

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE
MELANCIA DO NORDESTE BRASILEIRO**

MARIA LUCIENE DA SILVA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO
BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE MELANCIA DO
NORDESTE BRASILEIRO**

MARIA LUCIENE DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do grau de Doutora em Genética.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiróz

**RECIFE
2010**

Silva, Maria Luciene da

Avaliação molecular da variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de melancia do Nordeste brasileiro / Maria Luciene da Silva. – Recife: O Autor, 2010.

161 folhas, il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko-Iseppon.

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Genética, 2010.**

Inclui bibliografia e anexos.

1. Germoplasma vegetal- recursos genéticos 2. Marcadores genéticos 3. *Citrullus* 4. Genética vegetal I. Título.

581.15

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-241

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA

Parecer da comissão examinadora da tese de:
Maria Luciene da Silva

AVALIAÇÃO MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO BANCO
ATIVO DE GERMOPLASMA DE MELANCIA DO NORDESTE BRASILEIRO

A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO

Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Maria Luciene da Silva faz jus ao
grau de Doutor em Genética pela UFPE. Recife, 29 de outubro de 2010

1º Examinador: Luiza Suely Semen Martins
Profª Dª Luiza Suely Semen Martins
UFRPE

2º Examinador: Ederson Akio Kido
Prof. Dr. Ederson Akio Kido
UFPE

3º Examinador: Maria Aldete J. de Fonseca Ferreira
Drª Maria Aldete J. da Fonseca Ferreira
Embrapa Semiárido/CPATSA

4º Examinador: Manoel Abilio de Queiroz
Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiróz
UNEB/DTCS

5º Examinador: Ana Maria Benko-Iseppon
Profª Drª Ana Maria Benko-Iseppon
UFPE

Orientador: Ana Maria Benko-Iseppon
Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon
UFPE

Coorientador: Manoel Abilio de Queiroz
Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiroz
UNEB/DTCS

Coordenador: Valdir Queiroz Balbino
Prof. Dr. Valdir Queiroz Balbino
UFPE

Agradecimentos

A Deus por estar sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe (Severina de Souza Silva) e irmãs (Ana Cristina da S. Carvalho, Maria Luciana Silva e Andrea Keyla dos Santos) pelo carinho, incentivos, amizade e cumplicidade.

À minha Grande Família pelo estímulo, carinho, cuidados e atenções. Aos meus avós (Maria e Manoel), cuja fé e orações ajudaram-me a alcançar os objetivos.

Ao Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiróz pela orientação, paciência, atenção, amizade, e dedicação plena.

A Dr^a. Maria Aldete J. F. Ferreira pela amizade, orientação e apoio.

Aos irmãos científicos Lindomar, Izaias, Aline, Márcia, Ronaldo, Carla, Oscar e Rodrigo cuja amizade, dedicação e respeito mútuos serviram de exemplo na prática profissional.

A Prof. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon pela orientação, ensinamentos, ótima convivência, companheirismo e exemplo de determinação.

Ao grupo do Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFPE, em especial as pessoas de Lidiane L. B. Amorim, Alberto Onofre, Vanessa Cristina e Claudete Marques pela amizade e apoios.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética Prof. Dr. Valdir Balbino e à Propeq pelo apoio e incentivo. Aos secretários Lobo e Filipe pelo apoio indispensável.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética pelos ensinamentos, em especial a Prof. Dr^a. Ana Cristina Brasileiro Vidal, Prof. Tercílio Calsa Júnior e Prof^a. Valesca Pandolfi pelas valiosas sugestões para melhoria deste trabalho.

À Embrapa Semiárido, especialmente à Dr^a. Rita de Cássia Souza Dias curadora do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas pelo apoio e fornecimento das sementes.

À Universidade do Estado da Bahia e Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (campus III, Juazeiro – BA) por disponibilizar o Laboratório de Biologia e a casa de vegetação para condução dos experimentos.

Aos Professores do Curso de Engenharia Agrônoma (Prof^a. Lindete e Prof. Valtemir) e seus respectivos bolsistas (Jackson, Aline, Carol, Joelma, Jussara, Gérsika, Sirando, Essione e Laís) pela amizade, apoios e incentivos.

Aos meus amigos para sempre Paulo, Almecy, Carla, Liliane, Lídia, Suzane e Ana Acássia (*in memória*) com os quais aprendi o valor da verdadeira amizade.

Aos professores que participaram da Banca Examinadora pelas sugestões, que foram fundamentais, para melhoria e conclusão desse trabalho

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Introdução.....	vi
1. Revisão da Literatura.....	14
1.1. O gênero <i>Citrullus</i> Schrad.....	14
1.1.1. Origem, distribuição geográfica.....	14
1.2. A melancia [<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsume & Nakai].....	15
1.2.1. A cultura da melancia no Nordeste brasileiro.....	17
1.3. Recursos genéticos vegetais.....	18
1.3.1. Histórico, conservação e uso.....	18
1.4. O Banco ativo de germoplasma de melancia.....	21
1.4.1. Manejo do banco ativo de germoplasma de melancia.....	22
1.4.1.1. Coleta.....	22
1.4.1.2. Introdução e intercâmbio.....	22
1.4.1.3. Multiplicação e regeneração.....	24
1.4.1.4. Caracterização.....	25
1.4.1.4.1 Caracterização morfológica.....	25
1.4.1.4.2. Caracterização molecular.....	28
1.4.1.5. Avaliação de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas	29
1.5. Aplicação dos marcadores moleculares na caracterização de germoplasma.....	31
2. Objetivos.....	35

2.1. Geral.....	35
2.2. Específicos.....	35
3. Materiais e Métodos.....	36
3.1. Levantamento de linhagens e os acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas.....	36
3.2. Estratégia de amostragem para seleção dos acessos.....	36
3.3. Experimentação para obtenção de material vegetal para extração de DNA.....	37
3.4. Extração de DNA.....	37
3.5. Análises moleculares.....	38
3.5.1. Otimização, seleção de <i>primers</i> e reação DAF (DNA Amplification Fingerprinting).....	38
3.5.2. Seleção de <i>primers</i> e reação ISSR (<i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>).....	39
3.6. Análises de dados.....	40
3.6.1. Marcadores DAF e ISSR.....	40
3.6.2. Análise de variância molecular – AMOVA.....	40
4. Resultados.....	42
4.1. Levantamento de linhagens e acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas.....	42
4.1.1. Identificação de linhas e acessos preservados no BAG e locais de coleta.....	42
4.2. Estudos com o marcador DAF.....	54
4.2.1. Extração de DNA.....	54
4.2.2. Otimização de um protocolo para amplificação com o marcador DAF.....	54
4.2.3. Seleção de <i>Primers</i> e reação de DAF.....	55
4.2.4. Reação DAF em 291 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitáceas.....	61
4.2.4.1. Perfil molecular dos acessos de melancia.....	61
4.2.4.2. Divergência genética entre acessos de melancia.....	64
4.3. Análise de variância molecular por meio dos dados do marcador DAF.....	68
4.4. Estudos com o marcador ISSR.....	69
4.4.1. Perfil molecular de 281 acessos de melancia e dois de melão.....	69
4.4.2. Divergência genética.....	73
5. Discussão.....	74
6. Conclusões.....	89
7. Referências Bibliográficas.....	90
8. Anexos.....	101

Anexo 1. Tabela 2. Acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas selecionados para

caracterização molecular, com indicação do conjunto, espécies e subespécies, tratamento (Trat), locais de coleta (Estados e municípios) e código do BAG	102
Anexo 2. Tabela 3. Linhagens avançadas de melancia selecionadas para caracterização molecular com os marcadores DAF e ISSR.....	106
Anexo 3. Figura 12A. Dendrograma de 291 acessos de melancia e dois de melão obtido com o marcador DAF (continuação nas próximas páginas).....	107
Anexo 4. Figura 15A. Primeira parte do dendrograma ISSR de 281 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitácea, (ponto verde corresponde as cultivares comerciais).....	110
Anexo 5. Artigo 1. Fingerprinting de DNA e Determinação de Grupos Heteróticos no Germoplasma de Melancia.....	112
Abstract.....	113
Resumo.....	114
Introdução.....	115
Materiais e Métodos.....	117
Resultados e Discussão.....	119
Agradecimento.....	124
Referências Bibliográficas.....	124
Anexo do artigo 1.....	128
Anexo 6. Artigo 2. Diversidade genética em acessos de melancia provenientes da agricultura tradicional usando marcadores DAF.....	132
Abstract.....	133
Resumo.....	134
Introdução.....	135
Materiais e Métodos.....	136
Resultados e Discussão.....	138
Agradecimentos.....	144
Referências Bibliográficas.....	145
Anexos do artigo 2.....	149
Anexo 7. Instruções para autores da revista <i>Crop Science</i>	154
9. Publicações	159
10. Memorial do Aluno	161

Lista de abreviaturas

AFLP	(<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo no comprimento do fragmento amplificado);
AMOVA	(<i>Analysis of Molecular Variance</i> - Análise de Variância Molecular);
BAG	(<i>Germplasm Active Bank</i> - Banco Ativo de Germoplasma);
BGCIA	(<i>Watermelon Germplasm Bank</i> - Banco de Germoplasma de Melancia);
DAF	(<i>DNA Amplified Fingerprinting</i> – Impressão digital do DNA);
DNA	(<i>Desoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico);
ISSR	(<i>Inter-Simple Sequence Repeats</i> – Regiões Entre Sequências Simples Repetidas);
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase);
RPM	(Rotação Por Minuto);
RAPD	(<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> - Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso);
RFLP	(<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> - Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição);
SSR	(<i>Simple Sequence Repeats</i> - Repetições de Sequência Simples);
UPGMA	(<i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average</i> – Método de agrupamento em pares com média aritmética não ponderada);
PRSV-W	(<i>Papaya ringspot virus – type watermelon</i> - vírus da mancha anelar do mamoeiro estirpe melancia)
ZYMV	(<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> – vírus do mosaico amarelo da abobrinha vírus)
WMV	(<i>Watermelon mosaic virus</i> – vírus do mosaico da melancia)
CGC	(Capacidade Geral de Combinação)
CEC	(Capacidade Específica de Combinação)

Lista de Figuras

i

Figura 1 – Banco Ativo de Cucurbitáceas do Nordeste Brasileiro, localizado na Embrapa Semiárido (Petrolina-PE). (3A - Acessos de melancia armazenados em caixas, detalhe do termômetro).....	44
Figura 2. Distribuição dos acessos de melancia em conjuntos com local de coleta, número de municípios visitados e totais de acessos de melancia localizados no BAG de Cucurbitáceas. As áreas pintadas não apresentaram registros de expedições de coleta nos Estados do CE, PB, AL, SE.....	45
Figura 3. Caracterização dos locais de coletas de acessos de melancia do centro de cultivo do Nordeste brasileiro, com suas respectivas distâncias entre regiões em quilômetros (3A, 3B e 3C - Bahia e 3D – Maranhão).....	48
Figura 4. Caracterização dos locais de coletas de acessos de melancia do centro de cultivo do Nordeste brasileiro, com distância entre regiões em quilômetros (4A - Piauí, 4B - Pernambuco, 4C - Rio Grande do Norte).....	49
Figura 5. Características morfológicas dos acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas. (5A - indicação de resistência a alternaria; 5B - cor externa (gene golden) e formato de fruto; 5C - melancia partenocárpica; 5D - <i>C. colocynthis</i> ; 5E e 5F - variedades comerciais).....	50
Figura 6. Germinação e desenvolvimento das linhagens avançadas de melancia (6A - Comerciais; 6B - resistentes a vírus e 6C - resistentes ao oídio).....	53
Figura 7. Germinação e desenvolvimento de acessos de melancia (7A – germinação de <i>C. colocynthis</i> (T4339), em casa de vegetação; 7B – Desenvolvimento do referido acesso em campo; 7C- Diferentes acessos de melancia em germinação).....	53
Figura 8. Acesso de melancia da espécie <i>C. colocynthis</i> (T4339) frente ao ataque de nematoides. (8A e 8B - acesso T4339 em campo, 8C - presença de nematoides nas raízes de acessos suscetíveis; 8D - efeitos do ataque de nematoides em acesso de melancia, sendo 8C e 8D - <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>).....	54
Figura 9. Perfil molecular produzido por <i>primers</i> DAF (OPC02, OPC10 e OPB06) na amplificação de linhagens avançadas de melancia. Linhagens: C18, O10, O18, V07 e C35 (<i>C. lanatus</i>), V10 e V11 (<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>), V35 (<i>C. colocynthis</i>) e 1kb – DNA padrão.....	56
Figura 10. Dendrograma de sete linhagens avançadas de melancia obtido com 45 <i>primers</i> DAF, com valor do <i>Bootstrap</i>	61
Figura 11. Perfil molecular do <i>primer</i> p15-10 na amplificação do DNA de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, Ladder 100pb.....	63
Figura 12A, B e C. Dendrograma de 291 acessos de melancia e dois de melão obtido com os dados do marcador DAF (Anexo 3).....	107
Figura 13. Padrões moleculares dos <i>primers</i> ISSR (835, 849, 841, 845, 844, 834 e 830) amplificando o DNA de oito acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas. Acessos: 01 = T02; 02 = T20; 03 = T204; 05 = T253 (<i>C. lanatus</i>); 04 = T213 (<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>); 06 = T210, 07 = T211 e 08 = T4339 (<i>C. colocynthis</i>).....	71
Figura 14. Padrão molecular do <i>primer</i> 856 na amplificação do DNA de acessos de melancia por meio do marcador ISSR.....	72
Figura 15A, B e C. Primeira parte do dendrograma ISSR d 283 acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas (Anexo 4).....	110

Tabela 1. Lista de acessos de melancia e melão selecionados, a partir do levantamento no BAG de Cucurbitáceas, para caracterização molecular com os marcadores DAF e ISSR, indicando as espécies, local de origem, número de acessos e conjuntos	43
Tabela 2. Acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas selecionados para caracterização molecular, com indicação do conjunto, espécies e subespécies, tratamento (Trat), locais de coleta (Estados e municípios) e código do BAG (Anexo 1).....	102
Tabela 3. Linhagens avançadas de melancia DAF selecionadas para caracterização molecular com os marcadores DAF e ISSR (Anexo 3).....	106
Tabela 4. Organização e distribuição dos acessos de melancia submetidos à análise de variância molecular, indicando os conjuntos, locais de coletas (Estados, regiões e municípios), número de acessos e espécies avaliados por meio de dados fornecidos pelos marcadores DAF.....	47
Tabela 5. Dados de passaporte de 39 acessos de melancia coletados no Nordeste brasileiro, com número do tratamento, código do acesso, características morfológicas, número do BGCIA e local de coleta.....	51
Tabela 6. Lista de <i>primers</i> selecionados na amplificação do DNA de acessos de melancia por meio do marcador DAF, com número total de bandas polimórficas e monomórficas dentro e entre três espécies do gênero <i>Citrullus</i>	57
Tabela 7. Relação de <i>primers</i> utilizados na amplificação de DNA de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, com marcadores DAF e suas respectivas sequências, total de bandas polimórficas e monomórficas	59
Tabela 8 – Divergência genética entre sete linhagens avançadas de melancia obtida por meio de dados fornecidos pelo marcador DAF, com percentual de divergência e identificação das espécies.....	60
Tabela 9. Relação de <i>primers</i> DAF selecionados para amplificação do DNA de 291 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitáceas, mostrando a variação no número de bandas produzidas dentro e entre as diferentes espécies do gênero <i>Citrullus</i> e <i>Cucumis</i>	62
Tabela 10. Acessos e linhagens de melancia do BAG de Cucurbitáceas com 75% de divergência genética, com tratamentos e suas possíveis combinações híbridas, com sequências, números de bandas polimórficas dentro e entre espécies.....	65
Tabela 11. Análise de variância molecular de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas em diferentes níveis hierárquicos, obtida a partir do marcador DAF.....	69
Tabela 12. Relação de <i>primers</i> ISSR que amplificaram o DNA de acessos de melancia e melão, com sequências, números de bandas polimórficas dentro e entre espécies.....	70

Com o objetivo de estudar a variabilidade genética entre os acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro (Petrolina – PE, Brasil), um levantamento no acervo resultou na localização de 753 acessos (agricultura tradicional, espécies do centro de origem e variedades comerciais) e 300 linhagens (produtos do melhoramento) com dados de passaporte. Destes, 291 foram avaliados quanto à variabilidade genética, com 16 *primers* DAF e 11 *primers* ISSR, incluindo dois acessos de melão (*Cucumis melo*) como grupo externo. Os dados foram analisados no programa NTSYS para a estimativa do coeficiente de similaridade de Jaccard e na obtenção dos dendrogramas pelo método UPGMA. As análises dos dados dos marcadores DAF e ISSR revelaram altos índices de polimorfismo (65,3% e 76,9%, respectivamente). Os marcadores DAF foram pouco informativos na separação dos acessos em grupos, não correspondendo com a taxonomia do gênero *Cucumis* e *Citrullus*, porém indicam que há variabilidade expressiva entre os acessos coletados na agricultura tradicional do Nordeste brasileiro, inclusive, mostrando divergência entre os grupos de linhagens analisadas. Os marcadores ISSR revelaram boa precisão na separação das diferentes espécies, sendo determinantes na identificação de polimorfismo e agrupamento dos acessos e linhagens de melancia. Constatou-se grande porcentagem de variação dentro dos quatro conjuntos de germoplasma do banco (76,7%), inclusive identificando que os produtos do melhoramento apresentaram 87,4% de variação dentro dos três grupos de linhagens. Esses resultados indicam que o banco agrega germoplasma muito promissor para dar suporte a programas de melhoramento de melancia no Nordeste Brasileiro. Especialmente, a maior porcentagem de variação foi encontrada nos acessos coletados dentro de cada Estado (86,1%) e de municípios (76,2%) ou grupos de municípios próximos (73,1%) indicando que há necessidade imperiosa de continuar o resgate de germoplasma de melancia da agricultura tradicional nos Estados e municípios ou grupos de municípios não contemplados nesta pesquisa.

Palavras-Chave: *Citrullus*, banco de germoplasma, divergência genética, marcadores DAF e ISSR.

Abstract

With the aim to study the existing genetic variability in the watermelon accessions of the Cucurbit Genetic Active Germplasm Bank for the Northeast Brazil (located in Petrolina-PE, Brazil) a survey of the watermelon collection was carried out, using passport data from 753 accessions (including traditional agriculture, species from the origin center and commercial varieties) and 300 lines (breeding program). From these, 291 were evaluated regarding the genetic variability using 16 primers DAF and 11 ISSR markers and two of melon (*Cucumis melo*) accessions were also included. The data were analyzed using NTSYS to estimative the similarity coefficient of Jaccard and obtain a dendrogram using UPGMA with NTSYS program. The analyses of the data from the DAF and ISSR markers indicated high indices of polymorphism (65.3% and 76.9%, respectively). Both markers revealed good precision in the separation of different species and have also shown that there was expressive genetic variability among the accessions collected in the traditional agriculture of Northeast Brazil as well as genetic diversity among the breeding lines, while the ISSR marker was precise in the identification of polymorphism and grouping of the accessions and breeding lines. The AMOVA showed great percentage of variation within the four germplasm sets (76.7%), also indicating 87.4% of variation within the three groups of breeding lines. These results indicate that the bank has a very promising germplasm to give support to a watermelon breeding program in the Northeast Brazil. Spatially, the greater percentage of variation was found in the accessions collected within each state (86.11) and municipalities (76.2%) or group of near municipalities (73.1) indicating that there is a strong demand to continue rescuing watermelon germplasm from the traditional agriculture in the states, municipalities or group of municipalities in the Northeast Brazil not yet considered previously.

Key-world: *Citrullus*, germplasm bank, genetic diversity, DAF and ISSR markers.

Introdução

A melancia é uma importante cucurbitácea cultivada em diversos países. No Brasil, com dados do ano de 2008, esta cultura apresentou uma ampla área de cultivo (89.336 hectares) e uma produção de 1.995.206 toneladas/ano, contribuindo para um agronegócio anual de mais de R\$ 500 milhões de reais, tendo expressiva participação do Nordeste Brasileiro.

Contudo, apesar do volume expressivo da produção, as áreas de cultivo necessitam de uso de agroquímicos diversos contra os estresses bióticos. Vários são os patógenos que atacam a melancia no Brasil, com destaque para o oídio [*Podosphaera* (sec. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish (*Sphaerotheca fuliginea* Schechtend. Fr.) Pollacci]; a alternária (*Alternaria* spp.), viroses [*Papaya ringspot virus*] - type watermelon (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e a antracnose (*Colletotrichum lagenarium* (syn. *C. orbiculare*, *C. gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae*).

Entretanto, para que programas de melhoramento brasileiros de melancia possam se desenvolver faz-se necessário identificar a variabilidade genética. O Nordeste brasileiro apresenta uma agricultura tradicional expressiva baseada em introduções feitas da África. A variabilidade encontrada na referida região serviu de base para a formação de um Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas (BAG) (Embrapa Semiárido, Petrolina – PE), o qual possui além de amostras da agricultura tradicional, alguns acessos de melancia africanas silvestres (*Citrullus colocynthis* e *C. lanatus* var. *citroides*), variedades comerciais e produtos do melhoramento.

Os marcadores moleculares baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm contribuído para o conhecimento da diversidade genética de diferentes espécies, incluindo acessos preservados em bancos de germoplasma. Os marcadores DAF (*DNA Amplified Fingerprinting*) e ISSR (*Intre-Simple Sequence Repeats*) apresentam propriedades que os destacam dos demais marcadores gerados via PCR, como reprodutibilidade, alta eficiência na detecção de polimorfismo e rapidez na obtenção dos resultados. Os marcadores ISSR complementam as informações do DAF, porque amplificam segmentos do DNA entre regiões hipervariáveis e amplamente distribuídas no genoma.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética da melancia preservada no BAG de cucurbitáceas a partir de informações obtidas com marcadores moleculares DAF e ISSR.

1. Revisão da Literatura

1.1. O gênero *Citrullus* Schrad

1.1.1. Origem e distribuição geográfica

O gênero *Citrullus* (Schrad. ex Eckl & Zeyh) pertence à família Cucurbitaceae, sendo constituído por cinco espécies nativas diploides ($2n = 22$): *C. ecirrhosus* Cogn., *C. colocynthis* (L.) Schrad., *C. rehmanii* de Winter, *C. naudinianus* (Sond.) Hook.f. e *C. lanatus* (Thunb) Matsume & Nakai, todas originárias de regiões africanas, cuja história sobre domesticação e distribuição tem sido amplamente estudadas (WHITAKER & DAVIS, 1962; JEFFREY, 1975; DANE *et al.*, 2007).

Há relatos da *C. colocynthis* nos tempos bíblicos, sendo intensamente utilizada como medicinal e suas sementes como importante fonte de óleo. Esta espécie é classificada como uma herbácea perene, resistente à seca, caracterizada por seus frutos pequenos de polpa branca e extremamente amarga, sendo amplamente distribuída entre a África e o Mediterrâneo (DANE *et al.*, 2007). Por ser uma das espécies mais antigas a ser explorada pelo homem, estudos sobre a sua origem e distribuição têm sido realizados com intuito de esclarecer processos que levaram ao surgimento da melancia cultivada (*C. lanatus* var. *lanatus*), sendo descritas possíveis rotas de distribuição. Dane & Lang (2004), utilizando sequências de DNA cloroplastos e mitocondrial apontaram a África como centro de origem mais provável das espécies, bem como uma possível rota de distribuição saindo do continente africano para o Oriente Médio e o Oeste da Ásia, sugerindo um possível isolamento por distância. Contudo, não há relatos de uma possível rota para o Brasil.

A espécie *C. rehmanii*, monoica anual com $2n = 22$ cromossomos, é nativa do sul da África, sendo descrita como mais intimamente relacionada à *C. lanatus* do que a *C. colocynthis* (JARRET & NEWMAN, 2000). Os frutos dessa espécie diferem morfológicamente dos frutos de *C. lanatus*, sendo globosos com polpa amarga, embora ambas apresentem folhagem bem semelhante (MEUSE, 1962). Segundo Jarret & Newman (2000), o cruzamento entre *C. lanatus* e *C. rehmanii* pode originar descendentes férteis, porém não há relatos sobre o potencial da espécie *C. rehmanii* no melhoramento convencional.

Outra espécie perene, *C. ecirrhosus* Cong, é conhecida apenas na forma silvestre em áreas do deserto da Namíbia (MEUSE, 1962; FURSA, 1972). Segundo Navot & Zamir (1986) e Navot *et al.* (1990), esta espécie apresenta potencial de uso como fonte de alelos para tolerância à seca para *C. lanatus*, uma vez que o cruzamento entre essas espécies é compatível e que foram encontrados genes de *C. ecirrhosus* na espécie de *C. lanatus*.

Estudos morfológicos e citológicos têm revelado que quatro espécies são compativelmente cruzadas e que a manutenção da identidade das diferentes espécies pode ser atribuída ao isolamento geográfico, a diferenças no hábito de florescimento, diferenças genéticas e mudanças cromossômicas estruturais. O gênero *Citrullus* tem sido revisado considerando quatro espécies: *C. lanatus* (sin. *C. vulgaris*), *C. ecirrhosus*, *C. colocynthis* e *C. rehmanii* (de Winter) (MAYNARD, 2001). Há outras duas espécies intimamente relacionadas: *Praecitrullus fistulosus* da Índia e Paquistão e *Acanthosicyos naudinianus* do sul da África do Sul. Contudo, estudos citogenéticos suportam a separação de *Praecitrullus* de *Citrullus* (JEFFREY, 1990)

1.2. A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsume & Nakai]

A melancia é uma das principais espécies que compõem o gênero *Citrullus*, sendo encontrada em diferentes partes do mundo, principalmente nas regiões da África, Ásia e América do Sul. No Nordeste brasileiro, a espécie apresenta ampla diversidade de tipos com variabilidade no tamanho e formato do fruto, cor da polpa, cor da semente e expressão sexual, constituindo importante fonte de germoplasma para o melhoramento genético (MEUSE, 1962; WHITAKER & BEMIS, 1975; QUEIROZ, 2004).

A espécie *C. lanatus* pertence à subfamília Cucurbitoidea, tribo Benicaseae, subtribo Binincasinae, sendo nativa da África (MAYNARD, 2001) e encontra-se dividida em duas variedades botânicas: a *C. lanatus* var. *lanatus* e a *C. lanatus* var. *citroides*. A subespécie *C. lanatus* var. *citroides* produz frutos com polpa não comestível, não amarga e dura, com semente marrom claro ou verde. O sabor amargo característico das cucurbitáceas tem sido atribuído à substância cucurbitacina. Os diferentes tipos desta substância vêm sendo utilizados como critério de classificação para diferentes espécies de *Citrullus*. A cucurbitacina E encontra-se nas espécies *C. lanatus*, *C. colocynthis* e *C. ecirrhosus*. Já a cucurbitacina B e seus derivados ocorrem na espécie *C. naudinianus* (LIU, 2005).

Segundo Esquinas-Alcazar & Gulick (1983), a melancia tem como centro de origem a África. Achados arqueológicos encontrados na Líbia indicam novas rotas de distribuição de seus parentes silvestres, bem como um provável início de domesticação da melancia no Egito, apontando o Norte da África como possível centro de origem da espécie (WASYLIKOWA & VAN DER VEEN, 2004).

Por ser uma das culturas mais antigas a acompanhar o homem, a melancia também tem sido estudada no intuito de esclarecer os processos que levaram à domesticação das plantas cultivadas. Para isto, sequências altamente conservadas do genoma de cloroplastos e

mitocôndrias têm sido exploradas para inferir sobre possíveis rotas de distribuição das diferentes espécies do gênero *Citrullus* (DANE & LANG, 2004; LEVI & THOMAS, 2005; DANE *et al.*, 2007).

A introdução da espécie no Brasil ocorreu primeiramente com os escravos africanos, há cerca de 459 anos. Com isto, diferentes tipos de melancia de várias localidades africanas foram disseminados, acompanhando a ocupação do Nordeste brasileiro. O hábito de cultivar melancia em pequenas áreas e que foi passado de geração a geração onde os agricultores utilizavam as próprias sementes para o plantio, provavelmente constitui um dos principais mecanismos de manutenção e ampliação da variabilidade genética da melancia na região (QUEIRÓZ, 1993; ROMÃO *et al.*, 2008).

Considerando os hábitos culturais desenvolvidos no Nordeste brasileiro e a importância da cultura, é provável que a variabilidade genética da melancia introduzida com os escravos encontre-se conservada, bem como ampliada por meio de cruzamentos naturais (dentro e entre espécies) e ou por ação antrópica nas áreas de cultivo tradicional. Contudo, os longos períodos de seca, o êxodo rural e a substituição da lavoura por cultivares melhoradas são os principais fatores que podem contribuir para o risco de perdas de alelos úteis (QUEIRÓZ, 2004).

Na década de 1950, japoneses e americanos introduziram no Brasil as primeiras cultivares melhoradas como “Charleston Gray”, “Crimson Sweet”, “Omaru Yamato” e “Yamato Sato”, entre outras, o que favoreceu o estabelecimento de cultivos comerciais que se espalharam por diferentes regiões do Brasil, chegando ao Nordeste na década de 1970 (COSTA & PINTO, 1977; RESENDE & COSTA, 2003). Dentre os híbridos antigos e recentes, cita-se “Audry”, “Quetzali”, “Tiger Baby”, “Shadow”, “Boston”, “Extasy”, “Eureka”, “Madera”, “Jetstream”, “Mirage”, “Palomar”, “Rubi” e “Tiffany”, entre outros, (LIMA NETO, 2009). Segundo Castellane & Cortez (1995), a variedade “Crimson Sweet” é o genótipo mais explorado no país. Contudo, as variedades e híbridos comerciais por não terem sido produzidos para as condições bióticas e abióticas brasileiras têm apresentado padrão não satisfatório quanto à produção, bem como suscetibilidade a vários patógenos (FAZZA, 2006; LIMA NETO, 2009).

1.2.1 A cultura da melancia no Nordeste brasileiro

Com uma diversidade climática característica, envolvendo regiões extremamente secas a muito úmidas (300 mm/ano a 2.457 mm/ano), o Nordeste brasileiro vem sendo apontado como um potencial centro de diversidade secundária para as espécies *Citrullus lanatus* spp. (ROMÃO *et al.*, 2008), destacando-se entre as demais regiões quanto à produção de melancia. Dados apontam a importante contribuição da região na produção desta hortaliça para o agronegócio brasileiro, pois em 2005 a produção de melancia na região foi de 455.225 toneladas, apresentando um salto para 560.817 toneladas em 2006, chegando a 607.850 toneladas/ano em 2008 (IBGE, 2008). Vale salientar que os indicadores de produção referem-se apenas às áreas de cultivo irrigado.

Segundo Queiróz (1993), o cultivo de melancia tem sido praticado sob dois sistemas, o irrigado onde os agricultores aplicam insumos como irrigação sistemática, defensivos, adubos e variedades melhoradas e o de sequeiro, onde pequenos produtores cultivam a melancia em períodos chuvosos, tendo o cuidado de armazenar as sementes para diferentes períodos de cultivo. A melancia produzida por pequenos agricultores apresenta variabilidade para diferentes características de plantas, frutos e sementes, não existindo uniformidade na produção, sendo localmente comercializada e com isto, não havendo registros sobre seus índices de produção (QUEIRÓZ, 2004; ROMÃO *et al.*, 2008).

Pragas e doenças são os principais problemas no cultivo da melancia. O fungo *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm é o agente causal do crestamento gomoso do caule e constitui uma dos principais limitantes no cultivo da melancia, provocando cancro do caule, queima das folhas e apodrecimento dos frutos (SANTOS *et al.*, 2005). A doença é fonte de preocupação no mundo, principalmente nos Estados Unidos e no Brasil. Segundo Santos *et al.* (2006), o controle químico não é eficiente, o que tem sido atribuído à rápida infecção das folhas e à resistência dos vetores e patógenos aos princípios ativos, como os bemizidazóis e tiofanato metílico, que vêm sendo aplicados há mais de 15 anos nos Estados do Tocantins, Goiás e no Distrito Federal.

O oídio, doença causada pelo fungo *Podosphaera* (sect *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castang) U. Braun & N. Shish. [*Sphaerotheca fuliginea* (Schlechtend: Fr.) Pollaci], caracteriza-se pelo surgimento de pontos brancos e pulverulentos correspondentes a micélios, conidióforos e conídios do fungo. Este patógeno provoca perda de área foliar, redução no tamanho e número de frutos e redução do período reprodutivo da planta (STADNIK *et al.*, 2001). A ocorrência de diferentes raças de oídio no Brasil tem sido relatada para melão

(*Cucumis melo*). A raça 1 foi identificada na década de 1980 por vários autores ocorrendo em diversos Estados brasileiros. Em 2000, a raça 2 foi identificada em São Paulo, Distrito Federal, Pernambuco e Rio Grande do Norte. No Nordeste brasileiro foram identificadas as raças 3, 4 e outras duas ainda não identificadas. No entanto, não se tem relatos da raça que ataca a melancia (FAZZA, 2006).

O controle do oídio no cultivo do melão é baseado no emprego de variedades resistentes e de produtos químicos. Contudo, o alto custo dos agroquímicos e seus efeitos à saúde e ao meio ambiente constituem fatores limitantes no cultivo da melancia. O desenvolvimento de seleção assistida por marcadores e a identificação de genes de resistência são considerados a melhor alternativa para superar o problema (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Os vírus da família Potyviridae constituem um grave problema no cultivo da melancia, bem como nas demais cucurbitáceas. Dentre os principais vírus, o *Papaya ringspot virus* - type Watermelon (PRSV-W) da família *Potyviridae* gênero *Potyvirus*, é considerado um dos mais importantes, devido à predominância em áreas de produção de cucurbitáceas no país, sendo o agente causal do mosaico comum (YUKI *et al.*, 2000; PACHECO *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2009). Igual atenção tem sido atribuída ao vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus*, WMV), pois tem causado prejuízos significativos à produção dessas olerícolas (YUKI *et al.*, 2000; GUNER *et al.*, 2002). Na China, estudos de herança revelam que a resistência ao vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) é controlada por um único gene recessivo, simbolizado pela sigla *zym-CH* e a tolerância ao WMV atribuída a dois genes recessivos (XU *et al.*, 2004).

1.3 Recursos genéticos vegetais

1.3.1. Histórico, conservação e uso

Durante alguns milênios, a humanidade tem feito uso da biodiversidade para o bem estar humano e seu desenvolvimento econômico, sem se preocupar com a perda e até mesmo com a extinção de espécies, principalmente aquelas de maior interesse. A partir de 1961 a preocupação com os recursos genéticos vegetais tornou-se mais evidente, após uma Conferência Internacional realizada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), cujo tema relacionava-se com a perda de genes provocada pela destruição acelerada da vegetação primária e abandono das variedades primitivas em substituição por novas cultivares melhoradas (GOEDERT, 2007).

Dentro deste contexto uma segunda conferência, também realizada pela FAO em 1974, resultou na criação do *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), depois denominado *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), atualmente denominado *Biodiversity International*. Esse centro tem como estratégia internacional ressaltar a importância do manejo e conservação dos recursos genéticos. Já em 1984 criou-se a comissão de Recursos Fitogenéticos, que se constitui em um fórum intergovernamental que tem priorizado o desenvolvimento de um Sistema Mundial para conservação e utilização dos recursos fitogenéticos para alimentação e agricultura (SANTOS & BETTENCOURT, 2001). Cerca de 150 países, incluindo o Brasil, fazem parte do Sistema Mundial, o qual ressalta a conservação *ex situ*, a conservação *in situ* e o uso sustentável dos recursos genéticos. Em 1992, na Conferência das Nações Unidas do Meio Ambiente e Desenvolvimento os recursos genéticos vegetais tiveram sua importância reconhecida, sendo aprovada a Convenção da Diversidade Biológica, assinada por 168 países, cujo objetivo envolve a conservação da diversidade biológica, o uso sustentável de seus componentes e a divisão justa e equitativa dos benefícios advindos do uso dos recursos biológicos (GOEDERT, 2007).

Diante do crescente risco de erosão dos recursos genéticos vegetais, estratégias para conservação dos mesmos têm sido adotadas. A preocupação maior teve início na FAO na década de 1960, tendo sido criado o *Biodiversity International*. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, desde 1974, organiza e orienta as atividades em recursos genéticos, por meio de uma rede constituída de 166 Bancos Ativos de Germoplasma, que envolve 152 gêneros e 221 espécies vegetais, animais e microorganismos. A coleção de base é constituída por um acervo de aproximadamente 170 mil acessos conservados em câmara fria, em campo ou *in vitro* (GOEDERT, 2007).

A conservação dos recursos genéticos vegetais tem sido realizada tanto por meio de conservação *in situ* (no local de ocorrência) quanto por conservação *ex situ* (fora do local de ocorrência). A conservação *in situ* significa a conservação de ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus meios naturais e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos meios onde tenham desenvolvido suas propriedades características. Já a conservação *ex situ* significa a conservação de componentes da diversidade biológica fora de seus habitats naturais (VALOIS, 1996; MORALES & VALOIS, 1996).

Com a expansão da agricultura comercial, diferentes sistemas de exploração agrícola, que de algum modo promoviam a preservação da diversidade local, vêm sendo modificados e, conseqüentemente, muitas variedades locais têm sido perdidas. Visando diminuir a erosão genética, os bancos de germoplasma muitas vezes representam a única opção para

conservação da diversidade. Vale salientar que a conservação *ex situ* não visa apenas à conservação pela conservação; busca igualmente assegurar o crescimento agrícola, mantendo representantes das diferentes espécies disponíveis para criadores, agricultores e pesquisadores.

