape", **Plasma Science and Technology**, v. 20, n. 9, p. 95502, 2018. DOI: 10.1088/2058-6272/aac3d0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1088/2058-6272/aac3d0>.
- LOS, A., ZIUZINA, D., BOEHM, D., *et al.* "Investigation of mechanisms involved in germination enhancement of wheat (*Triticum aestivum*) by cold plasma: Effects on seed surface chemistry and characteristics", **Plasma Processes and Polymers**, v. 16, n. 4, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1002/ppap.201800148. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ppap.201800148>.
- MILDAZIENE, V., IVANKOV, A., PAUZAITE, G., *et al.* "Seed treatment with cold plasma and electromagnetic field induces changes in red clover root growth dynamics, flavonoid exudation, and activates nodulation", **Plasma Processes and Polymers**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1002/ppap.202000160. .
- MISRA, N. N., PANKAJ, S. K., SEGAT, A., *et al.* "Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems", **Trends in Food Science and Technology**, v. 55, p. 39–47, 2016. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.07.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.001>.
- MOTRESCU, I., CIOLAN, M. A., CALISTRU, A. E., *et al.* "Germination and Growth Improvement of Some Micro-Greens under the Influence of Reactive Species Produced in a Non-Thermal Plasma (NTP)", **Agronomy**, v. 13, p. 150, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13010150>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/13/1/150/pdf>.
- PAŃKA, D., JESKE, M., ŁUKANOWSKI, A., *et al.* "Can Cold Plasma Be Used for Boosting Plant Growth and Plant Protection in Sustainable Plant Production?", **Agronomy**, v. 12, n. 4, p. 1–20, 2022. DOI: 10.3390/agronomy12040841. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/12/4/841>.
- PANKAJ, S. K., MISRA, N. N., CULLEN, P. J. "Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge", **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 153–157, 2013. DOI: 10.1016/j.ifset.2013.03.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.001>.
- PÉREZ-PIZÁ, M. C., IBANÉZ, V. N., VARELA, A., *et al.* "Non-Thermal Plasmas Affect Plant Growth and DNA Methylation Patterns in *Glycine max*", **Journal of Plant Growth Regulation**, n. 0123456789, 2021. DOI: 10.1007/s00344-021-10470-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10470-8>.

- PÉREZ-PIZÁ, María C., PREVOSTO, L., GRIJALBA, P. E., *et al.* "Improvement of growth and yield of soybean plants through the application of non-thermal plasmas to seeds with different health status", **Heliyon**, v. 5, n. 4, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01495. .
- RAJAN, A., BOOPATHY, B., RADHAKRISHNAN, M., *et al.* "Plasma processing: a sustainable technology in agri-food processing", **Sustainable Food Technology**, v. 1, n. 9, p. 1–42, 2023. DOI: 10.1039/d2fb00014h. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/fb/d2fb00014h>.
- RAJPUT, V. D., MINKINA, T., AHMED, B., *et al.* "Nano-biochar: A novel solution for sustainable agriculture and environmental remediation", **Environmental Research**, v. 210, n. January, p. 112891, 2022. DOI: 10.1016/j.envres.2022.112891. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112891>.
- RAO, W., LI, Y., DHALIWAL, H., *et al.* "The Application of Cold Plasma Technology in Low-Moisture Foods", **Food Engineering Reviews**, n. 1, 2023. DOI: 10.1007/s12393-022-09329-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12393-022-09329-9>.
- SARANGAPANI, C., MISRA, N. N., MILOSAVLJEVIC, V., *et al.* "Pesticide degradation in water using atmospheric air cold plasma", **Journal of Water Process Engineering**, v. 9, p. 225–232, 2016. DOI: 10.1016/j.jwpe.2016.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.01.003>.
- SEDDIGHINIA, F. S., IRANBAKHS, A., ORAGHI ARDEBILI, Z., *et al.* "Seed Priming with Cold Plasma and Multi-walled Carbon Nanotubes Modified Growth, Tissue Differentiation, Anatomy, and Yield in Bitter Melon (*Momordica charantia*)", **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 87–98, 2020. DOI: 10.1007/s00344-019-09965-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09965-2>.
- SONG, J. S., KIM, S. B., RYU, S., *et al.* "Emerging Plasma Technology That Alleviates Crop Stress During the Early Growth Stages of Plants: A Review", **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. July, p. 14, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00988. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00988/full>.
- STARIČ, P., VOGEL-MIKUŠ, K., MOZETIČ, M., *et al.* "Effects of nonthermal plasma on morphology, genetics and physiology of seeds: A review", **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1–18, 2020. DOI: 10.3390/plants9121736. .
- SUROWSKY, B., FISCHER, A., SCHLUETER, O., *et al.* "Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system", **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 146–152, 2013. DOI: 10.1016/j.ifset.2013.04.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.002>.
- TEN BOSCH, L., KÖHLER, R., ORTMANN, R., *et al.* "Insecticidal effects of plasma treated water", **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 12, 2017. DOI: 10.3390/ijerph14121460. .
- THIRUMDAS, R., KOTHAKOTA, A., ANNAPURE, U., *et al.* "Trends in Food Science & Technology Plasma activated water (AAP): Chemistry , physico-chemical properties , applications in food and agriculture", **Trends in Food Science & Technology**, v. 77, n. September 2017, p. 21–31, 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.05.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.007>.

- TYŚKIEWICZ, R., NOWAK, A., OZIMEK, E., *et al.* "Trichoderma: El estado actual de su aplicación en la agricultura para el biocontrol de hongos fitopatógenos y la estimulación del crecimiento vegetal.", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, 2022. .
- XIANG, L., HARINDINTWALI, J. D., WANG, F., *et al.* "Integrating Biochar, Bacteria, and Plants for Sustainable Remediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants", **Environmental Science and Technology**, v. 56, n. 23, p. 16546–16566, 2022. DOI: 10.1021/acs.est.2c02976. .
- YAN, D., LIN, L., ZVANSKY, M., *et al.* "Improving Seed Germination by Cold Atmospheric Plasma", **Plasma**, v. 5, n. 1, p. 98–110, 2022. DOI: 10.3390/plasma5010008. Disponible em: <https://www.mdpi.com/2571-6182/5/1/8/htm>.
- ZHANG, B., LI, R., YAN, J. "Study on activation and improvement of crop seeds by the application of plasma treating seeds equipment", **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 655, n. April, p. 37–42, 2018. DOI: 10.1016/j.abb.2018.08.004. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.08.004>.
- ZIUZINA, D., VAN CLEYNENBREUGEL, R., TERSARUOLO, C., *et al.* "Cold plasma for insect pest control: *Tribolium castaneum* mortality and defense mechanisms in response to treatment", **Plasma Processes and Polymers**, v. 18, n. 10, 2021. DOI: 10.1002/ppap.202000178. .

CAPÍTULO III

VARIABILIDADE FENOTÍPICA NA POPULAÇÃO M1 DE MELANCIA IRRADIADA COM RAIOS GAMA 60Co.

RESUMO

Visando a busca por incrementar a variabilidade genética dentro do grupo das mini melancias para o mercado, sementes da variedade comercial Sugar Baby foram tratadas com raios gama provenientes de uma fonte de Cobalto-60 (60 Co), tipo Gammacell-220, nas doses: 0 (controle), 100, 200, 300 e 400Gy. Foram avaliadas variáveis relacionadas à germinação, frequências de anomalias, desenvolvimento, floração e frutificação, totalizando 29 variáveis quantitativas e qualitativas, além de 79 marcadores dos tipos RAPD, ISSR e SSR para a detecção de efeitos ao nível molecular. Realizou-se uma análise de variância com teste de Tukey para as variáveis qualitativas e análise de frequências, seguida de um teste Qui-quadrado (X^2). Foi calculado o coeficiente de dissimilaridade de Gower com todas as variáveis para a construção de um fenograma no software R por dosagem. Observou-se que os raios gama têm a capacidade de gerar mudanças em variáveis associadas à germinação ($p < 0.001$); apenas o número de cotilédones não apresentou variações significativas. Nos níveis baixos, as mudanças foram positivas ou com médias iguais ao controle, enquanto nas dosagens altas observou-se uma drástica redução nos parâmetros germinativos. A análise de variância mostrou que apenas as variáveis: número de pecíolos, número de anteras e largura da pétala não sofreram mudanças ocasionadas pelos raios gama. As 25 variáveis avaliadas evidenciaram efeitos altamente significativos ($p < 0,001$) entre as quatro doses, com mudanças positivas no desenvolvimento para as doses 100 e 200 e frequências maiores de efeitos deletérios para as doses 300 e 400Gy. O índice de Gower agrupou a diversidade fenotípica em três grupos para a dose 400, onde dois grupos foram fenotipicamente diferentes. A dose 300 obteve cinco grupos; a dose 200Gy obteve dois grupos distantes do controle e para a dose 100, obteve-se quatro grupos. As mudanças geradas pelos raios gama a nível genético foram identificadas por dois marcadores RAPD (OPM 02 e OPD 08), cinco marcadores ISSR (DiCA3'YG, DiGA3'RC, DiGA5'CR, DiCA5'CY, TriGTG) e um marcador SSR (BVWS00106) específico para a espécie. O uso dos raios gama foi eficiente na geração de variabilidade na mini melancia, com a obtenção de 17 morfotipos diferentes do controle, evidenciando assim a variabilidade fenotípica gerada, ocasionando mudanças observáveis morfolologicamente e detectáveis mediante marcadores moleculares.

Palavras chaves: Mutações, variação fenotípica, epigenético, fixação, polimorfismos.

CHAPTER III
PHENOTYPIC VARIABILITY IN M₁ POPULATIONS OF WATERMELON WITH
GAMMA RAY ⁶⁰Co IRRADIATED.

ABSTRACT

Aiming to increase genetic variability within the group of mini watermelons for the market, seeds of the commercial variety Sugar Baby were treated with gamma rays from a source of Cobalt-60 (⁶⁰Co), type Gammacell-220, in the following doses: 0 (control), 100, 200, 300 and 400Gy. Variables related to germination, frequencies of anomalies, development, flowering and fruiting were evaluated, totaling 29 quantitative and qualitative variables, in addition to 79 markers of the RAPD, ISSR and SSR types to detect effects at the molecular level. An analysis of variance was carried out with Tukey's test for qualitative variables and frequency analysis, followed by a Chi-square test (X²). Gower's dissimilarity coefficient was calculated with all variables to construct a phenogram in the R software by dosage. It was observed that gamma rays have the ability to generate changes in variables associated with germination (p<0.001); only the number of cotyledons did not show significant variations. At low levels, the changes were positive or with averages equal to the control, while at high dosages a drastic reduction in germination parameters was observed. The analysis of variance showed that only the variables: number of petioles, number of anthers and petal width did not undergo changes caused by gamma rays. The 25 variables evaluated showed highly significant effects (p < 0.001) between the four doses, with positive changes in development for doses 100 and 200Gy and higher frequencies of deleterious effects for doses 300 and 400Gy. The Gower index grouped phenotypic diversity into three groups for dose 400, where two groups were phenotypically different. Dose 300 obtained five groups; dose 200Gy obtained two groups far from the control, and for dose 100, four groups were obtained. The changes generated by gamma rays at the genetic level were identified by two RAPD markers (OPM 02 and OPD 08), five ISSR markers (DiCA3'YG, DiGA3'RC, DiGA5'CR, DiCA5'CY, TriGTG) and a species-specific SSR marker (BVWS00106). The use of gamma rays was efficient in generating variability in the mini watermelon, obtaining 17 morphotypes different from the control, thus highlighting the phenotypic variability generated, causing morphologically observable changes and detectable through molecular markers.

Keywords: Mutations, phenotypic variation, epigenetics, fixation, polymorphisms.

1. INTRODUÇÃO

A variação genética é a fonte da diversidade fenotípica, importante na diversificação evolutiva em todas as espécies (Gurushidze, *et al.*, 2016, Jankowicz-Cieslak, *et al.*, 2016). Assim, a variabilidade genética nos cultivos pode ser obtida como resultado de cruzamentos, a partir da seleção de parentais mediante técnicas específicas e tipos de cruzamentos particulares. Também pode ser obtida pela mutação induzida, que é uma das formas de gerar variabilidades além da disponível naturalmente (Maluszynski, *et al.*, 2009)

O uso das mutações induzidas tem sido aplicado desde a década de 1920, e há registro de mais de 3200 cultivares mutantes (Gurushidze, *et al.*, 2016) para diferentes cultivos. Assim, a mutagênese é uma ferramenta no melhoramento de espécies, permitindo a identificação de fenótipos novos e melhorados que podem ser usados em programas de melhoramento (Parry, *et al.*, 2009). Além de ser considerada uma tecnologia líder no fornecimento de novos genes para cultivares melhoradas (Coretchi, *et al.*, 2018), a hibridação, assim como a mutagênese induzida, são métodos alternativos na criação de novas cultivares (Gurushidze, *et al.*, 2016)

A indução de mutações é um processo aleatório e difícil de prever o resultado com precisão (Nakagawa, 2009). Portanto, não é necessário ter conhecimento prévio dos genes ou da função dos genes para gerar com sucesso plantas com características melhoradas (Jankowicz-Cieslak, *et al.*, 2016). Uma das mudanças de interesse em cultivares obtidas pela indução de mutações é ao nível de arquitetura. A arquitetura anã é uma característica agrônômica de valor no melhoramento de melancias obtidas após o processo de mutagênese e está relacionada com o potencial de aumentar o rendimento da fruta e reduzir os custos na mão de obra na cultura (Wei, *et al.*, 2019).

Além do uso de agentes mutagênicos para a geração de indivíduos com características específicas, a identificação dos efeitos posteriores ao tratamento pode ser feita a nível fenotípico e genético. É importante aprimorar a eficiência no melhoramento de culturas, para o qual estratégias como o melhoramento rápido, ferramentas de edição de genoma e fenótipo de alto rendimento são de grande utilidade (AHMAR, GILL, *et al.*, 2020). Sendo que o grupo de mini melancias é um dos mais comerciais, porém a diversidade fenotípica é limitada. Este trabalho teve como objetivo: Avaliar a factibilidade no uso de raios gama na geração de variabilidade fenotípica na população M1 de mini melancia irradiada com raios gama do ^{60}Co , além de selecionar progênies com potencial comercial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Sementes de melancia da variedade Sugar Baby (polinização aberta), da marca Top Seed, com 85% de germinação e 99% de pureza, o conteúdo de umidade do lote de sementes foi medido antes de serem irradiadas ($H=9\%$), posteriormente foram acondicionadas separadamente em sacos de polietileno e enviadas para o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP).

2.2. Tratamento de sementes

As sementes de melancia da variedade Sugar Baby foram submetidas à radiação gama proveniente de uma fonte de Cobalto-60 (^{60}Co), tipo Gammacell-220, com quatro níveis ($Y1=100$, $Y2=200$, $Y3=300$ e $Y4=400\text{Gy}$) e um controle na dose 0.