Por germoplasma entende-se o elemento dos recursos genéticos que representa a variabilidade dentro de cada espécie (variabilidade intra-específica), com fins de utilização para pesquisa em melhoramento genético e em biotecnologia (GOEDERT, 2007). Neste contexto, Chang *et al.* (1979) descrevem as três principais fontes de germoplasma: o *Centro de Diversidade*, onde se encontram os tipos primitivos, híbridos naturais entre cultivares e espécies silvestres relacionadas, além dos gêneros relacionados; o *Centro de Cultivo* refere-se aos tipos comerciais, variedades obsoletas e os tipos cultivados na agricultura tradicional e nos quintais domésticos e o *Conjunto do Programa de Melhoramento*, que envolve as linhas puras, variedades híbridas elite ou F₁, mutantes, poliploides, aneuploides, híbridos intergenéricos e interespecíficos.

Segundo Valls (2007), a disponibilidade de informações sobre acessos nos bancos de germoplasma brasileiros é limitada, pois, com exceção de alguns cereais e leguminosas, o nível de informação sobre acessos reunidos no Brasil é muito baixo. Sloten (1987) ressaltava três causas principais: 1) a falta de interesse de parte dos melhoristas, que geralmente já possuem coleções de trabalhos substanciais; 2) o desejo da maioria dos melhoristas de trabalhar com materiais avançados e não com raças locais, cultivares antigas e espécies silvestres conservadas em bancos de germoplasma; 3) a falta de informação sobre os materiais dos bancos de germoplasma. Marshall (1989) acrescenta muitas outras causas, incluindo a falta de melhoristas para muitas espécies, uma causa até então muito presente no país.

De acordo Queiróz (2004), essas limitações podem ser contornadas durante o processo de manejo dos recursos genéticos de um banco de germoplasma, explorando a fase de multiplicação do germoplasma para caracterizar os acessos e estabelecer descritores, pois para as culturas anuais preservadas *ex situ*, quando se vai fazer a multiplicação das sementes coletadas, no mesmo experimento permite a coleta de informações sobre muitos caracteres morfológicos, constituindo-se em uma caracterização preliminar dos mesmos, tanto para caracteres de planta como caracteres dos frutos.

1.4. Banco ativo de germoplasma de melancia

A riqueza genética da melancia existente no Nordeste brasileiro, introduzida na época do Brasil colonial (1551-1857), havia sido detectada na década de 1980, deixando pesquisadores preocupados com a perda de alelos úteis, devido ao êxodo rural e secas prolongadas (QUEIRÓZ, 1993). Neste contexto, as primeiras expedições de coleta de germoplasma em áreas de agricultura tradicional do Nordeste brasileiro iniciaram em áreas próximas do município de Petrolina – PE e Juazeiro - BA, sendo coletados 42 acessos de melancia, entre outras cucurbitáceas. Os mesmos, quando submetidos à caracterização em campo, revelaram variabilidade para diferentes caracteres de planta, fruto e semente. Quando avaliados com relação à suscetibilidade aos principais patógenos que atacam os cultivos da área irrigada, indicaram a presença de genes de resistência ao oídio, a viroses e à micosferela em vários acessos (DIAS *et al.* 1996; QUEIRÓZ, 1993; 2004; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Estudos posteriores revelaram a ocorrência de frutos de melancia com polpa branca e baixo teor de sólidos solúveis, encontrados entre acessos utilizados pelos agricultores para alimentação animal, sendo os mesmos caracterizados citogeneticamente e identificados, por Assis (1994) como pertencentes à subespécie *Citrullus lanatus* var. *citroides*. Borges (1996), avaliando acessos da subespécie *C. lanatus* var. *lanatus* resistente ao oídio, reportou que esta resistência é controlada por um único alelo dominante.

Considerando a variabilidade genética da melancia encontrada em várias comunidades em torno de Petrolina – PE e Juazeiro - BA, novas questões sobre a existência e distribuição da mesma em diferentes áreas de agricultura tradicional do Nordeste brasileiro surgiram. Questionamentos em torno da origem e manutenção da variabilidade genética da melancia deram suporte ao estudo sobre a dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia em três regiões do Nordeste Brasileiro (Depressão Sertaneja, Maranhão e Bahia), ficando evidenciada a influencia dos escravos africanos na introdução de sementes de melancia na região, assim como a disseminação das mesmas durante a ocupação da região (ROMÃO *et al.*, 2008).

Quanto à manutenção e ampliação da variabilidade genética, Romão *et al.* (2008) destacam três componentes:

- 1) Histórico – com o tráfico de escravos e a colonização do Nordeste;
- 2) Genético – com os fenômenos de dormência de sementes, explosão de frutos maduros e intercruzamentos;

- 3) Ecológico – envolvendo a dispersão das sementes pelos animais e sementes deixadas pelos agricultores na própria roça.

Assim, o nível de variabilidade encontrada na agricultura tradicional das regiões estudadas destaca o Nordeste brasileiro, de acordo com os autores, como um potencial centro secundário de diversificação e uma área importante para coleta de germoplasma (ROMÃO *et al.*, 2008), embora os autores tenham analisado uma amostra muito reduzida de acessos de apenas uns poucos municípios de três regiões. No processo de manejo de banco de ativo de germoplasma, diversas atividades desenvolvidas nas diferentes fases de estudo e manejo do Banco Ativo de Cucurbitáceas foram descritas por Ramos *et al.* (2007), envolvendo as etapas sequenciais como coleta, multiplicação, caracterização, preservação/conservação e avaliação.

1.4.1. Manejo do banco ativo de germoplasma de melancia

1.4.1.1 Coleta

A coleta de germoplasma envolve um conjunto de atividades que visam à obtenção de unidades físicas vivas, que contenham a composição genética de um organismo ou amostra populacional de uma espécie, com habilidade de se reproduzir (WALTER & CAVALCANTI, 2005). A justificativa para coleta de germoplasma envolve toda a discussão relacionada à totalidade de plantas utilizadas pelo homem, quando comparada ao número de espécies existentes na natureza, o risco iminente da produção agrícola provocado por doenças e pragas que podem comprometer a alimentação humana e o risco de perda de genes úteis quando se considera a substituição de lavouras por novas cultivares e degradação ambiental (WALTER *et al.*, 2007). Vale salientar a importância de se coletar espécies nativas como fonte de alelos para resistência a estresses abióticos, principalmente quando se considera futuras mudanças climáticas.

Com relação à coleta de germoplasma de cucurbitáceas, o resgate de diferentes espécies tem sido considerado de extrema prioridade, devido às constantes introduções de variedades melhoradas em áreas de reserva indígenas e de cultivo tradicional (QUEIRÓZ, 2004; TAHIR & YOUSIF, 2006).

1.4.1.2. Introdução e intercâmbio

Embora o Brasil possua mais de 55 mil espécies de plantas superiores, destacando-se entre os demais países em termos de biodiversidade, a agricultura é dependente da introdução

de recursos genéticos. Três espécies exóticas (arroz, trigo e milho) constituem a base alimentar da população e, na linha de produção, o país se destaca como maior produtor de outras duas espécies exóticas; citros e café, sendo o segundo maior produtor mundial de soja (GOEDERT, 2002; MARQUES & MARINHO, 2007).

Pode-se dizer que toda essa dependência tem uma base histórica iniciada na época das grandes navegações. Neste período, os colonizadores portugueses contribuíram com a introdução de várias espécies no Brasil, inclusive favorecido pelo tráfico negreiro, que possibilitou o fluxo de materiais africanos como inhame, quiabo, jiló, maxixe e melancia, entre outras espécies. Outras contribuições foram realizadas pelos padres da Companhia de Jesus que chegaram ao Brasil a partir de 1549 e os jesuítas que contribuíram com a introdução de algumas espécies, como a canela (MADEIRA *et al.*, 2008). Segundo Madeira *et al.* (2008), os colonos e os navegadores portugueses introduziram, além da cana-de-açúcar, outras fruteiras como limoeiros, laranjeiras, cidreiras, figueiras, romãzeiras e as hortaliças como alface, couve, repolhos, nabos, cenouras, espinafres, alhos, mostarda, gengibre e inhame.

Atualmente, todo processo de introdução e quarentena é subordinado à legislação, que está baseado no Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal e nas portarias complementares que regulam e estabelecem normas segundo a necessidade de cada caso. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é o órgão credenciado que pode autorizar o intercâmbio de germoplasma e adotar procedimento de quarentena, sendo amparado pela portaria nº 224 de 3 de maio de 1977 (RAMOS *et al.*, 2007). Este intercâmbio abrange a introdução (exportação) e o trânsito interno de germoplasma vegetal, atendendo a um grande número de usuários no Brasil e no Exterior (MARINHO *et al.*, 2003). No caso do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária, coordenado pela EMBRAPA, segue-se a portaria supracitada para germoplasma introduzido para fins de pesquisa.

O intercâmbio de germoplasma é uma atividade importante e fundamental para o enriquecimento do patrimônio genético, que promove o desenvolvimento de novas variedades que incrementam a agricultura nacional (MARINHO *et al.*, 2003). Com relação ao intercâmbio de germoplasma de cucurbitáceas, além dos acessos coletados na agricultura tradicional como anteriormente descritos, em 1994 foram introduzidos 35 acessos de melancia de origem de países africanos, correspondendo a diferentes espécies. Assim, o BAG de Cucurbitáceas, neste mesmo ano, foi enriquecido com acessos da espécie *Citrullus lanatus* var. *citroides* da África do Sul, *C. colocynthis* da Etiópia e acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* oriundos da África do Sul, Ghana, Nigéria e Zaire.

Considerando a dinâmica evolutiva da melancia mantida na agricultura tradicional do Nordeste brasileiro aliada ao manejo de sementes pelos agricultores e às oportunidades de

intercruzamento de populações africanas de diferentes regiões (ROMÃO, 1995; 2000), é provável que o perfil de variabilidade das populações existentes na região seja expressivo ou até mais variável do que as mesmas espécies mantidas na África. Uma comparação do perfil molecular das espécies de diferentes centros de diversidade poderá auxiliar no esclarecimento dessa questão.

1.4.1.3. Multiplificação e regeneração

A multiplificação de acessos preservados em bancos de germoplasma constitui uma das principais fases do manejo de recursos genéticos, pois raramente é possível coletar quantidades adequadas para o armazenamento de sementes, principalmente aquelas provenientes das reservas dos agricultores. Desta forma, o processo de multiplificação tem por finalidade ampliar o número de sementes para fins de conservação, intercâmbio e estabelecimento de coleções de trabalho, bem como o conhecimento prévio dos materiais a serem conservados (QUEIRÓZ, 1993; ENGEL & VISSER, 2003; RAMOS *et al.*, 2007).

Segundo Hawkes (1982), a multiplificação de amostras da coleção ativa deve ser realizada com sementes da própria coleção, de forma direta. Já para evitar perdas em termos de integridade genética o material das coleções de base deve ser submetido à regeneração periódica. A distribuição de germoplasma por parte do banco exige certificação fitossanitária e, portanto, a produção sob condições controladas, uma vez que as sementes quando coletadas na natureza ou obtida dos agricultores ou mercados podem apresentar viabilidade e sanidade desconhecida (ENGEL & VISSER, 2003).

Para Engel & Visser (2003), os procedimentos para multiplificação e regeneração de acessos em bancos de germoplasma são provenientes de estudos de genética de populações, que podem indicar problemas causados por mudanças genéticas e deriva genética, de modo a favorecer a manutenção do mais alto grau de integridade genética. Neste contexto, as técnicas moleculares permitem monitorar as alterações na composição genética dos acessos conservados em bancos de germoplasma.

No caso do BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, estratégias de multiplificação e regeneração são adotadas conforme a espécie. Como a melancia é alógama, mas que também pode apresentar sistema misto de reprodução (FERREIRA, 2000), os processos de polinização são desenvolvidos visando manter a variabilidade originalmente coletada, sendo realizados por polinização livre, SIB (cruzamento entre plantas dentro do acesso) e autofecundação, obtendo-se diferentes progênies de meios irmãos e endogâmicas quando se tem polinização livre, bem como irmãos germanos e endogâmicas quando se tem

SIB e autofecundação, respectivamente. Concomitantemente, durante a multiplicação são realizadas atividades de caracterização morfológica, o que favorece o conhecimento das características dos acessos para uso dos mesmos em programas de melhoramento ((FERREIRA *et al.*, 2000; QUEIRÓZ, 2004).

1.4.1.4. Caracterização

1.4.1.4.1. Caracterização morfológica

A degradação da agrobiodiversidade vem provocando uma intensa busca e conservação de germoplasma, devido aos efeitos de erosão genética. Com isto, a coleta de germoplasma visa minimizar os efeitos da crescente vulnerabilidade de culturas na agricultura avançada e suscetibilidade potencial que pode levar a quebra de safras. Como consequência, o acúmulo de material preservado e as limitações de uso devido à falta de informações constituem um desafio para gestores de bancos de germoplasma. Dentre as atividades de manejo de um banco de germoplasma, a fase de caracterização constitui etapa fundamental para viabilizar o germoplasma e consequentemente favorecer sua utilização em programas de melhoramento (GIAGOMETTI, 1988; VALLS, 1988).

A caracterização de acessos de germoplasma consiste em conhecer a expressão dos caracteres altamente herdáveis, envolvendo características morfológicas, proteínas de sementes e marcadores moleculares. A caracterização possibilita ainda a discriminação entre os fenótipos, levando ao agrupamento simplificado dos acessos. Para isto, avalia-se um grande número de descritores, tanto qualitativos como quantitativos. Descritores morfológicos são características que permitem diferenciar e identificar facilmente os acessos em campo e devem apresentar alta herdabilidade e se expressar em todos os ambientes, sendo o estado do descritor o valor que o mesmo poderá assumir (GIACOMETTI, 1988). Diferentemente, a avaliação permite descrever as características quantitativas, com forte influência ambiental controlada por poucos ou muitos genes de difícil manipulação e úteis no processo de melhoramento (RAMOS *et al.*, 2007).

O emprego de marcadores morfológicos na caracterização de germoplasma tem possibilitado grandes avanços na descrição da divergência genética entre acessos. Na realização desses estudos, são aplicadas técnicas biométricas, principalmente análises multivariadas (componentes principais, análise de agrupamento e variáveis canônicas). A técnica de variáveis canônicas possibilita representar os indivíduos em espaço multidimensional, de modo que as dimensões sejam correspondentes às características

medidas, obtendo-se dados de similaridade entre indivíduos por meio de dispersão gráfica. A aproximação ou distância, neste espaço, indica o quanto os indivíduos são geneticamente similares (CRUZ & REGAZZI, 2001).

Para os estudos de agrupamento, primeiramente são estabelecidas medidas de dissimilaridade, como a distância de *Mahalanobis* (D^2), sendo que esta distância é aplicada quando diferentes características são avaliadas em coleções de acessos, de modo a representar a variabilidade genética. Neste contexto, geralmente é utilizado o método de otimização de Tocher, onde os grupos originalmente avaliados são subdivididos de forma que a maior distância média intragrupo é menor que a distância intergrupo. O critério utilizado para a escolha do método multivariado depende do conjunto de dados, da análise a ser realizada e qual a precisão requerida (CRUZ & REGAZZI, 2001).

O Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro dispõe de 1.527 acessos de diferentes espécies (*Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Citrullus lanatus*, *Cucumis melo*, *Cucumis anguria*, *Lagenaria siceraria* e *Momordica* sp.), dos quais 600 são de *Citrullus* sp. (QUEIRÓZ *et al.*, 1999). Estudos têm sido realizados visando intensificar a caracterização dos acessos de melancia preservados no banco. Neste contexto, experimentos em campo foram conduzidos na Estação Experimental da Embrapa em Bebedouro (Petrópolis, PE) e Mandacaru (Juazeiro, BA), com intuito de diferenciar os acessos, selecionar descritores importantes para determinação de variabilidade genética presente no BAG, estimar a divergência genética entre acessos de modo a identificar grupos promissores (ROMÃO, 2000; SILVA, 2004; SILVA *et al.*, 2006).

A caracterização de germoplasma de melancia inicia com a determinação da biologia floral dos acessos. Segundo Mohr (1986), as flores de melancia são caracteristicamente pequenas e vistosas, quando comparadas a outras espécies de cucurbitáceas cultivadas, sendo a maioria monoica, mas havendo também variação na expressão sexual, podendo a flor ser hermafrodita, monoica, ginomonoica, andromonoica, trimonoica, ginoica ou androica.

Romão (1995) promoveu a caracterização morfológica de 39 acessos de melancia coletados em três regiões do Nordeste brasileiro utilizando 26 descritores, detectando grande variabilidade genética, tanto dentro de populações de uma mesma região como entre populações de regiões distintas. A partir dos resultados obtidos, o autor sugere uma lista de 21 descritores específicos para a melancia que pode facilitar a caracterização e avaliação de acessos de melancia.

Dentre os descritores sugeridos destacam-se o comprimento do cotilédone, tamanho da folha, tamanho do pecíolo, comprimento do internó, diâmetro do ramo principal, número de ramos, número de dias para o florescimento, distância para a primeira flor feminina a partir da

base do caule, peso do fruto, comprimento do fruto, diâmetro do fruto, espessura da casca, espessura da polpa, teor de sólidos solúveis, número de sementes, peso de 50 sementes e tamanho de sementes como os mais informativos na caracterização de acessos de melancia.

Na discriminação dos acessos coletados, destaca-se variação quantitativa e variação qualitativa para plantas, frutos e sementes. O caráter formato do fruto revelou tipos bastante variados, sendo cilíndrico, redondo, oval e longo de ocorrência nas três regiões, predominando um tipo ou outro de acordo com as preferências locais por parte dos consumidores/agricultores (QUEIRÓZ, 1993; ROMÃO, 1995). A cor externa dos frutos igualmente revela certa tendência local, predominando o verde escuro no Maranhão, verde médio nas áreas de Depressão Sertaneja, envolvendo as regiões de Paulistana – PI; Ouricuri, Cabrobó e Petrolina – PE e Juazeiro, Casa Nova e Uauá – BA, e verde claro de maior predominância na Bahia e no Maranhão. Vale salientar que a preferência local por determinados tipos não impede a ocorrência dos demais tipos, apenas variando em termos de frequência.

O padrão de casca é um caráter de significativa importância para o uso em programas de melhoramento, sendo variáveis nas referidas regiões onde ocorrem tipos com listras, rendilhados, mosqueados e sem listras. A busca por germoplasma para o caráter padrão de casca com listras pode ser realizada na Bahia, Maranhão e Depressão Sertaneja onde esses tipos ocorrem de forma predominante, mas germoplasma com tipo mosqueado tem maior expressão nas áreas de Depressão Sertaneja e os tipos sem listras ocorrem com mais frequência no Maranhão.

A variabilidade genética da melancia para cor da polpa apresenta-se expressivamente variável, sendo controlada por vários genes e um inibidor para cor amarela. Desta forma, o melhoramento para uma cor de polpa específica revela-se muitas vezes como desafiante devido às frequentes distorções encontradas na herança de alguns genes. Fenótipos não muito comuns encontram-se nas populações segregando de vermelho a amarelo canário. Alguns frutos revelam coloração diferenciada entre porções da polpa, apresentando centro róseo e margem branca ou polpa branca com blocos rósea (GUSMINI & WEHNER, 2006).

1.4.1.4.2. Caracterização molecular

Tecnologias modernas têm sido aplicadas como ferramentas na caracterização de germoplasma e a principal vantagem está relacionada à possibilidade de se avaliar um grande número de acessos em uma única análise, favorecendo a disponibilidade de informações tão necessária aos melhoristas.

As isoenzimas foram as primeiras a serem utilizadas como técnica bioquímica na caracterização de germoplasma. As limitações relacionadas à caracterização morfológica favoreceram a aceitação das isoenzimas como ferramenta molecular (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As isoenzimas são múltiplas formas de uma mesma enzima com funções específicas, que representam um grupo especializado de proteínas, sendo encontrado em todos os organismos (CLOUTIER & LANDRY, 1994). Apresenta natureza codominante o que possibilita a identificação de genótipos homozigotos e heterozigotos, permitindo a separação de indivíduos com alto grau de parentesco. Contudo, o número de locos detectado constitui a principal limitação da técnica. Navot & Zamir (1987) realizaram análise eletroforética de 26 isoenzimas, obtendo-se informações sobre a filogenia do gênero *Citrullus*, separando as espécies *C. lanatus* e *C. lanatus* var. *citroides* em um grupo e a *C. colocynthis* em outro grupo, sendo que a espécie *C. lanatus* var. *citroides* apresenta-se mais intimamente relacionada com a espécie *C. ecirrhosus*. A variação em seis bandas protéicas extraídas de semente corrobora com estudos filogenéticos do gênero e espécies relacionadas.

O cruzamento e retrocruzamento entre *C. lanatus* e *C. colocynthis* revelaram segregação de isoenzimas e proteínas de sementes, sendo identificados quatro grupos de ligação (NAVOT & ZAMIR, 1986). Assis *et al.* (2000) estudaram a variabilidade de 39 acessos de melancia comum (*C. lanatus* var. *lanatus*) e seis acessos de melancia forrageira (*C. lanatus* var. *citroides*), coletados em áreas de agricultura tradicional do Nordeste brasileiro e preservadas no BAG de Cucurbitáceas, por meio de seis sistemas isoenzimáticos, encontrando divergência genética entre melancia comum e melancia forrageira, mas nenhuma divergência entre os acessos de melancia comum, não sendo consistente com os estudos realizados por Romão (1995), que detectou variação morfológica no mesmo grupo de acessos estudados, com implicações para o melhoramento da melancia.

As principais aplicações dos marcadores moleculares estão relacionadas à organização de germoplasma e à estimativa da diversidade genética dentro e entre diferentes espécies de

cucurbitáceas (KATZIR *et al.*, 1996; FERRIOL *et al.*, 2004). Os acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas também têm sido caracterizados por meio de marcadores moleculares. Capeloto (2003) estudou 18 acessos de melancia coletados na ilha de São Luis – MA, aplicando 59 *primers* que produziram 417 fragmentos, não sendo informado o total de bandas polimórficas, revelando ampla variabilidade dentro e entre os acessos. A informação da existência de variabilidade entre um pequeno grupo de acessos coletados em uma ilha levou a questionamento sobre a distribuição desta variabilidade no Nordeste Brasileiro. Silva *et al.* (2006) caracterizaram por meio de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD) 43 acessos de melancia coletados em três regiões da Bahia (Irecê, Chapada Diamantina e Vitória da Conquista), sendo os acessos diferenciados morfológicamente em dez grupos, com nove características contribuindo com 85% para divergência genética entre acessos. A análise molecular revelou 28 grupos, sendo alguns coincidentes com o agrupamento morfológico quanto à distribuição dos acessos nos grupos. A variância molecular indicou 46,3% de variabilidade genética dentro de acessos coletados numa mesma região e 24,6% entre acessos de regiões distintas.

Desta forma, a associação dos marcadores morfológicos com os moleculares constitui em importante ferramenta na caracterização de acessos de melancia. Considerando a relevância da caracterização morfológica na identificação de caracteres de importância econômica e suas limitações quanto à ação dos efeitos de ambiente e principalmente em virtude do elevado número de acessos a serem avaliados em campo, a caracterização molecular constitui vantagem possibilitando a análise de um maior número de acessos em curto prazo de tempo.

1. 4. 1. 5. Avaliação de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas

No processo de avaliação de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas os caracteres relacionados à resistência a doenças, bem como os relacionados à produção e qualidade dos frutos são os mais estudados. Avaliação dos acessos de melancia teve início com a caracterização fisiológica da micosferela (*Didymella bryoniae*) e identificação de fontes de resistência em acessos coletados no Maranhão, Pernambuco e Bahia, com alto índice de resistência encontrado entre acessos coletados no Maranhão (DIAS *et al.*, 1996; 1999). Também foram identificadas fontes de resistência ao oídio em vários acessos coletados em municípios ao redor de Petrolina – PE e Juazeiro - BA. Estudos realizados por Borges (1996) revelou que a herança da resistência ao oídio é monogênica e dominante.

Halfeld-Vieira *et al.* (2004) relatam a ampla dispersão do PRSV-W em cultivos de cucurbitáceas no território nacional e a expansão do ZYMV no mundo. Vários estudos têm revelado variação no comportamento das cucurbitáceas na presença de vírus da família Potyviridae. Maluf *et al.* (1997) encontraram fontes de resistência ao PRSV-W em acessos de *Cucurbita moschata* e *C. maxima* coletados no Brasil em áreas de cultivo tradicional. Oliveira *et al.* (2002) avaliaram fontes de resistência em acessos de melancia coletados no Nordeste brasileiro encontrando resistência ao PRSV-W, WMV e ZYMV, sendo a resistência isolada ou em combinação com outro potyvirus.

A seleção de acessos e progênes de melancia resistentes a viroses tem revelado comportamento diferenciado frente aos vários patógenos. Silveira *et al.* (2005), constataram plantas não infectadas com o PRSV-W em seis acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, dois acessos não infectados com WMV e cinco acessos não infectados com o ZYMV. Progênes desses acessos apresentaram percentagem variando de 20 a 100% de resistência ao PRSV-W e de 60 a 100% de resistência a WMV, contudo nenhuma progênie resistente ao ZYMV foi detectada, revelando padrão diferenciado na genética da resistência ao ZYMV.

Um levantamento sorológico de vírus nas principais cucurbitáceas na região do Submédio São Francisco tem revelado a ocorrência dos três potyvirus (PRSV-W, WMV e ZYMV), indicando que programas de melhoramento em cucurbitáceas visando resistência a viroses na região devem ser desenvolvidos (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Avaliações quanto às características de planta e fruto também têm sido realizadas. Nesse sentido, Ferreira *et al.* (2002) estimaram a capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação e efeito recíproco (ER) em relação à precocidade, componentes de produção e características do fruto em sete populações de melancia, obtendo-se efeitos significativos na maioria das variáveis analisadas, exceto número de fruto por planta.

A capacidade geral de combinação está diretamente relacionada a efeitos aditivos e representa o comportamento médio dos pais em combinações híbridas. Já a capacidade específica de combinação envolve os efeitos gênicos não-aditivos, caracterizando os desvios de combinações híbridas em relação ao comportamento médio dos pais. A combinação híbrida mais favorável é a que representa maior CEC, na qual pelo menos um dos genitores tenha maior CGC, sendo divergente em relação ao genitor com o qual será cruzado. Contudo, é importante frisar que o cruzamento entre dois genitores com alta CGC e divergentes nem sempre resulta na obtenção do melhor híbrido em um dialelo, devido principalmente aos efeitos de dominância envolvidos no controle dos caracteres (VENCOVSKY & BARRIGA, 1992; FERREIRA *et al.*, 2002).

Souza *et al.* (2002) estimaram a capacidade de combinação entre genitores tetraploides e diploides de melancia, sendo evidenciada ação gênica aditiva e não aditiva entre os caracteres analisados. Por outro lado estudos envolvendo análise de capacidade combinatória, bem como a caracterização morfológica são limitados em virtude do elevado número de acessos preservado no BAG de Cucurbitáceas, tendo-se um pequeno quantitativo de acessos caracterizados e avaliados. Faz-se necessária a utilização das técnicas moleculares, que permitam a análise de maior número de amostras em um único momento, visando ampliar o número de acessos caracterizados.

1.5. Aplicação dos marcadores moleculares na caracterização de germoplasma

Toda atividade para conservação deve favorecer o conhecimento da diversidade genética, que em geral envolve a descrição da variação das características morfológicas, principalmente as características morfoagronômicas de interesse direto para o uso. Contudo, a caracterização morfológica apresenta certas limitações, como por exemplo, caracteres altamente herdáveis, que muitas vezes mostram pouca variação e até mesmo a expressão do caráter estudado em geral sofre forte influência do ambiente (KARP *et al.*, 1997).

Porém, as limitações têm favorecido o desenvolvimento de abordagens e tecnologias que permitem a obtenção de informações diretamente do DNA, a partir de técnicas moleculares desenvolvidas para descrever o polimorfismo contido na molécula (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH & MCCLELLAND, 1990). Vale salientar que essas tecnologias não substituem, mas complementam a caracterização morfológica.

Com o desenvolvimento da PCR, várias tecnologias moleculares podem ser aplicadas em muitos aspectos que envolvem a conservação de germoplasma, como caracterização, manutenção e uso. A técnica de PCR possibilita a amplificação de sequências de DNA específicas, por meio de três passos essenciais: (1) desnaturação, que consiste na separação da hélice dupla de DNA; (2) anelamento de dois *primers* (oligonucleotídeos) à fita simples do DNA e (3) extensão dos *primers* pela enzima termoestável DNA polimerase (HENSON & FRENCH, 1993). A especificidade da amplificação depende primeiramente da sequência dos *primers* desenhados, que em geral apresenta um comprimento seletivo que envolve de 20-24 nucleotídeos e da temperatura de anelamento. Com o estabelecimento de métodos para isolamento do DNA de plantas e da técnica de PCR (EDWARD *et al.*, 1991), várias informações têm sido obtidas para o entendimento das relações evolutivas em plantas.

Apesar da eficiência na identificação de polimorfismo do DNA, a técnica de PCR apresenta limitações, como a necessidade de conhecimento prévio sobre a sequência de

nucleotídeo da espécie a ser estudada, os custos elevados para obtenção deste conhecimento e para realização das análises da sequência do DNA. Após o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA utilizando *primers* pequenos e de sequência arbitrária o uso da tecnologia da PCR tornou-se acessível, possibilitando a análise genética de diversas espécies a um custo baixo e de forma simplificada (WILLIAMS *et al.*, 1990; KARP *et al.*, 1997; FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998; LACERDA *et al.*, 2002).

Diferentes marcadores têm sido avaliados quanto à sua eficiência de detectar polimorfismo e reprodutibilidade (JONES *et al.*, 1997; BELAJ *et al.*, 2003). Tendo em vista que a eficiência de um marcador está diretamente relacionada à quantidade de polimorfismo capaz de detectar, a mesma pode ser significativamente ampliada pelo uso de *primers* previamente identificados como mais informativos (VIDAL *et al.*, 2005). Tais informações permitem a identificação de indivíduos com menor divergência dentro do grupo e maior divergência entre grupos. O número de marcadores empregado na análise, que por sua vez independe do número de *primers* utilizados, pode variar de acordo com a espécie em estudo (VIDAL *et al.*, 2005).

Metodologias desenvolvidas a partir da variação da PCR surgiram na década de 1990, quando três grupos independentes apresentaram as técnicas denominadas RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990), AP-PCR (WELSH & MCCLELLAND, 1990) e DAF (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991).

Segundo Lacerda *et al.* (2002), a técnica RAPD consiste na amplificação via PCR utilizando um único *primer* de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos e com conteúdo GC entre 50 e 70%. O princípio básico envolve, primeiramente, o anelamento do *primer* à sequência alvo do DNA de forma complementar, sendo então amplificada pela ação da enzima DNA polimerase. Os sítios de ligação em geral encontram-se separados por 3 a 4 mil pares de base, o que garante a ação da DNA polimerase. O tamanho do *primer* aumenta as chances de se encontrar várias regiões do genoma, de modo que diversos fragmentos de tamanhos diferentes sejam amplificados (WILLIAMS *et al.*, 1990; LACERDA *et al.*, 2002).

O RAPD tem como vantagem a rapidez na obtenção dos dados, o baixo custo, a necessidade de pouca quantidade de DNA e a isenção de efeitos ambientais, quando comparado a outras técnicas como isoenzimas e RFLP, podendo ainda fornecer padrões polimórficos em número praticamente ilimitado, sendo detectado em qualquer estado de desenvolvimento do indivíduo. Além de fornecer subsídios para obtenção de informações sobre a divergência genética na eleição de genótipos com desempenho promissor e ampla base genética (WILLIAMS *et al.* 1990). A técnica tem sido aplicada com êxito em estudo de

divergência genética de várias culturas economicamente importante como arroz (AREIAS *et al.*, 2006), feijão (MIMURA *et al.*, 2000) e melão (SOLTANI *et al.*, 2010).

O DAF difere do RAPD, principalmente com relação às condições de reação utilizadas, sendo mais informativo. Segundo Caetano-Anollés *et al.* (1992), os fatores mais importantes que podem influenciar às condições de reação envolvem a concentração do *primer*, enzima e cloreto de magnésio, além da temperatura de anelamento. Os *primers* DAF são curtos com sete a oito nucleotídeos em comprimento (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991), que quando submetidos à amplificação resultam em padrões claramente distintos, podendo ser detectados em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata, revelando produtos característicos do padrão DAF, rico em informações.

Caetano-Anollés (1993) descreve com detalhes o processo de amplificação do DNA com *primers* arbitrários. Esta técnica tem sido usada com êxito na caracterização genética e desenvolvimento de mapas de diversas espécies, principalmente grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) e feijão-caupi (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2003; AMORIM, 2009).

O marcador ISSR foi desenvolvido em 1994 e constitui uma classe de marcador semiarbitrário amplificado por PCR na presença de um *primer* complementar a sítios microssatélites. As sequências-alvo dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente, sendo mais eficientes na caracterização e estudos genéticos de espécies intimamente relacionadas (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994).

Em melancia, Hashizume *et al.* (2003) construíram um mapa de ligação para melancia baseado em informações dos marcadores RAPD, RFLP, ISSR e isoenzimas, usando uma população F₂ derivada de um cruzamento entre uma linha melhorada cultivada e um acesso silvestre africano. Com isto, 554 locos foram mapeados em 11 grupos de ligação. O mapa construído fornece informações importantes para o melhoramento da melancia.

Levi *et al.* (2004) aplicando marcadores AFLP e ISSR na análise de variedades americanas de melancia detectaram um baixo índice de polimorfismo, com 79 a 98,3% de similaridade genética entre as cultivares de melancia estudadas. Comparativamente ao RAPD, os marcadores ISSR e AFLP foram bem mais informativos na diferenciação das cultivares de melancia.

Considerando a eficiência dos vários marcadores baseados em PCR e que todos apresentam vantagens e desvantagens, como por exemplo, o marcador AFLP é uma técnica com alta capacidade de produzir elevado número de fragmentos polimórficos, mas devido ao custo das análises e exigências técnicas, a sua aplicação para fins de estudos de diversidade de germoplasma, que em geral envolve análise de elevado número de acessos, é menos indicada comparando-se ao DAF. O marcador DAF apresenta capacidade de detectar grande número

de fragmentos polimórficos, sendo uma metodologia rápida e simples, além de não apresentar problemas com reprodutibilidade de dados, quando comparado ao RAPD (VOS *et al.*, 1995; CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991).

Já o marcador ISSR envolve a amplificação de DNA por um único *primer* com sequência repetidas ancoradas em 3' ou 5' terminal por 2-4 nucleotídeos arbitrários (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994), sendo altamente informativo e reprodutível, bem como de fácil manuseio. Uma vez que as sequências repetidas são abundantes em todo o genoma, o *primer* ISSR anela em várias regiões promovendo um padrão de amplificação complexo em que os fragmentos são frequentemente polimórficos entre indivíduos.

A eficiência do marcador ISSR foi analisada por Behera *et al.* (2008), a partir de uma análise comparativa da diversidade genética de *Momordica charantia* L. aplicando 29 marcadores RAPD e 15 ISSR. Como resultado, os autores descrevem que o marcador RAPD revelou 208 bandas, com 36,5% de polimorfismo e os marcadores ISSR amplificaram 125 bandas, das quais 94 (74,7%) foram polimórficas, fornecendo 6,3 fragmentos por *primer*. Alta correlação ($r = 0,77$) foi encontrada entre as matrizes fornecidas pelos dois marcadores, indicando que o agrupamento obtido por ambos foram consistentes. Contudo, a análise conjunta revelou que o dendrograma obtido foi similar ao agrupamento dos acessos realizado pelo marcador ISSR.

Outro estudo realizado por Verma *et al.* (2007) revelou que 42 *primers* RAPD produziram 130 bandas polimórficas que foram discriminantes na avaliação de 10 linhagens melhoradas de *Benincasa hispida* (Thunb) Cogn, cujas distâncias genéticas variaram de 0,31 a 0,07. Neste mesmo estudo, cinco marcadores ISSRs produziram 11 bandas polimórficas, com percentual de polimorfismo de 80%, maior que o revelado por meio de RAPD (46%).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a estrutura genética e a distribuição da variabilidade genética de acessos de melancia preservados no BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, utilizando informações fornecidas pelos marcadores moleculares DAF e ISSR.

2.2. Específicos

- 1- Realizar o levantamento do acervo de melancia do BAG de Cucurbitáceas, visando o conhecimento do total de acessos preservados para adequada amostragem.
- 2- Caracterizar 291 acessos de melancia e dois acessos de melão do BAG de Cucurbitáceas do Nordeste Brasileiro, a fim de gerar informações sobre a estrutura genética dos mesmos a partir dos marcadores DAF e ISSR, tendo em vista o enriquecimento futuro da coleção, a conservação e o uso em programas de melhoramento.
- 3- Estimar as distâncias genéticas entre linhagens avançadas de melancia com base no marcador DAF, visando à determinação de grupos heteróticos para fins de melhoramento.
- 4- Examinar a distribuição da variabilidade genética dos acessos melancia, coletados em áreas de cultivo tradicional no Nordeste brasileiro.