2.3. Testes de germinação

Cada tratamento foi composto por quatro repetições de 25 sementes, as quais foram semeadas em bandejas de 200 células, contendo areia esterilizada, umedecida com água destilada estéril (na proporção de 600 ml/4 kg de areia) (Brasil, 2009). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação a uma temperatura de 30°C e foram irrigadas com água destilada estéril, diariamente, no mesmo horário, até atingirem a capacidade de campo (CC).

As observações quanto à germinação das sementes foram feitas a cada 24 horas por 14 dias, seguindo as normas para análise de sementes (Brasil, 2009). Foram consideradas como sementes germinadas aquelas com cotilédones totalmente expandidos. Após os 14 dias, foi mensurado o comprimento da parte aérea (CC), contados os pecíolos (NP), número de folhas verdadeiras (NF) e foram tiradas fotos de cada tratamento para obtenção do comprimento do pecíolo (CP), largura dos pecíolos (LP) e comprimento das folhas (CF).

Também foram considerados os seguintes parâmetros associados à germinação, propostos por Ling et al. (2014) e adaptados às características de germinação da melancia:

- Potencial de germinação (PG) (%) = $(\text{Número de sementes germinadas em 7 dias} / \text{número total de sementes}) * 100\%$

- Taxa de germinação (TG) (%) = $(\text{Número de sementes germinadas em 14 dias} / \text{número total de sementes}) * 100\%$

- Índice de velocidade de germinação (IVG) = $\sum (Gt / Dt)$, onde Gt representa o número de sementes germinadas no dia t e Dt representa os dias de germinação.

- LD50: Obtido a partir dos comprimentos das hastes. Considerando o que levou a uma redução do 50% do comprimento da parte aérea. Além estimou-se mediante um modelo de regressão lineal ajustado a linha reta.

2.4. Detecção de mutações mediante marcadores moleculares

2.4.1. Extração

Foram selecionadas plantas jovens que apresentaram mudanças consideráveis por tratamento, folhas novas e sadias foram coletadas. Um bulk com segmentos de folhas de cada planta por tratamento foi formado e, o DNA foi extraído a partir do protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1990). A quantificação de DNA foi realizada em géis de agarose a 1% (p/v), comparando-se visualmente a intensidade das bandas do DNA, com bandas de peso molecular conhecido de 1 kb (cellco). 10 ng μL^{-1} para utilização em reações de PCR.

2.4.2. Análise com os marcadores RAPD, ISSR e SSR

As reações de amplificação com os marcadores RAPD, ISSR e SSR foram realizadas utilizando volumes finais de 12 μL , contendo 10 ng do DNA; 0.2 μM dos primers ISSR e 5 μM dos RAPD e de cada um dos marcadores (forward e reverse) do marcador SSR; 2 mM de cada dNTP; solução tampão 1X (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 mM de MgCl_2 ; 5 μg de BSA e 1 U de Taq DNA polimerase. As sequências dos primers RAPD, ISSR e SSR utilizados estão descritos na Tabela 1 do Anexo.

As reações de amplificação para os marcadores RAPD consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minutos, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 1 min para desnaturação, 1 min a 40°C para e 2 min a 72°C e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 minutos. Para os ISSR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 40s para temperatura de anelamento 45-55 °C por 40s e 72°C por 1min e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 minutos. Para os SSR uma etapa inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 1 minuto para o anelamento em temperatura específica para cada

marcador e 2 minutos a 72 °C para a extensão e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

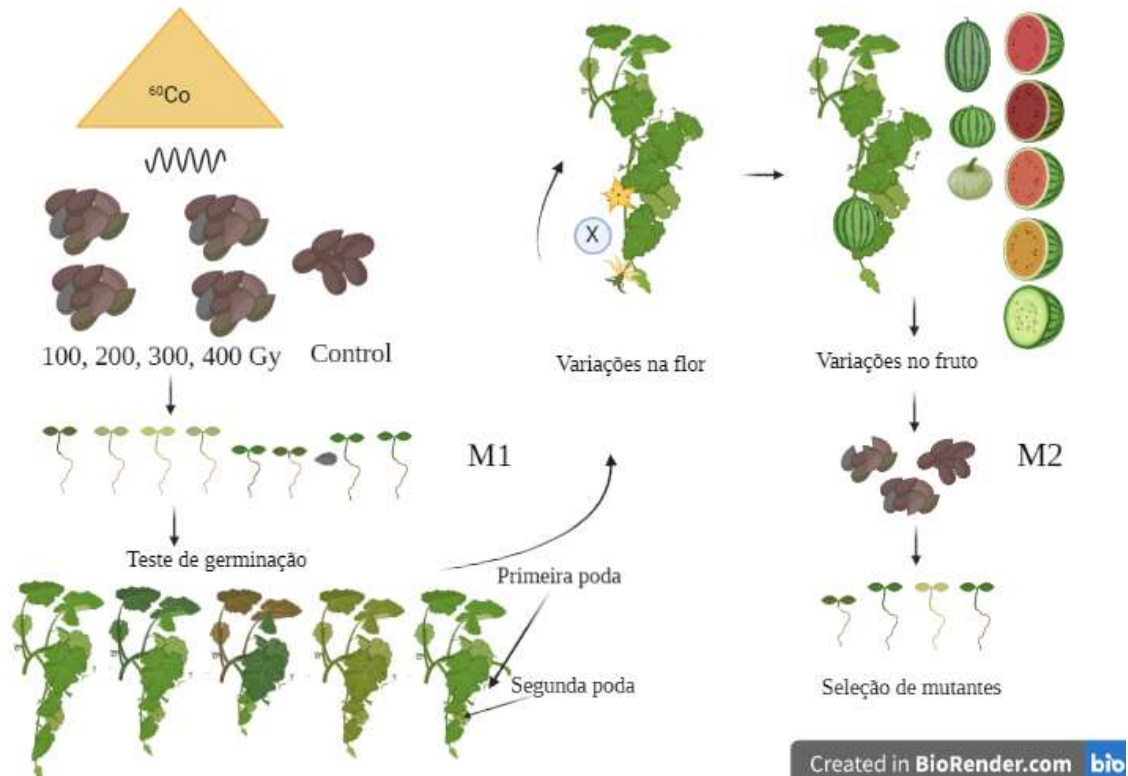
Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1.2 % para RAPD, a 2 % para os ISSR e 3% para os SSR, corados com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹) em tampão TBE 1X a 120 V por 2-3 h e posteriormente, visualizados sob luz UV, usando o sistema de fotodocumentação em gel (Proteinsimple). O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com o padrão de peso molecular de 100 pb “DNA Ladder Plus” (Cellco).

Os resultados das amplificações com os iniciadores ISSR e RAPD nos tratamentos foram analisados em sistema binário para a presença de bandas “1” ou ausência “0”, sendo consideradas somente bandas nítidas e reproduzíveis. Para os marcadores SSR foram observados os polimorfismos por cada marcador avaliado.

2.5. Avaliação do desenvolvimento das plantas

Após os 14 dias de avaliação da germinação, as plantas foram transplantadas para baldes de oito litros em uma mistura de solo e substrato Topstrato numa proporção de 3:1. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (37°C), com irrigação diária até atingir a capacidade de campo. Após 38 dias da sementeira, foi avaliada a taxa de sobrevivência (TS) (%) = (Plantas vivas aos 38 dias * 100) / total de plantas germinadas. Também, foram avaliadas em diferentes estágios de desenvolvimento. Variáveis como número de hastes (NH) foram avaliadas prévio da poda, as plantas foram podadas duas vezes para reduzir o efeito de quimeras (Figura 1) o corte foi feito a um cm do primeiro nó da guia principal após oito dias foi realizada a poda novamente na guia secundária e mantida até o fruto (Amano,2004). Foram avaliadas variáveis quantitativas, como largura média de folha (LMF), comprimento médio de folha (CMF), dias até a floração, total de flores anômalas (TFA), número de pétalas com anomalias (NPA), número de anteras (NA), frequência da presença de anomalia (FPA), número de flores hermafroditas (NFH), dias até a floração (DF), peso da fruta (PF), largura do pericarpo (Lpe), número de sementes do fruto (NS), e variáveis qualitativas como hábito de desenvolvimento (HD), grau de lobulação das folhas (GL), cor das folhas adultas (CF), presença de flores hermafroditas (FH), forma do fruto (FF), padrão de distribuição de cor de fruto (DCF), cor predominante da casca (CPC), cor secundária da casca (CSC) e cor da polpa (CP), levando em consideração a lista dos descritores mínimos para melancia (ECPGR, 2008)

Figura. 1. Procedimento de avaliação das linhas M1 expostas às doses de raios gama e de obtenção de plantas M2 em melancia.



2.6. Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos a uma análise estatística composta com o Teste F e um teste de comparações múltiplas de médias de Tukey ao nível de 95% de probabilidade. Para as variáveis qualitativas, realizou-se uma análise de frequências, seguida de um teste Qui-quadrado (X^2) com um nível de confiança de 95,0% para testar a significância da associação observada entre as variáveis e os níveis avaliados nas categorias em uma tabela de contingência. Calculou-se o coeficiente de dissimilaridade de Gower com todas as variáveis para a construção de um fenograma no software R, versão 3.0.0, por nível.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeitos dos raios gama na germinação e desenvolvimento de plântulas

Os raios gama têm a capacidade de gerar mudanças em variáveis associadas à germinação. Nos níveis baixos, as mudanças foram positivas ou com médias iguais ao

controle; nas dosagens altas, observou-se uma drástica redução nos parâmetros germinativos (Figura 2). Algumas variáveis avaliadas foram significativamente afetadas ($p < 0,001$), como o IVG e TG (%). Para as doses 300 e 400, a diferença em relação às doses 100 e 200, que se mantiveram semelhantes ao controle (Figura 1), indicou que as doses 100 e 200 incrementaram o PG, com médias entre 40% e 45%, em relação ao controle com 21%. Os valores inferiores ao controle foram obtidos pelas doses 300 e 400 (Tabela 1).

Figura. 2. Efeitos das doses dos raios gama na germinação de mini melancia variedade Sugar Baby, a) controle, b) 100Gy, c) 200 Gy, d) 300 Gy e 400 Gy.



O desenvolvimento das plântulas de melancia foi afetado pelas doses de raios gama. A partir da dosagem 200, o crescimento foi reduzido, com CH de 4,49 cm no controle e 1,57 cm para a dose 400. Um comportamento similar foi observado em LC, CC e NF, com redução apenas nas doses 300 e 400. Para CF, todas as doses geraram uma redução no tamanho. Ao contrário do mencionado anteriormente, o número de cotilédones NC não foi afetado pelas dosagens de raios gama. A sobrevivência das plantas após os 15 dias de transplante foi afetada pelas dosagens aplicadas, onde TS viu-se reduzida a partir da dose 200, com 96,7%, para a dose 300, a sobrevivência baixou para 21,5% em relação à dose 200 e 42,7% para 400 em relação à dose 300 (Tabela 1).

Tabela. 1 Influência dos raios gama na germinação e desenvolvimento de plântulas de mini melancia variedade Sugar Baby.

TRAT	IVG	±SD		PG(%)	±SD	
Y100	4.23	0.7	a	45	14.1	a
Y200	3.96	0.5	b	40	10.6	a
Y300	2.18	0.8	b	10	10.6	b
Y400	2.35	0.7	a	9	11.3	b
Controle	3.85	0.4	a	21	2.82	b
DMS	0.84			17.01		
MG	3.31			25		
F	26.9		***	19.7		***
TRAT	TG(%)	±SD		CH(cm)	±SD	
Y100	97	12.2	a	4.81	1.1	a
Y200	90	7.21	a	3.42	0.1	b
Y300	63	11.9	b	2.23	0.8	c
Y400	59	14.7	b	1.57	1.2	d
Controle	90	7.21	a	4.49	0.8	a
DMS	19.4			0.57		
MG	79.8			3.31		
F	16.5		***	119		***
TRAT	NC(ud)	±SD		CC(cm)	±SD	
Y100	2	0	a	1.96	0.1	a
Y200	2	0	a	1.89	0.1	a
Y300	2	0	a	1.52	0.2	b
Y400	1.98	0.01	a	1.24	0.4	c
Controle	2	0	a	2.06	0.2	a
DMS	0.02			0.21		
MG	2			1.78		
F	0.12		ns	35.9		***
TRAT	LC(cm)	±SD		NF(ud)	±SD	
Y100	1.64	0.17	a	1	0.11	a
Y200	1.23	0.11	b	1.03	0.13	a
Y300	1.15	0.17	b	0.56	0.19	b
Y400	1.08	0.22	b	0.34	0.35	c
Controle	1.69	0.21	a	1.04	0.14	a
DMS	0.21			0.17		
MG	1.39			0.84		
F	28.21		***	6.92		***
TRAT	CF(cm)	±SD		TS(%)	±SD	
Y100	1.25	0.2	ab	100	13.5	a
Y200	1.07	0.1	b	96.7	11.2	ab
Y300	0.58	0.3	c	75.2	4	b
Y400	0.34	0.5	c	32.5	34.2	c
Controle	1.4	0.3	a	100	13.5	a
DMS	0.24			24.5		
MG	0.99			80.9		
F	13.4		***	28.4		***

LMF=largura das folhas, CMF=comprimento das folhas, NH=número de hastes, DF=dias até a floração, TFA=total de flores anômalas, NPA=número de pétalas anômalas, NA=número de anteras, NFH=número de flores hermafroditas, FPA=frequência de plantas anômalas, PF=peso da fruta, Lpe=largura do pericarpo (Lpe), NS=número de sementes. *, **, *** Significado ao nível de probabilidade 0,05, 0,01, 0,001. DMS= diferença menos significativa, MG= média, F = Valor de F. Fonte Rosero (2024)

Para a mini melancia Sugar Baby, os efeitos das doses de 100 e 200Gy não afetaram negativamente a germinação, apresentando altas taxas de germinação (TG) de 97% e 90%, respectivamente, foram e TG de 63% e 59% para as doses altas 300 e 400 Gy. O comportamento da Sugar Baby foi superior a reportes feitos para outras variedades de melancia. Pesquisas feitas para as variedades Kaolack e Crimson Sweet mostraram radiosensibilidade nas doses 100 e 200 Gy com TG de 83 e 60% respectivamente. Para as doses 300 e 400 Gy o comportamento foi semelhante com Sugar Baby com TG de 70 e 40% para Kaolack e Crimson Sweet (Ernest, *et al.*, 2020).

Quanto à taxa de sobrevivência, a variedade Sugar Baby apresentou altas taxas na dose de 100 e no controle, ambos com 100%, que foram reduzidas a partir da dose de 200 para 96,7%. O comportamento da dose de 200 para Sugar Baby foi semelhante ao obtido para Kaolack na dose controle (96,66%) (Paul Ernest, *et al.*, 2020), evidenciando uma baixa radiosensibilidade aos Gy de Sugar Baby, com uma LDS50 de 325,81 Gy em comparação com Kaolack e Crimson Sweet, que possuem LDS50 de 225,40 Gy e 221,56 Gy, respectivamente.

A curva de crescimento mostra um comportamento positivo até a dosagem de 100 Gy, com um leve incremento. Após essa dosagem, o crescimento foi severamente afetado, apresentando uma notável redução (Figura 3). A análise de variância (ANOVA) revelou uma relação estatisticamente significativa entre TRC (Taxa de Redução de Crescimento) e a dosagem ($p < 0,05$) com 95,0% de confiança, e um coeficiente de correlação igual a -0,98855. Indicando forte relação negativa entre as variáveis. Dessa forma, a taxa de redução de crescimento teve um comportamento linear negativo, demonstrando que, para cada incremento na dosagem, a tendência era reduzir significativamente o crescimento. De acordo com a equação linear, a LD50 para a mini melancia Sugar Baby foi de 325,81 Gy (Tabela 2).

Figura. 3. Relação da taxa de relativa de crescimento e as diferentes doses de raios gama Co-60 testadas para a variedade de melancia Sugar Baby.

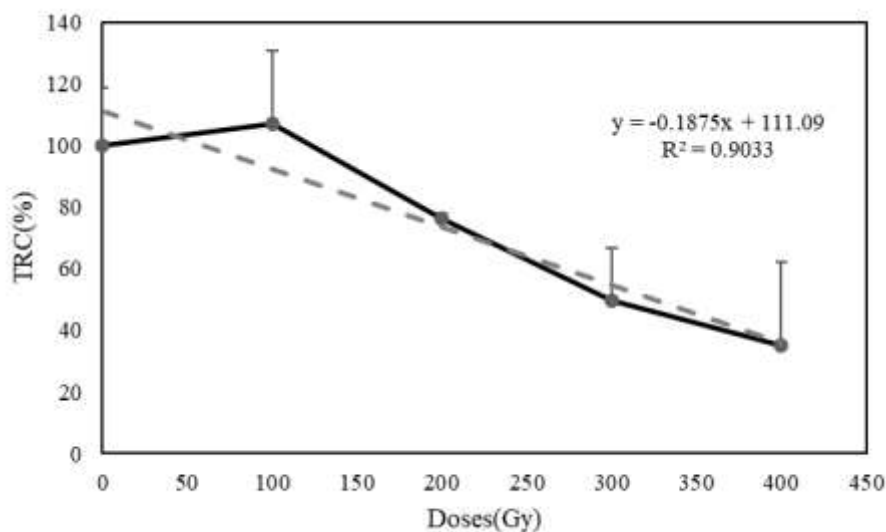


Tabela. 2. Cálculo da LD50 para s raios gama 60Co em melancia da variedade Sugar Baby.

Equação linear	R ²	LD50%(GY)
$y = -0.1875x + 111.09$	0.9033	325.8133

Fonte: Rosero (2024)

3.2. Variações fenotípicas associadas aos raios gama do Cobalto-60 em melancia

Os raios gama possuem a capacidade de gerar variações em características associadas à morfologia, desenvolvimento e fenologia da mini melancia. Entre todas as variáveis avaliadas, apenas Lpe (ns) não apresentou variação; as demais variáveis mostraram diferenças significativas ($p < 0,001$). A aplicação de raios gama parece ter relação com as mudanças na arquitetura da planta. Todas as doses provocaram alterações na quantidade de hastes (NH), incrementando para mais de uma haste, inclusive com plantas com até 4 hastes; os valores mais altos foram obtidos nas doses 200 e 400Gy (Tabela 3). Mesmo com baixa frequência, ocorreram mudanças no hábito de crescimento (HD), onde algumas plantas, representando 0,58% da população total avaliada, apresentaram um hábito de crescimento determinado - arbustivo, para os tratamentos 100 e 300Gy (Tabela 4).

As variáveis de morfologia de folha apresentaram variações quanto ao tamanho; o LMF mostrou plantas com folhas de menor tamanho (8.1cm) na dose 300 e folhas grandes

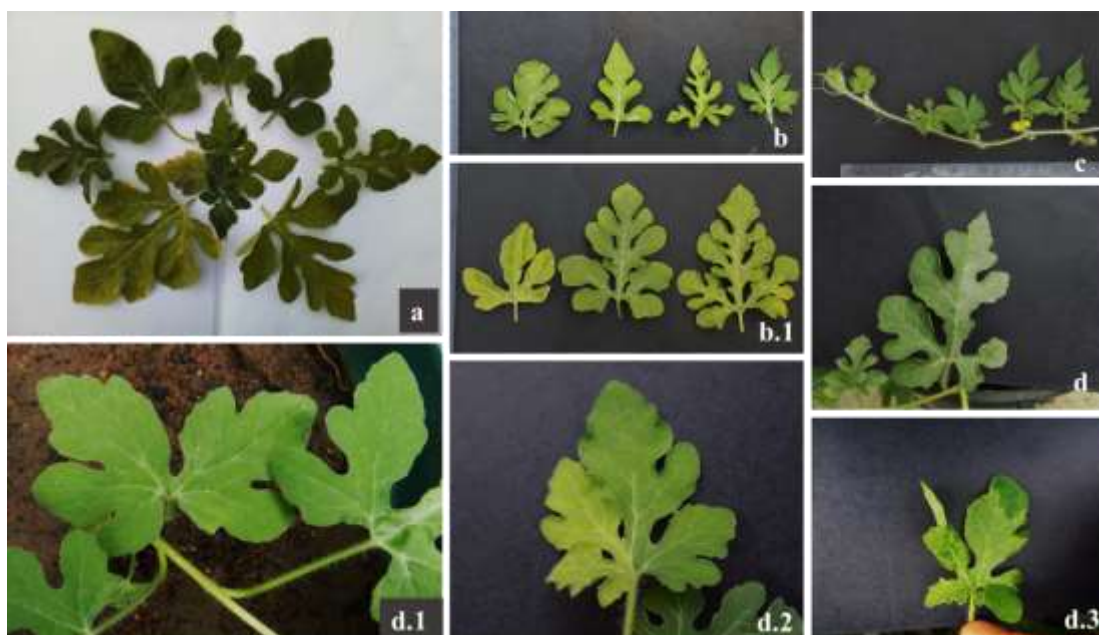
(9.53 cm) nas doses 200. Uma mudança semelhante foi observada em CMF (8.11 cm), com valores baixos para a dose 300 (Tabela 3). Características morfológicas da folha, como o grau de lobulação, mostraram uma diversidade morfológica observada pelos efeitos dos raios gama (Figura 4b, b1), incluindo variações nas margens, mudanças no tipo de folha (Figura 4a, 4c) ou folhas com deformações e variações na cor (Figura 4d2). Esta última variação foi apresentada em duas novas categorias, 2 e 3 (verde claro e verde escuro), com frequência de 4,62% de verde claro para todas as doses e 0,87% nas doses 100 e 300 para verde escuro (Tabela 4). Os baixos níveis de clorofila observados dentro da população avaliada geraram indivíduos com folhas verde claras, sendo nas frequências de 0,58% e 0,29% nas doses de 100 e 300 respectivamente. Essas mudanças podem estar associadas a genes envolvidos na biossíntese da clorofila (HEMA, HEMD, CHL1, CHLM e CAO), o que pode explicar por que o conteúdo de pigmento de clorofila foi menor. Variações nos genes do metabolismo da clorofila, como PDS, ZDS e VDE (Xu, *et al.*, 2023), podem estar associadas à presença de indivíduos com pigmentações mais intensas de verde, como os 4,62% de indivíduos apresentados neste estudo.

Tabela. 3. Influência dos raios gama no desenvolvimento e morfologia em cultivar de melancia Sugar Baby.

Dose Gy	LMF (cm)	±SD		CMF (cm)	±SD		NH (ud)	±SD		DF (dias)	±SD	
100	8.93	0.1	abc	8.55	0.2	ab	1.3	0.03	ab	64	1.71	bc
200	9.53	0.53	c	9.53	0.5	b	1.7	0.24	c	60	1.16	a
300	8.1	0.48	a	8.11	0.5	a	1.3	0.01	ab	63	0.63	ab
400	9.44	0.46	bc	9.41	0.5	b	1.6	0.19	bc	65	2.01	c
Controle	8.24	0.38	ab	8.57	0.1	ab	1	0.21	a	60	1.47	a
F	5.43		***	6.19		***	14		***	6.5		***
MG	8.78			8.77			1.3			62		
DMS	1.27			1.05			0.3			4.1		
Dose	TFA (ud)	±SD		NPA (ud)	±SD		NA (ud)	±SD		NFH (ud)	±SD	
100	1.25	0.14	b	5.16	0.5	b	2.83	0.13	b	0.66	0.13	b
200	1.16	0.08	b	5.16	0.5	b	3.05	0.28	b	0.66	0.13	b
300	1.12	0.06	b	5.5	0.8	b	3.62	0.69	b	0.25	0.15	ab
400	1.66	0.43	b	5.5	0.8	b	3.66	0.72	b	0.5	0.02	ab
Controle	0	0.73	a	0	3.1	a	0	1.86	a	0.1	0.33	a
F	14.19		***	30.2		***	19.4		*	4.39		**
MG	1.038			4.41			2.64			0.47		
DMS	0.63			1.74			1.34			0.59		
Dose	FPA (%)	±SD		PF (gr)	±SD		Lpe (mm)	±SD		NS (ud)	±SD	
100	14.64	3.86	ab	177	5.4	bc	5	0.04	a	37	1.19	ab
200	14.73	3.79	ab	207	27	c	5.3	0.15	a	41	1.44	b
300	24.34	2.99	ab	119	36	a	4.8	0.16	a	23	11.2	a
400	46.79	18.9	b	159	7.4	ab	4.7	0.26	a	40	1.25	b
Controle	0	14.2	a	156	9.3	ab	5.2	0.14	a	48	6.57	b
F	3.06		*	9.4		***	0.7		ns	7.2		***
MG	20.1			169			5			39		
DMS	43.14			48.4			1.3			15		

LMF=largura das folhas, CMF=comprimento das folhas, NH=número de hastes, DF=dias até a floração, TFA=total de flores anômalas, NPA=número de pétalas anômalas, NA=número de anteras, NFH=número de flores hermafroditas, FPA=frequência de plantas anômalas, PF=peso da fruta, Lpe=largura do pericarpo (Lpe), NS=número de sementes. *, **, *** Significado ao nível de probabilidade 0,05, 0,01, 0,001. DMS= diferença menos significativa, MG= média, F = Valor de F.

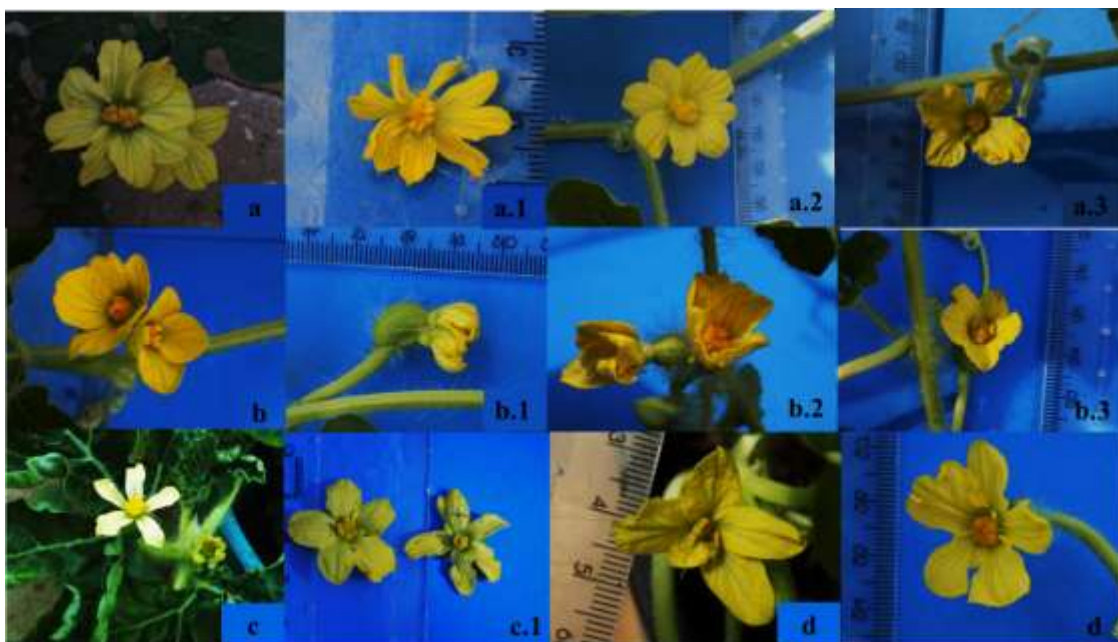
Figura. 4. Influência das doses de raios gama na morfologia foliar da melancia variedade Sugar Baby. a) Diversidade de formas nas folhas, b) variações nas margens e b.1) graus de lobulação, c) mudanças no tipo da folha, d) folha com deformação lateral, d.1 - d.3) folha com deformação sem segmento do ápice, d.2-d3) variações na cor.



A floração foi afetada, apresentando um incremento médio de cinco dias, geralmente acontece aos 60 dias, mas na dose 300 Gy, oscilo nos 65 (Tabela 3). Houve casos de indivíduos com até 80 dias de floração na dose 400. Quanto à morfologia, foram observadas algumas anomalias na estrutura floral (Figura 5). Constatou-se que houve a ocorrência de flores anômalas (TFA) em todas as doses, especialmente nas doses 400 e 100, incluindo flores siamesas onde as duas eram masculinas, masculina e feminina ou feminina (Figura 5 b, b.1, b.2). Também foi constatado a presença de pétalas anômalas (NPA) e teve incrementos, especialmente nas doses altas 300 e 400, com flores com mais de 5 pétalas (Tabela 3), apresentando flores com até nove pétalas, com variações de cor e morfologia nas pétalas (Figura 5a e 5a1), além de um número inferior entre três e quatro (Figura 5a3).

O NA apresentou variações para todas as dosagens avaliadas, com uma redução no número para a dose 100, com flores de duas anteras, e até quatro anteras nas doses 300 e 400. Para o NFH, a quantidade se incrementou nas doses 100 e 200 (Tabela 3) (Figura 5b3), enquanto, na floração, as frequências foram superiores nas doses 100, 200 e 300 para FH, com um total de 5,22% (Tabela 4). Outras anomalias associadas à morfologia das pétalas foram observadas, com mudanças em todas as pétalas, gerando pétalas finas, com bordas irregulares (Figura 5c e 5c1) ou com tamanho irregular de pétalas, como observado na Figura 5. d, d.1 (FPA) A dosagem de 400 obteve até 46,79% do total das anomalias geradas pelos raios gama (Tabela 4).