3. Materiais e Métodos

3.1. Levantamento de linhagens e acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas

Inicialmente realizou-se um levantamento minucioso do número total de acessos de melancia preservado no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas (Embrapa Semiárido, Petrolina – PE), que foram coletados na agricultura tradicional do Nordeste Brasileiro, bem como introduções da África (*C. colocynthis*, *C. lanatus* var. *lanatus* e *C. lanatus* var. *citroides*), fazendo-se uma consulta às cadernetas de coleta e verificação dos acessos armazenados na câmara fria (10°C e 40% de umidade relativa).

3.2. Estratégia de amostragem para seleção dos acessos

Para estabelecimento da amostragem o germoplasma de melancia existente no BAG foi dividido em quatro conjuntos, adotando-se o critério de Chang *et al.* (1979), com modificações:

- 1) **Conjunto de acessos do Centro de Diversidade** - Compreende as espécies de *Citrullus colocynthis* e *C. lanatus* var. *lanatus*, bem como seus híbridos naturais, normalmente designados como *Citrullus lanatus* var. *citroides*, de origem africana.
- 2) **Conjunto de acessos do Centro de Cultivo** - Nesse conjunto foram considerados os tipos cultivados na agricultura tradicional e os de população espontânea, bem como os acessos da subespécie *C. lanatus* var. *citroides*. Todos foram coletados em diferentes municípios da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte. Dois acessos da espécie *Cucumis melo* (M1 e M5) foram incluídos como grupo externo.
- 3) **Conjunto de linhagens do Programa de Melhoramento de melancia** – Para compor o conjunto foram consideradas linhagens avançadas de melancia com diferentes graus de endogamia existentes no BAG, sendo selecionadas para o estudo de diversidade e determinação de grupos heteróticos;
- 4) **Conjunto de Cultivares Comerciais** – Para formar este conjunto foram selecionados representantes das variedades comerciais.

Os acessos de melancia e melão foram selecionados por sorteio, conforme o número de sementes disponíveis para análise, bem como entre os acessos que foram multiplicados e regenerados. Os acessos selecionados foram submetidos a uma avaliação da divergência genética por meio dos dados obtidos com marcadores moleculares DAF e ISSR.

3. 3. Experimentos para obtenção de material vegetal para extração de DNA

Para obtenção de material vegetal utilizados na extração de DNA, diferentes experimentos foram conduzidos nas dependências do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e também em casa de vegetação no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) em Juazeiro - BA e no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) da UFPE/ Recife - PE.

Todos os experimentos foram conduzidos em bandejas de isopor contendo substrato de hortaliça, onde foram semeadas 20 sementes de cada linha ou acesso de melancia, sendo irrigadas diariamente. Quando necessário foram aplicados defensivos à base de cobre para controle da alternaria e “Ridomil” para controle do tombamento de mudas. Não foram realizados testes de germinação prévios devido ao número insuficiente de sementes dos acessos.

3. 4. Extração de DNA

Os procedimentos de extração de DNA dos acessos de melancia foram realizados no Laboratório de Biologia e Melhoramento Genético Vegetal (LBMGV) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB/DTCS, campus III, Juazeiro – BA). A extração do DNA do conjunto do programa de melhoramento foi realizada no LGBV.

Dez folhas jovens de cada acesso foram coletadas para formação de um *bulk*, que foi levado ao laboratório e rapidamente submetido a processos de extração de DNA, seguindo-se os procedimentos estabelecidos por Weising *et al.* (2005), com algumas modificações. O *bulk* de folhas jovens foi submetido à maceração na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O material macerado foi então transferido para tubos Eppendorf de 2,0 ml, previamente identificado, ao qual foram adicionados 700 µl de tampão de extração CTAB 2%. Os tubos foram levados ao banho-maria a 60-65°C por 45 minutos, com agitação a cada 10 minutos.

Com os tubos à temperatura ambiente foram adicionados 700 µl de uma solução de clorofórmio: álcool isoamil na proporção de 24:1, com posterior agitação até a se obter uma emulsão homogênea. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. Da fase aquosa superior 540 µL foram transferidos para um novo conjunto de tubos, ao qual foram adicionados 340 µl de isopropanol gelado, sendo os mesmos levemente agitados por inversão até a observação de um precipitado.

Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores para obtenção do *pellet* de DNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com um ml de etanol a 70% por cinco minutos e posteriormente com etanol a 95% por dois minutos. O material obtido foi mantido à temperatura ambiente até total evaporação do álcool. O DNA foi resuspendido em 100 µl de solução Tris-EDTA (TE) contendo RNase, sendo posteriormente submetido a uma temperatura de 37°C por 30 minutos.

A quantificação do DNA foi realizada pelo método comparativo em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (5 µg/ml) usando-se diferentes concentrações de λ-DNA como referencial. Para conservação do DNA o mesmo foi precipitado na presença de cloreto de potássio 5 M, com posterior centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos, ao *pellet* foi adicionado 1 ml de etanol a 70%.

3.5. Análises moleculares

3. 5. 1. Otimização, seleção de *primers* e reação DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*)

- Laboratório do LGBV, UFPE, Recife-PE

A definição de um procedimento para amplificação do DNA por meio do marcador DAF foi conduzida com base nos trabalhos de Caetano-Anolles *et al.* (1999). Foram selecionadas aleatoriamente cinco linhagens avançadas de melancia (C18-Smile; C35 - Crimson Sweet; O10 - *C. lanatus* var. *lanatus*; V10 e V11 – *C. lanatus* var. *lanatus*), que foram aplicados para o teste com diferentes volumes de DNA (0,3; 0,5 e 1 ng/µl), de cloreto de magnésio (1,5; 2,0; 2,5 e 3 mM) e de Taq polimerase (0,025; 0,05; 0,07 e 1 U).

O mix de reação foi estabelecido para um volume final de 13 µl com a reação otimizada contendo DNA no intervalo de 0,3 a 1 ng; conjunto de deoxinucleotídeos a 1mM; Tampão da enzima Taq polimerase 1X (10 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3); *primer* a 3,33 µM; cloreto de magnésio a 2,5 mM e Taq polimerase a 0,05U, sendo utilizados dois ciclos de temperatura alternativos para amplificação: **(A)** desnaturação (96°C – 2 minutos), 95°C por 30 segundos, anelamento (35°C – 1 minuto) e uma extensão (72°C – 1 minutos) e extensão final de 72°C por 2 minutos, sendo cada ciclo repetido 39 vezes; **(B)** 96°C por 1 minuto; 94°C por 36 segundos; 42°C por 1 minuto; 72°C por – 1 minuto e extensão final de 72°C por 2 minutos, com 39 ciclos de repetições.

Para confirmar o protocolo DAF estabelecido, sete linhagens avançadas de melancia (C18, C35, V07, V10, V11, V35 e O18), do programa de melhoramento da Embrapa Semiárido em parceria com a UNEB/DTCS, foram utilizadas na determinação de *primers* informativos.

- Laboratório LBMGV, UNEB, Juazeiro-BA

As reações de amplificação foram estabelecidas de acordo com os procedimentos indicados anteriormente, sendo realizadas no LGBV da UFPE e a tecnologia transferida para o LBMGV da UNEB. Cento e oitenta e dois *primers* foram submetidos à avaliação, dos quais 16 foram selecionados para análise com marcador DAF.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% (p/v), usando tampão TBE pH 8,0 (0,09 M Tris; 0,09 M de ácido ascórbico e 2 mM de EDTA), aplicando-se uma corrente elétrica de 80 Volts e 160 mA, por quatro horas. Após eletroforese o gel foi corado em uma solução contendo 20 µl de brometo de etídeo (10 mg/ul) diluídos em 200 ml de TBE 1x por 40 minutos e foto documentado sob luz ultravioleta. Para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado DNA de peso molecular de 1 kb e de 100pb.

3. 5. 2. Seleção de *primers* e reação de ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*)

- Laboratório LGBV, UFPE, Recife-PE

Para seleção de *primers* ISSR, o DNA de seis acessos de melancia (T02, T20, T204, T253, – *C. lanatus*; T206 – *C. lanatus* var. *citroides* e T4339 – *C. colocynthis*) (Tabela 1) foram submetidos à amplificação com 47 *primers* (Tabela 4), sendo as reações realizadas conforme Bornet & Branchard (2001) com modificações para melancia. Os *primers* foram obtidos do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de *British Columbia*. As reações foram conduzidas em um volume de 15 µl contendo: 0,1U de enzima *Taq DNA polimerase*, tampão da enzima 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTPs, 50 µM de primer e 25 ng de DNA genômico. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do *primer* de 49,7°C a 58°C (variando para cada *primer*) por 35 segundo e extensão a 72°C por 2 minutos, seguida de extensão final por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,8% contendo brometo de etídeo a 0,5 µg/ml em tampão TBE 0,5X e visualizados e fotografados sob luz-ultravioleta.

3. 6. Análises dos dados

3. 6.1. Marcadores DAF e ISSR

Os dados foram interpretados como presença (1) ou ausência (0) de bandas para construção de uma matriz de dados. Com base na matriz de similaridade foi mensurada a percentagem de locos polimórficos (quociente entre o número de bandas polimórficas e o número total de bandas produzidas). Desta forma, foi estimada a similaridade genética entre os acessos de melancia baseada no coeficiente de similaridade de Jaccard. O dendrograma foi obtido pelo método de agrupamento por pares de médias não ponderadas (UPGMA – *Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*), por meio do programa NTSYS (ROHLF, 1998).

3.6.2. Análise de variância molecular - AMOVA

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada a partir dos dados fornecidos pelos marcadores DAF em acessos de melancia, aplicando-se o programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2006). Foi investigada a distribuição da variabilidade genética dentro e entre conjuntos, conjunto do programa de melhoramento e dentro e entre acessos coletos em áreas da agricultura tradicional do Nordeste brasileiro, preservada no BAG de Cucurbitáceas. Para isto, foram considerados cinco níveis hierárquicos:

1) Nível 1 - Análise geral: dentro e entre acessos dos quatro conjuntos:

- 1.1 Conjunto 1: Centro de Diversidade.
- 1.2 Conjunto 2: Centro de Cultivo.
- 1.3 Conjunto 3: Programa de Melhoramento.
- 1.4 Conjunto 4: Cultivares Comerciais.

2) Nível 2 - Análise específica: Conjunto do melhoramento (linhagens endogâmicas):

- 2.1 Entre linhagens avançadas de melancia (resistentes ao oídio, resistentes a vírus e comerciais).
- 2.2 Dentro de linhagens avançadas de melancia.

- 3) Nível 3 – Análise específica: acessos da agricultura tradicional do Nordeste brasileiro:
 - 3.1 Entre Estados.
 - 3.2 Dentro de Estados.
- 4) Nível 4 – Análise específica: regiões (grupos de municípios próximos) dentro dos Estados
 - 4.1 Entre Estados.
 - 4.2 Entre regiões dentro de Estados.
 - 4.3 Dentro de Estados.
- 5) Nível 5 – Análise específica: acessos coletados nos municípios ou grupo de municípios dentro de estados:
 - 5.1 Entre regiões.
 - 5.2 Entre municípios dentro de regiões.
 - 5.3 Dentro de regiões.

4. Resultados

4.1. Levantamento de linhagens e acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas

4.1.1. Identificação de linhagens e acessos preservados no BAG e locais de coleta

Com o levantamento de acessos de melancia no BAG de Cucurbitáceas (Figura 1) foram encontrados 1117 acessos de melancia, que foram divididos em quatro conjuntos (1- Centro de Cultivo, incluindo os acessos da agricultura tradicional; 2- Centro de Diversidade; 3- Programa de Melhoramento e 4 - Cultivares Comerciais) (Figura 2).

Dos acessos do conjunto do centro de cultivo foram encontrados 375 acessos de melancia com sementes originais, armazenadas em potes de vidro hermeticamente fechados contendo sílica gel para controle da umidade. As respectivas multiplicações e demais acessos (367) foram localizadas em caixas de papelão devidamente identificadas (Figura 1). Do total de acessos preservados, 40% encontram-se multiplicados e caracterizados, sendo mantidos em câmara fria a 10°C e 40% de umidade relativa (Figura 1).

Verificou-se que os 742 acessos registrados nas cadernetas de coleta e localizados no BAG foram coletados em áreas de agricultura tradicional, sendo 161 acessos coletados em 24 municípios do Maranhão, 15 originários de um único município do Rio Grande do Norte, 66 acessos de nove municípios de Pernambuco, 443 acessos que foram resgatados em 38 municípios da Bahia, 37 acessos de melancia que foram coletados em seis municípios do Piauí e 20 plantas espontâneas foram resgatadas na Bahia (Figura 2).

Entre os materiais do conjunto do programa de melhoramento foram localizadas 300 linhagens avançadas de melancia. No conjunto de acessos do centro de diversidade, ou seja, acessos introduzidos foram localizados 35 acessos de melancia de duas subespécies, *C. lanatus* var. *lanatus* e *C. lanatus* var. *citroides*, um acesso da espécie de *C. colocynthis*, que foram introduzidos no ano de 1994, sendo sementes originais, não multiplicadas. Do conjunto de cultivares comerciais foram localizados 40 acessos de melancia (Figura 2).

Do total de acessos localizados no BAG de Cucurbitáceas, a amostra de 291 acessos de melancia e de dois de melão que foram selecionados para análise, entre acessos e linhagens, correspondeu a um percentual de 26,05% dos acessos preservados, os quais encontram-se expostos na Tabela 1, sendo detalhadamente discriminados nas Tabelas 2 e 3 (Anexos 1 e 2).

Com base no levantamento, no número de sementes disponíveis e a partir do sorteio de acessos, foram selecionados seis acessos de plantas introduzidas da África para formar o conjunto de acessos do centro de diversidade, 90 linhagens de melancia para constituir o conjunto do programa de melhoramento e 187 acessos de melancia originários da agricultura tradicional e oito variedades comerciais para compor o conjunto do centro de cultivo. A distribuição dos acessos e linhagens de melancia em conjuntos foi favorável para o conhecimento da estrutura do banco de germoplasma (Tabela 4).

Tabela 1. Lista de acessos de melancia e melão selecionados, a partir do levantamento no BAG de Cucurbitáceas, para caracterização molecular com os marcadores DAF e ISSR, indicando as espécies, local de origem, número de acessos e conjuntos.

Espécies	Local de origem	Nº de acessos	Conjunto
<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	África	1	Centro de Diversidade
<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>		1	
<i>C. colocynthis</i>		4	
<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Agricultura Tradicional do NE brasileiro	175	Centro de Cultivo
<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>		12	
<i>Cucumis melo</i>		2	
<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Agricultura Tradicional do NE brasileiro	34	Programa de Melhoramento
Linhagens comerciais			
Linhagens resistentes ao oídio			
Linhagens resistentes a vírus	África	21	
<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>		7	
Linhagens resistentes a vírus			
<i>C. colocynthis</i>	Comércio	4	
Linhagens resistentes a vírus			
<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>			8
			Cultivares Comerciais
Total de acessos		293	4

Na Tabela 4 observa-se a organização e distribuição dos acessos de melancia selecionados para análise de variância molecular. Os conjuntos do Centro de Diversidade e Cultivares Comerciais não foram submetidos à análise (AMOVA) devido ao número insuficiente de acessos para avaliação dentro de populações.

Foi observado que cinco Estados (BA, MA, PI, PE, RN) foram contemplados com as expedições de coleta de germoplasma de melancia. Dentro dos Estados, foi observada uma

distância máxima de 90 km entre os municípios que compõe cada região. Desta forma, foi observado que o Piauí apresentou duas regiões, envolvendo três municípios cada (R1 – Altos, União e José de Freitas, com distância variando de 60 a 90 km e R2- Monsenhor Gil, Agricolândia e Regeneração – 30 a 70 km). Igualmente, Pernambuco foi contemplado com duas expedições, uma em R3 que reúne os acessos coletados em Petrolina, Barreiro e Lagoa dos Cavalos, sendo os dois últimos distritos do município de Petrolina e em R4 que corresponde à coleta de planta espontânea da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* em Ouricuri a 200 km de Petrolina (PE). As coletas no Maranhão foram realizadas em sete localidades: R5 – com acessos coletados em Paraibano e Pastos Bons (41 km); R6 – com acessos coletados em São Luís; R7 – Turiaçu; R8 – com acessos originários de Codó e São Luís Gonzaga (90 km); R9 – envolvem as coletas realizadas no município de Nova Iorque; R10 – acesso oriundo de Fortaleza dos Nogueiras e R11 – com um acesso coletado em Frechal Mirinzal (Tabela 4).

Constatou-se que o Estado da Bahia apresentou o maior número de expedições de coleta, sendo visitadas sete regiões (R12 a R18) e 22 municípios (Tabela 4). A região R16 – contém o maior número de acessos, coletados em nove distritos próximos ao município de Juazeiro (47 acessos). No Rio Grande do Norte foi realizada uma única expedição de coleta no município de Mossoró (R19). Foi observado que os Estados do Ceará, Paraíba, Alagoas e Sergipe não apresentaram expedições para coleta de germoplasma (Figura 2).



Figura 1 – Banco Ativo de Cucurbitáceas do Nordeste Brasileiro, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. (3A - Acessos de melancia armazenados em caixas, detalhe do termômetro).

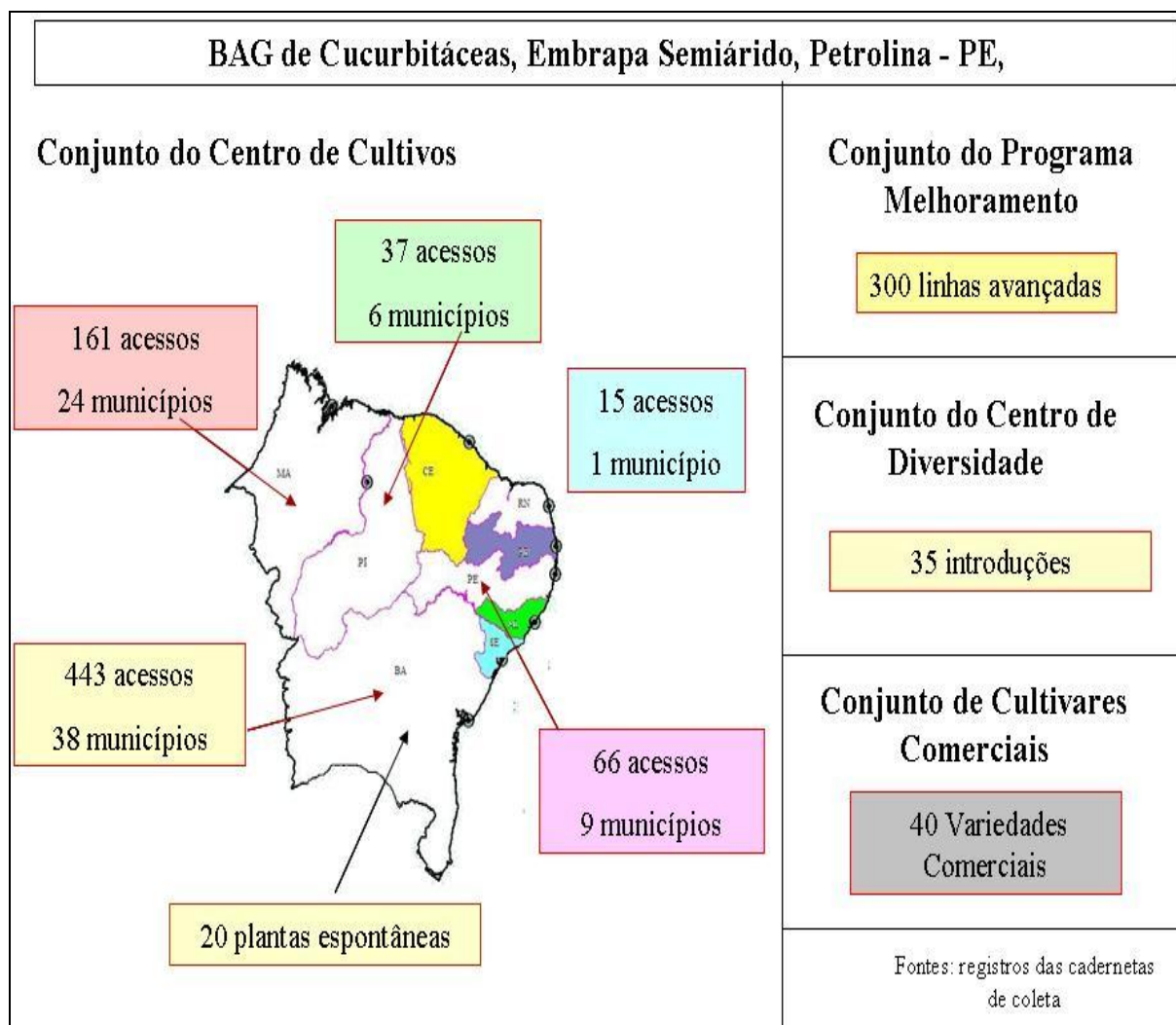


Figura 2. Distribuição dos acessos de melancia em conjuntos com local de coleta, número de municípios visitados e totais de acessos de melancia localizados no BAG de Cucurbitáceas. Os Estados coloridos (CE, PB, AL, SE) não apresentaram registros de expedições de coleta.

Foi constatado que as coletas foram intensificadas principalmente nas regiões da Bahia e Maranhão, como mostrado na Figura 2. Na Bahia, as regiões que apresentaram maior número de acessos coletados foram Jacobina (com 142 acessos), Mirangaba (63 acessos), Juazeiro (75 acessos), Orolândia (27 acessos) e Itaguaçu (20 acessos). Já no Maranhão, os acessos com maior representatividade foram coletados em São João dos Patos (29 acessos), Colinas (20), Pastos Bons (15) e São Luís (14 acessos). Pernambuco e Rio Grande do Norte foram os estados com menor número de acessos coletados de melancia e regiões visitadas.

Segundo os registros das cadernetas de coleta as regiões contempladas para coleta foram concentradas em 83 municípios do Nordeste brasileiro, envolvendo Maranhão, Bahia, Piauí, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Nas Figuras 3 e 4 encontram-se os mapas dos Estados da Bahia, Maranhão, Piauí, Pernambuco e Rio Grande do Norte, com indicação das regiões de origem dos acessos de melancia considerados para a caracterização molecular, com o respectivo número de acessos, bem como a indicação das distâncias em quilômetros entre as regiões de coleta.

Tabela 4. Organização e distribuição dos acessos de melancia submetidos à análise de variância molecular, indicando os conjuntos, locais de coletas (Estados, regiões e municípios), número de acessos e espécies avaliados por meio de dados fornecidos pelos marcadores DAF

Conjuntos	País/Estado	Região	País/Municípios/Distrito	Grupos	Nº de acessos	Espécies
1- Centro de Diversidade	África	R1	Ethiopia		6	<i>C. colocynthis</i> <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i> <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Zimbábwe			
			Marocos			
			Irã			
			Turkmesistão			
2 - Centro de Cultivo	PI	R1	União		2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			José de Freitas		3	
			Altos		2	
	PE	R2	Monsenhor Gil		1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Agricolândia		1	
			Regeneração		1	
	MA	R3	Petrolina		4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
			Barreiros/Petrolina		1	
			Lagoa dos Cavalos/Petrolina		2	
	BA	R4	Ouricuri		1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		R5	Paraibano		2	
			Pastos Bons		3	
			São Luís		13	
		R6	Turiação		4	
		R7	Codó		8	
		R8	São L. Gonzaga		5	
		R9	Nova Iorque		2	
		R10	Fortaleza dos Nogueiras		1	
		R11	Frechal Mirinzal		1	
		R12	Jacobina		18	
			Mirangaba		22	
			Ouroândia		4	
	RN	R13	Ibititá		2	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i> <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Ibipeba		1	
			Canarana		1	
		R14	Barro Alto		1	
			Am. Dourada		1	
			Pres. Dutra		3	
		R15	São Gabriel		1	
			Uauá		1	
			Canoa/Juazeiro		3	
		R16	Oliveira/Juazeiro		5	
			Papagaio/Juazeiro		4	
			Curral Novo/Juazeiro		2	
			Lagoinha/Juazeiro		4	
			Massaroca/Juazeiro		5	
			Massaroca Juazeiro		16	
			Juazeiro		4	
			Juazeiro		4	
	RN	R17	Vitória da Conquista		10	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		R18	Itaguaçu		8	
3 - Programa de Melhoramento				Comercias	34	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
				Resistentes a vírus	32	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> <i>C. colocynthis</i> <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
				Resistentes ao oídio	24	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
				Pérola		
4 - Comerciais				C. Sweet		
				Smile		
				Sugar Baby	8	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
				C. Gray		
				New Hampshire Midget		
				Peacock Improved		
				Mickelee		
Total	6	20	48		291	

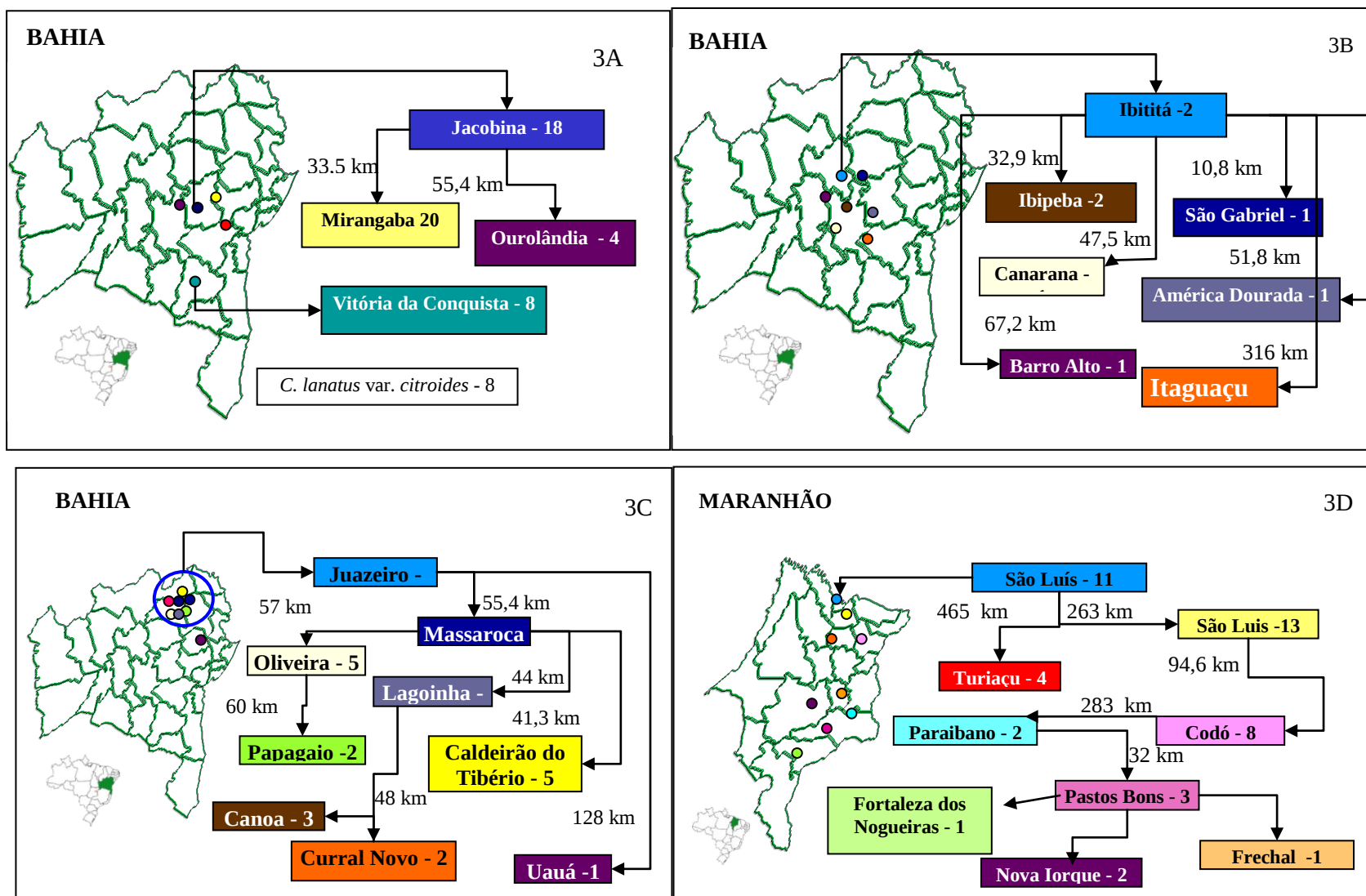


Figura 3. Caracterização dos locais de coletas de acessos de melancia do centro de cultivo do Nordeste brasileiro, com suas respectivas distâncias entre regiões em quilômetros (3A, 3B e 3C - Bahia e 3D – Maranhão).

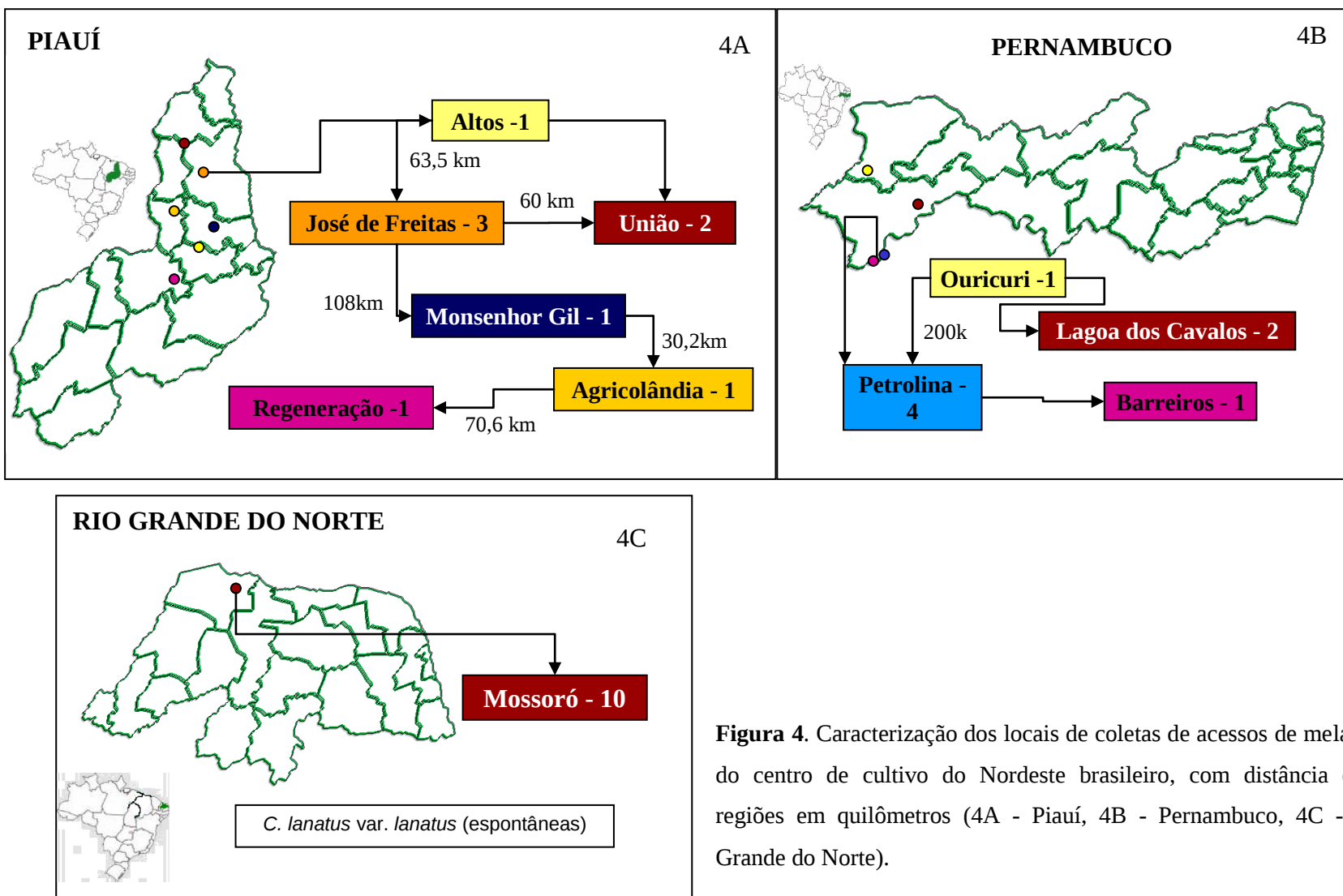


Figura 4. Caracterização dos locais de coletas de acessos de melancia do centro de cultivo do Nordeste brasileiro, com distância entre regiões em quilômetros (4A - Piauí, 4B - Pernambuco, 4C - Rio Grande do Norte).

Nas cadernetas de coleta foram encontrados relatos de uma prévia caracterização morfológica de alguns acessos de melancia (Tabela 5). Foi observado que os mesmos foram coletados a partir das sementes conservadas pelos agricultores e dos frutos nas áreas de produção na agricultura tradicional (Figura 5) e de pontos de vendas nas margens de estradas.

Nos experimentos de multiplicação de acessos coletados na agricultura tradicional observam-se características de planta com variação para resistência à alternária (Figura 5A) e de frutos de diferentes cores externas e formato (Figura 5B e 5E), inclusive apresentando o gene *golden* (*go*) e cor interna do fruto (Figuras 5C, 5D e 5E), sendo que na Figura 5C se apresenta um fruto partenocárpico.

Os frutos dos acessos coletados apresentaram variação quanto à forma (redondo - T64; oval - T24 e comprido - T30), padrão de listras (largas - T88 e estreitas - T27), cor da casca em diferentes tonalidades de verde [(claro - T89 e escuro - T90) chegando ao amarelo (T107)], cor da polpa (vermelha - T98; rósea - T87 e amarela T116), tamanho, massa e teor de sólidos solúveis (0° Brix - T94 e 10° Brix - T32) (Tabela 4). As características das sementes dos acessos variaram em cor (preta - T103; marrom - T95; creme - T96), padrão de casca (com pintas pretas -T104; borda preta - T96) e tamanho (Figura 5). Foram observados relatos sobre o comportamento das plantas (ciclo 60 a 90 dias - T24).

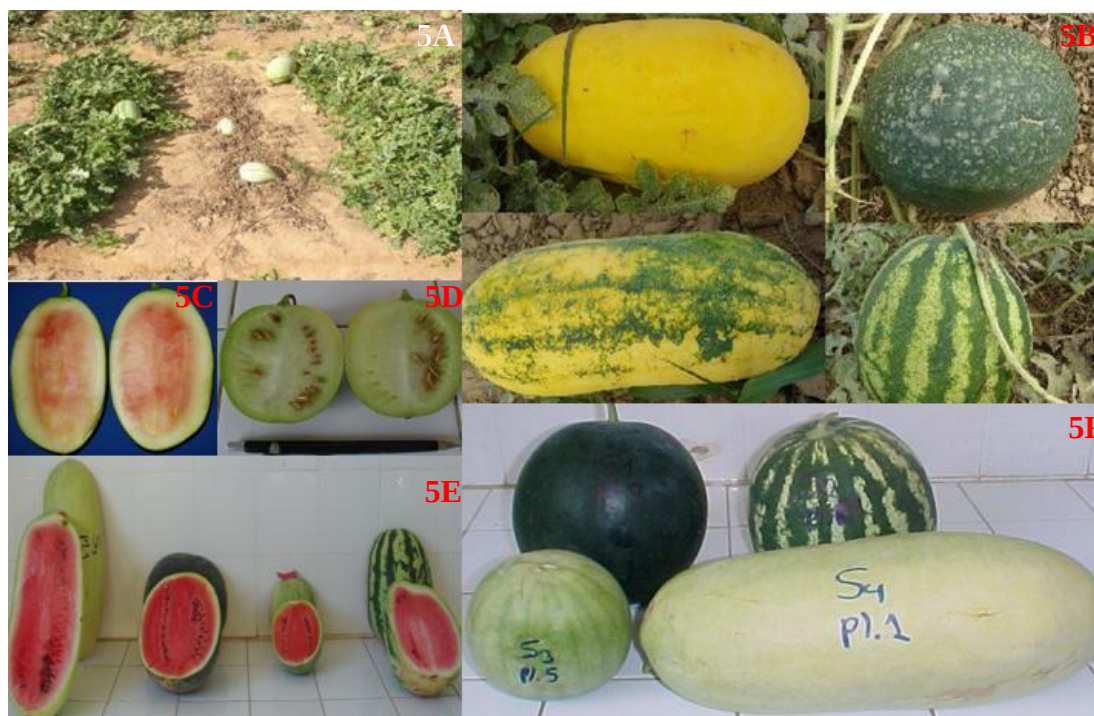


Figura 5. Características morfológicas dos acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas. (5A - indicação de resistência à alternária; 5B - cor externa (gene *golden*) e formato de fruto; 5C - melancia partenocárpica; 5D - *C. colocynthis*; 5E e 5F - variedades comerciais).