Figura. 5. Anomalias nas flores geradas pelas doses de raios gama em melancia, variedade Sugar Baby. a) variações no número de pétalas e anteras Anomalias nas flores geradas pelas doses de raios gama em melancia, variedade Sugar Baby. a) variações no número de pétalas e anteras a.1) superior a cinco pétalas de forma alargadas, a.2) superior a cinco pétalas de forma redondeada, a.3) número inferior a cinco pétalas b) formação de flores siameses, b.1) flor masculinas e femininas fusionadas, b.2) das flores femininas fusionadas b.3) flor hermafrodita c) variações na forma e cor das pétalas, c.1) flores assimétricas, d) assimetria ou fusão das pétalas

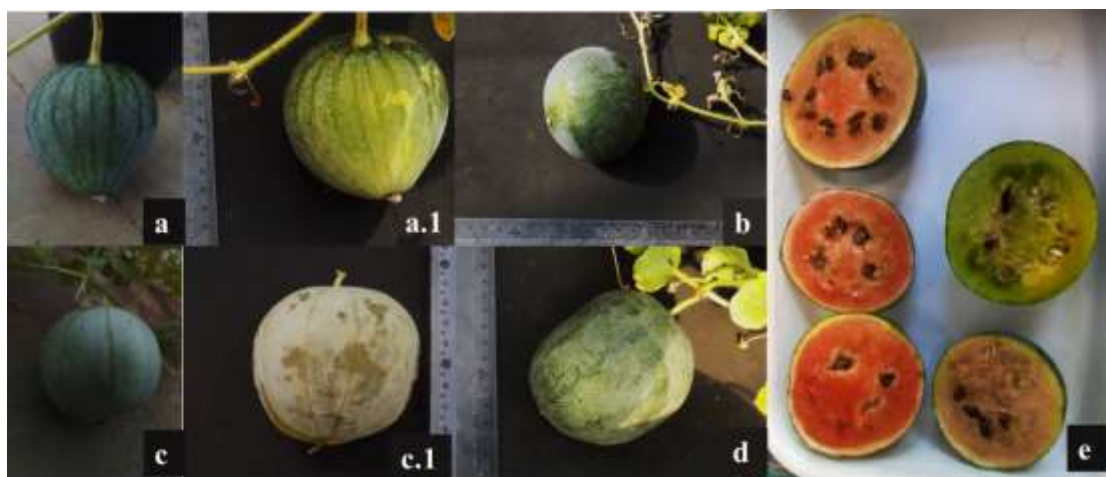


Variações associadas à floração também foram observadas, como flores siamesas, flores com duas até quatro anteras, nas doses de 300 e 400. Esses indivíduos poderiam ser usados na compreensão da biologia floral da melancia. Dosagens inferiores já foram testadas no uso da obtenção de embriões haploides a partir das doses de 275Gy (Taşkin, *et al.*, 2013).

As dosagens utilizadas também geraram efeitos no peso do fruto (PF), sendo constatado frutos de menor peso médio na dose 300 Gy, ao contrário do obtido na dose 200, que gerou frutos com os maiores pesos (207 g) (Tabela 3). A forma do fruto (FF) também foi uma característica onde se verificou variação, surgindo duas categorias novas de fruto: achatada e elíptica, além da forma redonda típica das Sugar Baby (Figura 6a, b, d). As variações no fruto são mostradas na figura 6, e a distribuição da cor teve uma categoria (3) adicional para os indivíduos tratados, correspondendo a frutos com faixas largas numa frequência de 1,76% para as doses 200, 300 e 400 (Tabela 4).

A cor da casca foi afetada pelos raios gama, apresentando duas novas categorias para a cor primária, 3 e 4 (verde claro e verde amarelado). No caso de CSC, a categoria 3 teve 0,87% de frequência (Figura 6c). A cor da polpa também sofreu mudanças, com a obtenção de três novas categorias nas plantas dos tratamentos, nas frequências de 5,81%, 3,78% e 5,52% (Tabela 4), correspondendo a vermelho intenso, laranja e verde (Figura 6e). O Lpe não teve variações significativas para as doses, enquanto o NS teve uma redução para a dose 300, que corresponde aos frutos com menor peso (Tabela 3).

Figura. 6. Influência dos raios gama na variação morfológica dos frutos. a) Variações na forma do fruto a- a1, b) redução do tamanho dos frutos, c) variações na epiderme do fruto, d) incremento de tamanho e mudanças na forma, e) variações na cor da polpa.



Além da boa resposta para as doses testadas, a Sugar Baby apresentou características fenotípicas interessantes para o melhoramento genético. Uma delas foi a mudança no hábito de desenvolvimento e levando em consideração que a arquitetura anã é uma característica agrônômica importante e valiosa no melhoramento da melancia (Wei, *et al.*, 2019), os raios gama foram eficientes na obtenção de indivíduos com essa característica. Fenotipicamente, a mudança no hábito de desenvolvimento foi mais evidente em plântulas e após o primeiro mês. Mesmo quando as mudanças na clorofila das folhas estiveram associadas aos hábitos de crescimento arbustivo, e isso afetou negativamente a sobrevivência das plantas, nos níveis baixos, só geraram cores das folhas verde claras e hábitos de crescimento arbustivo.

Tabela. 4. Efeitos dos raios gama nas frequências de variáveis morfológicas na M1.

Dose	HD			GL			
	1	2	Total f	3	5	7	Total f
100	1	99	100	18	38	44	100
	0.29%	0	0	5.20%	10.98%	12.72%	28.90%
200	0	85	85	3	60	22	85
	0.00%	0	0	0.87%	17.34%	6.36%	24.57%
300	1	50	51	10	29	12	51
	0.29%	14.45%	14.74%	2.89%	8.38%	3.47%	14.74%
400	0	19	19	3	12	4	19
	0.00%	5.49%	5.49%	0.87%	3.47%	1.16%	5.49%
Controle	0	91	91	0	43	48	91
	0.00%	26.30%	26.30%	0.00%	12.43%	13.87%	26.30%
Total C.	2	344	346	34	182	130	346
X2	0.58%	99.42%	100.00%	9.83%	52.60%	37.57%	100.00%
E	3.14			49.004			
Gl	4			8			
p	0.5346			ns			
				0.001			

Categoria	FH			CF			
	0	1	Total f	1	2	3	Total f
100	94	6	100	92	6	2	100
	27.25%	1.74%	28.99%	26.59%	1.73%	0.58%	28.90%
200	77	8	85	84	1	0	85
	22.32%	2.32%	24.64%	24.28%	0.29%	0.00%	24.57%
300	49	2	51	42	8	1	51
	14.20%	0.58%	14.78%	12.14%	2.31%	0.29%	14.74%
400	18	1	19	18	1	0	19
	5.22%	0.29%	5.51%	5.20%	0.29%	0.00%	5.49%
Controle	89	1	90	91	0	0	91
	25.80%	0.29%	26.09%	26.30%	0.00%	0.00%	26.30%
Total C.	327	18	345	327	16	3	346
X2	94.78%	5.22%	100.00%	94.51%	4.62%	0.87%	100.00%
E	6.39			25.511			
Gl	4			8			
p	0.1719			ns			
				0.0013			

Categoria	FF						
	0	1	2	3	Total f		
100	5	7	76	12	100		
	1.45%	2.03%	22.09%	3.49%	29.07%		
200	6	4	65	10	85		
	1.74%	1.16%	18.90%	2.91%	24.71%		
300	6	1	43	1	51		
	1.74%	0.29%	12.50%	0.29%	14.83%		
400	2	1	14	2	19		
	0.58%	0.29%	4.07%	0.58%	5.52%		
Controle	2	0	87	0	89		
	0.58%	0.00%	25.29%	0.00%	25.87%		
Total C.	21	13	285	25	344		
X2	6.10%	3.78%	82.85%	7.27%	100.00%		
E	30.385						
Gl	12						
p	0.0024						
	**						

DCF					
Categoria	0	3	4	5	Total f
100	8	0	12	80	100
	2.35%	0.00%	3.52%	23.46%	29.33%
200	10	2	15	58	85
	2.93%	0.59%	4.40%	17.01%	24.93%
300	12	2	8	28	50
	3.52%	0.59%	2.35%	8.21%	14.66%
400	2	2	4	11	19
	0.59%	0.59%	1.17%	3.23%	5.57%
Controle	2	0	12	73	87
	0.59%	0.00%	3.52%	21.41%	25.51%
Total C.	34	6	51	250	341
X2	9.97%	1.76%	14.96%	73.31%	100.00%
E	35.346				
Gl	12				
p	0.0004 ***				

CSC					
Categoria	0	1	3	4	Total f
100	5	28	1	66	100
	1.45%	8.14%	0.29%	19.19%	29.07%
200	6	26	1	52	85
	1.74%	7.56%	0.29%	15.12%	24.71%
300	6	6	1	38	51
	1.74%	1.74%	0.29%	11.05%	14.83%
400	2	3	0	14	19
	0.58%	0.87%	0.00%	4.07%	5.52%
Controle	2	10	0	77	89
	0.58%	2.91%	0.00%	22.38%	25.87%
Total C.	21	73	3	247	344
X2	6.10%	21.22%	0.87%	71.80%	100.00%
E	24.35				
Gl	12				
p	0.0182 **				

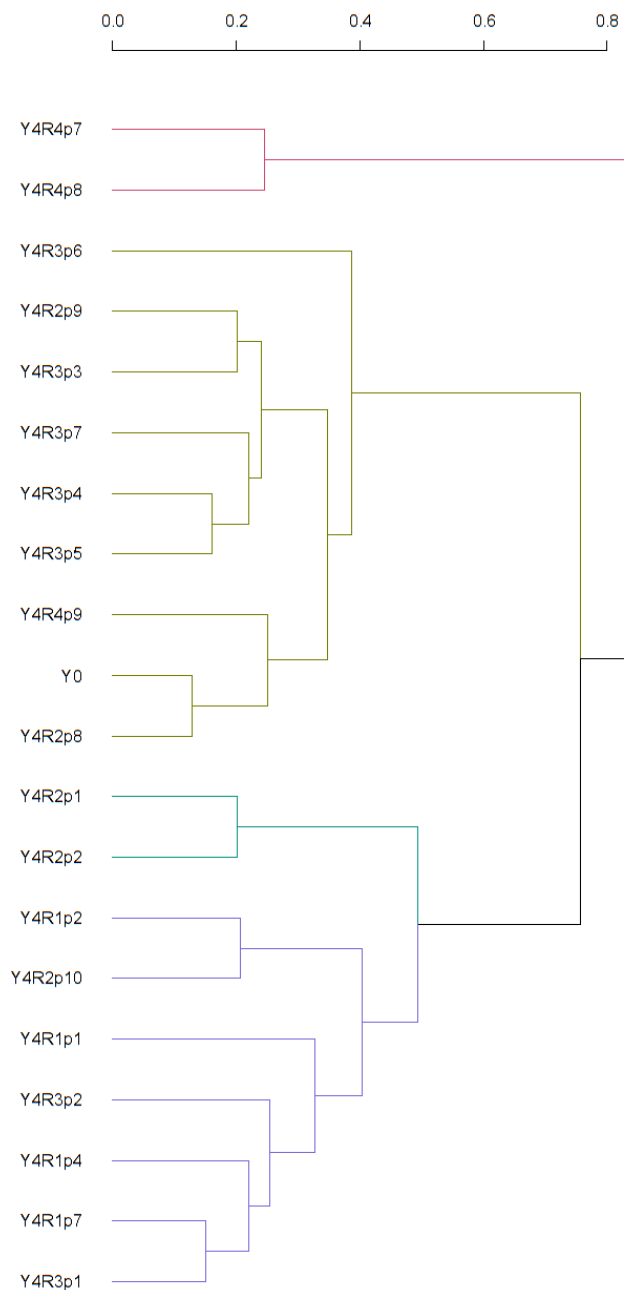
CPC							
Categoria	0	1	2	3	4	5	Total f
100	5	17	45	25	8	0	100
	1.45%	4.94%	13.08%	7.27%	2.33%	0.00%	29.07%
200	6	16	49	11	3	0	85
	1.74%	4.65%	14.24%	3.20%	0.87%	0.00%	24.71%
300	6	12	16	16	1	0	51
	1.74%	3.49%	4.65%	4.65%	0.29%	0.00%	14.83%
400	2	3	7	6	1	0	19
	0.58%	0.87%	2.03%	1.74%	0.29%	0.00%	5.52%
Controle	2	4	67	0	0	16	89
	0.58%	1.16%	19.48%	0.00%	0.00%	4.65%	25.87%
Total C.	21	52	184	58	13	16	344
X2	6.10%	15.12%	53.49%	16.86%	3.78%	4.65%	100.00%
E	114.01						
Gl	20						
p	0.0001 ***						

Categoria	CP						Total f
	0	1	2	3	4	5	
100	5	20	10	50	6	9	100
	1.45%	5.81%	2.91%	14.53%	1.74%	2.62%	29.07%
200	6	17	7	45	3	7	85
	1.74%	4.94%	2.03%	13.08%	0.87%	2.03%	24.71%
300	6	15	2	25	2	1	51
	1.74%	4.36%	0.58%	7.27%	0.58%	0.29%	14.83%
400	2	3	1	9	2	2	19
	0.58%	0.87%	0.29%	2.62%	0.58%	0.58%	5.52%
Controle	2	14	0	73	0	0	89
	0.58%	4.07%	0.00%	21.22%	0.00%	0.00%	25.87%
Total C.	21	69	20	202	13	19	344
X2	6.10%	20.06%	5.81%	58.72%	3.78%	5.52%	100.00%
E	46.865						
Gl	20						
p	0.0006		***				

3.3. Diversidade fenotípica gerada pelos raios gama

A diversidade fenotípica resultante dos efeitos dos raios gama foi agrupada por tratamentos. A dose alta deste estudo (400Gy) gerou quatro grupos, sendo o grupo I composto por dois indivíduos que se encontram distantes dos grupos restantes, com uma dissimilaridade de 0,8. Esses dois indivíduos (Y4R4P7 e Y4R4P8) apresentaram diversos distúrbios fisiológicos, como folhas amareladas, crescimento reduzido tanto em haste quanto em folhas, e frutos sem sementes. O grupo II, composto por nove indivíduos, foi o que apresentou menor quantidade de variações e manteve características semelhantes ao controle, com algumas anomalias na floração. O grupo III, semelhante ao IV, apresentou mudanças no desenvolvimento, alguns com frutos pequenos ou hastes curtas (Figura 7).

Figura. 7. Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower agrupando a diversidade fenotípica relacionada a mudanças morfológicas e distúrbios fisiológicos do tratamento 400Gy (Y4), agrupada em quatro grupos fenotípicos.



Constatou-se a formação de cinco grupos diferentes, quando a dose 300 Gy é aplicada, sendo esta dose a que gerou mais diversidade fenotípica. O grupo I, composto por cinco indivíduos, não apresentou a capacidade de gerar frutos com sementes ou frutos com flores geralmente com anomalias, com uma dissimilaridade >1 . Os grupos II (5) e III (12), a 0,8 de distância do restante dos grupos, foram formados por indivíduos com variações na morfologia de folhas, cor e frutos com casca diferenciada e de tamanho reduzido. O grupo IV (11), V (4)

e VI (12) caracterizaram-se por ter leves mudanças na morfologia, especialmente uma redução nos tamanhos das folhas para os grupos IV e V, a uma distância de 0,6. O grupo VI teve algumas leves mudanças pequenas nas flores, mas conservava muitas características do controle (Figura 8).

Aplicações com dose 200 Gy gerou cinco grupos, onde quatro deles estão distantes > 1 do I, correspondendo a indivíduos que tiveram problemas para geração de flores e frutos (6 indivíduos). O grupo II encontra-se a uma distância de 0,8 dos grupos restantes, composto por 22 indivíduos que apresentaram plantas vigorosas, com folhas grandes, número de hastes > 1 , e frutos grandes com valores de peso de fruto superiores e com variação em forma de fruto. Os grupos restantes conservaram características semelhantes ao controle, com algumas mudanças em características de folha, lobulação e cor da folha, além de frequências em flores hermafroditas (Figura 9).

Semelhante à dose 200, a dose de 100Gy gerou seis grupos. O grupo I (5 indivíduos) apresentou variações no número de flores, especialmente de flores hermafroditas, sendo o grupo mais distante >1 . O grupo II estava a uma distância $> 0,8$ dos outros grupos e foi composto por 20 indivíduos que apresentam variações na lobulação das folhas e cor da polpa. Os grupos III e IV formaram um grupo distintivo, com variações do controle, como, por exemplo, distribuição secundária das cores da casca e cor da polpa. Já os indivíduos dos grupos V e IV apresentam fenótipo parecido com o controle, com leves mudanças na floração e desenvolvimento (Figura 10).

Figura. 8. Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower agrupando a diversidade fenotípica relacionada às variações morfológicas causadas pelo tratamento 300Gy (Y3), agrupada em seis grupos fenotípicos.

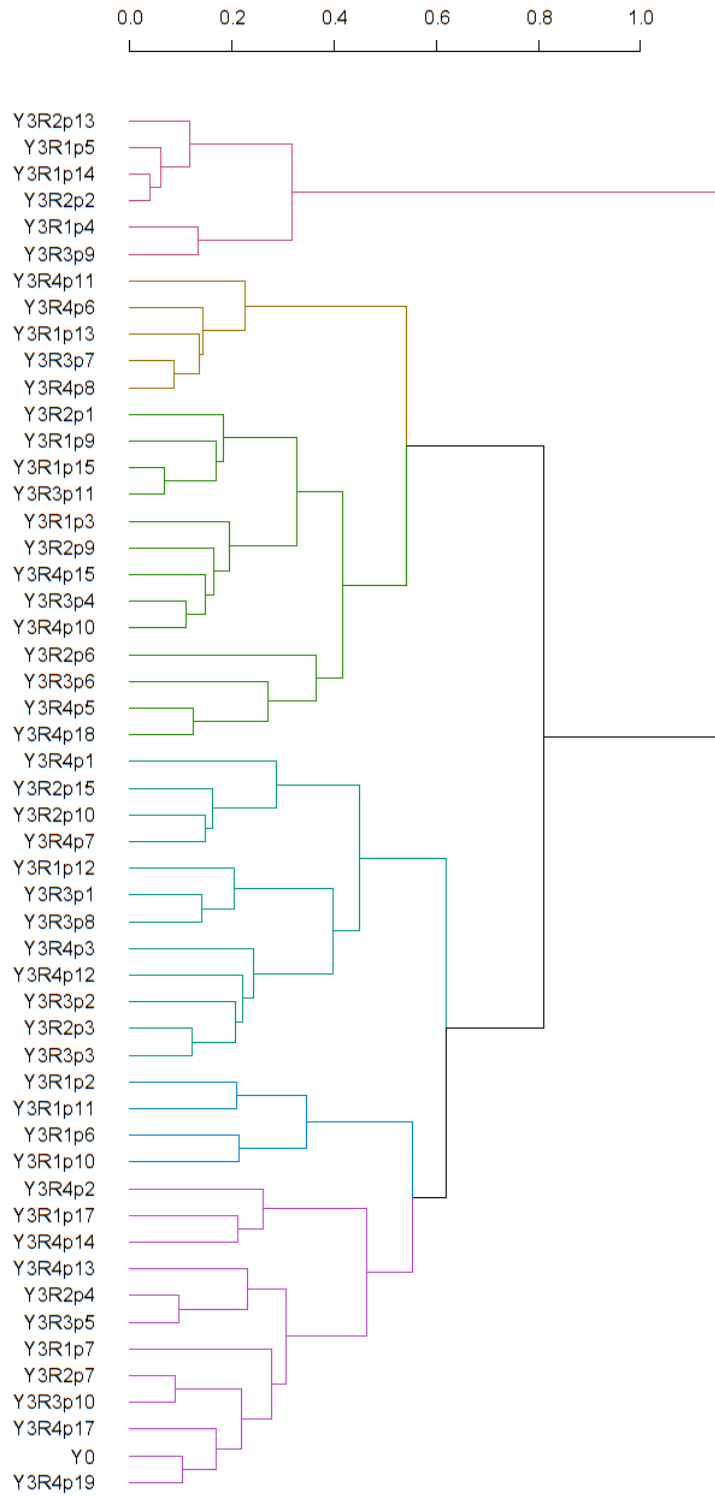


Figura. 9. Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower demonstrando a diversidade fenotípica do tratamento 200Gy (Y2) em melancia, agrupada em cinco grupos fenotípicos

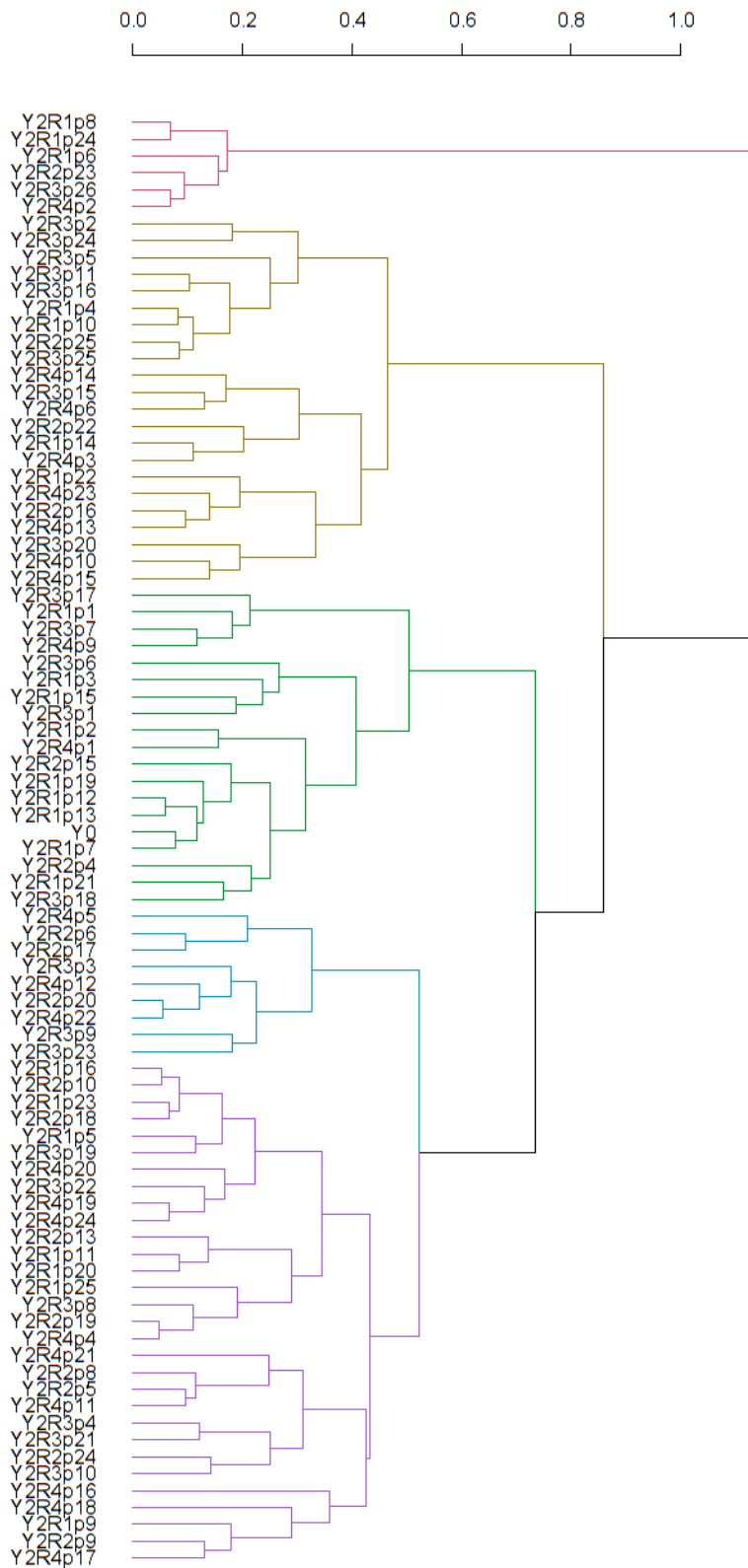
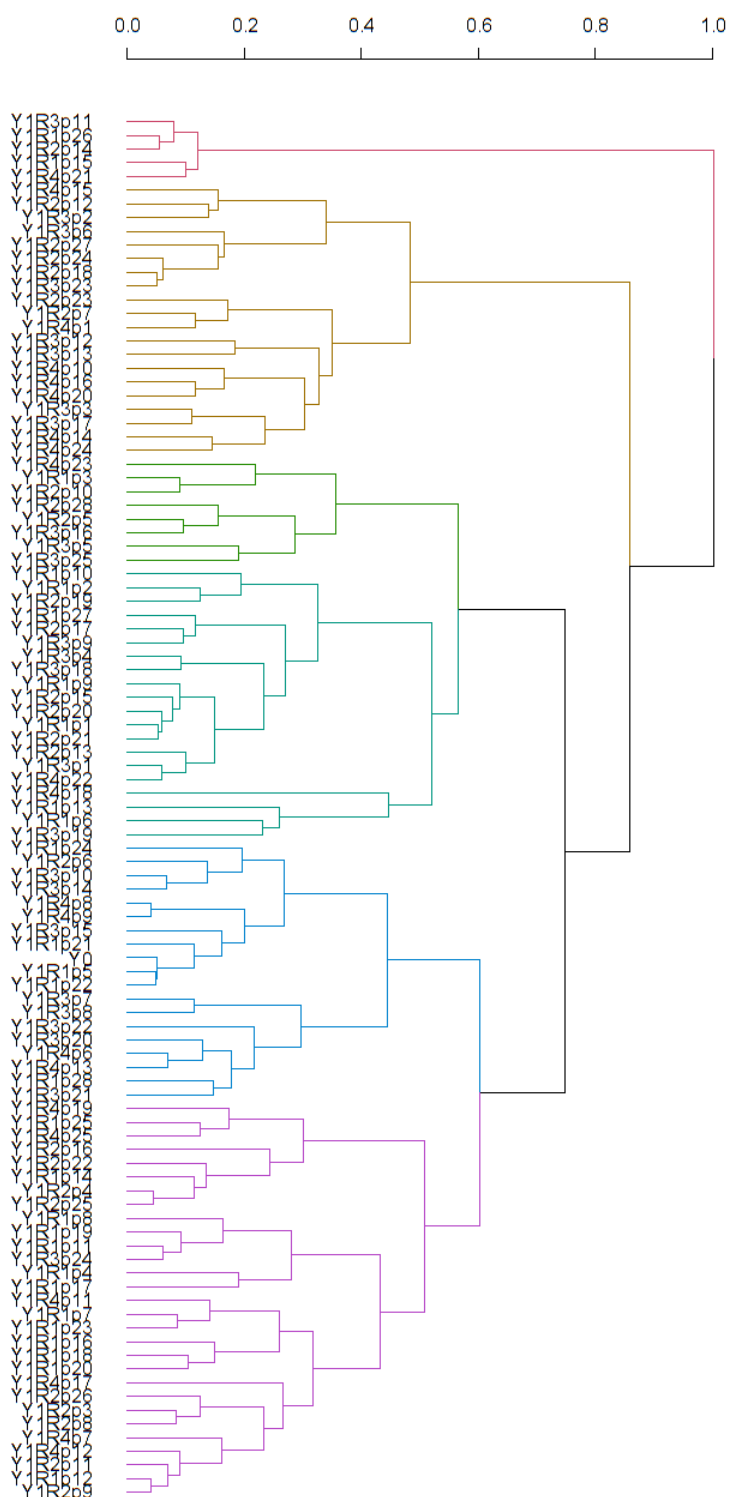


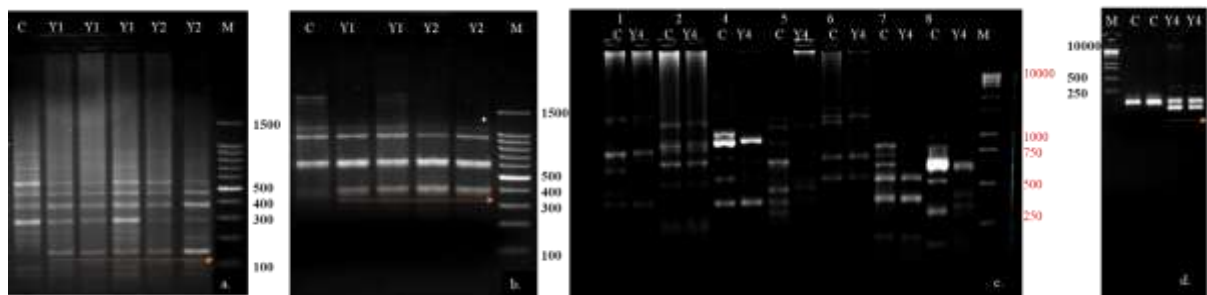
Figura. 10. Fenograma baseado no índice de dissimilaridade de Gower demonstrando a diversidade fenotípica do tratamento 100Gy (Y1) em melancia, agrupada em seis grupos fenotípicos.



3.4. Detecção de Mutações por Meio de Marcadores Moleculares

Dos 74 marcadores moleculares avaliados, os marcadores RAPD da série OPA não forneceram informações relevantes nem apresentaram polimorfismo. Na série OPM, apenas o primer 02 apresentou uma banda polimórfica com tamanho superior a 100 pb para os tratamentos nas doses Y1 e Y2 em comparação com o controle (C). Na série OPD, o primer 08 exibiu bandas polimórficas para os tratamentos Y1 e Y2, com fragmentos de 400 pb, mas com bandas pouco confiáveis. Dos primers ISSR, apenas os primers 1, 4, 6, 7 e 8 (DiCA3'YG, DiGA3'RC, DiGA5'CR, DiCA5'CY, TriGTG) apresentaram bandas polimórficas. Quanto aos primers SSR avaliados, apenas o primer BVWS00106 demonstrou polimorfismo para o tratamento Y4 em relação ao C (Figura 11).