Tabela 5. Dados de passaporte de 39 acessos de melancia coletados no Nordeste brasileiro, com número do tratamento, código do acesso, características morfológicas, número do BGCIA e local de coleta

Trat.	Acesso	Características morfológicas	Nº do BGCIA	Local de coleta
21	91-0012	Sementes de um fruto, comprido grande, casca fina, listra branca	BGCI A 012	Irecê
22	91-001	Fruto redondo de polpa vermelha,	BGCIA 001	Irecê
23	91-002	Verde claro, listra escuro, sementes (mistura de dois frutos)	BGCIA 002	Irecê
24	91-003	Fruto de formato oval, branco, ciclo 60-90 dias	BGCIA 003	Irecê
25	91-008	Mistura de sementes, frutos grandes, doce	BGCIA 008	Irecê
26	91-069	Sementes de vários frutos, amarelas	BGCIA 069	Irecê
27	91-005	Fruto comprido, verde escuro, estrias finas, precoce	BGCIA 005	Irecê
28	91-025	Frutos compridos, casca fina, polpa vermelha, mistura de sementes	BGCIA 025	Irecê
29	91-028	Sementes de vários frutos	BGICIA 028	Irecê
30	91-064	Fruto comprido, casca rajada, consórcio com milho	BGCIA 064	Irecê
32	92-315	Casca verde escura, polpa vermelha, Brix 10°	BGCIA 315	Chapada
38	92-161	Sementes de vários frutos	BGCIA 161	Chapada
44	92-314	Cascas rajadas, sementes marrom e preta, polpa vermelha, Brix 10°	BGCIA 314	Chapada
55	92-280	Casca verde e amarela gene golden	BGCIA 280	Chapada
64	91-044	Fruto redondo, rajado sem incidência de pragas ou doenças	BGCIA 044	Itaguaçu
65	91-043	Fruto redondo, sem incidência de pragas ou doenças	BGCIA 043	Itaguaçu
66	91-048	Frutos redondos, verde claro com listras grossas escuras, doce	BGCIA 048	Itaguaçu
67	91-049	Fruto redondo	BGCIA 049	Itaguaçu
68a	91-050a	Fruto redondo	BGCIA 050 ^a	Itaguaçu
68b	91-050b	Fruto redondo	BGCIA 050B	Itaguaçu
69	91-051	Fruto comprido, casca rajada	BGCIA 051	Itaguaçu
85	91-052	Fruto redondo	BGCIA 052	Itaguaçu
86	91-111	Frutos compridos, semente marrom escuro polpa vermelha clara	BGCIA 111	Pastos Bons

Tabela 5. Continuação...

Trat.	Cod. BAG	Características	Nº do BGCIA	Local de coleta
87	91-109	Formato redondo, polpa vermelha clara, sementes pretas	BGCIA 109	Pastos Bons
88	91-073	Fruto oval, pequeno, polpa vermelho claro, sementes pretas	BGCIA 420	Paraibano
89	91-080	Verde escuro com listras largas, fruto comprido, sementes pretas grandes, polpa vermelha clara	BGCIA 422	Paraibano
90	91-122	Verde claro com listras finas, pequeno, redondo, sementes marrom , polpa vermelha clara.	BGCIA 424	Nova Iorque
93	91-123	Verde com listras verdes escura, fruto pequeno, semente marrom escura, polpa vermelha	BGCIA 429	Nova Iorque
94	Cod. 02	Verde escuro com listras finas, polpa vermelha, semente marrom escura, insípido	BGCIA 430	São Luís
95	Cod. 03	Verde escuro sem listras, pequeno, sementes com bordas pretas, polpa e de cor vermelha claro	BGCIA 432	São Luís
96	Cod. 04	Verde escuro, tamanho médio, semente creme com bordas pretas, polpa de cor vermelho claro	BGCIA 434	São Luís
98	Cod. 06	Verde escuro com listras largas, pequeno, redondo, polpa vermelha, semente marrom	BGCIA 435	São Luís
100	Cod. 08	Fruto médio verde claro com listas larga verde, comprido, polpa vermelha e sementes marrons	BGCI Q436	São Luís
103	Cod. 27	Fruto verde claro com listra fina, polpa vermelho rosa, sementes preta e formato redondo	BGCIA 543	São Luís
104	Cod. 29	Fruto verde claro com listras finas, polpa vermelho rosa e sementes marrom com pintas pretas	BGCIA 544	São Luís
105	Cod. 30	Fruto verde escuro, pequeno (menor de 2,0kg), polpa vermelho rosa e sementes pretas	BGCIA 548	São Luís
106	Cod. 31	Fruto com listra verde e polpa vermelha	BGCIA 570	São Luís
107	5CD	Fruto de casca amarela, polpa vermelha, suscetível à virose	BGCIA 452	Codó
117	6CD	Fruto de casca verde escura com listra, polpa amarelada, sementes marrons com raias pretas	BGCIA 453	Codó

Nos experimentos em casa de vegetação, verificou-se que o longo período de armazenamento das sementes afetou a germinação das mesmas, pois as linhagens avançadas de melancia apresentaram de 60% a 90% de germinação (Figura 6A, 6B e 6C), enquanto que os acessos da agricultura tradicional germinaram de 55% a 100%. No entanto, alguns poucos acessos não germinaram e em outros foi observado processo de dormência (Figura 7).



Figura 6. Germinação e desenvolvimento das linhagens avançadas de melancia (6A - comerciais; 6B - resistentes a vírus e 6C - resistentes ao oídio).



Figura 7. Germinação e desenvolvimento de acessos de melancia (7A – germinação de *C. colocynthis* (T4339), em casa de vegetação; 7B – Desenvolvimento do referido acesso em campo; 7C- Diferentes acessos de melancia em germinação).

Das sementes de cada um dos 35 acessos de melancia introduzidos da África submetidas à germinação apenas seis acessos forneceram material para extração de DNA. Vale salientar que os acessos chegaram a ser transferidos para o campo de cultivo para multiplicação, mas apenas os acessos T4339 da espécie *C. colocynthis* (Figura 7B) e T248 (*C. lanatus* var. *lanatus*, coletado em Mirangaba - BA, agricultura tradicional) resistiram aos ataques de nematoides. Foram obtidas sementes do acesso T248 que chegou à fase de floração e frutificação, sendo indicativo de uma possível fonte de resistência ao referido patógeno. A Figura 8 mostra o comportamento do acesso T4339 em campo (8A) e em baldes (8B). A Figura 8C mostra a presença do nematóide nas raízes e a Figura 8D mostra o efeito do patógeno em acessos suscetíveis de *C. lanatus* var. *lanatus*.



Figura 8. Acesso de melancia da espécie *C. colocynthis* (T4339) frente ao ataque de nematoides. (8A e 8B - acesso T4339 em campo, 8C - presença de nematóides nas raízes de acessos suscetíveis; 8D - efeitos do ataque de nematoides em acesso de melancia, sendo 8C e 8D - *C. lanatus* var. *lanatus*).

4.2. Estudos como marcador DAF

4.2.1. Extração de DNA

Foi obtido um DNA incolor, livre de substâncias viscosas em quantidade e qualidade satisfatória para as reações de amplificação por meio dos marcadores DAF e ISSR. Foram obtidos cerca de 100 a 500 ng de DNA de cada *bulk* de 10 folhas de acessos de melancia, com cinco repetições cada, o que possibilitou a formação de um banco de DNA genômico de melancia.

4.2.2. Otimização de um protocolo para amplificação com o marcador DAF

As variações de concentração de DNA revelaram diferenças na intensidade das bandas. O cloreto de magnésio revelou ter maior influência na produção de fragmentos de boa qualidade, apresentando maior resolução e especificidade das bandas na concentração de 2,5 mM. A variação na concentração da enzima Taq polimerase apresentou diferenças no produto amplificado. Contudo, a utilização de enzimas Taq polimerase de dois fabricantes levou a produção de padrões de bandas distintos, indicando sérias implicações no resultado final da

análise. Com isto, foi utilizada enzima Taq polimerase de um mesmo fabricante do início ao fim das análises. O ciclo A de temperatura revelou maior eficiência na amplificação de bandas dos 291 acessos de melancia e dois de melão com o marcador DAF.

4.2.3. Seleção de primers e reação DAF

Dos 182 primers testados por meio do marcador DAF, 63 primers produziram um total de 498 bandas, sendo 353 bandas polimórficas (70,9% de polimorfismo) e 143 monomórficas, com média de oito por primers (Tabela 6). Os perfis moleculares produzidos por diferentes primers na amplificação de DNA de acessos de melancia encontram-se na Figura 9.

Quarenta e cinco primers identificaram polimorfismo entre os acessos de melancia das espécies *C. lanatus* var. *lanatus* (lan) e *C. lanatus* var. *citroides* (citr), sendo produzidas 178 bandas polimórficas, com 47,0% de polimorfismo. Os primers OPA01, OPF16, OPO15, OPAX14, OPB06, OPJ13, OPJ16, OP06 e OPX7 foram mais eficientes em detectar polimorfismo entre as referidas espécies, gerando de oito a 12 bandas (Tabela 5). Já os primers OPH01, OPA12, OPA11, 15-08 e 15-09 detectaram menor número de bandas (uma ou duas bandas) (Tabela 6).

Entre as espécies *C. lanatus* var. *lanatus* (lan) e *C. colocynthis* (col) os 45 primers detectaram 109 bandas (28,8% de polimorfismo). Os primers p15-16, p15-17A, p15-16G, OPZ05 e OPA20 revelaram cinco bandas cada (23,0% de polimorfismo). Apenas o primer OPV10 detectou seis bandas polimórficas. Vinte e oito primers revelaram no máximo duas bandas.

Foram detectadas 88 bandas polimórficas entre as espécies de *C. lanatus* var. *lanatus* (lan x lan). Doze primers não amplificaram o DNA dessas espécies; 11 produziram três bandas polimórficas e seis revelaram de quatro a sete bandas polimórficas. Dentro da espécie *C. lanatus* var. *citroides* (citr x citr) 30 primers não apresentaram polimorfismo. Dois primers detectaram quatro bandas cada e outros 12 primers revelaram de uma a três bandas polimórficas. No total 15 primers revelaram 32 bandas polimórficas.

Entre as espécies de *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis* (citr x col) foram encontradas 156 bandas polimórficas (43,4% de polimorfismo). Dez primers (OPE12, OPD12, OPD18, HPBIII, OPV10, OPC10, OPC15, OPB12, p15-16G e p15-16C) produziram 61 bandas, com 38,4% de polimorfismo. Vinte e dois primers produziram entre três e quatro bandas e nove primers revelaram menos de duas bandas polimórficas (Tabela 6).

Na Tabela 7 encontra-se a continuação da lista de *primers* que foram indicados para as análises com o marcador DAF.

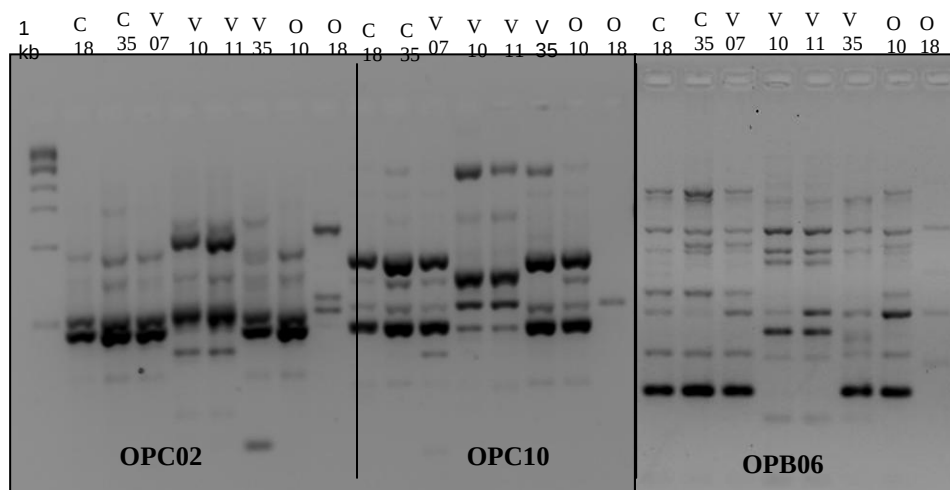


Figura 9. Perfil molecular produzido por *primers* DAF (OPC02, OPC10 e OPB06) na amplificação de linhagens avançadas de melancia. Linhagens: C18, O10, O18, V07 e C35 (*C. lanatus*), V10 e V11 (*C. lanatus* var. *citroides*), V35 (*C. colocynthis*) e 1kb – DNA padrão.

Tabela 6. Lista de *primers* selecionados na amplificação do DNA de acessos de melancia por meio do marcador DAF, com número total de bandas polimórficas e monomórficas dentro e entre três espécies do gênero *Citrullus*

<i>Primers</i>	Sequências	Total							
		Bandas	Polimórficos	Monomórficos	lan x citr	lan x col	lan x lan	citr x citr	citr x col
p15-1	TGCGTGCTTGTATAA	10	6	4	4	3	2	0	2
p15-2	TGCGTGCTTGCGCGG	9	6	3	4	2	0	0	3
p15-3	TGCGTGCTTGAGAGA	5	4	1	7	0	5	1	0
p15-06	TGCGTGCTTGAAGAA	9	6	3	3	5	3	4	4
p15-7 ^a	TGCGTGCTTGCACAA	8	5	3	4	5	0	0	4
p15-08	TGCGTGCTTGTTAAT	9	9	0	3	2	1	2	0
p15-09	TGCGTGCTTGTTTCAT	13	7	6	1	2	0	0	2
p15-10	AGGTCTTGGGTATAA	8	6	2	3	2	0	3	4
p15-11	AGGTCTTGGGTAGGG	13	7	6	4	3	1	0	3
p15-14	GTGGGCTGACGTGGG	8	6	2	6	0	2	4	0
p15-15	ACATCGCCCAACATC	7	6	1	3	4	2	0	3
p15-16C	GAACCTACGGTAGGG	9	8	1	3	4	3	2	5
p15-16G	GGAAGCCAAACGGAAG	11	7	4	6	5	3	3	8
p15-18	CCTCTGACTGCCTCT	7	4	3	2	0	2	0	0
OPZ04	AGGCTGTGCT	7	6	1	3	2	3	0	2
OPZ05	TCCCATGCTG	9	8	1	4	5	0	0	4
OPZ09	CACCCCAGTC	10	7	3	3	2	0	1	2
OPZ12	TCAACGGGAC	5	3	2	3	0	0	0	0
OPZ19	GTGCGAGCAA	11	8	3	3	3	7	0	3
OPA10	GTGATCGCAG	7	4	3	5	2	3	0	4
OPA11	CAATCGCCGT	6	3	3	2	0	3	0	2
OPA12	TCGGCGATAG	5	3	2	1	1	1	0	1
OPA19	CAAACGTCGG	6	3	3	3	0	1	0	3
OPA20	GTTGCGATCC	12	8	4	5	5	3	0	5
OPB06	TGCTCTGCCC	6	4	2	8	4	2	0	4
OPB12	CCTTGACGCA	7	6	1	7	1	3	0	6
OPB17	AGGGAACGAG	7	5	2	3	4	2	0	4
OPB18	GGACCCCTTAC	8	5	3	3	3	4	2	3
OPB20	TCAGAGCGCC	8	7	1	4	1	1	0	4

Tabela 6. Continuação...

<i>Primer</i>	<i>Seqüências</i>	Total							
		Bandas	Polimórficas	Monomórficas	lan x citr	lan x col	lan x lan	citr x citr	citr x col
OPC02	GTGAGGCGTC	8	4	4	5	2	2	0	4
OPC10	TGTCTGGGTG	7	5	2	7	2	0	2	7
OPC15	GACGGATCAG	9	9	3	5	2	4	0	5
OPC19	GTTGCCAGCC	10	4	3	6	3	6	0	4
OPD07	TTGGCACGGG	5	6	4	4	2	4	0	3
OPD11	AGCGCCATTG	9	3	2	3	2	3	0	2
OPD12	GGGGTGACGA	6	6	3	4	4	3	1	5
OPD18	GAGAGCCAAC	8	5	1	4	3	0	0	6
HPBIII	GCGACAGC-AGA	10	9	1	5	3	0	0	7
OPV10	GGACCTGCTG	8	4	4	6	6	3	1	6
OPO19	GGTGCACGTT	7	3	4	4	2	2	2	4
OPB09	TGGGGGACTC	9	6	3	3	1	1	3	3
OPE01	CCCAAGCTCC	6	6	0	4	2	0	1	6
OPH01	GGTCGGAGAA	5	4	1	2	1	0	0	3
OPH03	AGACGTCCAC	7	4	3	3	2	1	0	3
OPB15	GGAGGGTGTT	8	5	4	2	1	4	0	1
Total		362	250	115	178	109	88	32	156

Σ Total de Bandas da Tabela 5 e Tabela 6 = 498; Σ Total de Polimórficas = 353; lan = *C. lanatus* var. *lanatus*; citr = *C. lanatus* var. *citroides*; col = *C. colocynthis*

Tabela 7. Relação de *primers* utilizados na amplificação de DNA de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, com marcadores DAF e suas respectivas sequências, total de bandas polimórficas e monomórficas

<i>Primers</i>	Sequências	Total		
		Bandas	Polimórficas	Monomórficas
OPA01	GGTCCCTGAC	9	8	1
OPB14	TCCGCTCTGG	6	5	1
OPC06	GAACGGACTC	7	5	2
OPF16	GGAGTACTGG	8	6	2
OPE14	TGCGGCTGAG	7	7	0
OPO15	TCGCCTCCTT	9	6	3
OPO07	CAGCACTGAC	5	3	2
OPAX14	CACGGGCTTG	9	6	3
OPS18	CTGGCGAACT	7	7	0
OPC07	GTCCCGACGA	6	4	2
OPE01	CCCAAGCTCC	4	3	1
OPJ13	CCACACTACC	12	6	6
OPJ16	CTGCTTAGGG	10	7	3
OPO03	CTGTTGCTAC	8	6	2
OPO06	CCACGGGAAG	9	7	2
OPO09	TCCCACGCAA	5	4	0
OPO10	TCAGAGCGCC	6	5	1
OPX07	GAGCGAGGCT	9	8	1
Total		136	103	32

A partir dos dados obtidos na seleção dos *primers*, uma matriz binária foi construída para análise da eficiência do marcador DAF na estimativa da divergência genética e agrupamento de sete linhagens avançadas de melancia (C18, C35, V07, V10, V11, V35 e O18). A divergência genética entre as sete linhagens variou de 24% a 85% (Tabela 8). Maior divergência (85%) foi observada entre as linhagens C18 (*C. lanatus* var. *lanatus*) e V10 (*C. lanatus* var. *citroides*) e O18 (*C. lanatus* var. *lanatus*) e V10.

A linhagem da espécie *C. colocynthis* apresentou maior divergência com as das espécies *C. lanatus* var. *citroides* (76%) do que com as linhagens da espécie *C. lanatus* var. *lanatus*. As linhagens V10 e V11 apresentaram maiores índices de divergência entre todas as linhagens estudadas (70% a 85%). Entre as linhagens V10 e V11 a distância genética foi de apenas 24% (Tabela 8).

Entre as linhagens da espécie *C. lanatus* var. *lanatus* foi observada variação de 38 a 46% de divergência, indicando baixa variação tanto entre as comerciais (C18 e C35) como entre as linhagens resistentes a oídio e vírus (O18 e V07). A menor divergência genética foi encontrada entre as linhagens C35 e V07 (38%) (Tabela 8).

Tabela 8 – Divergência genética entre sete linhagens avançadas de melancia obtida por meio de dados fornecidos pelo marcador DAF, com percentual de divergência e identificação das espécies

Linhagens	Divergência %	Espécies
V10 x V11	24	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
C35 x V07	38	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
C35 x O18	41	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
C18 x V07	44	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
C18 x O18	44	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
C18 x C35	46	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
V07 x O18	46	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
C35 x V35	64	<i>C. lanatus</i> x <i>C. colocynthis</i>
V07x V35	66	<i>C. lanatus</i> x <i>C. colocynthis</i>
V35 x O18	70	<i>C. colocynthis</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
V11 x V35	70	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i> x <i>C. colocynthis</i>
C18 x V35	72	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. colocynthis</i>
C35 x V11	76	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
V10 x V35	76	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i> x <i>C. colocynthis</i>
C35 x V10	79	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
V07 x V11	82	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
V07 x V10	83	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
V11 x O18	84	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
C18 x V11	84	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
C18 x V10	85	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
V10 x O18	85	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> x <i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>

O dendrograma construído distribuiu as sete linhagens de melancia em três grupos principais, sendo que o primeiro pode ser dividido em dois subgrupos (Figura 10). O grupo I foi constituído com as linhagens das espécies *C. lanatus* var. *lanatus*, sendo que as linhagens comerciais (C18 - Smile e C35 – Crimson Sweet) ficaram em subgrupos distintos.

As linhagens da espécie *C. lanatus* var. *citroides* são altamente similares entre si (média de 24% de divergência), porém significativamente divergente entre as linhagens das demais espécies, e formam o grupo II. O grupo III foi constituído com a linhagem da espécie *C. colocynthis*.

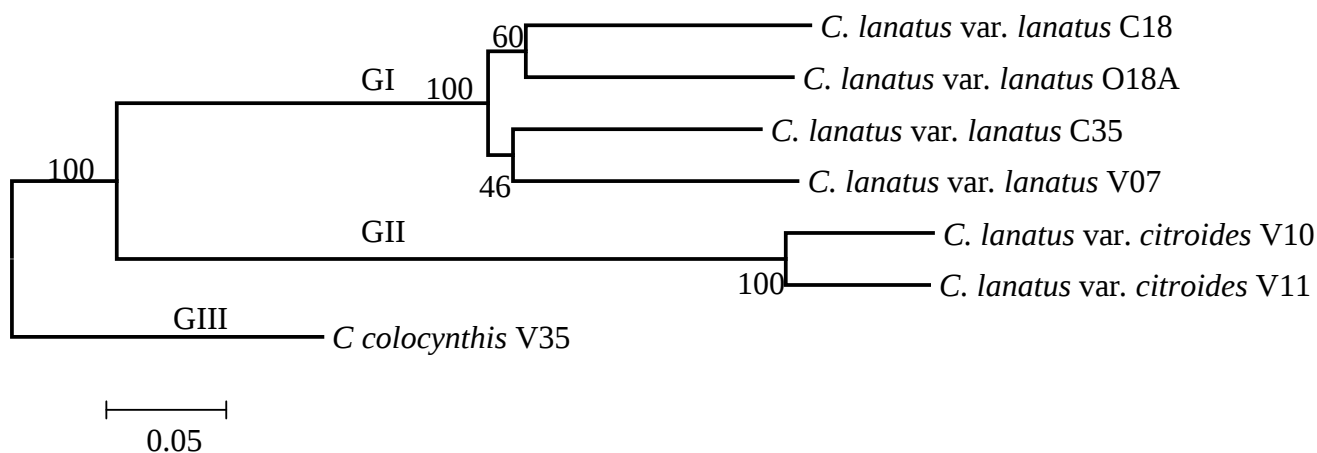


Figura 10. Dendrograma de sete linhagens avançadas de melancia obtido com 45 *primers* DAF, com valor do *Bootstrap*.

Foi verificada a eficiência dos marcadores DAF em detectar polimorfismos dentro e entre linhagens avançadas de melancia intimamente relacionadas, o que pode ser potencializada com a aplicação de *primers* previamente selecionados como polimórficos.

4.2.4. Reação DAF em 291 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitáceas

4.2.4.1. Perfil molecular dos acessos de melancia

Dezesseis *primers* produziram 216 bandas, sendo 141 polimórficas (65,27% de polimorfismo), com média de nove bandas polimórficas por *primer* (Tabela 8). Quando se soma o número de bandas polimórficas amplificadas entre as espécies observa-se o elevado número de bandas produzidas (421 bandas), que variaram em tamanhos de 250 a 2160 pb. Vale salientar que no processo de contagem de bandas polimórficas uma mesma banda foi contabilizada mais de duas vezes entre as espécies, ou seja, um marcador de 278 pb foi polimórfico nas espécies *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis* e monomórfica para *C. lanatus* var. *lanatus*, sendo então este mesmo marcador contabilizado duas vezes, uma para *C. lanatus* var. *citroides* e outra para *C. colocynthis*. Os *primers* p15-10, OPB14, OPO15 e OPB15 revelaram maior número de bandas polimórficas (15, 9, 12 e 13, respectivamente). Na Figura 11 encontra-se o perfil molecular produzido pelo *primer* p15-10.

Os *primers* utilizados foram mais informativos na amplificação do DNA entre 265 acessos das subespécies de *C. lanatus*. var. *lanatus* e 18 acessos da subespécies de *C. lanatus*

var. *citroides*, revelando 118 e 64 bandas polimórficas, respectivamente. Indicando variação genética entre os acessos estudados. Apenas 39 bandas foram detectadas entre os acessos da espécie *C. colocynthis*.

O número de bandas polimórficas detectado dentro da espécie *Cucumis melo* foi considerado satisfatório (59), com destaque para os *primers* OPA19 (8 bandas), OPF16 (5 bandas), OPO10 (6 bandas), OPO15 (6 bandas), OPC15 (9 bandas) e p15-10 (7 bandas), uma vez que foram utilizados apenas dois acessos da referida espécie (Tabela 9).

O nível de polimorfismo detectado indica variabilidade dentro e entre o germoplasma de melão conservado no BAG de Cucurbitáceas, o que pode ser confirmado com a análise de um maior número de acessos. Os resultados também demonstraram que o protocolo de reação DAF foi eficiente na amplificação do DNA das espécies *Cucumis melo* (melão) sem modificações, favorecendo a caracterização de acessos de melão do BAG de Cucurbitáceas, cujos estudos até então foram realizados com base na caracterização morfológica.

Tabela 9. Relação de *primers* DAF selecionados para amplificação do DNA de 291 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitáceas, mostrando a variação no número de bandas produzidas dentro e entre as diferentes espécies do gênero *Citrullus* e *Cucumis*

<i>Primers</i>	Número de Bandas Polimórficas				Total	
	<i>C. lanatus</i>	<i>C. citroides</i>	<i>C. colocynthis</i>	<i>Cucumis</i>	Polimórficas	Bandas
OPA19	5	6	2	8	7	15
OPA01	6	4	2	4	8	13
OPB14	8	5	3	0	9	11
OPC06	5	3	2	4	7	7
OPF16	8	7	2	5	9	13
OPE01	4	2	2	3	4	8
OPE14	6	0	1	2	7	10
OPO15	10	3	3	0	12	15
OPO07	6	4	2	1	6	12
OPAX14	9	3	1	0	11	14
OPS18	5	4	2	2	6	11
OPO10	9	6	3	6	9	13
OPB15	8	0	3	6	13	13
OPC15	11	3	4	9	12	16
OPD18	5	3	2	2	6	23
P15-10	13	11	5	7	15	22
Total	118	64	39	59	141	216

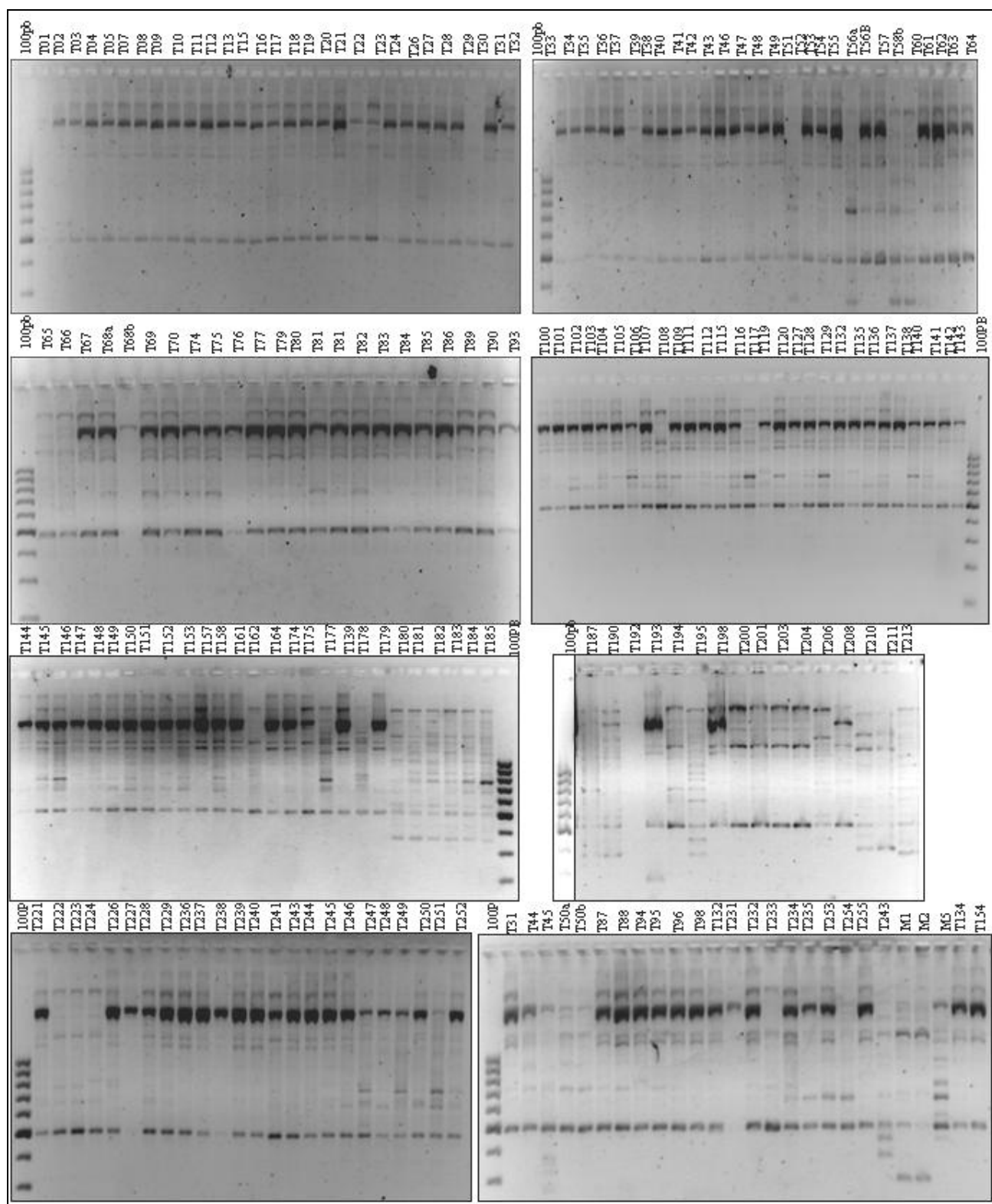


Figura 11. Perfil molecular do *primer* p15-10 na amplificação do DNA de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, Ladder 100pb.

4.2.4.2 Divergência genética entre os acessos de melancia

O coeficiente de similaridade genética de Jaccard entre os 291 acessos de melancia e dois de melão revelou que os valores variaram de 0,10 (acessos T110 e V28) a 0,89 (acessos T200 e T201), com média igual a 0,36 de similaridade, revelando ampla faixa de variação, o que demonstra variabilidade genética de melancia existente no BAG de Cucurbitáceas (dados não mostrados).

Índices altos de similaridade genética foram detectados entre os acessos coletados na região de Massaroca - BA, variando de 0,61 (acessos T1 e T12; T7 e T9; T13 e T15) a 0,87 (T3 e T5; T4 e T5), porém, a distância genética entre esse conjunto de acessos e os demais, foi expressiva variando de 24% (T5x T255; T7xT255 e T15x T239) a 79% de divergência (V9xT01; V9xT8 e V11xT8).

Na Tabela 10 encontram-se os acessos de melancia que apresentaram 75% de divergência genética. Foi observado que os acessos da espécie *C. colocynthis* (T4339) apresentaram divergência genética com 14 acessos de *C. lanatus* var. *lanatus*, incluindo quatro cultivares comerciais (C2 e C5 – “Pérola”; C30 e C31 – “Sugar Baby”). As linhagens da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* apresentaram divergência genética com maior número de combinações (21 acessos), sendo três linhagens comerciais (C20 a C31 – “Sugar Baby”). Vinte e um acessos da agricultura tradicional (*C. lanatus* var. *lanatus*) apresentaram diferentes possibilidades de combinações com vários acessos e linhagens, favorecendo a obtenção de híbridos com diferentes características de frutos.

Tabela 10. Acessos e linhagens de melancia do BAG de Cucurbitáceas com 75% de divergência genética, com tratamentos e suas possíveis combinações híbridas

Tratamentos		Combinações híbridas possíveis					
V09	C30	C31	C29	T86	T100	T232	T238
V10	C31	T21	T40	T54	T232		
V11	C29	T46	T47	T54	T154		
V12	T46	T48	T49	95			
T31	V08	V28	C18				
C31	T37	V32	V11	V10	O25	O15	O24
T30	V32	O13	O08	O01	O24	C19	
T56a	O20	O25	O06	V19	O18		
T52	O04	O12	V19				
T50a	O25	O02	V16	V12	V34	V15	C19
T58	V28	V19	V17	C12	T254	T251	T203
T20	V34	V110	V15	V9			
T96	V12	V27	V16	C19	C14	C03	
T60	V15	V12	O25	O16	T249		
T58a	V10						
V32	T227	C30					
T110	T57	T100	T69	T252	T236		
T134	V33	58 ^a	O23	O03	C30	O22	
T154	T208	O04	O02	V19	V07	C13	
O17	T249						
T4339	T29	T15	T17	T54	T36	C5	C30
	C32	O21	C2	T227	T198	T183	T213
V16	M5	T211				15	
C29	V9	O16	O17	O8	V11		
O23	T136						
T183	V19	C31					
T187	V17	O16					
T182	O04	O08	O11	O15			
T190	O03	V29					
T185	V28						
T211	O25						

V = Linhagens resistentes a vírus; O =Linhagens resistentes a oídio e C = linhagens de variedades comerciais

Na Figura 12A (Anexo 3) encontra-se o início do dendrograma que compreende 291 acessos e linhagens de melancia e dois de melão. As Figuras 12B e 12C mostram a continuidade do dendrograma, revelando os acessos e linhagens de melancia nos diferentes grupos e subgrupos (Anexo 3).

O dendrograma foi constituído basicamente de dois grupos principais: o grupo I foi formado pelo acesso introduzido T4339 da espécie *C. colocynthis*, comportando-se como um grupo externo e o grupo II foi constituído pelos demais acessos. Neste segundo grupo, as linhagens originárias de acessos introduzidos da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* (V9 a V12) foram alocadas na base do agrupamento como grupo irmão dos demais acessos (Figura 12A – Traço A, Anexo 3). Os acessos do gênero *Cucumis* (melão - M1 e M5) ficaram alocados entre os acessos de *Citrullus*.

Os acessos introduzidos ficaram em dois subgrupos distintos. Em um dos subgrupos os acessos de V32 a V35 (*C. colocynthis*) ficaram próximos do grupo de linhagens do programa de melhoramento (Figura 12A – Traço C, Anexo 2) em outro subgrupo os acessos introduzidos T206, T208, T210, T211 e T213 ficaram alocados juntamente com acessos do centro de cultivo da agricultura tradicional do Nordeste Brasileiro (Figura 12A - círculo 2, Anexo 3).

Contudo, foi observado que o referido marcador apresentou potencial tanto na detecção de polimorfismos quanto no agrupamento de acessos de melancia. Diferentes subgrupos foram formados, indicando variabilidade genética nas espécies do gênero *Citrullus*, principalmente quando se observa que as linhagens do programa de melhoramento ficaram em um subgrupo distinto entre os demais acessos, bem como, pela separação do subgrupo de linhagens em duas divisões. Na primeira divisão as linhagens comerciais foram agrupadas com as linhagens resistentes a vírus (V35 a C3), enquanto as linhagens resistentes ao oídio formaram um grupo isolado (O19 a O1).

A maior parte dos acessos de melancia do conjunto do centro de cultivo foi distribuída em subgrupos distintos. Os referidos acessos foram separados em seis divisões, conforme local de origem ou regiões próximas. A subdivisão I contém os acessos de *C. lanatus* var. *citroides* (T180 a T185, T187 e T190) coletados em Mirangaba - BA e quatro acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* coletados em Pernambuco (T190, T198), Bahia (T195) e a variedade comercial New Hampshire. Midget (T192).

Na subdivisão II ficaram alocados cinco acessos introduzidos (T208, T210 e T211 - *C. colocynthis*; T206 - *C. lanatus* var. *lanatus* e T213 - *C. lanatus* var. *citroides*) e três acessos coletados na Bahia (T24 - Presidente Dutra, T30 - América Dourada e T31 - Jacobina). Onze acessos formaram a subdivisão III, predominando os acessos coletados na Bahia (T178 a T140).

Um grande grupo formou a subdivisão IV, sendo constituído por 54 acessos que foram distribuídos em quatro subgrupos. No primeiro subgrupo há dois acessos de melancia

coletados em Turiaçu – MA (T117 e T119). No segundo subgrupo encontram-se 12 acessos, sendo três coletados na Bahia (T223 – Uauá, T233 e T234 – Massaroca, distrito de Juazeiro) (Figura 12C, Traço D, Anexo 3), quatro em Pernambuco (T222 e T224 – Petrolina, T229 – Barreiros e T221 – Lagoa dos Cavalos, ambos distritos de Petrolina) e três no Maranhão (T232 – Frechal Mirinzal, T226 – Fortaleza dos Nogueiras e T235 – São Luís) e duas variedades comerciais (T193 – “Peacock” e T194 – “Mickelee”).

O terceiro subgrupo compreende 20 acessos coletados entre Bahia (T157 e T158 – Juazeiro), Rio Grande do Norte (T145, T146, T148, T149 e T150 a 153 – Mossoró); Piauí (T135 – Altos, T137 – União, T142 e T143 – José de Freitas) e Pernambuco (T161, T162 e T164 – Petrolina, e mais três variedade comerciais (T174 – “Riviera”, T175 – “Pérola” e T177- “C. Gray”). Já no quarto subgrupo foram agrupados 18 acessos oriundos do Maranhão (T100 a T104 e T105 – São Luís; T106, T107, T111, T112 e T115 – Codó; T128, T129 e T132; T116 e T120 – Turiaçu) e dois acessos do Piauí (T138 – Regeneração e T139 – Agricolândia).

A subdivisão V foi formada por 58 acessos, que foram divididos em pequenos conjuntos de melancia, todos originários da Bahia e Maranhão. Entre os acessos, destaca-se um grupo de 27 acessos provenientes de coletas realizadas em regiões da Chapada Diamantina (BA), principalmente Ibipêba (T21), Ibititá (T25 e T26), São Gabriel (T22), Presidente Dutra (T23 e T27), Canarana (T29), Jacobina (T32 a T43, T46 a T49), Mirangaba (T51, T53 e T54) e um oriundo de Barro Alto (T28), uma vez que acessos coletados em três regiões da Chapada Diamantina estudados por Silva (2004), por meio de caracterização morfológica e molecular (RAPD), apresentaram 46% de variação dentro de regiões.

O Subdivisão VI que compõe o conjunto da agricultura tradicional foi constituído por 42 acessos coletados na Bahia; neste mesmo grupo foram observados quatro subgrupos. O primeiro reuniu quatro acessos de melancia (T200, T201, T203 e T204) que apresentaram sementes morfológicamente similares às de abóboras, sendo denominados pelos agricultores de melancia abóbora, embora as características de plantas, frutos e flores sejam similares às da espécie *C. lanatus* var. *lanatus*, exceto pelo fato de serem maiores sugerindo um estado poliploide, fato que estudo citogenético poderá esclarecer. A similaridade genética entre os variou de 0,50 (T8 x T200) a 0,68 (T10 x T201). Já com relação aos demais acessos a similaridade genética variou de 0,22 (T50a x T204) a 0,58 (T148 x T201) (Figura 12A - Traço D, Anexo 3).

O segundo e o terceiro subgrupos agruparam os acessos coletados em pontos de venda em Massaroca, enquanto o quarto subgrupo foi composto pelos acessos coletados nas demais

comunidades de Massaroca (Oliveira, Papagaio, Curral Novo, Canoa e Lagoinha) (Figura 12A – Traço E, Anexo 3).

4.3. Análise de variância molecular por meio do marcador DAF

Observou-se o maior percentual de variação (76, 71%) dentro de cada conjunto de materiais (conjunto do programa de melhoramento, conjunto do centro de diversidade, conjunto do centro de cultivo e conjuntos de cultivares comerciais). Foram detectados 23,2% de variação entre acessos de melancia dos diferentes conjuntos (Nível 1), indicando que eles são bem diferenciados um dos outros (Tabela 11). As maiores distâncias genéticas (0,365; 0,315) foram observadas entre os conjuntos do centro de diversidade e o conjunto de acessos das cultivares comerciais, seguida da distância do conjunto do centro de diversidade e o conjunto de linhas endogâmicas, respectivamente. A menor distância genética (0,110) foi observada entre os acessos da agricultura tradicional e as variedades comerciais.

A análise de variância molecular revelou que 12,60% da variabilidade genética se encontram entre os grupos de linhagens avançadas de melancia e 87,40% dentro dos grupos das linhagens (Tabela 11, Nível 2). As maiores distâncias genéticas foram observadas entre as linhagens resistentes ao oídio e as linhagens comerciais (0,195) e entre as linhagens resistentes ao oídio e aquelas resistentes a vírus (0,142), sendo a menor distância observada entre as linhagens resistentes a vírus e as variedades comerciais (0,059).

Quando se considera a variabilidade genética dos acessos de melancia coletados no Nordeste brasileiro (Nível 3) foi detectada maior variação dentro de Estados com 86,11% de variabilidade e menor variação entre Estados (13,89%), (Tabela 11). Os acessos de melancia coletados no Rio Grande do Norte apresentaram a maior distância genética com os acessos resgatados da Bahia (0,184) e Maranhão (0,174). Já os acessos coletados na Bahia revelaram menor distância genética dos acessos de melancia do Maranhão (0,114) e de Pernambuco (0,122). Ao se considerar as diferentes regiões dentro de cada Estado (Nível 4), observa-se que a variação entre os Estados foi significativamente reduzida (5,91%), aumentando-se o nível de variação entre regiões dentro de Estados (20,40%) e dentro dos Estados (73,70%).

A variabilidade genética da melancia coletada entre diferentes municípios foi significativamente inferior (10,48%) à variabilidade encontrada entre os acessos de melancia dentro de cada região, ou seja, grupos de municípios próximos (72,16%).

Tabela 11. Análise de variância molecular de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas em diferentes níveis hierárquicos, obtida a partir do marcador DAF

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Nível 1				
Entre conjuntos	3	1,163199	7,67074 va	23,29
Dentro de conjuntos	286	7,226818	25,26859 vb	76,71
Total	289	8,390017	3,293933	
Índice de Fixação	FST:	0,23287		
Nível 2				
Entre linhagens	2	238,009	3,24942 va	12,60
Dentro de linhagens	87	1,960358	22,5385 vb	87,40
Total	89	21,983	25,782	
Índice de Fixação	FST:	0,126		
Nível 3				
Entre Estados	4	481,237	3,811 va	13,89
Dentro de Estados	181	4276,94	23,629 vb	86,11
Total	185	4,758177	27,441	
Índice de Fixação	FST:	0,13891		
Nível 4				
Entre Estados	4	480,183	1,606 va	5,91
Entre regiões dentro Estados	14	935,786	5,544 vb	20,40
Dentro de Estados	168	3365,99	20,036 vc	73,70
Total	186	4781,96	27,187	
Índice de Fixação		FSC:0,217	FST: 0,263	FCT: 0,059
Nível 5				
Entre Regiões	18	1415,96	4,62 va	17,37
Entre municípios dentro De regiões	15	428,437	2,787 vb	10,48
Dentro de Regiões	153	2937,56	19,199 vc	72,16
Total	186	4781,96	26,608	
Índice de Fixação		FSC: 0,127	FST: 0,278	FCT: 19,199

N1 – conjuntos; N2 – Conj. do Programa de melhoramento; N3, N4 e N5 – Conj. Centro de Cultivos; FSC = Coeficiente de endogamia entre populações dentro de uma região; FST = Coeficiente de endogamia dentro de populações; Coeficiente de endogamia total das populações nas regiões.

4.4. Estudos com o marcador ISSR

4.4.1. Perfil molecular de 281 acessos de melancia e dois de melão

Dos 293 acessos selecionados para a análise com o marcador ISSR, 11 acessos (T213 – acesso; V13, V14, V15 – linhas *C. lanatus* var. *citroides*; V32, V33 e V34 – acessos *C. colocynthis*; T58a; T68a; T204 e T206 – *C. lanatus* var. *lanatus*) não amplificaram. A

diversidade genética de 281 acessos de melancia e dois de melão foi analisada com 11 *primers* previamente selecionados entre 47 *primers* testados (Figura 13). Foi obtido o total de 130 bandas, com 76,92% de polimorfismo, cujos fragmentos produzidos variaram de 210 a 1700 pares de base, sendo todos informativos, gerando em média 12 bandas polimórficas por *primer*, sob temperaturas de anelamento que variaram de 52°C a 54°C (Tabela 12).

Cinquenta e três bandas foram detectadas entre os acessos de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *lanatus* e 28 bandas entre os acessos de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *citroides*, correspondendo a um percentual de 47,7% e 21,5% de polimorfismo, respectivamente. Para os acessos de melancia (*C. colocynthis*) e melão (*Cucumis melo*), o número de bandas amplificadas foi equivalente a 32 e 33 bandas polimórficas, respectivamente, com 25,4% de polimorfismo cada. O perfil de amplificação do *primer* 856 em todos os acessos encontra-se na Figura 14.

Tabela 12. Relação de *primers* ISSR que amplificaram o DNA de acessos de melancia e melão, com sequências, números de bandas polimórficas dentro e entre espécies

<i>Primer</i> / T°C	Sequência	Bandas Polimórficas				Total Polimorf	Total Bandas
		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	<i>C. lanatus</i> var <i>citroides</i>	<i>C. colocynthis</i>	<i>Cucumis</i>		
811 - 52,0	(GA) ₈ T	6	3	2	4	15	16
841 - 52,8	(GA) ₈ YC	5	2	3	2	7	11
842 - 54,0	(GA) ₈ YG	4	2	6	3	15	16
844 - 52,8	(CT) ₈ RC	8	5	3	3	10	12
845 - 52,8	(CT) ₈ RC	6	3	4	6	9	13
846 - 54,0	(CA) ₈ RT	5	1	3	3	12	17
850 - 54,0	(GT) ₈ YC	4	1	1	1	5	7
852 - 52,0	(TC) ₈ RA	4	2	2	0	5	7
853 - 52,0	(TC) ₈ RT	4	1	2	4	6	10
855 - 52,0	(TC) ₈ YT	4	5	2	6	8	11
856 - 52,0	(AC) ₈ YA	3	3	4	1	8	10
Total		53	28	32	33	100	130

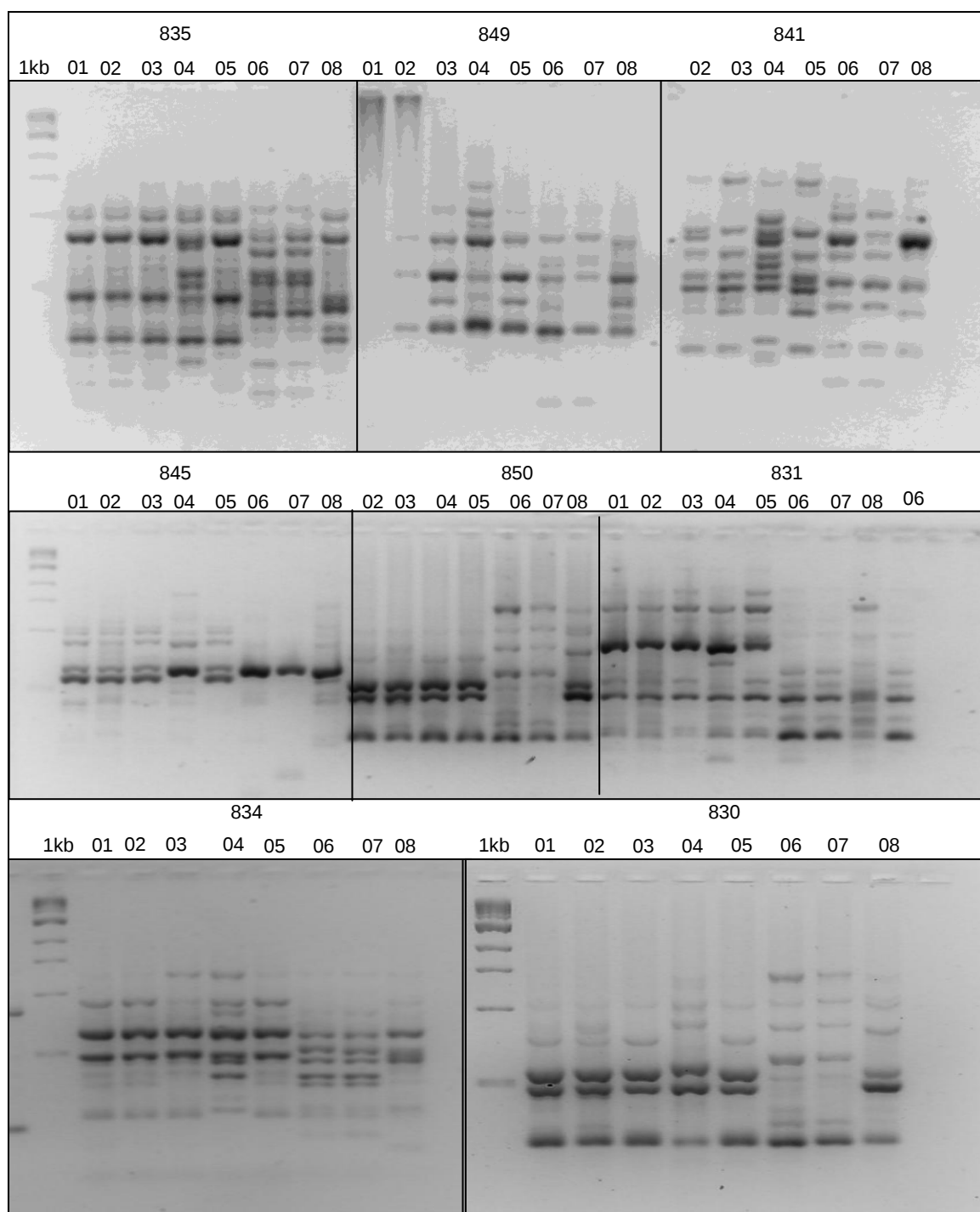


Figura 13. Padrões moleculares dos *primers* ISSR (835, 849, 841, 845, 844, 834 e 830) amplificando o DNA de oito acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas. Acessos: 01 = T02; 02 = T20; 03 = T204; 05 = T253 (*C. lanatus*); 04 = T213 (*C. lanatus* var. *citroides*); 06 = T210, 07 = T211 e 08 = T4339 (*C. colocynthis*).

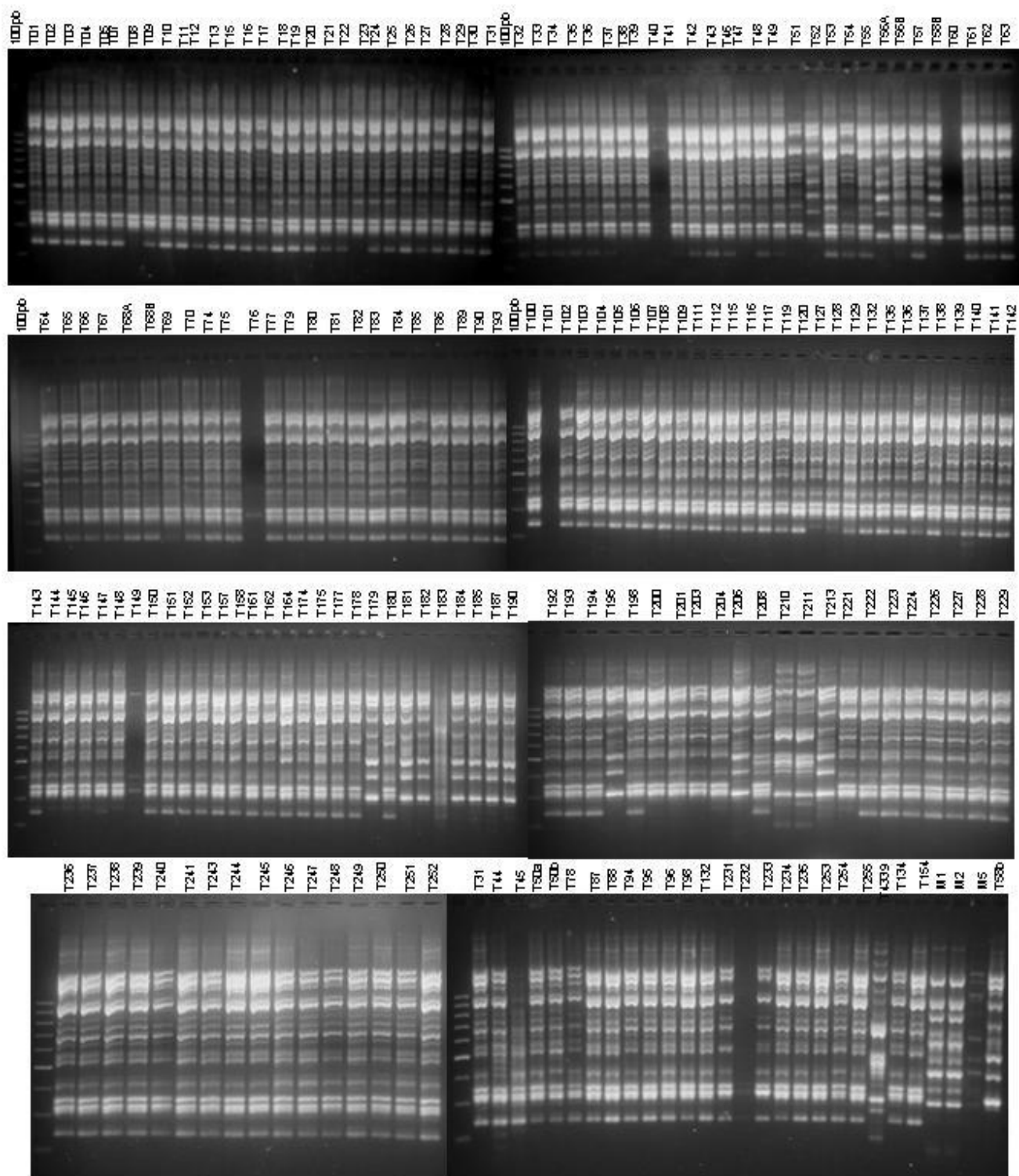


Figura 14. Padrão molecular do *primer* 856 na amplificação do DNA de acessos de melancia por meio do marcador ISSR, Ladder 100pb.

4.4.2. Divergência genética

O nível de divergência genética detectado pelos marcadores ISSR variou de 5% (O21 x O22) a 90% (V15 x T110), indicando ampla variabilidade genética entre os acessos de melancia estudados. Entre as linhas avançadas de melancia o marcador ISSR detectou variação de 0,52 (C1 x V8) a 0,96 (O14 x O25) de similaridade genética. Níveis altos de similaridade foram observados entre os acessos de melancia *C. lanatus* var. *citroides*, com variação de 0,50 (T187 e T185) a 0,93 (T180 e T182). Já dentro do conjunto do centro de cultivo a similaridade foi de 0,20 (T251 x T182, T183 e T184) a 0,67 (T190 x T192).

A análise de agrupamento pelo método UPGMA revelou cinco grupos principais (Figura 15 – Anexo 4). O grupo I foi composto pelos acessos de melão (*Cucumis*). Os grupos II e III foram constituídos pelo acesso T4339 e da linhagem V35, respectivamente, da espécie *C. colocynthis*. O grupo IV apresentou três subgrupos, sendo que no primeiro subgrupo ficaram alocadas as linhas avançadas de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* (V9, V10, V11 e V12). O segundo subgrupo foi constituído por dois acessos da espécie *C. colocynthis* (210 e 211) e o terceiro subgrupo alocou todos os acessos de melancia *C. lanatus* var. *citroides* coletados no Nordeste brasileiro (T180 a T190).

O grupo V dividiu-se em dois principais subgrupos: o subgrupo I incluiu um único acesso de melancia (T208 – *C. colocynthis*) totalmente isolado dos demais acessos. O subgrupo II comportou dois grandes conjuntos de acessos, sendo um conjunto com linhas avançadas de melancia do programa de melhoramento e o outro com os acessos de melancia coletados em áreas de agricultura tradicional, ou seja, do conjunto do centro de cultivos.

5. Discussão

5.1. Estudos no Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro

Os estudos direcionados ao conhecimento e conservação de recursos genéticos vegetais envolvem desde a correta identificação botânica da espécie até a determinação de descritores facilmente visíveis e/ou mensuráveis em todos os ambientes. Entende-se por descritor qualquer atributo ou caráter que permita a distinção entre acessos (GIACOMETTI, 1988).

Queiróz *et al.* (1999) descreveram a situação do referido BAG em termos de números de acessos, em um período de 12 anos após as primeiras coletas, indicando que foram resgatados até aquela época, 1527 acessos das diversas espécies de cucurbitáceas, sendo 572 acessos de melancia. Onze anos após a última avaliação, verificou-se que o BAG de Cucurbitáceas continha 753 acessos de melancia, com 40% dos mesmos multiplicados e ou caracterizados, que se encontram preservados em câmara fria a 10°C e 40 % de umidade relativa, sendo que parte já começa a ser preservada a temperatura sub-zero na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Comparando os dois levantamentos, observa-se que o número de expedições de coleta aumentou, porém o quantitativo de acessos coletados foi reduzido (Figura 2). Entre as regiões abordadas para coleta de acessos de melancia, observa-se uma predominância de acessos coletados tanto na Bahia como no Maranhão e a falta de acessos representativos das regiões da Paraíba, Sergipe, Ceará e Alagoas (Figura 2). No Rio Grande do Norte, assim como em Pernambuco e no Piauí as coletas foram limitadas.

Nos dados de passaporte verifica-se que as sementes foram na sua maioria doadas pelos agricultores, sendo relatado o hábito de guardá-las juntamente com cinzas de carvão em garrafas plásticas ou outros tipos de recipientes, numa tentativa de conservação em curto prazo para plantios futuros. O hábito de conservar sementes e seu intercâmbio entre agricultores tem sido apontado como um fator cultural que favorece a manutenção e ampliação da variabilidade genética da melancia no Nordeste brasileiro (ROMÃO, 1995; 2000).

Considerando que as roças dos agricultores familiares, muitas vezes ficam contíguas, e sendo a melancia uma planta alógama cujo vetor de transporte de pólen é a abelha, existe alta possibilidade de recombinação gênica entre seleções de diferentes agricultores, o que

contribui para ampliar a variabilidade genética existente e possivelmente explica a existência de grande variabilidade mesmo em amostras coletadas em um único local, como ocorre nas amostras coletadas na Ilha de São Luís – MA (CAPELOTO, 2003).

Por outro lado, a mistura de sementes realizada pelos agricultores pode favorecer a coleta de acessos duplicados. Com isto, durante a fase de coleta, quando possível, deve-se obter o maior número possível de sementes ou até mesmo dar preferência a coletas de frutos diretamente na roça dos agricultores quando possível, visando à obtenção de acessos representativos da variabilidade genética, bem como para evitar possíveis duplicatas (RITSCHER *et al.*, 1999; RITSCHER & HUAMÁN, 2002). Vale salientar que em se tratando de espécies alógamas e com grande possibilidade de recombinação, observa-se uma tendência de maior variabilidade entre as amostras.

5.3. Estratégia de amostragem

Os critérios estabelecidos por Chang *et al.* (1979) demonstram que o espectro do germoplasma de espécies vegetais está dividido em três grupos distintos: Centro de Diversidade, que inclui as cultivares primitivas de cultígene (termo utilizado para denominar as espécies domesticadas de animais e plantas) (BREWBAKER, 1969), os híbridos naturais entre genótipos cultivados e os parentes silvestres, bem como gêneros relacionados; Centro de Cultivo, que envolve os tipos comerciais, variedades obsoletas e outros tipos cultivados; e Plantas do Programa de Melhoramento, referindo-se às linhas puras e avançadas, estoques do melhoramento, mutantes, poliploides, híbridos interespecíficos e intergenéricos.

O estudo de caracterização molecular dos 291 acessos de melancia e dois de melão, com base nos critérios de Chang *et al.* (1979), resultou em informações sobre a variabilidade genética de 40% dos acessos preservados no BAG de Cucurbitáceas, o que seria inviável por meio de marcadores morfológicos. A distribuição dos acessos em conjunto foi favorável ao conhecimento da estrutura do banco e facilita a exploração dos acessos por parte dos melhoristas para compor novas coleções de trabalho.

5.4. Preservação de acessos de melancia no BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro

Os resultados obtidos com o levantamento dos acessos de melancia no BAG de Cucurbitáceas permitem considerar que o BAG de Melancia é uma exceção com relação às informações dos acessos preservados em BAG de germoplasmas, pois a partir dos dados de passaporte observou-se informações importantes para o estabelecimento da identidade do acesso, como região de coleta, se coletados em roças ou feiras livres, tipo de material coletado (fruto ou semente), descrição morfológica preliminar de alguns frutos e sementes, etc. Todas essas informações têm relevância no processo de caracterização e uso do germoplasma e permite inferir sobre os fatores que podem favorecer ou influenciar a variabilidade genética dos acessos, beneficiando a exploração do germoplasma por parte dos melhoristas.

Vale salientar que apenas os dados de passaporte apesar de necessários não são suficientes para fins de melhoramento. Contudo, informações sobre os acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro têm sido apresentadas nos diversos congressos e encontros, sendo estas mesmas informações obtidas durante as fases de multiplicação, regeneração, caracterização e avaliação (LIMA NETO *et al.*, 2005; 2007; QUEIRÓZ *et al.*, 2008). As análises dos dados de passaporte fornecem informações preliminares que auxiliam na caracterização do acesso.

5.5. Caracterização morfológica e avaliação

A fase de caracterização morfológica dos acessos de melancia tem revelado importantes caracteres agronômicos. Nos estudos realizados por Romão (1995) há relatos não só sobre os descritores de maior relevância na discriminação dos acessos de melancia, como também da contribuição relativa dos mesmos para a variabilidade genética da espécie. Neste mesmo estudo, foram relatadas as variações para caracteres qualitativos e quantitativos, sendo indicadas as frequências de determinado caráter nas três regiões estudadas. Na região da Bahia foi possível encontrar com maior frequência fruto oval verde claro, com listras largas verdes e polpa branca. Na Depressão Sertaneja (envolvendo regiões da Bahia, Pernambuco e Piauí) encontra-se fruto com formato cilíndrico, verde médio e padrão de casca com listras na cor verde médio e cor de polpa rosa. Já no Maranhão o autor relata maior frequência de frutos cilíndricos, com listras verde-escuras e cor de polpa vermelha.

Vale salientar que muitos dos genes descritos até então para melancia (GUNER & WEHNER, 2004) apresentam-se de forma dispersa no Nordeste brasileiro, como o gene *golden (go)* que confere fruto de casca amarela, podendo servir como indicador da maturação dos mesmo (Figura 5B). Aliás, foi observado um gene que dá a cor amarela à casca do fruto desde o início da formação do mesmo indicando a ação de diferentes alelos que ainda não foram descritos, mas que ocorrem em acessos da Bahia, Piauí e Maranhão. Entre os acessos selecionados para análise que apresentam este gene citam-se: T128 coletado em São Luís Gonzaga (MA) e T239 resgatado em Massaroca (BA) (Tabela 4, dados de passaporte).

Três genes controlam a cor do tegumento da semente (*r* – vermelho, *t* – marrom claro e *w* – branco) e suas interações resultam em seis fenótipos (*RRTTWW* – preto (T105), *RRttWW* – marrom (T100), *RRttww* – branco com marrom (T96), *rrttWW* – vermelho; *rrttww* – branco com rosa e *RRTTww* – *clump*) (GUNER & WEHNER, 2004). Para o tamanho das sementes há dois genes responsáveis pela expressão do caráter, podendo indicar sementes pequenas (*llss* – T116), grandes (*llSS* - T87) e médias (*LLSS*), ocorrendo em acessos de melancia de Turiaçu e Paraibano (MA), respectivamente. Um único gene atua na expressão do formato do fruto (*O*), produzindo fruto oval (*Oo*), alongado (*OO*) ou esférico (*oo*) (GUNER & WEHNER, 2004) (Figura 5).

Caracteres mais complexos também têm sido estudados, como de frutos partenocárpicos (LIMA NETO e QUEIROZ, comunicação pessoal), tamanho de frutos, cor de polpa e resistência a vários patógenos (SILVEIRA *et al.*, 2009). Vale salientar que genes de resistência a diferentes patógenos têm sido identificados entre os acessos de melancia conservados no BAG de Cucurbitáceas. Oliveira *et al.* (2002) indicaram 21 acessos resistentes a ZYMV, 15 acessos resistentes a ZYMV isolado ou combinado, cinco acessos com resistência tripla e um acesso de melancia resistente ao PRSV-W, como fontes promissoras para serem empregadas em programas de melhoramento, visando ao desenvolvimento de cultivares resistentes. Silveira *et al.* (2005) descrevem a ocorrência de fontes de resistência a potyvirus em acessos coletados em Petrolina – PE (87-019), Piauí (87-029), Bahia (91-043 – Itaguaçu) e Maranhão (91-080 – Paraibano), bem como entre acessos introduzidos (*C. colocynthis* e *C. lanatus* var. *citroides*).

Lima Neto (2009) avaliou genótipos de melancia quanto à expressão de alternariose (*Alternaria cucumerina*) em dois ambientes, revelando a existência de interação GxA na avaliação de genótipos de melancia quanto à resistência à alternariose no Submédio São Francisco, sendo a maior parte da variância fenotípica observada atribuída a fatores genéticos (74,5%). O acesso 91-0043, coletado na Bahia foi indicado como fonte consistente para

resistência à alternariose, sendo que, entre os acessos de melancia, observam-se frequentemente plantas com resistência ao patógeno.

5.6. Caracterização Molecular

O processo de extração de DNA permitiu a formação de um banco de DNA genômico, o qual poderá ser utilizado para diversos estudos. De fato, segundo Santos *et al.* (2002), a importância da aplicação de bancos de DNA está diretamente relacionada ao fato de que em tais estudos há exploração da biodiversidade em seu aspecto mais fundamental que se dá em nível molecular, e que no presente caso foi utilizado para avaliar a diversidade genética entre germoplasma de melancia que se encontra armazenado no Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro.

Para isto, como não se dispunha de um procedimento para amplificação de DNA de melancia por meio do marcador DAF foram realizados experimentos visando obter a melhor condição de reação, considerando os trabalhos de Caetano-Anollés *et al.* (1992). Tal procedimento permitiu a diminuição de custos das reações, aumentando-se a eficiência na detecção do polimorfismo.

No processo de amplificação do DNA de melancia, dezesseis *primers* foram informativos na detecção de polimorfismo, revelando que o potencial de um marcador está diretamente associado ao número de fragmentos polimórficos produzidos. No presente estudo, o polimorfismo detectado foi suficiente para indicar variação (65,3% de polimorfismo) entre os acessos de melancia analisados. De acordo com Vidal *et al.* (2005), quando poucos *primers* promovem boa formação de bandas em cada população, maior número de *primers* serão necessários para adequada estimativa da variabilidade genética. Todavia, quando muitos *primers* promovem boa formação de bandas em cada população, poucos são suficientes para estimativa adequada da variabilidade genética. No caso da melancia, foi observado que para futuros estudos envolvendo mapeamento e seleção assistida por marcadores faz-se necessário ampliar o número de marcadores polimórficos detectados.

5. 6.1 Marcador molecular DAF

No presente estudo os 65 *primers* DAF produziram 498 bandas, com percentual de 70,88% de polimorfismo, indicando ampla variabilidade genética entre as sete linhas avançadas de melancia do BAG de Cucurbitáceas, discordando de Levi *et al.* (2001a) que detectaram baixa variabilidade entre cultivares e plantas introduzidas de melancia ao testar 138 *primers* que amplificaram 288 bandas, com 29,5% de polimorfismo. A diferença no número de bandas detectadas pode ser justificada pelo marcador aplicado (RAPD) e os genótipos utilizados. Resultados semelhantes foram relatados por Lee *et al.* (1996) e Silva *et al.*, (2006) aplicando-se o marcador RAPD.

De acordo com Navot & Zamir (1986), o polimorfismo produzido por sistemas isoenzimáticos apresentou pouca variação entre *C. lanatus* e *C. colocynthis*, sendo todos os locos monomórficos entre as variedades cultivadas. O baixo número de polimorfismos pode ser atribuído à ancestralidade comum entre as espécies, uma vez que foram encontrados alelos de *C. colocynthis* em espécies de *C. lanatus*. Segundo Assis *et al.* (2000), o acesso de *C. lanatus* que carrega alelos de *C. colocynthis* é identificado como *C. lanatus* var. *citroides*, uma subespécie obtida de cruzamento natural entre *C. lanatus* e *C. colocynthis*, muito utilizada na alimentação de animais e que também ocorre no Nordeste brasileiro.

Com um número reduzido de linhas avançadas de melancia (sete) foi possível identificar, com o marcador DAF, variação genética nas três espécies do gênero *Citrullus*. Apesar da estreita base genética da melancia domesticada, as três espécies foram claramente diferenciadas e separadas em grupos específicos, com nível de divergência variando entre 25% a 85%, uma indicação favorável à continuidade das análises e da potencialidade do marcador DAF em detectar polimorfismo entre espécies intimamente relacionadas (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991).

O marcador DAF revelou potencial na produção de bandas informativas, quando comparado ao RAPD, sendo esta diferença atribuída ao fato de se utilizar menor quantidade de DNA (0,1 a 1,0 ng/μl) e maior concentração de *primers* na reação (mais de 3 μM), o que resultou em produtos informativos e com maior reprodutibilidade (CAETANO-ANOLLÉS, 1993). As 216 bandas produzidas com 65,3% de polimorfismo nos 239 acessos podem ser atribuídas às especificações dos *primers*, que envolvem alto conteúdo GC (>50%) e principalmente ao polimorfismo entre as espécies estudadas e seus respectivos acessos.

De acordo com Romão *et al.* (2008), o germoplasma de melancia existente na agricultura tradicional do Nordeste brasileiro foi introduzido diretamente de diferentes localidades da África, centro primário de diversidade das espécies, cuja variabilidade genética vem sendo mantida e ampliada na região segundo fatores históricos, culturais e genéticos. O nível de similaridade genética entre os acessos de melancia variou de 0,10 (acessos T110 e V28) a 0,89 (acessos T200 e T201) e, considerando amostragem tanto do número de acessos como das localidades de coleta dos mesmos, atestam que o BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro detém acessos de melancia com ampla variabilidade genética e potencial para fins de melhoramento. Estudos iniciais com amostragem limitada, tanto em número de acessos como de locais, e baseada em caracteres morfológicos já indicavam ocorrência de variabilidade genética no BAG de melancia (ROMÃO, 1995; SILVA *et al.*, 2006).

A distribuição dos referidos acessos em um dendrograma revelou grupos que concordam com a distribuição dos mesmos conforme o espectro do germoplasma citado por Chang *et al.* (1979) (Figura 12A-C Anexo 3). O dendrograma apresentou dois grupos principais. O grupo I foi formado com o acesso da espécie *C. colocynthis* (T4339) que foi introduzida no BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro devido, principalmente, às características de resistência a patógenos. A espécie *C. colocynthis* é nativa do deserto africano (centro primário de diversificação), sendo conhecida como maçã amarga e muito utilizada como medicinal desde os tempos mais remotos. A referida espécie apresenta diferentes linhagens, que migraram da África para Ásia tropical e Mediterrânea e que se encontram amplamente distribuídas em regiões filogeográficas da África ao Oriente Médio. A essência de linhagens divergentes tem sido atribuída à restrita migração e fluxo gênico entre populações de regiões distantes e às diferenças no tamanho das populações de haplótipos divergentes com padrão diferencial de adaptação ambiental (DANE *et al.*, 2007).

O grupo II foi constituído pelos acessos dos gêneros *Citrullus* e *Cucumis* (Figura 12A - círculo 1, Anexo 3), diferindo significativamente da taxonomia da espécie. O gênero *Citrullus* pertence à tribo Benincaseae e à subtribo Benincasinae. O gênero *Cucumis* pertence à tribo Melotriceae e subtribo Cucumerinae, tendo sido aplicado na análise como grupo externo (JOBST *et al.*, 1998), o que pode ser atribuído ao número de marcadores DAF que não foi suficiente para ampla cobertura do genoma dos diferentes gêneros.

No que se refere ao conjunto do centro de diversidade houve uma separação dos acessos introduzidos, sendo que o acesso T4339 formou um grupo isolado (GI) e os acessos T206, T208, T210, T211 e T213 apresentaram maior similaridade com os acessos do centro

de cultivo, indicando ancestralidade comum entre os mesmos (Figura 12A - círculo 2, Anexo 3).

Quatro linhagens de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* (V9 a V12) ficaram inteiramente isoladas dos demais acessos do gênero *Citrullus* (Figura 12A - Traço A, Anexo 3). Os acessos de *C. lanatus* var. *citroides*, incluindo os introduzidos, apresentaram menor divergência genética com os acessos de *C. colocynthis* (79%) do que com *C. lanatus* var. *lanatus* (86%), concordando com estudos baseados no polimorfismo de genoma mitocondrial e cloroplasto de espécies e subespécies de *Citrullus*, que indicam maior similaridade entre *C. colocynthis* e *C. lanatus* var. *citroides*, complementando estudos anteriores (LEVI *et al.*, 2001b).

Dois pequenos grupos foram formados por acessos de melancia coletados em áreas de agricultura tradicional da Bahia (Figura 12A – Traço B, Anexo 3), cujo nível de similaridade entre os mesmos variou de 0,49 a 0,86, sendo separados dos demais acessos do centro de cultivo. Segundo Romão (1995), a rota de introdução de espécies e subespécies de *C. lanatus* no Brasil teve início pela costa brasileira da Bahia ao Maranhão, sendo distribuídas para as demais regiões conforme a ocupação do Nordeste brasileiro. Neste contexto, os acessos isolados nesse pequeno grupo podem representar um elo entre os acessos do centro de origem e os acessos do centro secundário de diversidade, cujas distâncias e o isolamento entre essas regiões podem levar à formação de novos tipos de subespécies de *C. lanatus*, bem distintos dos encontrados no centro de origem, considerando-se ainda os processos adaptativos, a seleção natural e artificial.

De acordo com Dane & Lang (2004), o isolamento por distância é o principal fator para formação das diferentes linhagens de *C. colocynthis*. Estudos com análises de sequências de DNA podem esclarecer esta hipótese. Neste intuito, sequências de cpDNA, regiões ITSs e mDNA têm sido aplicadas para esclarecer o relacionamento entre espécies do gênero *Citrullus* (DANE & LANG, 2004; DANE & LIU, 2007).

Quatro linhagens oriundas de acessos da espécie *C. colocynthis* (V32 a V35) mostraram-se intimamente relacionados com o conjunto de linhagens do programa de melhoramento (Figura 12A - Traço C, Anexo 3), indicando que o processo de autofecundação para formação das linhagens revelou a variabilidade genética dos diferentes genótipos estudados (LEVI & THOMAS 2005; DJÈ *et al.*, 2010).

Entre os acessos do conjunto do programa de melhoramento a divergência genética variou de 19% a 77%, revelando ampla possibilidade de combinações. A linhagem comercial

C18 (Smile) revelou alto índice de divergência (62%) com as linhas V16, V27, O7 e O22, podendo ser explorada para obtenção de plantas com resistência tanto a vírus como ao oídio.