Figura. 11. Gel de agarose contendo amplificações com os marcadores RAPD, ISSR e SSR visando a detecção dos efeitos dos raios gama ao nível molecular dos tratamentos com raios gama (Y) versus o controle(C). a) Primer OPM 02 para Y1e Y2 com duas repetições, b) Primer OPD08, c) primer ISSR 01-08 para os tratamentos Y4 (400Gy) versus C(Controle), d) Primer SSR BVWS00106 para os tratamentos Y4 versus C. A letra M corresponde ao marcador de peso



No uso de marcadores moleculares, somente dois marcadores RAPD encontraram polimorfismo e indivíduos mutantes. Rodrigues et al. (2001), caracterizando geneticamente plantas de figueira irradiadas por raios gama também identificaram a ineficiência de marcadores RAPD em acessar regiões de mutações.

Embora poucos marcadores RAPD e SSR tenham sido polimórficos, foi observada uma maior taxa de polimorfismo nos marcadores ISSR. Este polimorfismo derivado da amplificação ISSR origina-se de variações nas sequências de DNA no ponto de ligação do primer. Conforme observado por Reddy et al. (2002), a origem desse polimorfismo pode ser atribuída a mutações em sítios e/ou eventos de inserção/deleção na região SSR. Com isso, os marcadores ISSR demonstram um poder discriminativo considerável em relação a mutantes ou loci mutantes (e à diversidade genética entre eles), em concordância com estudos similares (Amorim, *et al.*, 2012, Taheri, *et al.*, 2014). Esse método oferece uma alternativa a outro sistema para obter marcadores altamente reprodutíveis, dispensando a necessidade de

informações prévias sobre a sequência para diversas análises genéticas. Devido à abundância e rápida evolução das regiões SSR, a amplificação ISSR tem o potencial de revelar um número muito maior de fragmentos polimórficos por primer do que qualquer outro sistema de marcação utilizado, como RFLP ou microssatélites.

4. CONCLUSÕES

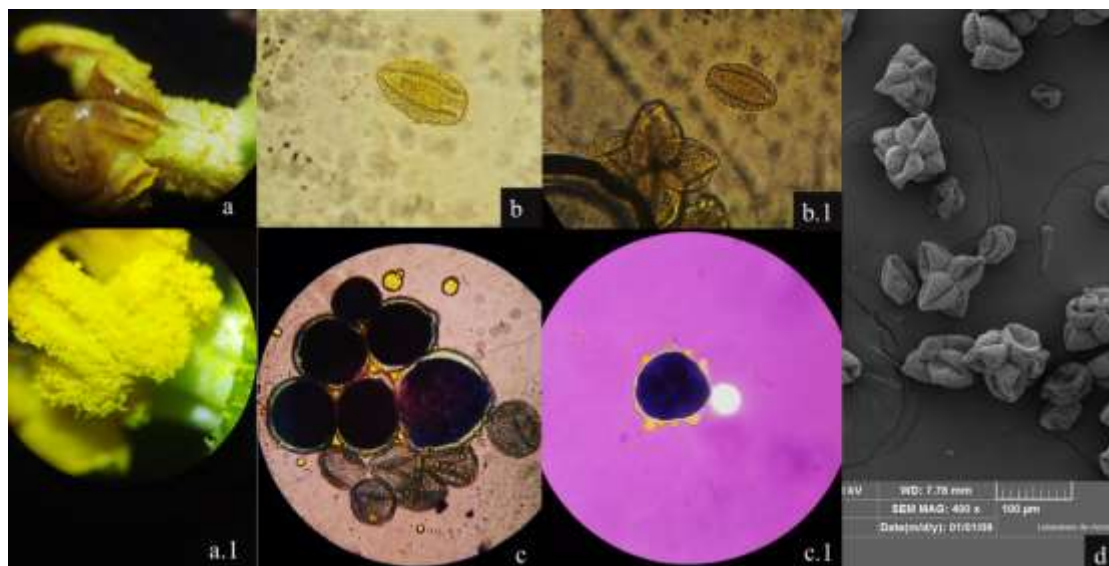
O uso dos raios gama é eficiente na geração de variabilidade da mini melancia, com a obtenção de morfotipos diferentes do controle. Esta variabilidade fenotípica gerada pode ser observada e detectada por meio de marcadores moleculares. Para a variedade Sugar Baby, doses abaixo de 325 Gy podem ser úteis na geração de variabilidade fenotípica e a dose 100Gy promoveu o crescimento em tanto que as doses 200 e 300 geraram indivíduos com mudanças morfológicas evidentes.

1. CONSIDERAÇÕES NO AVANÇO GERACIONAL DAS LINHAGENS PROMISSORAS

1.1. Linhagens M2

Como foi relatado previamente, nas altas dosagens de 400 e 300Gy, o desenvolvimento foi limitado para algumas plantas (46% e 13% respectivamente), que só chegaram até a fase fenológica prévia a floração. As mudanças incluíram o desenvolvimento limitado com plantas anãs e hábito de crescimento arbustivo. Plantas anãs geraram flores, mas não tiveram sucesso no processo de polinização, devido à escassa geração de flores femininas ou anomalias nas flores masculinas, às anomalias na formação das anteras, na produção de grãos de pólen (Figura 1 a-a1), assim como as mudanças na morfologia dos grãos de pólen (Figura 1 b-b1, d), seja por variações na conformação dos grãos com fusão deles formando uma estrela, ou a presença de grãos de pólen jumbo 8 (Figura 1c, c.1) que afetaram a fertilidade de alguns indivíduos das linhas M2. Em plantas com problemas para a fecundação foi possível observar uma redução na produção de grãos de pólen nas anteras (variações na morfologia do grão).

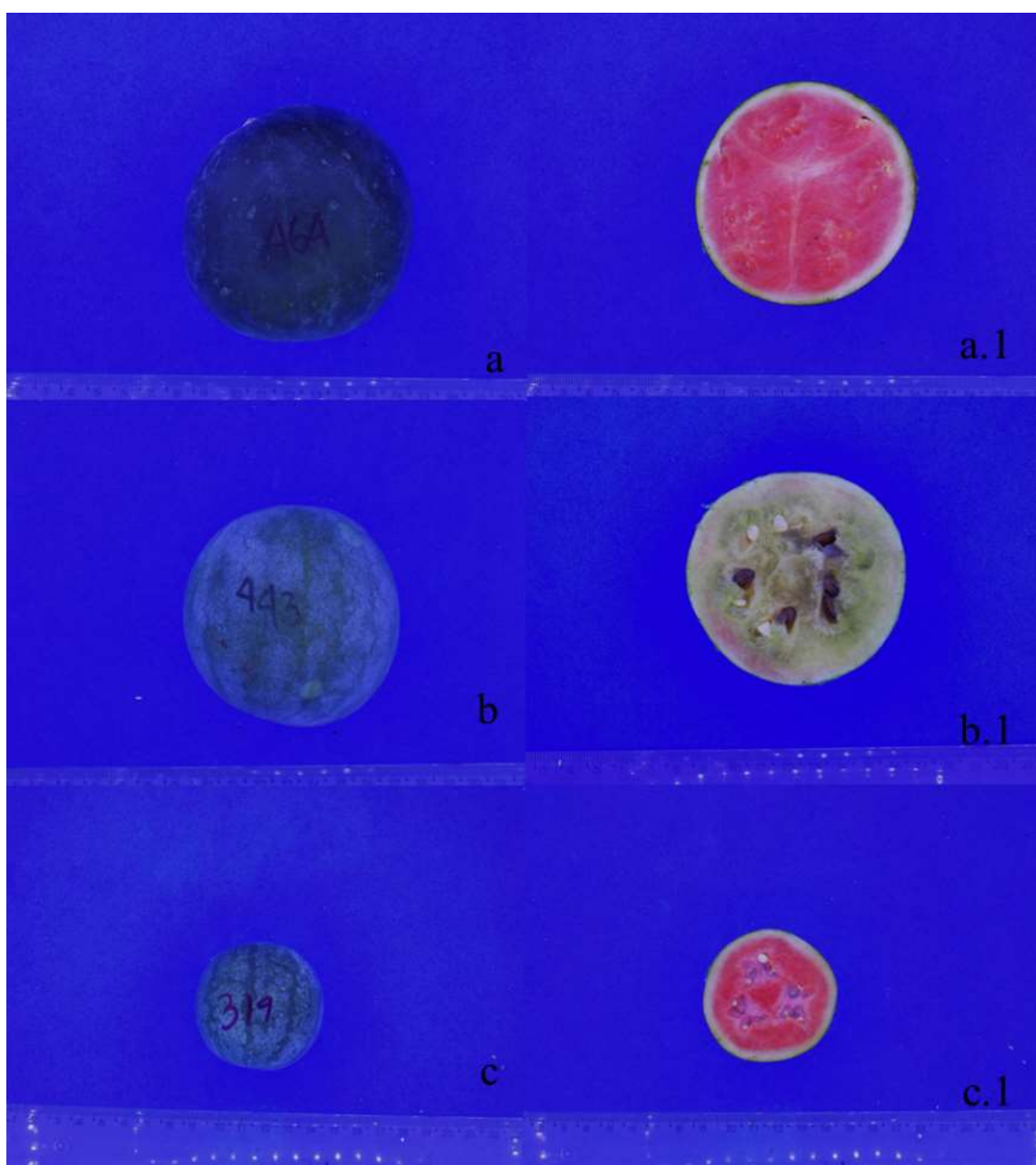
Figura, 1. Variações nos grãos de pólen. a) redução da quantidade de pólen nas anteras de indivíduo M2 a.1) controle, b) mudanças na estrutura de grão de pólen, c) problemas nos processos meióticos, com a geração de grãos de pólen jumbo ou polinucleados (c.1).



Junto com o processo de polinização, viu-se afetado subsequentemente o processo de frutificação. Indivíduos tiveram abortos florais e abortos do fruto, já para os indivíduos onde a frutificação foi possível, se apresentaram frutos sem sementes (figura 2, a1), pouca produção

de sementes ou sementes inviáveis (figura 2, b1) e sementes sem embrião. (figura 2, c1). A produção de sementes não esteve associada a nenhuma característica morfológica do fruto, apresentando-se em frutos grandes e pequenos, de casca escura ou com cor secundária, polpas vermelhas, verdes etc. Assim, muitos indivíduos só conseguiram ser avaliados até M2 e alguns deles conformam grupos pequenos dentro das análises por meio do índice de Gower.

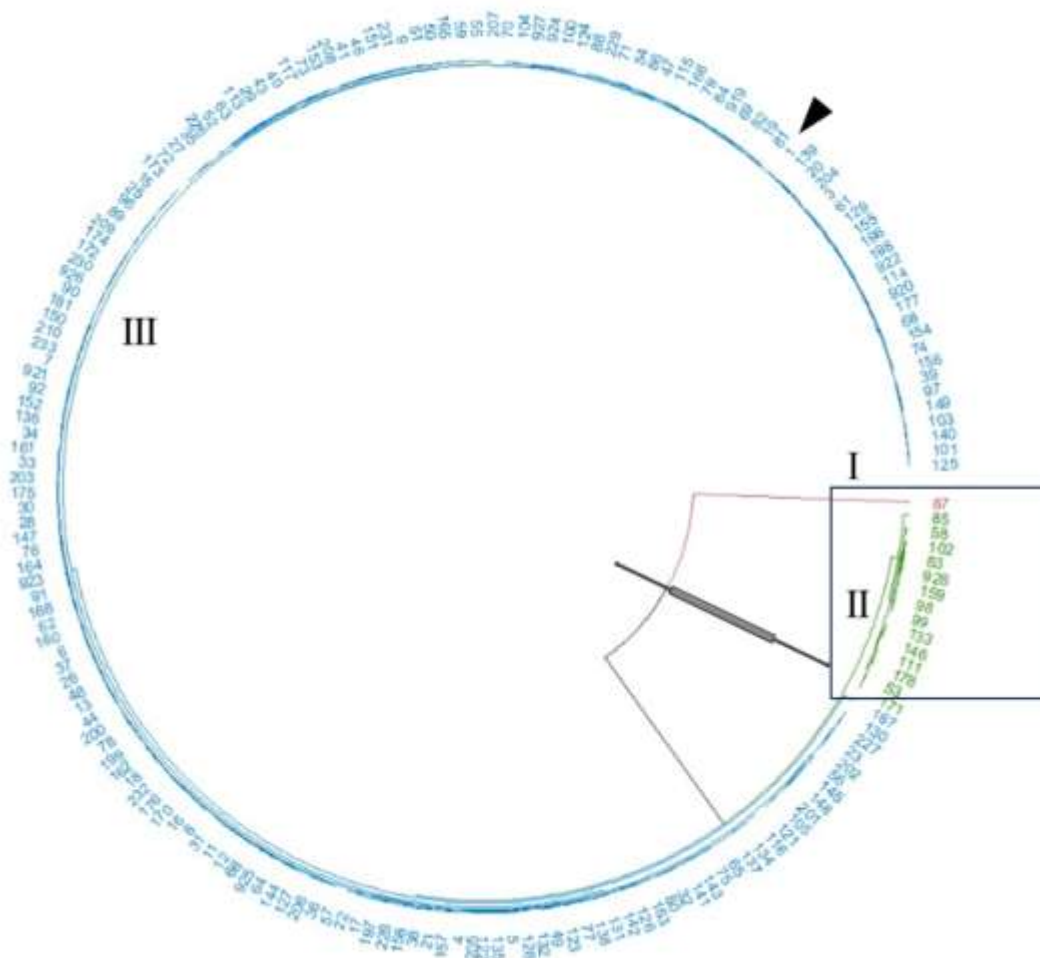
Figura, 2. Variações dos frutos na geração de sementes, a) frutos sem sementes, b) frutos com sementes e baixa viabilidade, c) com sementes sem embrião.



1.2. População 400Gy da M2

Três grupos apresentaram características diferenciadas na população M2, obtida por meio da dose 400Gy. No entanto, só dois deles apresentaram variações no desenvolvimento com porte reduzido. A linha 87 conservou as mudanças no hábito de desenvolvimento (grupo I) e atraso na floração de até 90 dias; grupo II, formado por 15 indivíduos, teve ainda um crescimento reduzido, mas não tanto quanto o grupo I. As variações deste grupo também estiveram associadas a floração com atraso até 70 dias e pouca produção de sementes. O grupo III, formado por 193 indivíduos, foi o que mais compartilhou características com o controle e as variações geralmente nas variáveis de fruto como cor da casca e cor da polpa. Apenas 7% das doses 400Gy fixou atributos em M2.

Figura, 3. Fixação de caraterísticas na M2 provenientes da dosagem 400Gy em melancia.