A linhagem C18 apresenta frutos pequenos e plantas prolíficas e precoces, sendo altamente suscetível aos vírus e a oídio. Já as linhas resistentes a vírus (V16 e V17) e ao oídio (O7 e O22) são provenientes da agricultura tradicional do Nordeste brasileiro. Segundo Silveira *et al.* (2005), as linhagens avançadas de melancia resistentes a vírus não apresentaram comportamento coincidente com relação à resistência em campo e em casa de vegetação, indicando a variação nos isolados que infestam as plantas em campo e que no desenvolvimento de programas de melhoramento para resistência a vírus, onde se pretende cultivar a nova variedade, na região deve-se considerar os três vírus e a ocorrência de diferentes isolados.

Considerando um índice de divergência entre acessos e linhagens de 75% observou-se a formação de 165 combinações possíveis. As linhagens comerciais C29, C31 e C30 (Sugar Baby - frutos pequenos e precoces, suscetíveis aos principais vírus e oídio) possibilitam de quatro a cinco combinações com linhagens resistentes tanto ao oídio quanto a vírus, sendo favorável para o estudo da capacidade de combinação para os diversos caracteres (FERREIRA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2004), incluindo a obtenção de resistência dupla.

As linhagens introduzidas V9, V10, V11 e V12 resistentes a vírus formaram um grupo isolado das demais linhagens avançadas de melancia e apesar de não apresentarem boas características de frutos (frutos pequenos, polpa branca, sementes verdes) apresentam cruzamentos favoráveis à alta heterose com as três referidas linhagens comerciais, além de combinações possíveis com linhagens da agricultura tradicional (T21, T40, T86, T100 e T232.), possibilitando que o caráter de resistência seja transferido para plantas com diferentes padrões de frutos, como no cruzamento entre V9 e T100 que pode resultar entre as progênie segregantes, fruto variando em tamanho, diferenças na cor externa, cor de polpa, tamanho e cor de sementes.

As diferentes combinações favorecem, além de estudos de herança da resistência, a avaliação da capacidade de combinação para vários caracteres (FERREIRA *et al.*, 2002, GUSMINI *et al.*, 2005; GUSMINI & WEHNER, 2006). A identificação de fontes de resistência ao oídio e seu emprego em programa de melhoramento favorece a obtenção de novas variedades, uma vez que a herança da resistência tem sido descrita como monogênica e dominante (BORGES, 1996), bem como favorece os estudos de mapeamento e seleção assistida por marcadores.

Com relação ao conjunto do centro de cultivo, o grande grupo (Figura 12A-C, Anexo 3) contendo a maioria dos acessos coletados em áreas de agricultura tradicional (T187 a T01), tem na base do agrupamento os acessos de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* coletados em Mirangaba (BA) (T180 a T185 e T187) e mais três acessos de *C. lanatus* var. *lanatus*, sendo uma comercial (T192 – New Hampshire Midget) e dois acessos (T195 – Mirangaba, BA e T198 – Petrolina, PE).

O marcador DAF apresentou habilidade em separar os genótipos de *C. lanatus* var. *citroides* adaptados às condições do Nordeste brasileiro dos introduzidos da África, revelando nível divergência que variou de 51% (T213 x T185) a 81% (T50A x V09). Essa divergência pode ser atribuída ao fato das diferentes subespécies de *C. lanatus* encontrarem-se no Nordeste brasileiro há mais de 300 anos, submetidas a tratos culturais e seleção artificial diferenciados por parte dos pequenos agricultores de áreas de cultivo tradicional, condições bem diferentes das encontradas no centro de origem, bem como pela atuação de processos adaptativos e seleção natural na manutenção das espécies na região (ROMÃO *et al.*, 2008).

Quatro acessos de melancia se destacam dos demais, por apresentarem caracteres morfológicos diferenciados (T200, T201, T203 e T204) (Figura 12C – Traço D, Anexo 2), sendo as sementes semelhantes às de abóbora em forma, cor e tamanho. As plantas de um modo geral apresentaram características contrastantes com relação ao tamanho das folhas e flores, que nos quatro acessos foram hermafroditas. O desenvolvimento diferenciado dos acessos de melancia remete a uma condição poliploide, sendo maiores e mais robustos que os diploides, sendo necessária avaliação citogenética dos mesmos para confirmação da poliploidia. O desenvolvimento de melancia sem semente (triploide) tem sido desenvolvido a partir do cruzamento de uma planta tetraploide com outra diploide, sendo a tetraploide obtida pelo tratamento de sementes ou plântulas diploides com colchicina (SOUZA & QUEIRÒZ, 2004).

No programa de melhoramento de melancia, além do desenvolvimento da melancia sem sementes, há prioridades no sentido de se obter padrões de frutos diferenciados, como frutos pequenos e plantas resistentes a diferentes patógenos, como *Alternaria* spp. (agente causal da alternariose), oídio (*P. xanthii*) e aos potyvirus (PRSV-W, WMV e ZYMV), (BORGES, 1996; LIMA NETO, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Dentro do conjunto do centro de cultivo (agricultura tradicional) verifica-se a tendência da separação dos acessos de melancia conforme o local de coleta, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento de cultivos com preferências para determinado tipo de melancia nas diferentes regiões do Nordeste brasileiro, por parte dos consumidores/produtores. Silva *et*

al. (2007) descreveram a variação genética dos acessos de melancia coletados em três regiões da Bahia, indicando a ocorrência de frutos ovais e esféricos nas regiões de Irecê e Vitória da Conquista, respectivamente, enquanto que na Chapada Diamantina os frutos longos predominam sobre os ovais. A variabilidade genética da melancia no Nordeste brasileiro tem sido relatada com base na caracterização morfológica (FERREIRA *et al.*, 2002; QUEIRÓZ, 2004; SILVA *et al.*, 2007) e molecular (CAPELOTO, 2003; SILVA *et al.*, 2006).

Já no topo do dendrograma (Figura 12C - Traço E, Anexo 3) observa-se o agrupamento de acessos de melancia coletados em diferentes pólos de cultivo, em Massaroca (BA) e em outros municípios vizinhos a Juazeiro (BA).

O marcador DAF foi importante para a caracterização de acessos e linhagens de melancia, com a indicação de que os mesmos apresentam ampla variabilidade genética.

5.6.2. Marcador molecular ISSR

Os resultados mostraram a potencialidade do marcador ISSR na detecção de polimorfismo entre espécies intimamente relacionadas com 11 *primers* previamente selecionados, sendo detectados 76,92% de polimorfismo entre os acessos de melancia. Os dados não concordam com Levi *et al.* (2004), que aplicando 58 *primers* ISSR, diferenciaram cultivares de melancia com 79 a 98,3% de similaridade genética. Djè *et al.* (2010) utilizaram 20 *primers* ISSR para acessar a diversidade genética de *Citrullus lanatus* (*landraces*) coletados na África, revelando 97,67% de bandas polimórficas. A diferença no percentual de polimorfismo pode ser atribuída ao germoplasma utilizado que foi coletado no centro primário de diversidade, local que concentra ampla variabilidade da espécie.

As informações demonstraram que os marcadores ISSR, são altamente polimórficos e muito promissores para estimativa da divergência genética em melancia. Outros estudos que demonstraram a eficiência do referido marcador foram desenvolvidos por Paris *et al.* (2003) em *Cucurbita pepo* (74%), Behera *et al.* (2008) analisando *Momordica charantia* e Verma *et al.* (2007) em *Benincasa hispida* (>80%). No presente estudo, os *primers* aplicados detectaram polimorfismo dentro e entre as espécies estudadas, sendo observados 47,7% de polimorfismo entre os acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* e 25,5% de polimorfismo entre os acessos de *C. colocynthis* e *C. melo*, com nível de divergência entre todos os acessos variando de 5% a 88%.

O marcador ISSR foi mais eficiente em detectar polimorfismo (77,0%) quando comparado o marcador DAF (65,3%), o que pode ser justificado pelo método de detecção,

pela natureza dos *primers* e pelas condições de reação mais estridentes. Resultados semelhantes foram obtidos quando marcadores RAPD e ISSR foram aplicados em análises de relacionamento genético em *Cucurbita pepo* (KATZIR *et al.*, 1996; PARIS *et al.*, 2003) e *C. lanatus* (LEVI *et al.*, 2004), sendo as diferenças atribuídas à alta capacidade do ISSR em detectar polimorfismo e a natureza do germoplasma avaliado.

Maior divergência genética foi encontrada entre os acessos de *Cucumis melo* (M5 coletado no campo experimental da UNEB em Juazeiro, BA) e o acesso de *C. colocynthis* (T211, planta introduzida Iran) com 88% de divergência, o que é totalmente justificado por se tratarem de espécies de gêneros distintos.

Considerando a variação entre os acessos do centro de cultivos, observa-se maior distância entre os acessos de *C. lanatus* var. *citroides* (ex. T182, coletado em Mirangaba – BA) e os acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* (ex. T249, coletado em Massaroca, Juazeiro - BA) com 80% de divergência genética. Levi *et al.* (2001a) avaliaram a diversidade genética entre acessos de melancia com marcadores RAPD, sendo observado 58,8% de divergência, agrupando os acessos em três grupos distintos com o grupo I contendo três subgrupos, o primeiro com cinco melancias cultivadas, o segundo com acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* com genes de *C. lanatus* var. *citroides* e o terceiro subgrupo com acessos de *C. lanatus* var. *lanatus*. O grupo II comporta os acessos de *C. lanatus* var. *citroides* e o grupo III foi constituído pelos acessos de *C. colocynthis*

O agrupamento dos acessos e linhagens de melancia foi mais consistente que o estabelecido com o marcador DAF na separação dos acessos do gênero *Cucumis* e *Citrullus* (Figura 15A - GI e GII, Anexo 4), diferindo principalmente na topologia da árvore, bem como com relação ao maior número de acessos em grupo isolado. Dentro do gênero *Citrullus*, observa-se que os acessos de *C. colocynthis* ficaram distribuídos em subgrupos distintos, (Figura 15A - Subg I, Anexo 4), contudo os acessos de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* ficaram todos no subgrupo II, separados em dois conjuntos (Figura 15A - Subg II A e B, Anexo 4), sendo um conjunto composto pelas linhagens originárias de acessos introduzidos (V9 a V12) e outro conjunto constituído por acessos coletados no Nordeste brasileiro (T180 a T190), diferentemente do agrupamento observado com o marcador DAF e concordando com Nimmakayala *et al.* (2009).

O Subgrupo III comporta as linhagens avançadas de melancia do programa de melhoramento, sendo subdividido em três conjuntos principais: conjunto de linhagens resistentes a vírus, a oídio e cultivares comerciais. Já o Subgrupo IV foi constituído pelos acessos do conjunto do centro de cultivo, sendo observada uma tendência ao agrupamento dos

acessos conforme local de coleta nos diferentes Estados do Nordeste brasileiro. O agrupamento de acessos de melancia coletados em diversos Estados em um mesmo conjunto pode ser justificado pela ação dos agricultores na seleção de tipos específicos, bem como retrata a importância das áreas de agricultura tradicional como fontes de germoplasma de melancia.

O padrão de agrupamento dos acessos de melancia com o marcador ISSR mostrou-se mais consistente que o fornecido pelo marcador DAF, o que pode ser atribuído à natureza do polimorfismo produzido pelo ISSR ao amplificar regiões entre microssatélites, cujas sequências são hiper-variáveis e amplamente distribuídas no genoma.

5.7. Estrutura da variabilidade genética existente no BAG de Cucurbitáceas

O resultado da análise de variância molecular revelou a estrutura genética dos acessos preservados no BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro, indicando que há diferentes processos incluindo história evolutiva, mutação, fluxo gênico e seleção influenciando na distribuição, manutenção e ampliação da variabilidade genética dos acessos de melancia em seus respectivos locais de origem. Dane *et al.* (2007) avaliaram o DNA do cloroplasto de melancia utilizando PCR-RFLP e sequenciamento de regiões não codantes, indicando eventos de inserções, deleções e principalmente transversoão (quando a mutação é de uma purina para pirimidina A-->C, A-->T... ou de pirimidina para purina C-->G, C-->A) como principais fatores na separação de duas linhagens de melancia: a cultivada e o tipo “egusi” de *C. lanatus* var. *citroides*, sugerindo uma separação antiga a partir de ancestral comum com posterior fixação. Segundo os referidos autores a melancia cultivada e os tipos silvestres divergiram de forma independente a partir de um ancestral comum, possivelmente *C. ecirrhosus*, espécie com alta capacidade adaptativa frente às condições ambientais (AKASHI *et al.*, 2002).

A análise AMOVA dos 197 acessos de melancia com o marcador DAF, a partir da divisão das amostras em cinco níveis hierárquicos, revelou variação em todos os níveis estudados. No nível 1, 77,0% da variação foram detectados dentro dos quatro conjuntos (cultivo, diversidade, melhoramento e comerciais), indicando que os mesmos foram significativamente distintos. Em cada conjunto o estabelecimento da variabilidade foi dirigido por processos particulares, como no caso do conjunto do centro de diversidade, cujos acessos foram introduzidos do centro de origem onde estão sujeitos, principalmente, à seleção natural. Neste contexto, níveis consideráveis de variação (23,3%) foram observados entre os diferentes conjuntos e corroboram com os estudos realizados por Hamrick & Godt (1990)

com relação à determinação de índices de diversidade genética em vegetais com marcadores moleculares.

Hamrick & Godt (1990) relataram que há diferenças nos índices de variação dentro e entre espécies vegetais, sendo o índice de divergência entre plantas perenes de 22% e entre plantas anuais de 36%. Uma média de 23% de divergência foi observada para variação genética entre plantas de reprodução sexuada e assexuada. Já entre plantas polinizadas por animais a variação foi de 20% e em plantas autógamas a média esperada foi de 51%.

Entre as linhagens do melhoramento (Nível 2) o índice de variação genética foi consideravelmente alto dentro de linhagens (87,40%), o que pode ser atribuído a diferenças no grau de endogamia das linhagens de melancia. De fato, as linhagens resistentes a viroses (V9 a V15) apesar de sucessivas autofecundações, ainda não apresentam boas características de frutos, cujas plantas são muito prolíficas, com frutos pequenos. Contudo, as linhagens poderão ser usadas para cruzamentos para se dar sequência ao melhoramento da melancia na região Nordeste, conduzindo as populações segregantes por um dos métodos que se mostrarem mais adequados (genealógico e suas variações, retrocruzamento ou massal, dependendo das características das linhagens que forem cruzadas).

Dessa forma, com base na divergência genética entre linhagens avançadas de melancia é possível identificar um número de combinações heteróticas, perfeitamente exequível e que poderão ser aplicadas para estudos complementares e para orientar o programa de melhoramento de melancia. Esse estudo se mostra mais prioritário quando se observa que não existe germoplasma passível de ser usado no melhoramento de melancia, pois o cultivo comercial feito no país é praticamente realizado com cultivares americanas e japonesas, altamente suscetíveis aos principais estresses bióticos que atacam a cultura nas condições brasileiras (QUEIRÓZ, 2004).

As populações de melancia no conjunto do centro de cultivo foram estruturadas em função do local de coleta, principalmente dentro e entre locais de coleta em diferentes níveis hierárquicos (níveis, 3, 4 e 5). Comparando-se os resultados observa-se menor variação sempre entre os locais de coleta [Estados (13,89%), regiões (20,40%) e municípios (10,48%)]. Dois processos evolutivos podem estar associados aos resultados: deriva genética e fluxo gênico.

Segundo Romão (1995), a melancia foi introduzida no Brasil há 300 anos com os escravos africanos, sendo mantida na agricultura tradicional, principalmente por ação antrópica. Desta forma, é possível que as populações de melancia mais recentes ainda estejam sobre efeito fundador, com menor variação genética entre populações de melancia entre os

respectivos locais de coleta. Além disso, o hábito de cultivar melancia de modo tradicional em geral ocorre em áreas pequenas, onde o processo de endogamia é favorecido e com isto a deriva genética pode levar a maior divergência entre roças (QUEIRÓZ, 1993; ROMÃO, 1995).

Dentro de uma mesma região a seleção artificial realizada pelos agricultores também coopera para maior variação. De acordo com Queiróz (2004), no cultivo de abóbora e melancia os agricultores selecionam as próprias sementes para plantios futuros, segundo critérios particulares (consumo familiar ou comércio).

Os maiores índices de variação genética foram observados dentro dos diferentes níveis hierárquicos (dentro de conjuntos -77,0%; linhagens - 87,4%; Estados - 86,4%; Estados com regiões - 73,7% e dentro de regiões - 72,2%). Com isto, os resultados corroboram com os estudos da dinâmica evolutiva da melancia no Nordeste brasileiro (ROMÃO, 1995), concordando ainda que, de fato, a ação dos agricultores contribuiu decisivamente na diferenciação de tipos de melancia, bem como na hipótese de que a riqueza do germoplasma introduzido diretamente do centro de origem, a recombinação devido ao cruzamento de tipos de melancia previamente isolados no centro de origem e processos de dispersão de sementes, associados ao intercâmbio de sementes entre agricultores, vêm promovendo a manutenção e ampliação da variabilidade genética da melancia no Nordeste brasileiro.

Romão (1995) aponta o Nordeste brasileiro como um centro secundário de diversidade para a espécie de *C. lanatus* sp., porém, seu estudo se baseou em uma amostragem reduzida, constituída de 39 acessos coletados em três regiões do Nordeste brasileiro, correspondendo a 10% do total de acessos de melancia do BAG de melancia, bem como na análise de caracteres morfológicos. No presente estudo foi analisada uma amostragem bem mais abrangente, correspondendo a 39,21% dos acessos coletados em áreas de agricultura tradicional do Nordeste brasileiro, sendo avaliados com base em dois marcadores moleculares (DAF e ISSR) e assim com mais consistência, conclui-se que de fato, a região do Nordeste brasileiro detém rica fonte de germoplasma, podendo ser considerado Centro Secundário de Diversificação para espécies de *C. lanatus*.

Esses resultados também indicam claramente que para o BAG de Germoplasma de Cucurbitáceas dominar de forma representativa a variabilidade genética da melancia no Nordeste brasileiro será necessário resgatar a variabilidade existente na agricultura tradicional nos Estados que ainda não foram contemplados com coletas sistemáticas (Paraíba, Ceará, Alagoas e Sergipe) e complementar as coletas nos Estados que tiveram pouca representatividade de acessos de melancia como Piauí, Rio Grande do Norte e Pernambuco.

6. Conclusões

- 1 – Há variabilidade genética entre os acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro, variação esta de expressiva importância econômica para o melhoramento da melancia.
- 2- Os marcadores DAF apresentam potencial para estudos de diversidade entre espécies intimamente relacionadas. Contudo, devido à natureza do polimorfismo e com maior cobertura genômica, os marcadores ISSR mostraram maior eficiência na distinção dos acessos de melancia, sendo importante considerar a base do polimorfismo na escolha do marcador para estudos de diversidade genética das espécies do gênero *Citrullus*.
- 3- O estudo da estrutura genética enfatiza a necessidade de se continuar com as coletas de acessos de melancia em áreas não amostradas e principalmente em regiões pouco amostradas, visando ao conhecimento adequado da distribuição da variabilidade genética da espécie no Nordeste brasileiro, bem como para preservação de acessos que representem esta variabilidade, tendo em vista a preservação em longo prazo.
- 4- A formação de um banco de DNA genômico de melancia favorece futuros estudos de mapeamento e seleção assistida por marcadores.
- 5- A divergência genética entre as linhagens avançadas de melancia forneceu informações relevantes para identificação de combinações importantes entre diferentes linhagens para o melhoramento da melancia cultivada, favorecendo a alta heterose.

7. Referências Bibliográficas

AKASHI, Y.; FUKUDA, N.; WAKO, T.; MASUDA, M.; KATO, K. Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melon, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes. **Euphytica**, v. 125, p. 385-396, 2002.

AMORIM, L. L. B. **Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores moleculares**. 2009. 103p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

AREIAS, R. G. B. M.; PAIVA, D. M.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Genetic similarities of rice landraces according to morphology, RAPD markers and grain protein content. **Bragantia**, v.65, n. 1, p.19-28, 2006.

ASSIS, J. G. A. **Estudos genéticos no gênero *Citrullus***. Jaboticabal: 1994. 99 p. Dissertação (Mestre em Botânica). Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

ASSIS, J.G.A.; QUEIRÓZ, M.A.; ARAÚJO, S. M. C., BANDEL, G.; MARTINS, P. S. Implications of the introgression between *Citrullus colocynthis* and *C. lanatus* traits in the taxonomy, evolutionary dynamics and breeding of watermelon. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 121, p. 15-19, 2000.

BEHERA, T.K.; SINGH, A.K.; STAUB, J. E. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter melon (*Momordica charantia* L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies. **Scientia Horticulturae**, v.115, p. 209-217, 2008.

BELAJ, A.; SATOVIC, Z.; CIPRIANI, G.; BALDONI, L.; TESTOLIN, R.; RALLO, L.; TRUJILLO I. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 107, p. 736-744, 2003.

BENKO-ISEPPON, A. M.; WINTER, P.; HUTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MUEHLBAURE, F.J.; KAHL, G. Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. **Theoretical and Applied Genetics**, v 10, p. 379-386, 2003.

BORGES, R. M. E. **Estudo da herança da resistência ao oídio *Sphaerotheca fuliginea* (Schelecht. ex fr.) Poll em melancia *Citrullus lanatus* Thunb. Mansf.** 1996. 76 p. Dissertação (Mestre em genética). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeats ISSR Markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 209-215, 2001.

BREWBAKER, J. L. **Genética na agricultura**. Editora da Universidade de São Paulo, 217 p. Cap. 1, p. 18, 1969.

CAPELOTO, A. Caracterização molecular entre e dentro de acessos de melancia através de RAPD-PCR. 2003, 70 p. Dissertação (Mestre em Agronomia), UNESP/Universidade Estadual do Paulista. Jaboticabal.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio/Technology**, v. 9, p.:553-557, 1991.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P. M. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. **Molecular, Genetics & Genomics**, v.235, p. 157-165, 1992.

CAETANO-ANOLLÉS, G. Amplifying DNA with Arbitrary Ollgonucleotide Primers Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 1054-9803/93, v.3, p.:85-94, 1993.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; SCHLARBAUM, S. E.; TRIGIANO, R.N. DNA amplification fingerprinting and marker screening for pseudo-testcross mapping of flowering dogwood (*Cornus florida* L.) **Euphytica**, v. 106, p. 209-222, 1999.

CASTELLANE, P. C.; CORTEZ, G. E. P. **A cultura da melancia**. Jaboticabal: FUNEP. 64p. 1995.

CHANG, T.T; BROWN, W. L.; BOONMAN, J. G.; SNEEP, J.; LAMBERTS, H. **Crop genetic resources**. In: SNEEP, J.; HENDRIKSEN, O. (eds.) Plant breeding perspectives. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, p. 83-103, 1979.

CLOUTIER, S.; LANDRY, B. S. Molecular markers applied to plant tissue culture. **Cell and Developmental Biology**, v. 30, p 32-39, 1994.

COSTA, C. P.; PINTO, C. A. B. P. **Melhoramento de hortaliças, v. 2**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade do Estado de São Paulo, Piracicaba, 319p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 86p, 1977.

CRUZ C. D.; REGAZZI A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. rev. Viçosa: UFV. 390p, 2001.

CULLINGS, K.W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology**, v.1, p. 233-240, 2008.

DANE, F.; LANG, P. Sequence variation at cpDNA regions of watermelon and related species: implications for the evolution of *Citrullus* haplotypes. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1922-1929, 2004.

DANE, F.; LIU, J.; ZHANG, C. Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, p. 327-336, 2007.

DANE, F.; LIU, J. Diversity and origin of cultivated and citron type watermelon (*Citrullus lanatus*). **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 54, n. 6, p. 1255–1265, 2007.

DIAS, R. C. S., QUEIRÓZ, M. A.; MENEZES, M. Fontes de resistência em melancia a *Didymella bryoniae*. **Horticultura Brasileira**, v. 14, p. 15-18, 1996.

DIAS R. C. S.; QUEIROZ, M. A.; MENEZES, M.; BORGES, R. M. E. Avaliação de resistência a *Spherotheca fuliginea* e a *Didymella bryoniae* em melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 13-19, 1999.

DJÈ, Y.; TAHI, C.G.; ZORO BI, A.I.; BAUDOIN, J. P.; BERTIN, P. Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded *Citrullus lanatus* landraces. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p.159-164, 2010.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1349-1353, 1991.

ENGELS, J. M. M.; VISSER, L. **A guide to effective management of germplasm collections** (Eds). IPGRI, Handbooks for Genebanks, n. 6, 2003.

ESQUINAS-ALCAZAR, J. T.; GULICK, P. J. **Genetic resources of Cucurbitaceae: a global report**. IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 100p, 1983.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G, SCHNEIDER, S., **Arlequin ver 3.1** An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. 2006. URL: <http://cmpg.unibe.ch/~software/Arlequin3>.

FAZZA, A. C. **Caracterização e ocorrência de agentes causais de oídio em cucurbitáceas no Brasil e reação de germoplasma de meloeiro**. 2006, 86p. Dissertação (Mestre em Agronomia). ESALQ/USP. Piracicaba.

FERREIRA, M. A. J. F. **Sistema reprodutivo e potencial para o melhoramento de uma população de melancia** [*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai]. 2000, 101p. Tese (Doutora em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

FERREIRA, M. A. J. DA F.; VENCOSKY R.; VIEIRA, M. L. C.; QUEIRÓZ, M. A. Outcrossing rate and implications on the improvement of a segregating population of watermelon. **Acta Horticulturae**, v. 510, p. 47-54, 2000.

FERREIRA M. A. J. F.; BRAZ, L. T.; QUEIRÓZ, M. A.; VENCOSKY, R. Capacidade de combinação em sete populações de melancia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 963-970, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 2 ed., Brasília, DF, Embrapa - CENARGEN, 220p., 1998.

FERRIOL M. PICÓ, B. NUEZ, F. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. **Crop Science**, v. 44, p.653-664, 2004.

FURSA, T.B. K. Evolutzii roda *Citrullus*. Schrad. [On the evolution of the genus *Citrullus* Schrad.] **Botanicheski Zhurnal**, v. 57, p. 1365-1372, 1972.

GARCIA-MAS, J.; OLIVER, M.; GÓMEZ-PANIAGUA, H.; DE VICENTE, M. C. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.860-864, 2000.

GIACOMETTI, D. C. Descritores para caracterização e avaliação de germoplasma. In: ARAÚJO, S. M.; OSUNA, J. A. ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, SP: FCAV, p. 129-147, 1988.

GOEDERT, C. O. Germoplasma: o que é isso? **Seed News**, v. 6, p.22-27, 2002.

GOEDERT, C. O. **Históricos e avanços em recursos genéticos no Brasil**. In: NASS, L. L. (Ed.) Recursos Genéticos Vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Cap. 1. p.24-60, 2007.

GUNER, N.; STRANGE, E. B.; WEHNER, T. C.; PESIC-VANESBROECKB, Z. Methods for screening watermelon for resistance to papaya ringspot virus type-W. **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 297-307. 2002.

GUNER, N.; WEHNER, T. The genes of watermelon. **HortScience**, v. 39, p. 1175-1182, 2004.

GUSMINI, G., SONG, R. H. AND WEHNER, T. C. New sources of resistance to gummy stem light in watermelon. **Crop Science**, v. 45, p. 582-588, 2005.

GUSMINI, G.; WEHNER, T. C. Qualitative Inheritance of Rind Pattern and Flesh Color in Watermelon. **Journal of Heredity**, v. 97, p.177-185, 2006.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; RAMOS, N. F.; RABELO FILHO, F. A. C.; GONÇALVES, M. F. B.; NECHET, K. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; LIMA, J. A. A. Identificação sorológica de espécies de potyvirus em melancia, no estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 687-689, 2004.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. **Allozyme diversity in plant species**. In: BROWN, A. H. D. M.; CLEGG, T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. [eds.], Plant population genetics, breeding and genetic resources, 43-63. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 1990.

HASHIZUME, T., SHIMAMOTO, I. AND HIRAI, M. Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM & NAKAI] using RAPD, RFLP and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 106, p. 779-785, 2003.

HAWKES, J. G. Germplasm collection, preservation, and use. In: K. J. FREY (ed.). **Plant breeding II**. Kalyani Publishers, New Delhi, p. 57-82, 1982.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, v. 31, p.181-109, 1993.

HUH, Y.C.; SOLMAZ, I.; SARI, N. **Morphological characterization of Korean and Turkish watermelon germplasm**. Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat, M., ed), INRA, Avignon (France), p. 21-24, 2008.

IBGE. *Produção Agrícola*. Disponível: site Sistema IBGE de recuperação Automática – SIDRA (2008). Disponível no site: <[http:// www.sidra.ibge.gov.br/cginbin](http://www.sidra.ibge.gov.br/cginbin)>. Consultado em: 20/08/2010.

JARRET, R. L.; NEWMAN, M. Phylogenetic relationships among species of *Citrullus* and the placement of *C. rehmii* De Winter as determined by Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence heterogeneity. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 215-222, 2000.

JEFFREY, C. Further notes on Cucurbitaceae III: Some African taxa. **Kew Bull**, v. 30, p. 475-493, 1975.

JEFFREY, C. **Systematic of the Cucurbitaceae: an overview**. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA. 1990.

JOBST, J.; KING, K.; HEMLEBEN, V. Molecular Evolution of the Internal Transcribed Spacers (ITS1 and ITS2) and Phylogenetic Relationships among Species of the Family Cucurbitaceae **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 9, p. 204-219, 1998.

JOUBEUR, T.; KING, J. J.; NOLIN, S. J.; THOMAS, C. E.; DEAN, R. A. The fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features. **The Plant Journal**, 39, p. 283-297, 2004.

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M. O.; SALA, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSSNEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VASQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

KATZIR, N.; DANIN-POLEG, T.; TZURI, G.; KARCHI, Z. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 93, p. 1282-1292, 1996.

KARP A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies**. IPGRI Technical Bulletin. N.º 2. International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italy. 1997.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Review: A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana International Journal of Biodiversity**, v. 3, p.87-92, 2002.

LEE, S. J.; SHIN, J. S.; PARK, K. W.; HONG, Y. P. Detection of genetics diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 719-725, 1996.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; WEHNER, T. C.; ZHANG, X. Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. **HortScience**, v.36, p. 1096-1101, 2001a.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; KEINATH, A. P.; WEHNER, T. C. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, p.559-566, 2001b.

LEVI, A., C. THOMAS, NEWMAN, M.; REDDY, O. U. K.; ZHANG, X. ISSR and AFLP markers sufficiently differentiated among American watermelon cultivars with limited genetic diversity. **Journal American Society Hortscience**, v. 129, p. 553-558, 2004.

LEVI, A; THOMAS, C. E. Polymorphisms among chloroplast and mitochondrial genomes of *Citrullus* species and subspecies. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, p. 609-617, 2005.

LIMA NETO, I. S.; QUEIRÓZ, M. A.; SILVEIRA, L. M.; SILVA, M. L. Avaliação preliminar e multiplicação dos acessos de melancia coletados em Massaroca, Juazeiro - BA. In: **Anais...CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA**, 45., 2005, Fortaleza- Ceará. v. 23. 2005.

LIMA NETO, I. S.; QUEIRÓZ, M. A; SILVEIRA, L. M; SILVA, M. L. Reação de acessos de melancia às queimas foliares provocadas por oídio e alternária. In: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007, São Lourenço - MG. **Anais...CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS**, 4.,p. 56. 2007.

LIMA NETO, I. S. **Interação genótipo x ambiente na reação de progênes de melancia à alternariose no Submédio São Francisco**. 2009, 73p. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN.

LIU, J. **Phylogeny and biogeography of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] based on chloroplast, nuclear sequence and AFLP molecular marker data**. . 2005. 107p. (Master of Science), B.S., Yangzhou University.

MADEIRA, N. R; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; GIORDANO, L. B. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. **Horticultura Brasileira** [online], v. 26, p. 428-432, 2008.

MALUF, W. R.; PEREIRA, J. J.; FIGUEIRA, A. R. Inheritance to the papaya ring spot virus – watermelon strain for two different accessions of winter squash *Cucurbita maxima* Duch. **Euphytica**, v. 94, p. 163-168, 1997.

MARINHO, V. L. A.; MENDES, M. A. S.; TENENTE, R. C. V.; BATISTA, M. F.; OLIVEIRA, M. R. V; MARQUES, A. S. A URBEN, A. F.; FONSECA, J. N. L. GONZAGA, V. **Procedimentos e métodos utilizados no intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Documento/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,). 40p, 2003.

MARQUES, A. S.A.; MARINHO, V. L. A. **Movimentação de germoplasma vegetal no Brasil – Intercâmbio e Quarentena.** In: NASS, L. L. (Ed.) Recursos Genéticos Vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Cap. 4. p.144-168, 2007.

MARSHALL, D. R. **Limitations to the use of germplasm collections.** In: BROWN, A. D. H.; MARSHALL, D. R.; FRANKEL, O.; WILLIAMS, J. T. (Ed.) The use of plant genetic resources. Cambridge University Press, 382 p. 1989.

MAYNARD, D. N. **An introduction to the watermelon.** ASHS Press, Alexandria, VA, USA. 2001.

MEUSE, A. D. The Cucurbitaceae of Southern Africa. **Bothalia**, v. 8, p. 1-11, 1962.

MIMURA, M.; YASUDA, K.; YAMAGUCHI, H. RAPD variation in wild, weedy and cultivated azuki beans in Asia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p.603-610, 2000.

MOHR, H. C. **Watermelon breeding.** In: BASSET, M. I. (Ed). Breeding vegetable crops. Avi Publishing Company, Westport, CN, USA, p. 37-66, 1986.

MORALES, E. A. V.; VALLOIS, E. A. V. **Princípios para conservação e uso de recursos genéticos** In: *Consevación de germoplasma vegetal*. Ed. Juan P. Pulgnau - Montevideo: IICA-Procisur. Online, p.13-34, 1996.

NAVOT, N.; ZAMIR, D. Linkage relationships of protein coding genes in watermelon. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 72, p. 274-278, 1986.

NAVOT, N.; ZAMIR, D. Isozyme and seed protein phylogeny of the genus *Citrullus* (Cucurbitaceae). **Plant Systematic and Evolution**, v. 156, p. 61-68, 1987.

NAVOT, N.; SARFATTIO, M.; ZAMIR, D. Linkage relationships of genes affecting bitterness and flesh color in watermelon. **Journal Heredity**, v. 81, p. 162-165, 1990.

NIMMAKAYALA, P.; TOMASO, Y. R.; JEONG, J.; PONNIAH, S. K.; KARUNATHILAKE, A.; LEVI, A. PERUMAL, R.; REDDY, U. K. Genetic reticulation and interrelationships among *Citrullus* species as revealed by joint analysis of shared AFLPs and species-specific SSR alleles. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, p.1-10, 2009.

OLIVEIRA, V. B.; QUEIROZ, M. A.; LIMA, J. A. A. Fontes de resistência em melancia aos principais potyvirus isolados de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 589-592, 2002.

PACHECO, D. A.; REZENDE, J. A. M.; PIEDADE, S. M. S. Biomass, virus concentration, and symptomatology of cucurbits infected by mild and severe strains of *Papaya ringspot virus*. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 691-698. 2003.

PARIS, H.S.; YONASH, N.; PORTNOY, V. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 106, p. 971-978, 2003.

PARIS, H. S.; NELSON, R. B. The genes of pumpkin and squash. **HortScience**, v. 40, p. 1620-1630, 2005.

PITRAT, M. Gene list for melon. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v. 25, p. 1-18, 2001.

QUEIRÓZ, M. A. Potencial do Germoplasma de Cucurbitáceas no Nordeste Brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v.11, p. 7-9, 1993.

QUEIRÓZ, M. A.; RAMOS, S. R. R.; MOURA, M. C. C. L.; COSTA, M. S. V.; SILVA, M. A. S. Situação atual e prioridades do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de cucurbitáceas do Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 25-29, 1999.

QUEIRÓZ, M. A. Germplasm of Cucurbitaceae in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 377-383, 2004.

QUEIRÓZ, M. A.; LIMA NETO, I. S.; OLIVEIRA, R. S.; WENZEL, O.; SANTOS, M. A. C.; CARVALHO, N. S. C.; NUNES, G. K. O.; SANTOS, A. S. ; SILVEIRA, L. M.; SILVA, M. L. Avaliação de genótipos de melancia para estudo de herança de características de fruto. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Vitória-ES. **Anais...** Congresso Brasileiro de Fruticultura, v. 20, 2008.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A.; PEREIRA, T. N. S. Recursos genéticos vegetais: Manejo e uso. **Magistra**, v. 19, p. 265-273, 2007.

RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. Características produtivas da melancia em diferentes espaçamentos de plantio. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 695-698, 2003.

RITSCHER, P. S.; LOPES, C. A.; HUMÁN, Z.; FERREIA, M. E.; FRANÇA, F. H. MENEZES, J. E. TEIXEIRA, D. M.C.; TORRES, A. C. CHARCHAR, J. M. THOMAZELLI, L. **Organização do Banco Ativo de Germoplasma de batata-doce: situação atual e perspectivas**. 1999. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro (*online*). Versão 1.0. Embrapa Semi-Árido, Petrolina. Home Page: <http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livrorg/batatadoce.pdf>. 1999.

RITSCHER, P. S.; HUAMAN, Z. Variabilidade morfológica da coleção de germoplasma de batata-doce da Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online], v. 37, p. 485-492, 2002.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. **Exeter software Setauket**, v.32, p. 97-127. 1998

ROMÃO, R. L. **Dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai em três regiões do Nordeste brasileiro**. 1995. 75p. Dissertação (Mestre em Botânica). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo.