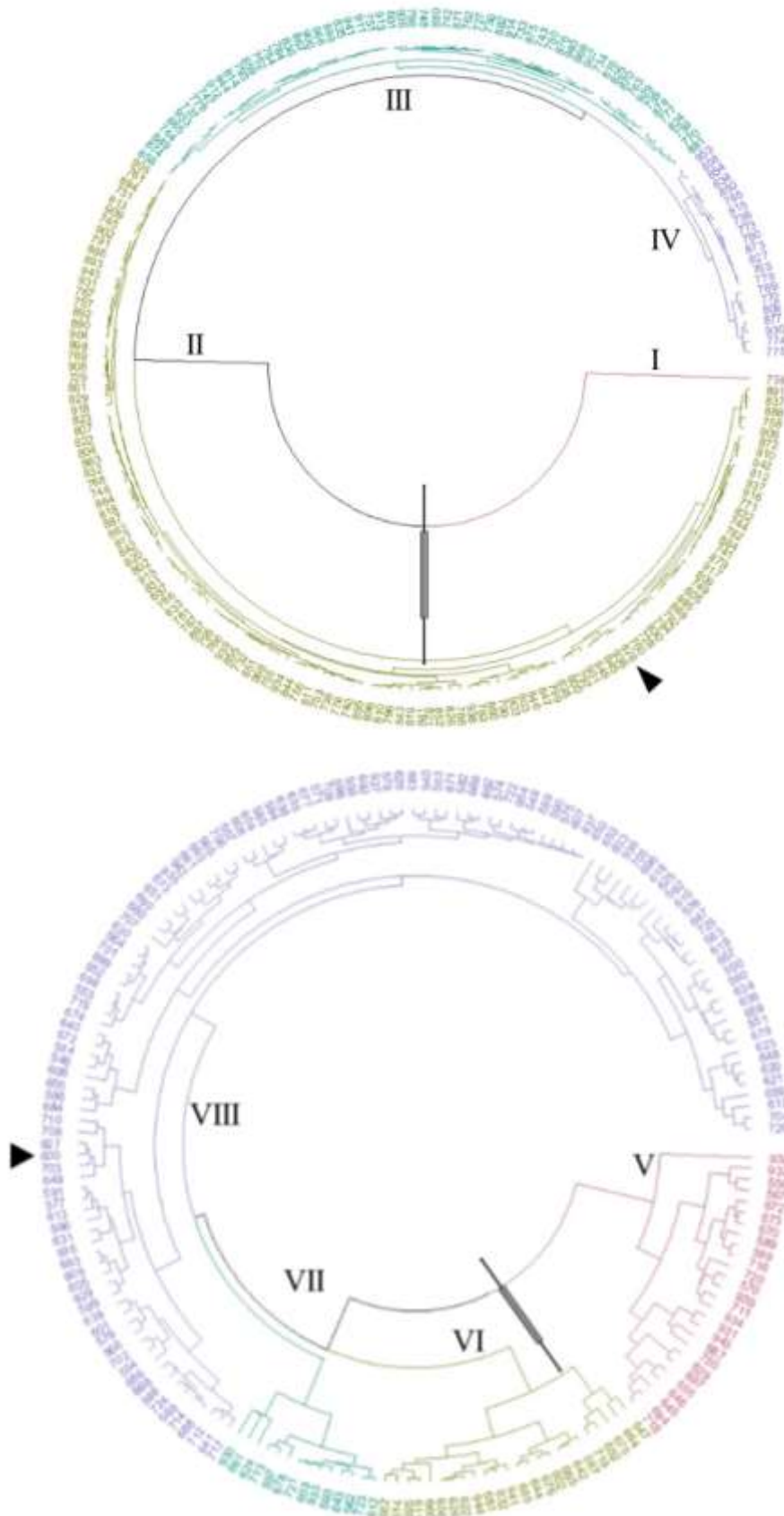


1.3. População 300Gy da M2

O maior número de linhas avaliadas na geração M2 foi proveniente da dosagem 300 Gy. Houve a formação de oito grupos diferentes dentro dos quais, seis foram morfológicamente diferentes do controle. O grupo I, formado por uma planta anã, com fenótipo totalmente diferente do controle e do grupo II. No grupo III, formado por 60 indivíduos, as variações foram no grau de lobulação tipo 3, variações na cor das folhas verde escuras ou verde claras, a cor da polpa em diferentes tipos de vermelho e número de sementes. O grupo IV foi formado por 21 indivíduos que apresentaram variações na cor da polpa, variando do rosa a vermelho claro. O grupo V, formado por 26 indivíduos, também apresentou variações com polpa vermelha e com tons mais intensos a escuros.

O grupo VI foi conformado por, 24 indivíduos e apresentou variações no número de sementes, na largura do pericarpo. Já o grupo VII, foi conformado por, 14 indivíduos que, apresentaram variações no período da floração e na epiderme do fruto, e na floração. Observou-se que 59.80% de indivíduos do ciclo 1 e 64.4% do ciclo 2 perderam as características obtidas pelas doses 300Gy. Os grupos II e VIII foram formados por um total de 238 indivíduos, onde 122 agruparam-se no grupo II e 116 no grupo VII, compartilharam grande quantidade de características semelhante ao controle. Foram observadas pequenas mudanças, por exemplo, variações na largura de colo e variações na floração com plantas apresentando flores hermafroditas, entre outras mudanças pouco representativas. Cabe ainda destacar as variações que se apresentaram no fruto, como tamanho, cor primária e distribuição da cor secundária. Apenas 40.2% de indivíduos do ciclo I e 35.6% do ciclo II mantiveram algumas mudanças morfológicas geradas pelos raios gama para a dosagem 300Gy.

Figura, 4. Fixação de características na M2 na dosagem 300Gy ciclo 1 (I, II, III, IV), ciclo 2 (V, VI, VII, VIII).

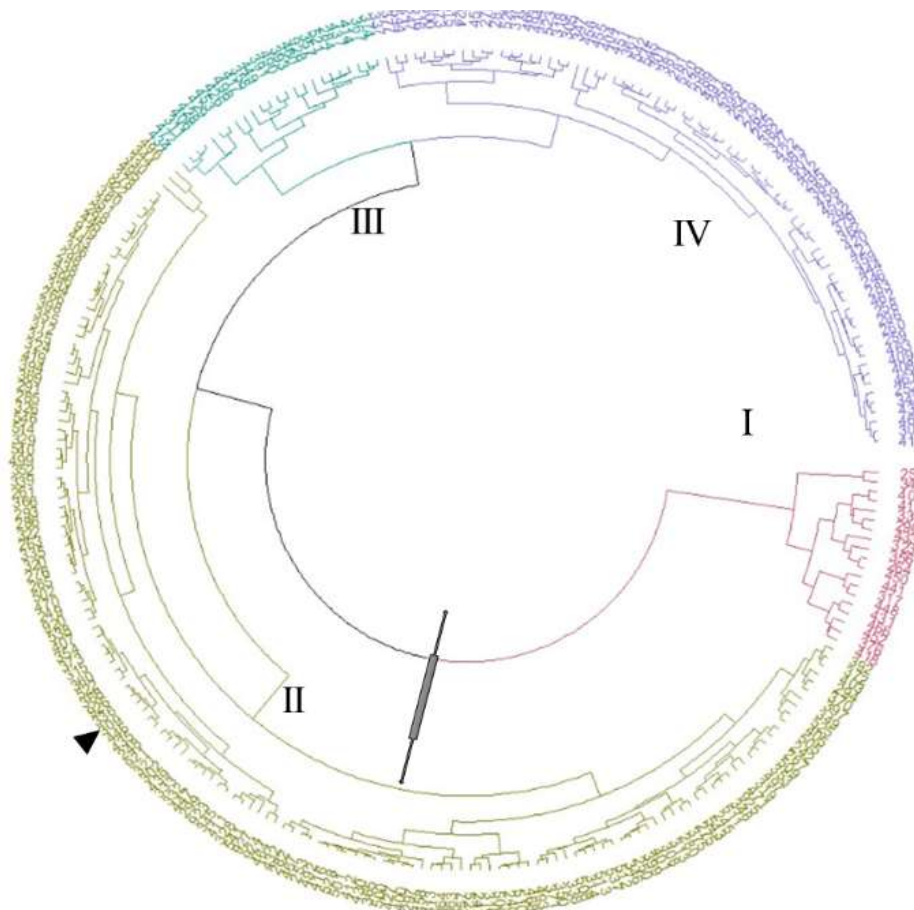


1.4. População 200 e 100Gy da M2

Para as dosagens 100 e 200Gy a quantidade de variabilidade morfológica gerada se manteve em três grupos que foram distintos do tratamento controle. A população do avanço geracional foi composta pelo grupo I, formado por 19 indivíduos que apresentaram mudanças na floração e variações na cor do fruto e geração de sementes.

O grupo II, com 154 indivíduos, compartilhou mais características com o controle, com variações leves na presença de flores hermafroditas e com uma redução nos dias para floração. O grupo III, com 24 indivíduos, apresentou variações na casca da fruta com manchas e geralmente frustos grandes e com muitas sementes. Já o grupo IV, composto por 73 plantas que, expressaram um fenótipo vigoroso, com folhas grandes, colos largos, verde intenso e frutos de tamanho maior, com polpa coloração vermelho intenso. Indivíduos avaliados (42.97%) dos tratamentos 100 e 200Gy mantiveram algumas características obtidas pelo procedimento, especialmente o 7% da população (grupo I).

Figura, 5. Fixação de características na M2 na dosagem 100 e 200Gy para melancia.



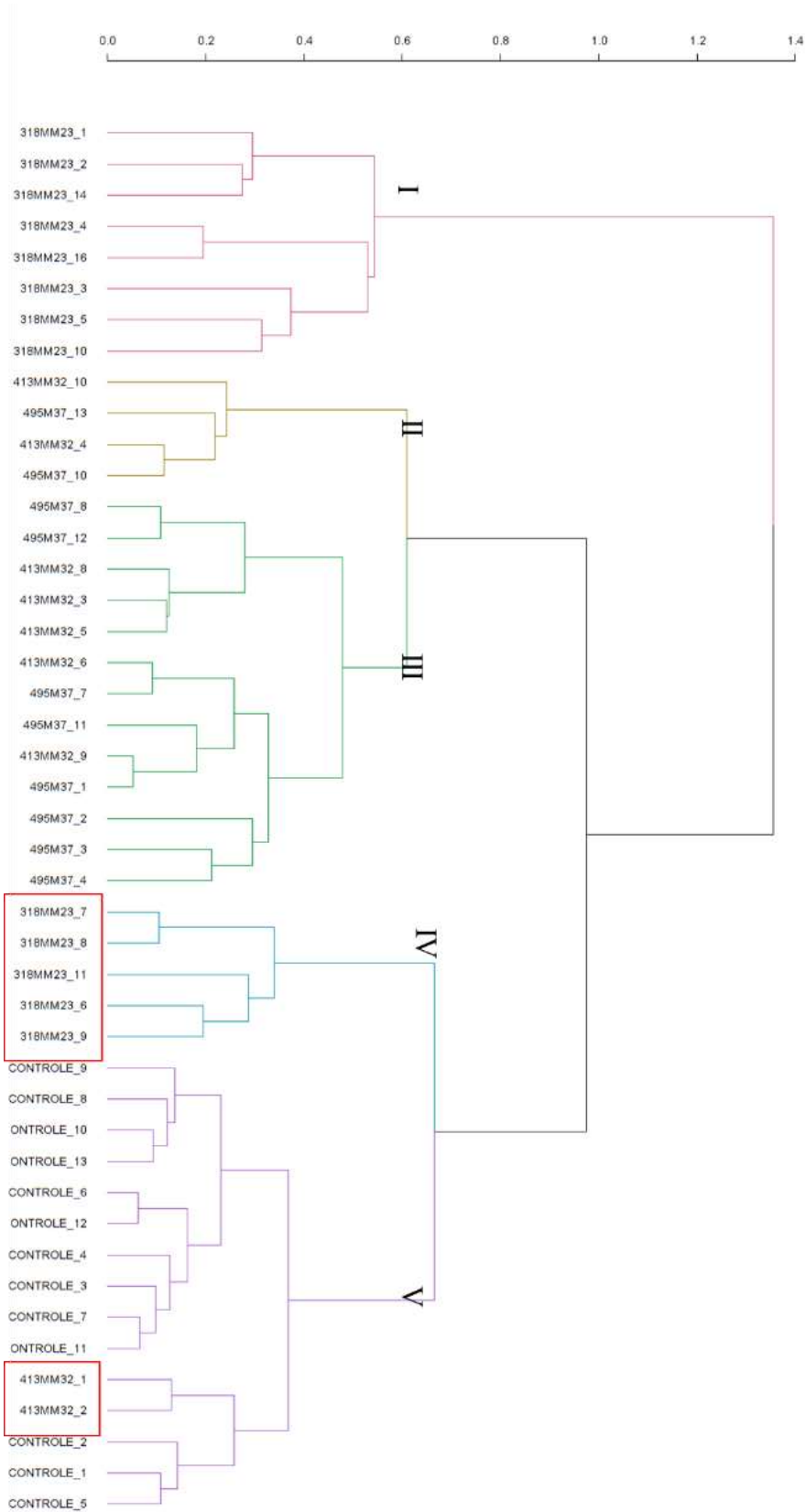
1.5. Linhagens M3 e M4

A linhagem 318MM23 apresentou a maior quantidade de características distintas dos demais grupos. Eram plantas menores e esguias, que geravam frutos menores, porém com mais segmentos e dias para floração. Alguns dos indivíduos desta linhagem foram agrupados no grupo I, que foi o grupo mais distante do controle, apresentando os valores mais altos de dissimilaridade, com o índice de dissimilaridade de Gower acima 1.20. No entanto, alguns indivíduos perderam algumas das características distintas (crescimento reduzido de todas as estruturas) e ficaram mais semelhantes com o controle (38.46%), e por isso foram agrupados no grupo IV.

A linhagem 413MM32 compartilha algumas características fenotípicas semelhantes ao controle e a linhagem 495M37, especialmente da parte vegetativa com poucas variações no hábito de desenvolvimento, porém a largura do ramo principal foi uma característica particular da linha (6.06 cm). Também vale ressaltar que da linhagem 413MM32 atingiu maior média referente ao peso do fruto (235.64 g). Dentre as linhagens testadas, a linhagem 495 e 413 são ainda segregantes e elas compartilham características, por isso foram agrupadas nos grupos II e III com índices de dissimilaridades de 0.60 entre elas.

A partir das características morfofisiológicas avaliadas foi possível separar os indivíduos em 5 grupos com características fenotípicas divergentes. Sendo o indivíduo 390-318MM23 o mais diferente dentre os grupos, possuindo aspectos únicos como o Brix mais elevado (8,2) e o maior número de hastes (3).

Figura 6. Fixação das características na M3 das linhas 318.413e 495 em melancia Sugar Baby.