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

ROMÃO, R. L.; ASSIS, J. G. A.; QUEIROZ, M. A. **Melancia: História africana de dar água na boca**. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. (ed.) Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.553-573, 2008.

SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA), Lisboa - Portugal e Instituto Internacional para os recursos fitossanitários (IPIGRI-SSA), Nairóbi, Quênia, 2001.

SANTOS, F. R.; GUIMARÃES, P. E. M.; REDONDO, R. A. F. Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. **Lundiana International Journal of Biodiversity**, v.3, p. 93-98, 2002.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; LEÃO, F. F.; CESAR, M.; FERNANDES, L. E. Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 230-234, 2005.

SANTOS, G. R.; CAFE-FILHO, A. C.; REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatologia brasileira**. [online], v. 31, n. 5, p. 476-482, 2006.

SILVA, M. L. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai]**. 2004, 70p. Dissertação (Mestre em Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, M. L. S.; QUEIROZ, M. A. de; FERREIRA, M. A. J. F.; BUSO, G. S. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 405-409, 2006.

SILVA, M. L., QUEIRÓZ, M. A., FERREIRA, M. A. J. F., ARAGÃO, C. A. Variabilidade genética de acessos de melancia coletados em três regiões do estado da Bahia. **Caatinga**, v. 20, p. 93-100, 2007.

SILVEIRA, L. M.; QUEIRÓZ, M. A.; LIMA, J. A. A.; NEGREIROS, M. Z.; RAMOS, N. F.; NASCIMENTO, A. K .Q. Seleção de acessos e progênes de *Citrullus* spp. para resistência a três potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 394-399, 2005.

SILVEIRA, L. M.; QUEIRÓZ, M. A.; LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; LIMA NETO, I. S. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n. 2, p. 123-126, 2009.

SLOTEN, D. H. V. **The role of curators, breeders and other uses of germplasm** In: IBPGR. Characterization and evaluation of crop genetic resources. Rome, p.3-8. 1987.

SOLTANI, F.; AKASHI, Y.; KASHI, A.; ZAMAN, Z.; MOSTOFI, Y.; KATO, K. Characterization of Iranian melon landraces of *Cucumis melo* L. Groups Flexuosus and Dudaim by analysis of morphological characters and random amplified polymorphic DNA. **Breeding Science**, v. 60, p. 34-45, 2010.

SOUZA, F. F.; QUEIROZ, M. A.; DIAS, R. C. S. Capacidade de combinação entre linhas tetraplóides e diplóides de melancia. **Horticultura Brasileira** [Online], v. 20, p. 654-658, 2002.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.22, p. 516-520. 2004.

SOUZA, F. F.; GAMA, F. C.; QUEIRÓZ, M. A. Análise da capacidade de combinação em cruzamentos dialélicos de três genótipos de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.789-793, 2004.

STADNIK, M. J.; KOBORI, R. F.; BETTIOL, W. **Oídios de cucurbitáceas**. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. (Eds.). Oídios. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, p.217-254, 2001.

TAHIR, I. M.; YOUSIF, M. T. Indigenous melons (*Cucumis melo* L.) in Sudan: a review of their genetic resources and prospects for use as sources of disease and insect resistance. **Plant Genetic Resources Newsletter - Bioversity**, v. 138, p. 36-42, 2006.

TEIXEIRA, A. P. M.; BARRETO, F. A. S.; CAMARGO; L. E. A. An AFLP marker linked to the Pm-1 gene that confers resistance to *Podospheera xanthii* race 1. In *Cucumis melo*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.547-550. 2008.

VALLS, J. F. M. **Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal**. In: ARAÚJO S. M. C.; OSUNA, J. A. (eds.) I Encontro sobre recursos genéticos. FCAV, Jaboticabal, p. 106-128. 1988.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos Genéticos Vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Cap. 8. p. 282-305. 2007.

VALOIS, E. A. V. **Conservação de gremoplasma ex situ**. In: *Consevación de germoplasma vegetal*. Ed. Juan P. Pulgnau – Montevideo: II CA-Procisur. Online, p.07-12. 1996.

VERMA, V.K.; BEHERA, T.K.; MUNSHI, A.D.; PARIDA, S.K.; MOHAPATRA, T. Genetic diversity of ash gourd [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] inbred lines based on RAPD and ISSR markers and their hybrid performance. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 231-237, 2007.

VENCOVSKY, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa, n. 1, 15 p, 1986.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 496 p, 1992.

VIDAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; NUNES, A. L. Otimização do número de *primers* empregados em RAPD para detectar variabilidade genética entre acessos de picão-preto **Scientia Agrária**, v.6, p.71-77, 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

YUKI, V. A.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W.; BARROSO, P. A. V.; KUNIYUKI, H.; GROPPPO, G. A.; PAVAN, M. A. Occurrence, distribution and relative incidence of viruse infecting cucurbits in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 84, p. 516-520. 2000.

XU, Y.; KANG D.; SHI, Z.; SHEN, H.; WEHNER, T. Inheritance of Resistance to Zucchini Yellow Mosaic Virus and Watermelon Mosaic Virus in Watermelon. **Journal of Heredity**, v. 95, p.498-502, 2004.

ZHEN, Q. F.; JIN, H. F. The study of genetics on the main commercial characteristics in seed-watermelon. **Acta Horticulture**, v. 402, p. 37-40, 1995.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ISSR) – anchored polymerize chain reaction amplification. **Genome**, v. 20, p. 176-183, 1994.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. 761 p. 2005.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B.; BIANCHETTI, L. B. Princípios sobre coleta de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.) **Recursos Genéticos Vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, IPGRI, Rome, Italy. Cap. 6, p. 192-229, 2007.

WASYLIKOWA, K.; VAN DER VEEN, M. An archaeobotanical contribution to the history of watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai (syn. *C. vulgaris* Schrad.) **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 13, p. 213-217, 2004.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. **DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications**. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Cold Spring Harbour, New York, USA, 444 pp, 2005.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 7213-7218, 1990.

WHITAKER, T. W.; BEMIS, W.B. Cucurbits In: Simmonds, N. W. (Ed.) **Evolution of Crops Plants**. Longman, London. P.:64-69, 1975.

WHITAKER, T. W.; DAVIS, G. N. **Cucurbits botany, cultivation and utilization**. Interscience Publishers, New York, 1962.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. E., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., AND TINGEY, S. C. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

ANEXOS

Anexo 1. Tabela 2. Acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas selecionados para caracterização molecular, com indicação do conjunto, espécies e subespécies, tratamento (Trat), locais de coleta (Estados e municípios) e código do BAG

Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG	Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG
BA/ Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T1	Juazeiro	181 - Oliveira	MA/ Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T84	Pastos Bons	91-110
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T2	Juazeiro	179 - Oliveira		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T85	Pastos Bons	91-111
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T3	Juazeiro	195 - Oliveira		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T86	Pastos Bons	91-109
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T4	Juazeiro	193 - Oliveira		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T87	Paraibano	(M3)91-073
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T5	Juazeiro	185 - Oliveira		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T88	Paraibano	(M4) 91-080
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T7	Juazeiro	136 - Papagaio		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T89	Nova Iorque	91-122
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T8	Juazeiro	165 - Papagaio		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T90	Nova Iorque	91-123
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T9	Juazeiro	170 - Papagaio		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T93	São Luís	Cod.02
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T10	Juazeiro	153 - Papagaio		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T94	São Luís	Cod.03
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T11	Juazeiro	46 - Canoa		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T95	São Luís	Cód. 4
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T12	Juazeiro	49 - Canoa		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T96	São Luís	Cod.06
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T13	Juazeiro	58 - Canoa		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T98	São Luís	Cod.08
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T15	Juazeiro	64 - Lagoinha		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T100	São Luís	Cod.24
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T16	Juazeiro	70 - Curral Novo		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T101	São Luís	Cod. 25
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T17	Juazeiro	17 - Curral Novo		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T102	São Luís	Cod.27
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T18	Juazeiro	10 - Lagoinha		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T103	São Luís	Cod. 29
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T19	Juazeiro	29 - Lagoinha		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T104	São Luís	Cod. 30
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T20	Juazeiro	38 - Lagoinha		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T105	São Luís	Cod. 31
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T21	Ibipeba	91-0012		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T106	Codó	5 CD
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T22	São Gabriel	(B5) 91-001		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T107	Codó	6CD
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T23	Pres. Dutra	(B10) 91-002		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T108	Codó	35 CD
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T24	Pres. Dutra	91-003		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T109	Codó	36 CD
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T25	Ibititá	(B15) 91-008		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T110	Codó	37 CD
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T26	Ibititá	91-069		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T111	Codó	39 CD
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T27	Pres. Dutra	91-005		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T112	Codó	45CD
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T28	Barro Alto	91-025		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T115	Codó	42 CD

Continua nas próximas páginas

Tabela 2. Continuação...

Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG	Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG
BA/ Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T29	Canarana	92-028 (B13)	MA/ Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T116	Turiaçu	09 Turi
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T30	América Dourada	91-064		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T117	Turiaçu	08 Turi -31
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T31	Jacobina	92-0300		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T119	Turiaçu	01 Turi
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T32	Jacobina	92-0315		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T120	Turiaçu	11 Turi
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T33	Jacobina	92-0195		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T127	S. L. Gonzaga	10 LSG
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T34	Jacobina	92-0190		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T128	S. L. Gonzaga	4A
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T35	Jacobina	92-0320		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T129	S. L. Gonzaga	3A
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T36	Jacobina	92-218		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T132	S. L. Gonzaga	4B
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T37	Jacobina	92-0212		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T226	F. Nogueira -	Melancia (7)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T38	Jacobina	92-161		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T227	São Luís	Cod. 23
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T39	Jacobina	92-0332		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T228	S.L. Gonzaga	01/10/95
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T40	Jacobina	92-0307		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T232	Frechal Mirim	16/02/97
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T41	Jacobina	92-0318		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T235	São Luís	Ac 19
			Jacobina		PI/ Centro de cultivo				
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T42		92-0323		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T134	Altos	Pi-1 (92-377)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T43	Jacobina	92-0299		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T135	Piauí	Pi-2 (92-378)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T44	Jacobina	92-0314		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T136	União	Pi-3 (92-379)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T45	Jacobina	92-0345		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T137	União	Pi-4 (92-380)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T46	Jacobina	92-0216		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T138	Regeneração	Pi-5 (92-381)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T47	Jacobina	92-0298		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T139	Agricolândia	Pi-6 (92-382)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T48	Jacobina	92-0346		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T140	Monsenhor Gil	Pi-8 (92-384)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T49	Mirangaba	92-0271		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T141	José de Freitas	92-389
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T50a	Mirangaba	92-0274A		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T142	José de Freitas	92-390
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T50b	Mirangaba	92-0274b		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T143	José de Freitas	92-391
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T51	Mirangaba	92-0267					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T52	Mirangaba	92-0172					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T53	Mirangaba	92-0167					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T54	Mirangaba	92-0292					

Continua nas próximas páginas.

Tabela 2. Continuação...

Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG	Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG
BA/ Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T55	Mirangaba – BA	92-0280	RN/Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T144	Mossoró	Mo1
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T56a	Mirangaba – BA	92-0148A		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T145	Mossoró	Mo3
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T56b	Mirangaba – BA	92-0148B		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T146	Mossoró	M5
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T57	Mirangaba – BA	92-0286		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T147	Mossoró	Mo6
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T58a	Mirangaba – BA	92-0229A		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T148	Mossoró	Mo7
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T58b	Mirangaba – BA	92-0229B		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T149	Mossoró	Mo10
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T60	Ourolândia – BA	92-0240		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T150	Mossoró	Mo11
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T61	Ourolândia – BA	92-0243		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T151	Mossoró	Mo14
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T62	Ourolândia – BA	92-0236		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T152	Mossoró	Mo16
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T63	Ourolândia – BA	92-0244		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T153	Mossoró	Mo19
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T64	Itaguaçu – BA	(B14) 91-044	PE/Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T161	Petrolina	87-019 (P14)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T65	Itaguaçu – BA	(B9) 91-0043		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T162	Petrolina	87-017 (P11)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T66	Itaguaçu – BA	91-048		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T164	Petrolina	87-015 (P11)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T67	Itaguaçu – BA	91-049		<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	190	Ouricuri	Ouricuri 9
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T68a	Itaguaçu – BA	91-050A		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T198	L dos Cavalos	87-018
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T68b	Itaguaçu – BA	91-050B		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T221	L dos Cavalos	81-041(P5)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T69	Itaguaçu – BA	91-051		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T222	Petrolina	85-033 (P7)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T70	Itaguaçu – BA	91-052		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T224	Petrolina	85-040
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T74	Vitória Conquista	Tra 5		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T229	Barreiros	85-030 (P2)
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T75	Vitória Conquista	Tra 8	África/ Diversidade	<i>C. colocynthis</i>	T4339	Turkmeskistão	Wir - 4339
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T76	Vitória Conquista	Tra 11		<i>C. colocynthis</i>	T208	Ethiopia	PI195927-01
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T77	Vitória Conquista	Tra 14		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T206	Zimbabwe	PI482335-01
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T78	Vitória Conquista	Tra 18		<i>C. colocynthis</i>	T210	Maroco	PI388770-01
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T79	Vitória Conquista	Tra 22		<i>C. colocynthis</i>	T211	Irã	PI386019-01
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T80	Vitória Conquista	Tra 27		<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T213	Africa	PI532659-01
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T81	Vitória Conquista	Tra 41					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T82	Vitória Conquista	Tra 46					

Continua nas próximas páginas.

Tabela 2. Continuação...

Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG	Estado/ Conjunto	Espécie/ subespécie	Trat.	Localidade	Código BAG
BA/ Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T83	Vitória Conquista	Tra 35	BA/ Centro de cultivo	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T254	Massaroca	192
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T154	UNEB	cia/04-0026		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T255	Massaroca	200
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T157	UNEB	cia/04-0025		<i>Cucumis melo</i>	M1	Juazeiro	
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T158	UNEB	cia/04-0020		<i>Cucumis melo</i>	M5	Juazeiro	
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T180	Mirangaba	92-239	BA/Comerciais	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	174	Juazeiro	Riviera
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T181	Mirangaba	92-225		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	175	Juazeiro	Pérola
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T182	Mirangaba	92-226		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	177	Juazeiro	Smile
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T183	Mirangaba	92-227		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	178	Juazeiro	Sugar Baby
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T184	Mirangaba	92-228		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	179	Juazeiro	C. Gray
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T185	Mirangaba	92-232		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	192	Juazeiro	New H. Midget
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T187	Mirangaba	92-405		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	193	Juazeiro	Peacock
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T195	Mirangaba	92-224		<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	194	Juazeiro	Mickelee
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T200	Juazeiro	A47_Nº4					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T201	Juazeiro	A47_nº6					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T203	Juazeiro	A47_					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T204	Juazeiro	A47_F1					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T231	UNEB	cia/04-0021					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T241	Massaroca	28					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T243	Caldeirão do Tibério	73					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T244	Caldeirão do Tibério	75					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T245	Caldeirão do Tibério	76					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T246	Caldeirão do Tibério	94					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T247	Caldeirão do Tibério	95					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T248	Massaroca	172					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T249	Massaroca	175					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T250	Massaroca	177					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	T251	Massaroca	178					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T252	Massaroca	189					
	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	T253	Massaroca	191					

Anexo 2. Tabela 3. Linhagens avançadas de melancia selecionadas para caracterização molecular com os marcadores DAF e ISSR

Linhagens	Identificação	Linhagens	Identificação	Linhagens	Identificação
01-C01	Pérola	31-C34	Sugar Baby	61-V29	87-029
02-C02	Pérola	32-C35	Crimson Sweet	62-V30	87-029
03-C03	Pérola	33-C36	Crimson Sweet	63-V32	PI 195927**
04-C04	Pérola	34-C37	Crimson Sweet	64-V33	PI 195927**
05-C05	Pérola	35-V01	87-019	65-V34	PI 195927**
06-C06	Pérola	36-V02	87-019	66-V35	PI 195927**
07-C07	Pérola	37-V03	87-019	67-O01	11, pl 4
08-C08	Pérola	38-V04	87-019	68-O02	11, pl 8
09-C09	Pérola	39-V05	91-043 ³	69-O03	11, pl 5
10-C10	Pérola	40-V06	91-043	70-O04	17, pl 17
11-C12	Pérola	41-V07	91-043	71-O05	17, pl 19
12-C13	Charleston Gray	42-V08	91-043	72-O06	17, pl 2
13-C14	Charleston Gray	43-V09	PI 244010*	73-O07	17, pl 20
14-C16	Riviera	44-V10	PI 244010*	74-O08	21, pl 19
15-C17	Riviera	45-V11	PI 244010*	75-O10	21, pl 18
16-C18	Smile	46-V12	PI 244010*	76-O11	15, pl 11
17-C19	Smile	47-V13	PI 244010*	77-O12	15, pl 9
18-C20	Smile	48-V14	PI 244010*	78-O13	15, pl 13
19-C22	Smile	49-V15	PI 244010*	79-O14	4, pl 12
20-C23	Smile	50-V16	87-019	80-O15	4, pl 14
21-C24	Smile	51-V17	87-019	81-O16	4, pl 1
22-C25	Sugar Baby	52-V18	87-019	82-O17	6, pl 15
23-C26	Sugar Baby	53-V19	87-019	83-O18	6, pl 1
24-C27	Sugar Baby	54-V20	87-019	84-O19	13, pl 4
25-C28	Sugar Baby	55-V21	87-029	85-O20	23, pl 16
26-C29	Sugar Baby	56-V22	87-029	86-O21	23, pl 18
27-C30	Sugar Baby	57-V25	87-029	87-O22	23, pl 16
28-C31	Sugar Baby	58-V26	87-029	88-O23	23, pl 12
29-C32	Sugar Baby	59-V27	87-029	89-O24	9, pl 13
30-C33	Sugar Baby	60-V28	87-029	90-O25	9, pl 16

V9 a V15* - *C. lanatus* var. *citroides*; V32 a V35** - *Citrullus colocynthis*; C – Comerciais; V - resistentes a vírus; O – resistentes ao oídio; pl – planta.

ANEXO 3

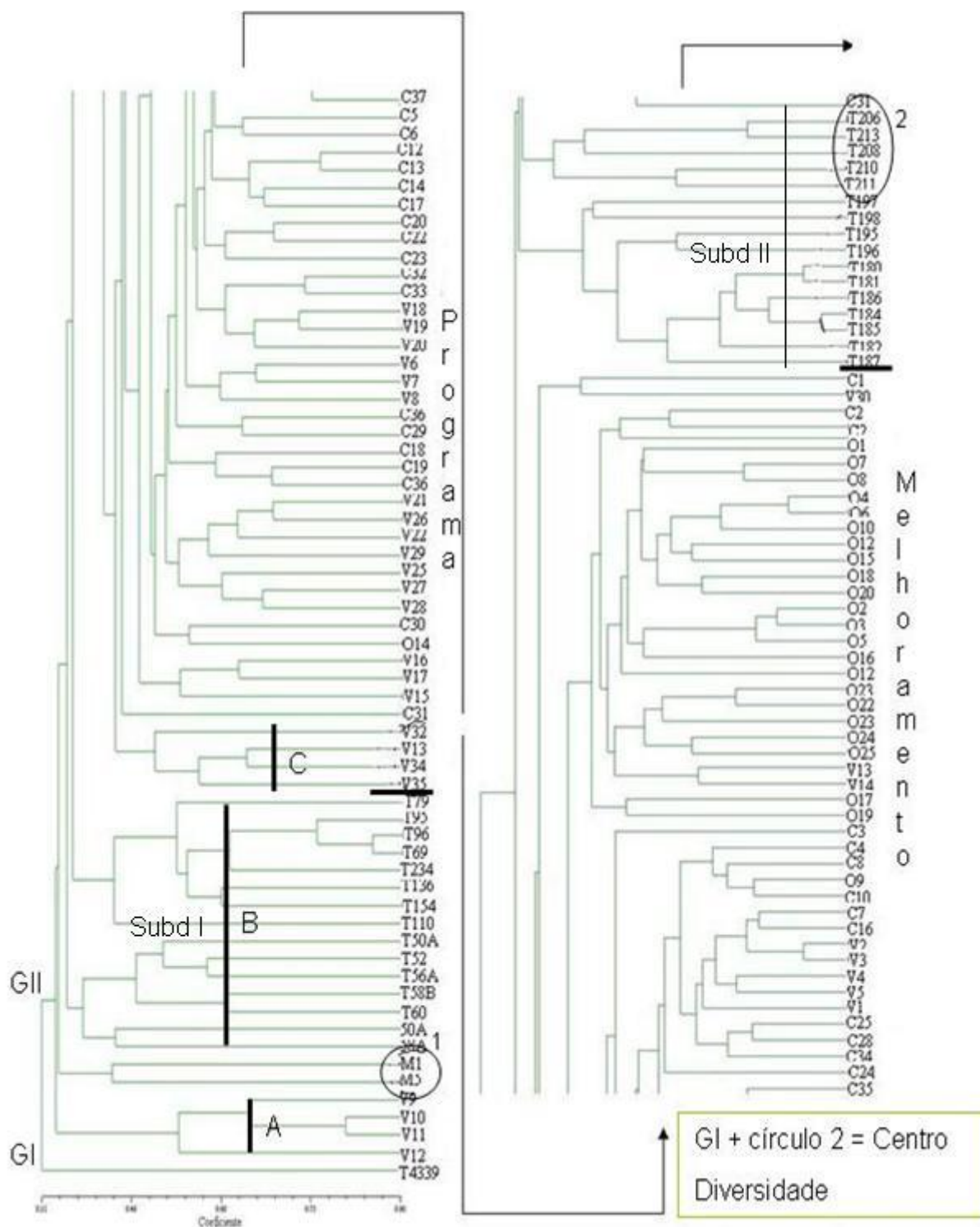


Figura 12A. Dendrograma de 291 acessos de melancia e dois de melão obtido com o marcador DAF (continuação nas próximas páginas).

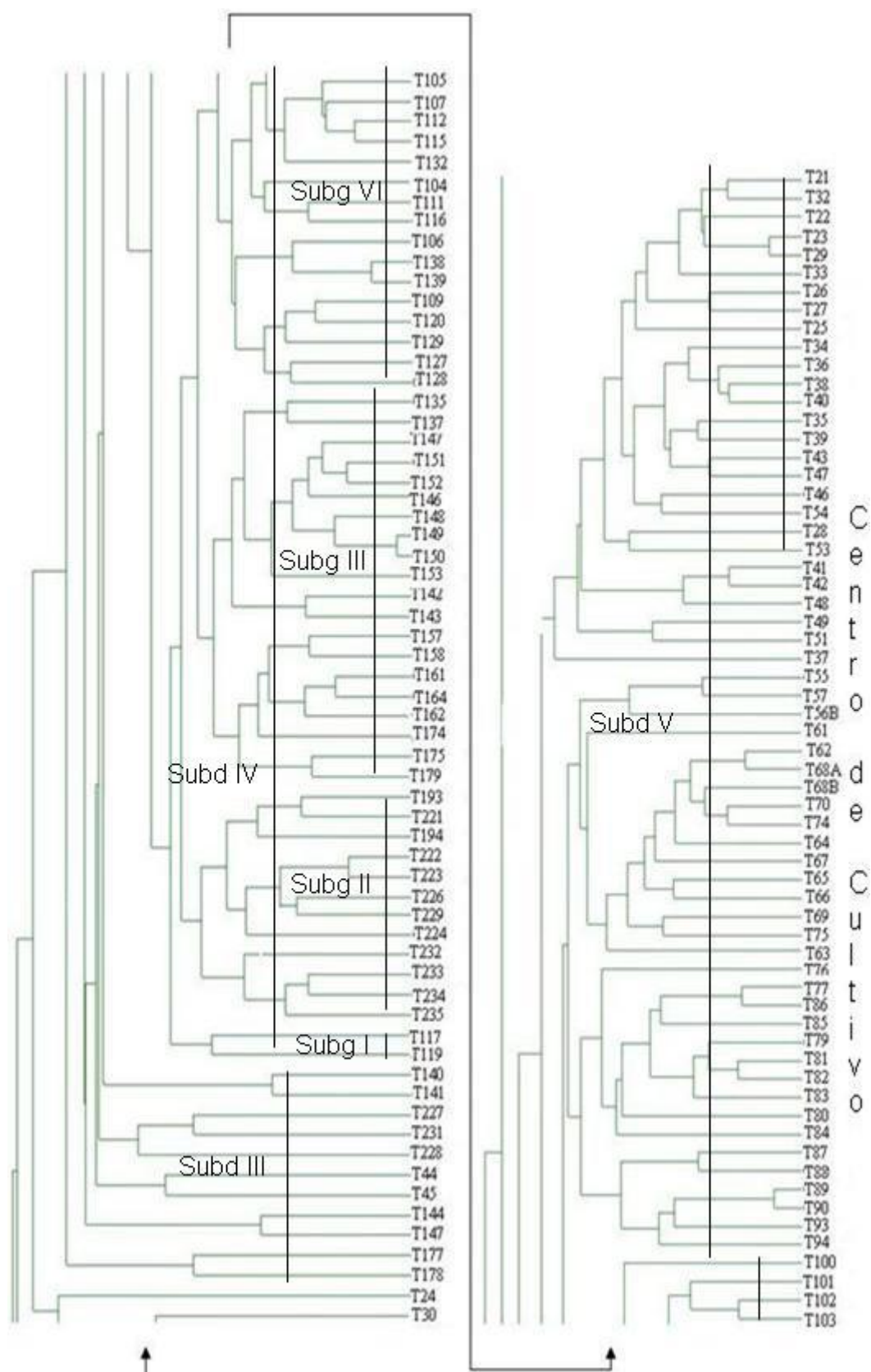


Figura 12 B. Continuação do dendrograma de 291 acessos de melancia e dois de melão obtido por meio do marcador DAF (continua na próxima página).

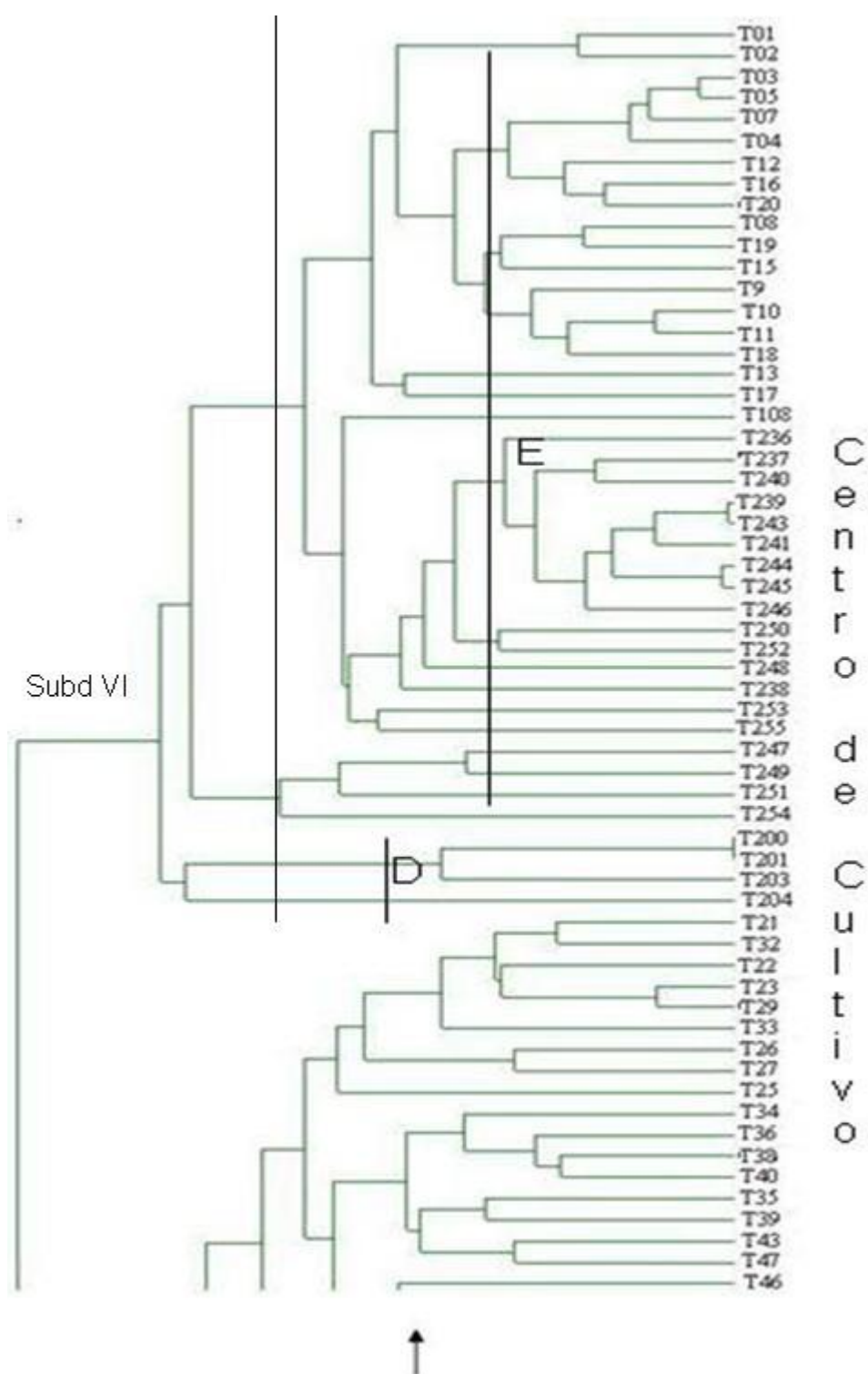


Figura 12 C. Final do dendrograma de 291 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitáceas obtido com o marcador DAF.

Anexo 4

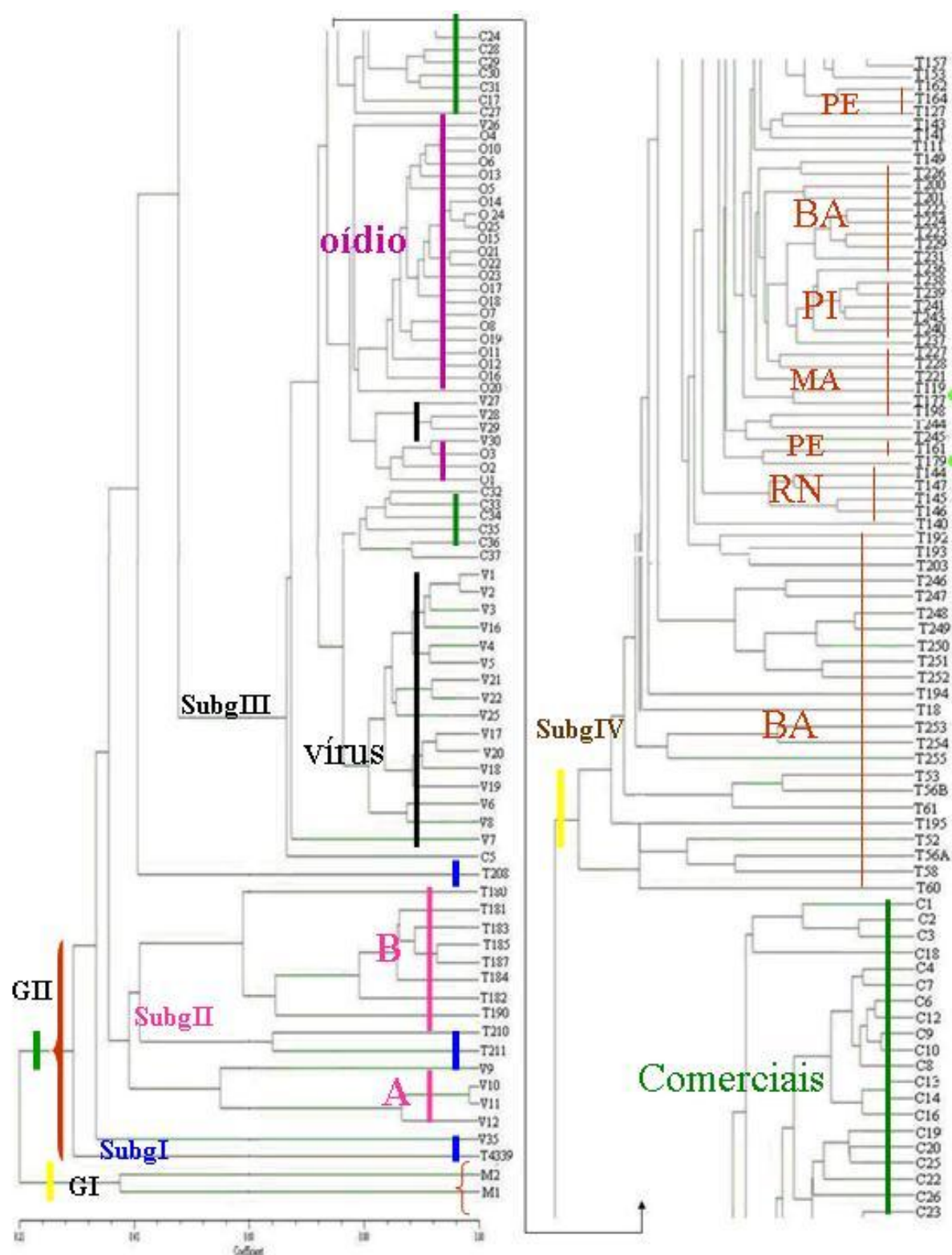


Figura 15A. Primeira parte do dendrograma ISSR de 281 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitácea, (ponto verde corresponde as cultivares comerciais).
(continua na próxima página).

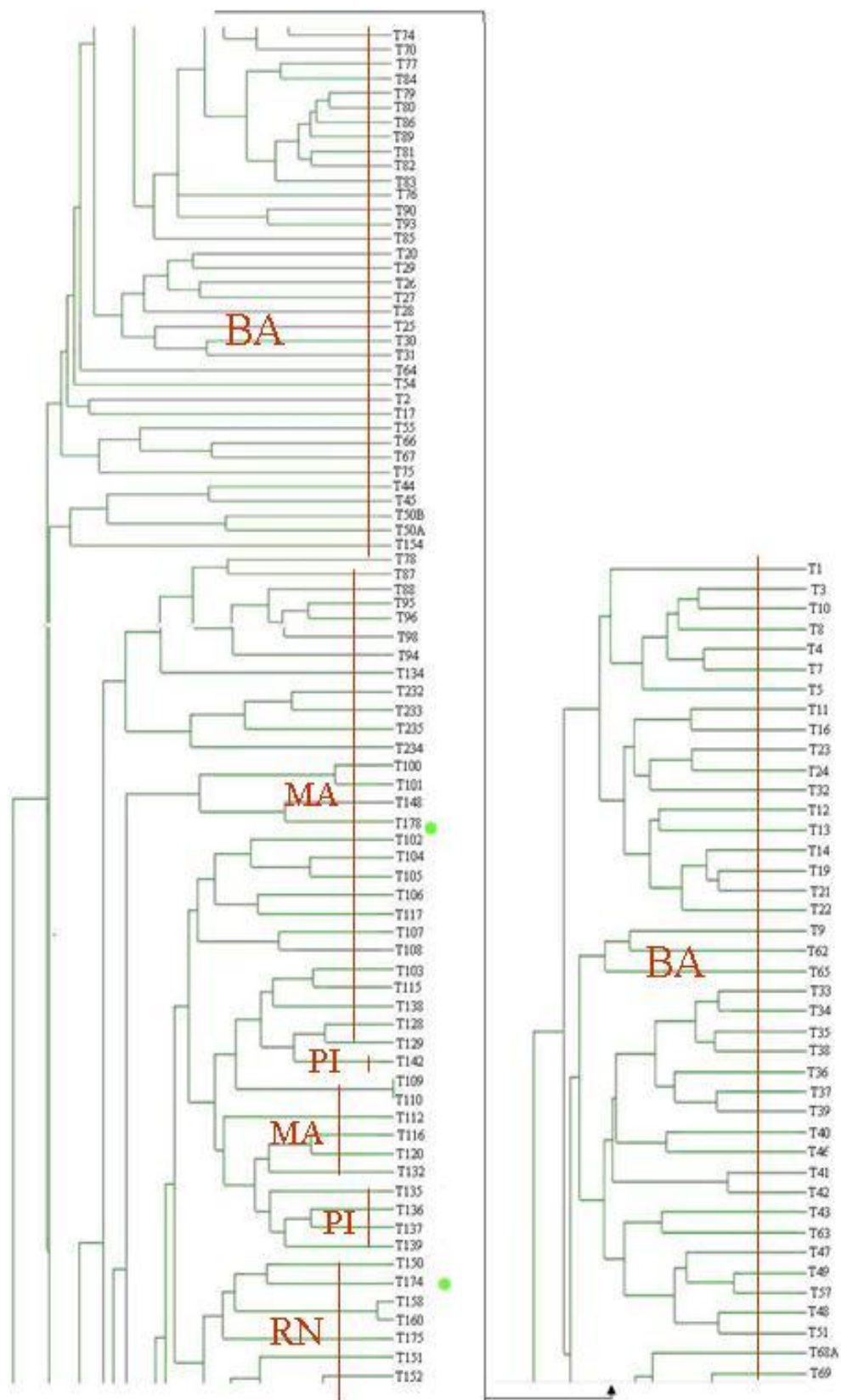


Figura 15B. Final do dendrograma ISSR de 281 acessos de melancia e dois de melão do BAG de Cucurbitáceas, (ponto verde corresponde as cultivares comerciais).