1.6. Linhas M3 e M4

450MM34: Planta de hábito de desenvolvimento rasteiro, de comprimento de haste principal superior a um metro, folhas de cor verde intenso, com lobulação de tipo 3, floração aos 40 DDS, frutos redondos com distribuição de cor tipo 5, cor primária verde esbranquiçado com verde, cor da polpa predominantemente verde, com uma leve coloração verde avermelhada, e linhagem M4 ainda segregante.

441 MM34: Planta de hábito de desenvolvimento rasteiro, com haste principal superior a 1m, grau de lobulação intermédio 5, cor do fruto verde esbranquiçado com distribuição de cor tipo 5, cor secundário verde, cor de polpa predominante verde, e segregante para amarelo.

MM75-5: linha M3, ainda segregante, planta rasteira, com guisas superiores a 1m, folhas verde intensas à escuras, ainda segregante para variáveis tamanho de fruto, cor da polpa vermelha intensa e uma redução no tamanho do pericarpo com valores entre 2 a 3 mm.

Figura, 7. Variações no fruto, cor da polpa, largura do pericarpo, grau de lobulação e cor das folhas nas gerações M3 e M4 de melancia. a) linha 450MM34-10, b) linha 441MM34, c) linha MM75-5.



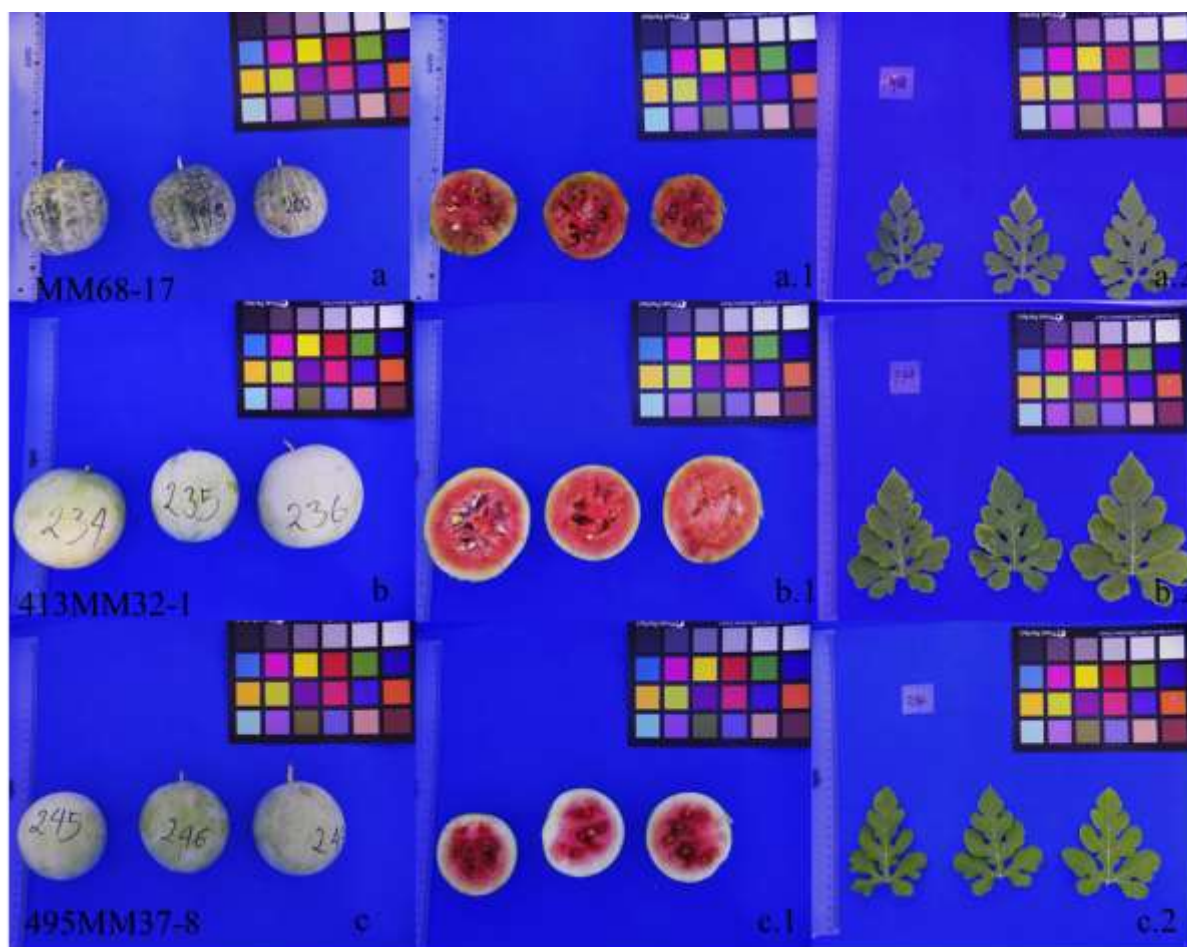
1.7. Variações na cor da casca

MM68: São plantas de hábito de crescimento rasteiro, com guias inferiores a 1m, folhas verdes intensas com grau de lobulação 7, polpa avermelhada com borda verde e pericarpo inferior a 2mm.

413MM32-1: Planta de hábito de crescimento rasteiro superior a 2m, folhas grandes, verdes e com tipo de lobulação intermédia 5, frutos redondos com casca verde esbranquiçada, cor da polpa vermelha, pericarpo de 5 mm.

495MM37-1: Planta de hábito de crescimento rasteiro superior a 2m, folhas grandes, verdes claras e com tipo de lobulação intermédia 5, frutos redondos com casca verde esbranquiçada, cor da polpa vermelha escura, pericarpo de 8 mm.

Figura, 8. Variações no fruto, cor da casca da fruta, cor da polpa, largura do pericarpo, grau de lobulação e cor das folhas nas gerações M3 e M4 de melancia. a) linha MM86-17, b) linha 413MM32-1, c) linha 495MM37-8.



REFERÊNCIAS

- AHMAR, S., GILL, R. A., JUNG, K. H., et al. "Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook", *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 7, p. 1–24, 2020. DOI: 10.3390/ijms21072590. .
- AMANO, E. *Practical Suggestions for Mutation Breeding*. . FNCA, [s.n.], 2004. Disponível em: http://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/mbm/e_mbm.html.
- AMORIM, E. P., PESTANA, R. K. N., E SILVA, S. de O., et al. "Caracterização agrônômica de mutantes de bananeira obtidos por meio da radiação gama", *Bragantia*, v. 71, n. 1, p. 8–14, 2012. DOI: 10.1590/S0006-87052012005000002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/WzH8gNXwCD5VrJVBkxdt9kN/?lang=pt>.
- BRASIL. Regras para análise de sementes. Ministério ed. Brasília - DF, Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf.
- CORETCHI, L., CLICIUC, D., BONDARENCO, E. "Molecular and Genetic Aspects of the Resistance of Leguminous Plants to Biotic Stress Factors", *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*, p. 171, 2018. Disponível em: https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:50012808.
- ECPGR. Minimum descriptors for Cucurbita spp ., cucumber , melon and watermelon. Cucurbits Working Group, 1., no 1. Madrid - Espanha, [s.n.], 2008. Disponível em: http://www.ecpgr.cgiar.org/fileadmin/templates/ecpgr.org/upload/NW_and_WG_UPLOADS/Cucurbits_DescriptorLists.pdf.
- GURUSHIDZE, M., HIEKEL, S., OTTO, I., et al. Site-directed mutagenesis in barley by expression of TALE nuclease in embryogenic pollen. [S.l: s.n.], 2016.
- JANKOWICZ-CIESLAK, J., TAI, T. H., KUMLEHN, J., et al. "Biotechnologies for plant mutation breeding: Protocols", *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*, p. 1–340, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-45021-6. .
- MALUSZYNSKI, M., SZAREJKO, I., BHATIA, C. R., et al., "Methodologies for generating variability Part 4: Mutation techniques". In: CECCARELLI, S., GUIMARÃES, E. P., WELTZIEN, E. (Org.), *Plant breeding and farmer participation*, FAO ed. Roma. Italia,

- ICRISAT, ICARDA, FAO, 2009. p. 1–671. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1070e/i1070e00.htm>.
- NAKAGAWA, H., "Induced mutations in plant breeding and biological researches in Japan". In: SHU, Q. Y. (Org.), *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*, Roma. Italia, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. v. 1. p. 51–58. Disponível em: <http://umc.edu.dz/vf/images/art-3511/i0956e.pdf#page=44%5Cnhttp://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/docdb/data/jpn035.pdf>.
- PARRY, M. A. J., MADGWICK, P. J., BAYON, C., et al. "Mutation discovery for crop improvement", *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 10, p. 2817–2825, 2009. DOI: 10.1093/jxb/erp189. .
- PAUL ERNEST, F., HORTENSE NOËLLE, M. A., GODSWILL, N. N., et al. "Radiosensitivity of two varieties of watermelon (*Citrullus lanatus*) to different doses of gamma irradiation", *Revista Brasileira de Botânica*, v. 43, n. 4, p. 897–905, 2020. DOI: 10.1007/s40415-020-00659-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00659-8>.
- TAHERI, S., ABDULLAH, T. L., AHMAD, Z., et al. "Effect of acute gamma irradiation on *Curcuma alismatifolia* varieties and detection of DNA polymorphism through SSR marker", *BioMed Research International*, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/631813. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24719878/>.
- TAŞKIN, H., YÜCEL, N. K., BAKTEMUR, G., et al. "Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization with irradiated pollen technique in watermelon (*Citrullus lanatus* L.)", *Canadian Journal of Plant Science*, v. 93, n. 6, p. 1165–1168, 2013. DOI: 10.4141/CJPS2013-059. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.4141/cjps2013-059>.
- WEI, C., ZHU, C., YANG, L., et al. "A point mutation resulting in a 13 bp deletion in the coding sequence of *Cldf* leads to a GA-deficient dwarf phenotype in watermelon", *Horticulture Research*, v. 6, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41438-019-0213-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41438-019-0213-8>.
- XU, B., ZHANG, C., GU, Y., et al. "Physiological and transcriptomic analysis of a yellow leaf mutant in watermelon", *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-36656-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36656-6>.

ZHANG, J., GUO, S., JI, G., et al. "A unique chromosome translocation disrupting CIWIP1 leads to gynoecey in watermelon", *Plant Journal*, v. 101, n. 2, p. 265–277, 2020. DOI: 10.1111/tpj.14537. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tpj.14537>.

ANEXOS

Tabela 1. Primers avaliados para a detecção dos efeitos do plasma frio e raios gama no DNA de melancia Sugar baby.

Primer	Sequência	Temperatura
OPA-02	TGCCGAGCTG	40
OPA-03	AGTCAGCCAC	40
OPA-04	AATCGGGCTG	40
OPA-05	AGGGGTCTTG	40
OPA-06	GGTCCCTGAC	40
OPA-07	GAAACGGGTG	40
OPA-08	GTGACGTAGG	40
OPA-09	GGGTAACGCC	40
OPA-10	GTGATCGCAG	40
OPA-11	CAATCGCCGT	40
OPA-12	TCGGCGATAG	40
OPA-13	CAGCACCCAC	40
OPA-14	TCTGTGCTGG	40
OPA-15	TTCCGAACCC	40
OPA-16	AGCCAGCGAA	40
OPA-17	GACCGCTTGT	40
OPA-18	AGGTGACCGT	40
OPA-19	CAAACGTCCG	40
OPA-20	GTTGCGATCC	40
OPD-03	GTCGCCGTCA	40
OPD-05	TGAGCGGACA	40
OPD-08	GTGTGCCCCA	40
OPD-11	AGCGCCATTG	40
OPD-12	CACCGTATCC	40
OPD-15	CATCCGTGCT	40
OPD-16	AGGGCGTAAG	40
OPD-18	GAGAGCCAAC	40
OPD-20	ACCCGGTCAC	40
OPM01	GTTGGTGGCT	40
OPM02	ACAACGCCTC	40
OPM03	GGGGGATGAG	40
OPM04	GGCGGTTGTC	40
OPM05	GGGAACGTGT	40
OPM06	CTGGGCAACT	40
OPM07	CCGTGACTCA	40
OPM09	GTCTTGCGGA	40
OPM12	GGGACGTTGG	40
OPM13	GGTGGTCAAG	40
OPM14	AGGGTCGTTC	40

Primer	Sequência	Temperatura
OPM15	GACCTACCAC	40
OPM16	GTAACCAGCC	40
DiCA3'YG	CACACACACACACACAYG	55
DiCA5'CR	CRCACACACACACACACA	55
DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	55
DiGA3'RC	GAGAGAGAGAGAGAGARC	55
DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	55
DiGA5'CR	CRCACACACACACACACA	55
DiCA5'CY	CYCACACACACACACACA	55
TriGTG	GTGGTGGTGGTGGTG	55
TriGTG5'CY	CYGTGGTGGTGGTGGTG	55
TriTGT3'RC	TGTTGTTGTTGTTGTRC	55
TriTGT5'CY	CYCACCACCACCACCAC	55
TriAAC3'RC	AACAACAACAACAACRC	55
TriAAG3'RC	AAGAAGAAGAAGAAGRC	55
TriATG3'RC	ATGATGATGATGATGRC	45
TriACA3'RC	ACAACAACAACAACARC	45
TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRC	55
TriTCA3'RC	TCATCATCATCATCARC	55
TriTCT3'RC	TCTTCTTCTTCTTCTRC	45
TriTCC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	45
TriTGA3'RC	TGATGATGATGATGARC	45
TriCAT3'RC	CATCATCATCATCATRC	55
TriCGA3'RC	CGACGACGACGACGARC	45
TriGAA3'RC	GAAGAAGAAGAAGAARC	45
BVWS00048	TCAAAAGGTTTGCCCTAAATGAAA	TGCTGATCTCCCATTTCTTAACCTC
BVWS00106	TGGCCTAGAAGATTATTGAGCTGC	CATTATCACATGGCAGATAATGGAAA
BVWS00155	TGGATCATTGACAGATTTAGCGA	CATCACAGTTAACGATCACAAAGGC
BVWS00208	GCAAAGATTGTCTATGAAGCAGCA	GCTCATTGGCTTCTTGAATCTGTT
BVWS00297	ACAACCTTGATTGATTGCACGATG	AAGTGAAAGACCCTTTTCCCAAAC
BVWS00314	GAGGAGAATCGGTTCTTGGACATA	TTGAGCATCCTTGGGACTATCATT
BVWS00441	TGGTTGAAATCAATAAAAAGTGAA	TGGATGTTTTTGGCATTGTA
BVWS00658	TTAGCCTAAGCAAGGGTTTTT	AAGTACACATTTTAAACAATCAATCCA
BVWS00948	TCAAACCGACTGCCATATCA	AGCTTGTCTTCCCTGGCCTTT
BVWS01734	AAAATTACATCTTAAATGCGCC	GGAACATTGACTTCAATCAGCA