ANEXO 5

DNA Fingerprinting and Determination of Heterotic Groups in Watermelon Germplasm Resources

Fingerprinting de DNA e Determinação de Grupos Heteróticos no Germoplasma de Melancia

Maria Luciene da Silva ⁽¹⁾; Ana M. Benko-Iseppon ⁽²⁾; Maria Aldete J. Fonseca Ferreira ⁽³⁾; Lidiane L. B. Amorim ⁽⁴⁾; Lindomar Maria da Silveira ⁽⁵⁾ and Manoel Abílio de Queiroz ⁽⁶⁾

(1) Universidade Federal de Pernambuco ^(1, 2,4) Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 - msluciene@yahoo.com.br⁽¹⁾, celisep@hotmail.com ⁽²⁾, lidianeamorim@gmail.com ⁽⁴⁾.

(2) Embrapa Semiárido ⁽³⁾ - BR 428, Km 152, zona Rural, CP. 23, Petrolina - PE, 56302-97b - aldete.ferreira@cpatsa.embrapa.br⁽³⁾.

(3) Universidade Federal Rural do Semiárido ⁽⁵⁾ - UFRSA - Av. Francisco Mota, 572, Bairro Costa e Silva, Mossoró - RN, CEP: 59.625-900. lindomarmaria@yahoo.com.br ⁽⁵⁾

(4) Universidade do Estado da Bahia ⁽⁶⁾ - DTCS Campus III - Av. Edgard Chastinet Guimarães, s/n, Juazeiro - BA CEP: 48905-680 - manoelabilio@terra.com.br⁽⁶⁾.

Non-Standard Abbreviations

CPATSA (Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido)

DAF (*DNA Amplified Fingerprinting*)

UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*)

Abstract

To evaluate the existing diversity and their potential for breeding purposes, 90 advanced lines of watermelon and related species have been selected among the Brazilian Cucurbitaceae Active Germplasm Bank (Embrapa Semiárido, Petrolina, Pernambuco) for a molecular characterization by DAF (*DNA Amplified Fingerprinting*). For this approach 69 primers have been evaluated, from which 19 were selected as highly informative, revealing 166 markers (polymorphism level of 78.91%) with an average of eight bands/primer. The data allowed the estimation of the Jaccard similarity coefficient and the construction of an UPGMA dendrogram. The similarity coefficient varied from 20 to 80% among lines, with clear identification of eight heterotic groups with genetic divergence of 70%. The line V12 presented 28 combinations, followed by V11 with 15 and V10 with 12 combinations. The dendrogram generated five groups, with group I including agricultural commercial lines; group II with lines from three taxonomic species (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* and *C. colocynthis*) and group III with watermelon accessions bearing resistance to *Podosphaera xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish = *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht: Fr.). The group IV was composed by accessions from *C. colocynthis* and group V by lines from *C. lanatus* var. *citroides*. DAF was considered advantageous over other molecular markers available, due to its easy generation, polymorphism detection potential and reproducibility. The identified diversity will be valuable for the identification of parental candidates for watermelon breeding programs.

Terms for indexing: *Citrullus lanatus*, germplasm, molecular markers, genetic resources.

Resumo

Visando avaliar a diversidade existente e seu potencial para programas de melhoramento, 90 linhagens avançadas de melancia e espécies relacionadas foram selecionadas do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas (Embrapa Semiárido, Petrolina, Pernambuco) para caracterização molecular usando DAF (*DNA Amplified Fingerprinting*). Para isso, 63 *primers* foram avaliados, dentre os quais 19 foram selecionados como mais informativos, revelando 166 marcadores (nível de polimorfismo de 78,91%) com uma média de oito bandas por *primer*. Os dados permitiram estimar o coeficiente de similaridade (Jaccard) e a construção de um dendrograma pela análise UPGMA. O coeficiente de similaridade variou entre 20 e 80% entre as linhagens, com clara identificação de oito grupos heteróticos, com divergência genética de 70%. A linhagem V12 apresentou 28 combinações, seguida por V11 com 15 e V10 com 12 combinações. O dendrograma gerou cinco grupamentos, onde o grupo I incluiu linhagens de variedades comerciais, o grupo dois incluiu linhagens de três táxons (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis*), enquanto o grupo III incluiu linhagens resistentes ao oídio (*Podosphaera xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish = *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht: Fr.)). O grupo IV compreendeu acessos de *C. colocynthis* e o grupo V linhagens de *C. lanatus* var. *citroides*. Marcadores DAF foram considerados vantajosos sobre outros tipos de marcadores disponíveis, devido à sua fácil geração, capacidade de detectar polimorfismos e reprodutibilidade. A diversidade identificada será valiosa para a identificação de candidatos a parentais em programas de melhoramento de melancia.

Termos para indexação: *Citrullus lanatus*, germoplasma, marcadores moleculares, recursos genéticos.

Introdução

O gênero *Citrullus* comporta uma das mais importantes espécies da família Cucurbitaceae, a melancia [*C. lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai]. Trata-se de uma espécie diploide ($2n = 22$) que apresenta ampla diversidade morfológica em regiões tropicais e subtropicais, cujo centro de origem é a África (Esquinas-Alcazar, 1983; Sain et al., 2002).

No Brasil, o cultivo da melancia contribui para um agronegócio de aproximadamente R\$ 500 milhões, com um volume de produção em torno de 1.995.206 toneladas. Dentre as regiões de maior produção, destacam-se Sul e Nordeste que juntas respondem por uma produção de 1.301.958 toneladas/ano (IBGE, 2008). Contudo, a produção de melancia no Brasil apresenta alguns fatores limitantes como susceptibilidade a estresses bióticos, o que tem levado os produtores a fazer uso intenso de agroquímicos (Keinarh, 2001; Bharath et al., 2005).

Uma alternativa visando à redução dos impactos causados pelos diversos patógenos, bem como ao uso de agroquímicos tem sido o desenvolvimento de programas de melhoramento para desenvolver cultivares adaptados às condições brasileiras. Para tanto, é preciso uma melhor exploração da variabilidade genética da melancia coletada em diferentes regiões do Nordeste, considerado um centro de diversificação da espécie (Romão, 1995) a qual está preservada no Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas (BAG) localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. De fato, o germoplasma de melancia preservado no BAG contém rica variabilidade genética, tanto no que tange a acessos coletados no campo como quanto a acessos de diferentes espécies do gênero (*C. lanatus* var. *lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis*) introduzidos de seus centros de origem (Oliveira et al., 2002; Queiróz, 2004; Silva et al., 2006).

Além do BAG da Embrapa Semiárido uma parceria com a Universidade do Estado da Bahia/Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (UNEB/DTCS) vem propiciando o desenvolvimento de um programa de melhoramento de melancia visando identificar fontes de resistência a vários patógenos, bem como desenvolver tipos com diferentes padrões de planta e fruto para atender às demandas atuais e futuras de mercado e dos agricultores. Esse programa gerou um conjunto de cerca

de 300 linhagens avançadas de melancia com diferentes graus de endogamia e resistência a viroses (Silveira, 2004) e ao oídio (Dias et al., 1999), algumas delas com elevada uniformidade; bem como linhagens de cultivares comerciais com diferentes padrões de frutos. Essas linhagens poderão ser cruzadas para obtenção de combinações híbridas de modo a se obter híbridos com resistência múltipla a viroses e oídio, bem como diferentes padrões de frutos. Contudo, devido ao elevado número de linhagens, bem como suas respectivas combinações a serem avaliadas em campo, torna-se inexecutável realizar e analisar todos os cruzamentos, limitando a caracterização de todos os possíveis híbridos (Smith, 1986).

Alternativamente, a definição de grupos heteróticos, com base na avaliação da divergência genética dos indivíduos envolvidos, constitui uma estratégia que possibilita a determinação e exploração mais eficiente do conjunto de linhagens no melhoramento. A determinação de grupos heteróticos pode ser realizada por meio de características morfológicas ou utilizando dados moleculares, cuja variação representa a variabilidade ao nível de sequência do DNA (Ferreira, 2000; Lee, 1995). Diferentes marcadores utilizados na descrição da variabilidade genética têm sido aplicados como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Lee et al., 1996; Jarret et al., 1997; Levi et al., 2001).

Os marcadores DAF são indicados para contornar o problema da reprodutibilidade dos marcadores RAPD, uma vez que utilizam maior quantidade de *primers* (10-, 12- e 15-meros) de alto conteúdo GC, bem como quantidades menores de DNA molde (Caetano-Anollés et al., 1999; Weising et al., 2005). Dessa forma, os marcadores DAF foram selecionados para desenvolvimento de sistemas de detecção de diversidade genética no presente estudo, como ferramenta para determinação de grupos heteróticos em uma amostra de linhagens avançadas de melancia.

Materiais e Métodos

Materiais

Noventa linhagens avançadas de melancia, representando o conjunto de cerca de 300 linhagens com diferentes graus de endogamia, foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, localizado na Embrapa Semiárido em Petrolina-PE, Brasil.

As linhagens foram subdivididas em subconjuntos, sendo:

(A) 34 linhagens derivadas de variedades comerciais (C) - (Pérola, Charleston Gray, Riviera, Smile, Sugar Baby e Crimson Sweet), cujas plantas apresentam frutos variando de grandes a pequenos, polpa vermelha e alto teor de açúcares, sendo algumas prolíficas e todas suscetíveis aos principais estresses bióticos;

(B) 24 linhagens com resistência ao oídio (O) (*Podosphaera xanthii*), que foram obtidas a partir de um programa de melhoramento utilizando-se como fonte de resistência um acesso coletado na agricultura tradicional, tendo sido retrocruzadas (três ciclos) com a cultivar comercial “Crimson Sweet”. As referidas linhagens apresentam alto grau de heterose para características de planta e frutos, com frutos variando de médios a grandes, polpa vermelha e prolificidade variando de média a baixa.

(C) 32 linhagens com genes de resistência aos potyvirus (V) PRSV-W, WMV e ZYMV, provenientes de diferentes acessos da agricultura tradicional (BAG2, BAG7 e do cruzamento do BAG4 com “Crimson Sweet”), bem como provenientes de introduções do Departamento de Agricultura dos EUA como BAG3 da espécie *C. lanatus* var. *citroides* (V9, V10, V11, V12, V13, V14 e V15) e BAG9 da espécie *C. colocynthis* (V32, V33, V34 e V35), com poucos ciclos de autofecundação. Contudo, são fontes de resistência a estresses bióticos, com alta prolificidade e de frutos pequenos, com polpa variando de branca a róseos e baixo teor de açúcares.

Análise da DAF

Para realização das análises moleculares foram conduzidos experimentos na casa de vegetação do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife - PE),

onde 20 sementes de todas as linhagens foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato de hortaliças, sendo irrigadas diariamente. Após o surgimento das primeiras folhas definitivas um *bulk* de folhas de dez plantas foi coletado e encaminhado ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE, onde os processos de extração de DNA foram conduzidos seguindo a metodologia definida por Weising et al. (2005).

As análises com marcadores DAF foram realizadas com base no trabalho de Caetano-Anollés et al. (1999) com modificações para melhor desempenho para a caracterização em melancia. As condições ótimas de amplificação foram obtidas por meio de teste segundo método *Taguchi* descrito por Cobb & Clarkson (1994). Para as reações de otimização foram testadas diferentes concentrações de DNA genômico (0,1; 0,3; 0,5 e 1 ng/μL), de enzima *Taq* DNA polimerase (0,25; 0,5; 0,7 e 1 U) e de MgCl₂ (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM).

A reação foi estabelecida para um volume final de 13 μl contendo DNA no intervalo de concentração de 0,1 a 1 ng; conjunto de deoxinucleotídeos a 1 mM; tampão da enzima 1X (10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl; pH 8.3); *primer* a 3,33 μM; cloreto de magnésio a 2,5 mM e *Taq* polimerase a 0,5 U/reação, sendo utilizados dois ciclos de temperatura alternativos para amplificação: A) desnaturação (96°C - 2 minutos), 95°C por 30 segundos, anelamento (35°C - 1 minuto) e extensão (72°C - 2 minutos) e extensão a 72°C por 2 minutos, sendo cada ciclo repetido 39 vezes; B) 96°C por 1 minuto; 94°C por 36 segundos; 42°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 2 minutos com 39 ciclos de repetições.

Sessenta e nove oligonucleotídeos (Operon) foram testados quanto à sua capacidade de gerar fragmentos polimórficos pela reação de DAF. Destes, 21 foram selecionados com base na literatura, por indicar alto nível de polimorfismo, quando aplicados em análises de diversidade genética em melancia por meio da técnica RAPD (Levi & Thomas, 2001; Capeloto, 2003; Silva et al., 2006).

Todos os *primers* foram submetidos a um novo teste para amplificação nas condições pré-estabelecidas para o marcador DAF. Dos oligonucleotídeos testados 19 revelaram-se altamente polimórficos e com significativa reprodutibilidade quando testados no Laboratório de Genética Vegetal e Biotecnologia da UFPE e no Laboratório de Biologia Vegetal da UNEB/DTCS, Juazeiro, BA.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% (p/v), usando tampão TBE pH 8,0 (0,09 M de Tris 0,09 M de ácido bórico e 2 mM de EDTA), aplicando-se uma corrente elétrica de 80 volts e 160 mA, por quatro horas. Após eletroforese o gel foi corado em uma solução contendo 20 µL Brometo de Etídio (10 mg/mL) diluídos em 200 mL de TBE 1X por 40 minutos e documentados sob luz ultravioleta. Para identificação dos fragmentos amplificados foi utilizado DNA de peso molecular de 1kb.

Uma matriz de dados binários foi obtida a partir dos produtos amplificados e interpretados pela presença (1) e ausência (0) de bandas. A similaridade entre as 90 linhagens foi obtida segundo o coeficiente de similaridade de Jaccard e para obtenção do dendrograma foi empregado o método de agrupamento por pares de médias ponderadas (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*) (Rohlf, 1998).

Resultados e Discussão

Inicialmente foram testadas diferentes concentrações de DNA, de $MgCl_2$ e enzima Taq polimerase, sendo observado que o intervalo de concentração de DNA analisada apresentou diferenças no número de bandas, porém a concentração de 0,5 ng/ul foi considerada suficiente para manter a especificidade da reação (Weising et al., 2005).

O cloreto de magnésio revelou ter maior influência na produção de fragmentos de boa qualidade, apresentando maior resolução e especificidade das bandas na concentração de 2,5 mM. A variação na concentração da enzima Taq polimerase não apresentou diferenças no produto amplificado. Contudo, a utilização de enzimas Taq polimerase de diferentes fabricantes levou à produção de padrões de bandas diferentes, com implicações no resultado final da análise. Com isto, foi utilizada enzima Taq polimerase de um mesmo fabricante do início ao fim das análises.

Ao se aplicar o ciclo de temperatura A, todas as bandas geradas foram monomórficas, possivelmente devido a pareamentos inespecíficos. Já com o ciclo B, observou-se um aumento significativo de bandas polimórficas, confirmando

maior eficiência na amplificação em temperaturas mais elevadas, aumentado assim a estringência no pareamento dos iniciadores (Caetano-Anollés et al., 1999).

Sessenta e nove *primers* foram avaliados quanto à habilidade de detectar polimorfismos. Dezenove foram selecionados por apresentar reprodutibilidade e número elevado de bandas polimórficas (Figura 1). Estes *primers* revelaram 166 marcadores, o que representa um percentual de polimorfismo de 78,91% (131 bandas polimórficas e 35 monomórficas) e média de oito bandas por *primer* (Tabela 1), cujos fragmentos variaram em tamanho de 250 a 2000 pb. Levi et al. (2002) analisando acessos de melancia detectaram, em média, 14 bandas polimórficas por *primer*. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os marcadores DAF mostraram-se bastante informativos, o que pode ser atribuído à variabilidade dos genótipos utilizados nas respectivas análises.

Os dados foram utilizados na construção de uma matriz de similaridade genética (coeficiente de Jaccard), sendo detectados níveis de similaridade variando de 20% a 80% (dados não mostrados). Considerando uma similaridade abaixo de 0,3 foram detectadas sete linhagens pertencentes ao subconjunto de linhagens comerciais, 12 linhagens resistentes a viroses e dezenove linhagens resistentes ao oídio que formaram 66 combinações com diferentes linhagens dos três subconjuntos (Tabela 2). Uma dessas linhagens chegou a participar de 28 combinações híbridas (linhagens V12) o que corresponde a 42% das combinações, porém, quando se consideram as linhagens V10, V11 e V12, as mesmas chegaram a participar de 55 combinações híbridas, ou seja, 83% das combinações, indicando posição relativamente divergente das demais (Tabela 2).

De fato, se tratam de linhagens provenientes da espécie *C. lanatus* var. *citroides*. Por outro lado, a linhagem V9 também pertencente à mesma espécie, participou de apenas uma combinação híbrida, indicando que o processo de endogamia utilizado na obtenção das linhagens criou combinações genotípicas muito distintas. Essas linhagens são de frutos muito pequenos (ao redor de 200 gramas), apresentam polpa de cor branca e baixo conteúdo de açúcar, algumas delas se mostrando homozigotas como fontes de resistência aos potyvirus PRSV-w e WMV (Silveira, 2009).

Considerando as linhagens V10, V11 e V12 as mesmas chegaram a formar 31 combinações divergentes com as linhagens resistentes ao oídio que são de frutos

grandes e apresentam elevado padrão de fruto (cor e conteúdo de açúcar) (Tabela 2). Considerando que a resistência ao oídio (representadas por O na Tabela 2) é homozigota e dominante (Borges, 1996), as combinações híbridas resultantes serão resistentes ao oídio.

No entanto, quanto à resistência ao vírus, a mesma parece ser controlada por diversos genes ou poligenes de efeitos menores (Silveira, 2009) sugerindo que as combinações híbridas não apresentarão resistência aos vírus. Torna-se, portanto, necessário o estabelecimento de uma estratégia para que se possa incorporar a resistência múltipla às potyvirose e ao oídio. Uma delas poderá ser a utilização do método do retrocruzamento (Bueno et al., 2001), utilizando-se uma das linhagens V10, V11 ou V12, que são muito semelhantes fenotipicamente como pai doador (resistência aos potyvirus, frutos pequenos e prolificidade) e as linhagens resistentes ao oídio como pai recorrente (boas características de fruto e resistência ao oídio). Porém, as progênies resultantes precisam ser avaliadas em casa de vegetação com inoculação dos isolados puros dos potyvirus, bem como, avaliadas em campo, onde as estirpes dos potyvirus ocorrem naturalmente (Silveira et al., 2005). Além da seleção para as doenças, deverão ser feitas seleções para diferentes padrões de frutos em tamanho, cor interna e externa, além de teor de açúcar.

Destacam-se ainda as linhagens V28 (resistente a vírus) e O25 (resistente ao oídio), permitindo 75 combinações, respectivamente. A linhagens V28 poderá formar híbridos com uma linhagens comercial (C18), quatro linhagens resistentes a vírus da var. *citroides* (V10; V11; V12 e V15) e duas linhagens resistentes ao oídio (O1; O25). Já a linhagens O25 poderá ser doadora de genes de resistência ao oídio para duas linhagens comerciais (C18 e C31) e três linhagens resistentes a vírus (V10; V11 e V12) visando à obtenção de resistência dupla, bem como na seleção de outras características de importância econômica, como tamanho e formato de fruto, teor de sólidos solúveis e cor de polpa. Assim, utilizando apenas as linhagens mais divergentes será possível obter diferentes combinações híbridas, permitindo o estudo de diversas características importantes, principalmente no que se refere à capacidade geral e específica de combinação de vários caracteres.

A matriz de similaridade foi empregada para obtenção de um dendrograma com o qual podemos destacar cinco principais grupos (Figura 2). 27

linhagens comerciais juntamente com nove linhagens de *C. lanatus* da agricultura tradicional formaram o primeiro grupo (Figura 2). A divergência entre os componentes do referido grupo permitiram selecionar possíveis cruzamentos com intuito de se obter híbridos com diferentes padrões de frutos, como no caso, por exemplo, do cruzamento entre a linhagem C1 (Pérola - frutos grandes e planta não prolífica) com C20 e C22 (Smile - fruto pequeno e planta prolífica e precoce), bem como entre V07 e V26, com resistência a potyvirose.

Um segundo grupo heterótico incluiu as linhagens provenientes da agricultura tradicional (V1 a V8 e V16 a V30), todas da espécie *C. lanatus* var. *lanatus*. Neste mesmo grupo, observou-se a presença das linhagens V13, V14 e V15 da espécie *C. lanatus* var. *citroides*, bem como da linhagem V32 da espécie *C. colocynthis*, com distância genética de em torno de 70% entre as linhagens da mesma subespécie (*C. lanatus* var. *citroides*: V9, V10, V11, V12 e *C. colocynthis*: V33, V34 e V35) e aquelas que constituíram o outro grupo heterótico.

A composição de grupos com linhagens de diferentes espécies indica a necessidade de ampliar o número de marcadores na análise, visando uma cobertura mais ampla do genoma. De fato, o dendrograma foi obtido com 166 marcadores DAF, número aquém dos aplicados por Levi & Thomas (2001) que utilizou 288 marcadores RAPD para estimar o relacionamento genético entre cultivares americanas de melancia e acessos introduzidos do gênero *Citrullus*.

Considerando a variabilidade morfológica das linhagens estudadas, características como cor da polpa, cor da casca, forma e tamanho do fruto, teor de sólidos solúveis e resistência a doenças são em geral governadas por um ou poucos genes (Guner & Wehner, 2004), podendo não ter sido detectados pelos marcadores empregados.

O grupo III foi constituído por todas as linhagens da agricultura tradicional com resistência ao oídio, com exceção da linhagem O14 que apresentou baixo índice de similaridade com relação às linhagens do mesmo local de origem (0,44) e maior similaridade com as linhagens comerciais do grupo I (0,49). Diversas combinações com resistência ao oídio foram sugeridas no presente estudo, empregando-se principalmente as linhagens de *C. lanatus* var. *lanatus* da agricultura tradicional do Nordeste brasileiro, considerando a resistência ao referido patógeno como monogênica e dominante (Borges, 1996). A aplicação deste

conjunto de linhagem no melhoramento irá contribuir de modo significativo no desenvolvimento de novas variedades.

O oídio constitui uma doença de importância econômica por provocar diminuição da área foliar e redução no tamanho e número de frutos. O uso de cultivares resistentes constitui um dos melhores métodos de controle em virtude do baixo custo, eficiência e não ser agressivo ao meio ambiente. Segundo Fazza (2006) diferentes raças do patógenos ocorrem no Brasil, com disponibilidade de fontes para melão, pepino e algumas abóboras.

A cultivar Opara, recentemente lançada pela Embrapa Semiárido, constitui a única fonte com resistência para melancia. Contudo, há necessidade de se obter novas fontes, devido à existência de diferentes raças fisiológicas do fungo (Fazza, 2006), o que implica que um material resistente em um local pode mostrar-se suscetível em outro, dependendo da raça do patógeno que compõe a população na localidade. Com isto, a determinação de grupos heteróticos de linhagens com resistência ao oídio poderá contribuir não só para o desenvolvimento de novas cultivares, mas também para identificação da ocorrência de diferentes raça em uma localidade.

As linhagens da espécie *C. colocynthis* (V33, V34 e V35) formaram o grupo IV e da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* formaram o grupo V, ambas tratando-se de introduções do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos com diferentes graus de endogamia. As linhagens estudadas apresentaram alto grau de divergência com relação às linhagens de *C. lanatus* var. *lanatus*, sendo as linhagens da espécie *C. colocynthis* mais divergente à *C. lanatus* var. *citroides*, ambas não apresentaram boas características de frutos, contudo o seu emprego no melhoramento da melancia cultivada mostra relevância, especialmente como fonte de resistência a patógenos. As referidas linhagens podem ainda ser exploradas para obtenção de frutos pequenos.

O presente estudo revelou que os marcadores DAF constitui importante ferramenta na investigação da diversidade genética, bem como na definição de grupos heteróticos de melancia contribuindo significativamente para o melhoramento genético da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Semiárido, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento, ao Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) pelo apoio para a realização dos trabalhos. A autora agradece a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas, em diferentes épocas, durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Referências

- Bharath B.G., S. Lokesh, and H.S. Shetty. 2005 Effects of Fungicides and Bioagents on Seed Mycoflora, Growth and Yield of Watermelon. *Integrative Biosciences*, 9:75-78.
- Borges, R.M.E. 1996. Estudo da herança ao oídio *Sphaerotheca fuliginea* (Schechte ex. Fr.) em melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.]. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 71p.
- Caetano-Anollés, G., S.E. Schlarbaum, and R.N. Trigiano. 1999. DNA amplification fingerprinting and marker screening for pseudo-testcross mapping of flowering dogwood (*Cornus florida* L.). *Euphytica* 106:209-222.
- Capeloto, A. 2003. Caracterização molecular entre e dentro de acessos de melancia através de RAPD-PCR. Dissertação Mestrado. UNESP-FCAV. 62p.
- Cobb, B.D. and J.M. Clarkson. 1994. A simple procedure for optimizing the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res.* 22:3801-3805.

- Dias, R.C.S., M.A. Queiróz, M. E. Meneses, R.M.E. Borges. 1999. Avaliação de resistência *Spherotheca fuliginea* e a *Didymella bryoniae* em melancia. Hort. Bras. 17:13-19.
- Esquinas-Alcazar, J.T., and P.J. Gulick. 1983. Genetic resources of Cucurbitaceae. Rome: IBPGR. (IBPGR-82/84), 101p.
- Fazza, A.C. 2006. Caracterização e ocorrência de agentes causais de oídio em cucurbitáceas no Brasil e reação de germoplasma de meloeiro. Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP. 61p.
- Guner, N., and T.C. Wehner. 2004. The genes of watermelon. HortScience 39:1175-1182.
- IBGE. 2008. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro: IBGE. www.ibge.gov.br/sidra. capturado em 25 junho 2008.
- Jarret, R.L., L.C. Merrick, T. Homls, J. Evans, and M.K. Aradhy. 1997. Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]. Genome 40: 433-441.
- Keinarh, A.P. 2001. Effect of fungicide applications scheduled to control gummy stem blight on yield and quality of watermelon fruit. Plant Disease 85:53-58.
- Lee, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. Adv. Agr. 55:265-344.
- Lee, S.J., J.S. SHIN, K.W. Kpark, and Y.P. Hong. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. Theor. Appl. Genet. 92:719-725. 1996.
- Levi, A., and C.E. Thomas. 2001. Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. Hortscience 36:1096-1101.

- Levi, A., C.E. Thomas, A.P. Keinath, and T. Wehner. 2001. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. Genet. Res. Crop Evol. 48: 559-566.
- Levi, A., C.E. Thomas, T. Joobeur, X. Zhang, and A. Davis. 2002. A genetic linkage map for watermelon derived from a testcross population: (*Citrullus lanatus* var. *citroides* x *C. lanatus* var. *lanatus*) x *Citrullus colocynthis*. Theor. Appl. Genet. 105:555-563.
- Oliveira, V.B., M.A. Queiróz, and J.A.A. Lima. 2002. Fontes de resistência em melancia aos principais potyvírus isolados de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. Hortic. Bras. 20: 589-592.
- Queiróz, M.A. 2004. Germplasm of Cucurbitaceae in Brazil. Crop Breed. Appl. Biot. 4:377-383.
- Rohlf, F. J., 1998 NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. Exeter software Setauket, 32:97-127.
- Romão, R.L. 1995. Dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] em três regiões do Nordeste brasileiro. Piracicaba: USP-ESALQ. 75p.
- Sain, R.S., P. Joshi, E.V. Divakara, and T. Sastry. 2002. Cytogenetic analysis of interspecific hybrids in genus *Citrullus* (Cucurbitaceae). Euphytica 128:205-210.
- Silva, M.L., M.A. Queiróz, A.M.J.F. Ferreira, and G.S.C. Buso. 2006. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. Hortic. Bras. 24:405-409.

- Silveira, L.M. 2004. Seleção de acessos e progênies de melancia para resistência a potyvirus. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Semi-Árido/UFERSA. Brasil, 64p.
- Silveira, L.M., M.A. Queiróz, J.A.A. Lima, M.Z. Negreiros, N.F. Ramos, and A.K.Q. Nascimento. 2005. Seleção de acessos e progênies de *Citrullus* spp. para resistência a três potyvirus. Fitop. Bras. 30:394-399.
- Silveira, L.M. 2009. Levantamento sorológico de vírus em cucurbitáceas na região do Sub-Médio São Francisco e determinação de fontes e herança de resistência em melancia a espécies de potyvirus. Tese. Universidade Federal do Semi-Árido - UFERSA. Brasil. 105p.
- Smith, O.S. 1986. Covariance between line per se and testcross performance. Crop Science, 26:540-543.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. DNA fingerprinting in plants. Principles, Methods, and Applications. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Cold Spring Harbour, New York, USA, 444 pp.

ANEXOS

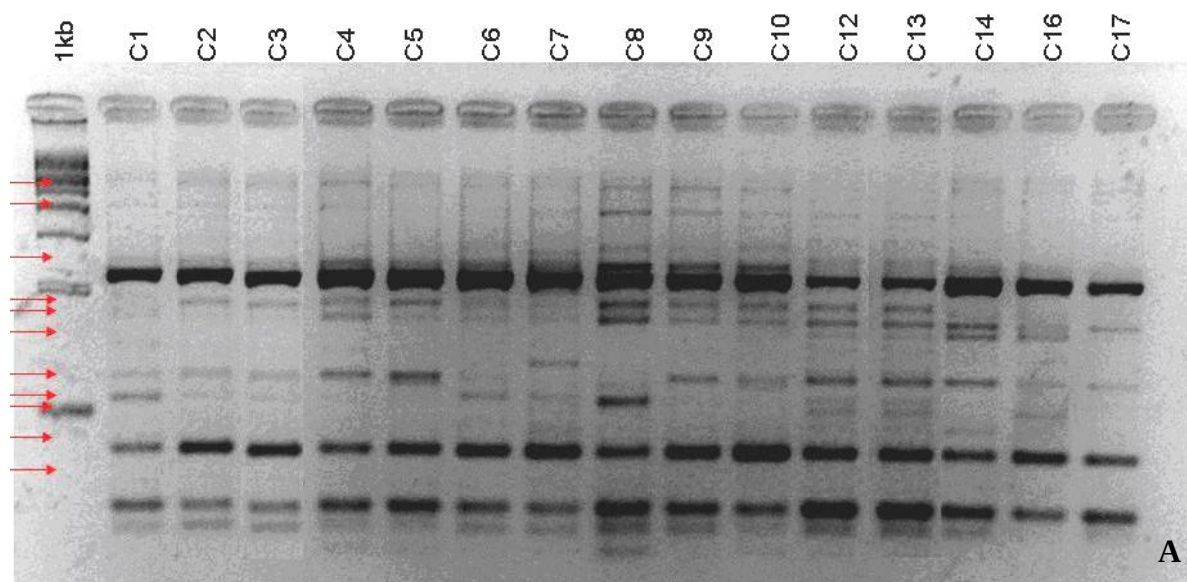


Figura 1 - Padrão de bandas amplificadas de DNA de linhagens comerciais de melancia com o *primer* OPAX14 por meio do marcador DAF. Setas indicam polimorfismo entre linhagens comerciais.

Tabela 1. *Primers* utilizados na análise da divergência genética entre linhagens avançadas de melancia, com suas seqüências nucleotídicas e número total de marcadores polimórficos e monomórficos

<i>Primers</i>	Seqüências	Monomórficas	Polimórficas	Total de Amplificações
OPA1	3'-CCTAGGATCG-5'	2	7	9
OPA19	3'-CAAACGTCGG-5'	2	6	8
OPB14	3'-TCCGCTCTGG-5'	2	6	8
OPC6	3'-GAACGGACTC-5'	2	5	7
OPC07	3'-GTCCCGACGA-5'	1	5	6
OPE1	3'-CCCAAGCTCC-5'	1	3	4
OPE14	3'-TGCGGCTGAG-5'	0	7	7
OPF16	3'-GGAGTACTGG-5'	3	7	10
OPJ13	3'-CCACACTACC-5'	3	11	14
OPJ16	3'-CTGCTTAGGG-5'	3	7	10
OPO3	3'-CTGTTGCTAC-5'	4	7	11
OPO6	3'-CCACGGGAAG-5'	3	15	18
OPO7	3'-CAGCACTGAC-5'	1	5	6
OPO9	3'-TCCCACGCAA-5'	0	4	4
OPO10	3'-TCAGAGCGCC-5'	1	5	6
OPO15	3'-TGGCCTCCTT-5'	4	8	12
OPS18	3'-CTGGCGAACT-5'	0	7	7
OPX7	3'-GAGCGAGGCT-5'	0	8	8
OPAX14	3'-CACGGGCTTG-5'	3	8	11
Total		35	131	166

Tabela 2 - Combinações promissoras de linhagens avançadas de melancia com 70% de divergência genética.

Grupos	Combinações possíveis	Total de Combinações
GH1	C18 x (V28; V34; O1; O17 e O25)	5
GH2	V9 x C31	1
GH3	V10 x (C31; V28; V29; O2; O4; O5; O8; O11; O15; O20; O23 e O25)	12
GH4	V11 x (C31; V14; V28; V29; V32; V35; O4; O5; O8; O11; O13; O15; O20; O22 e O25)	15
GH5	V12 x (C1; C24; C26; C35; V14; V15; V16; V17; V27; V28; V30; V32; V34; V35; O3; O4; O5; O6; O7; O8; O10; O11; O19; O20; O22; O24 e O25)	28
GH6	V28 x (V15; V34; O1 e O25)	4
GH7	O25 x C31	1
Total		66

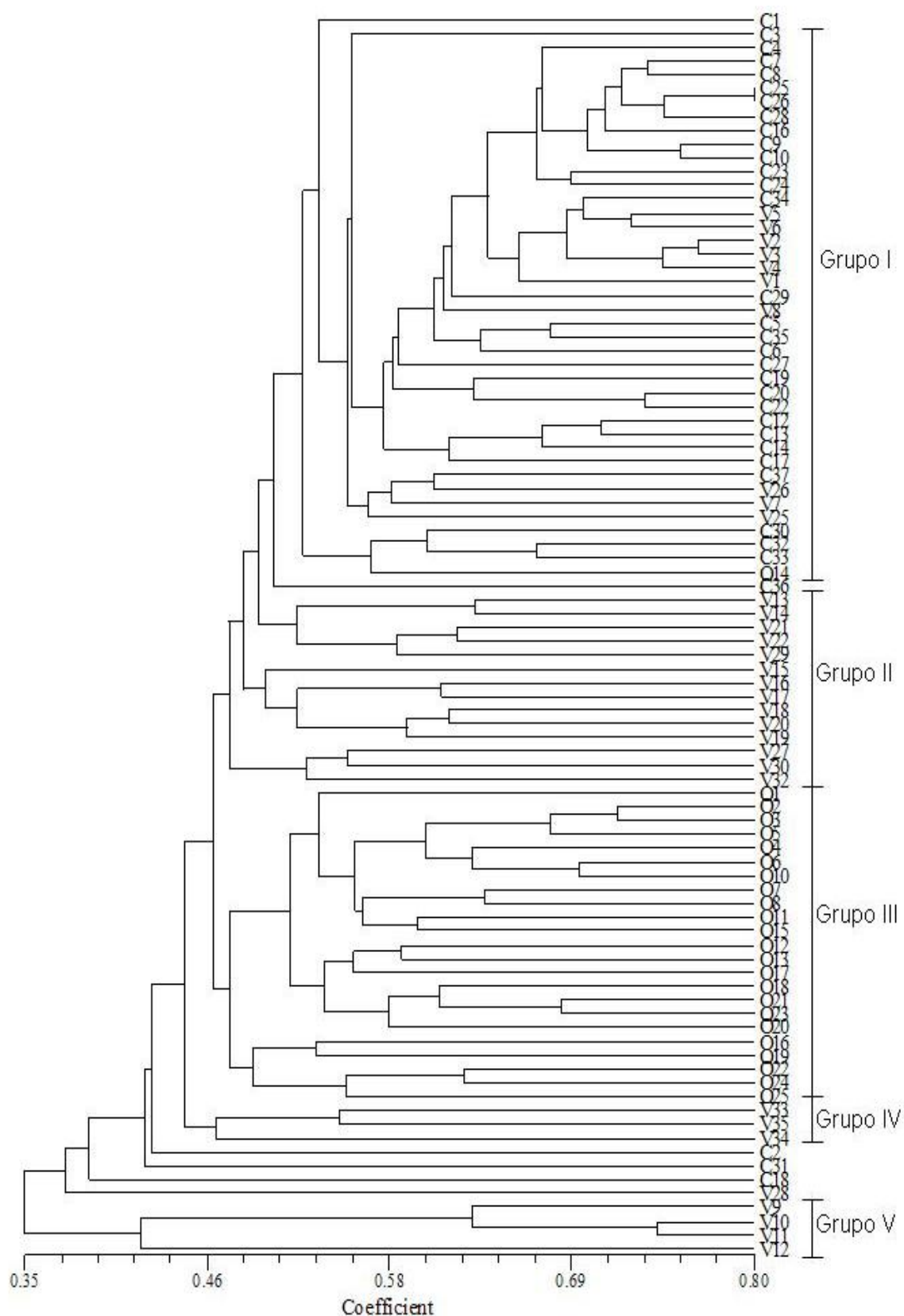


Figura 2 - Dendrograma de linhagens avançadas de melancia baseado na distância genética obtida de marcadores DAF utilizando o método UPGMA, indicando cinco principais grupos (V - resistente a vírus; O - resistentes ao oídio e C - Comerciais).

ANEXO 6

Genetic Diversity in watermelon accessions of traditional farming applying DAF markers

Diversidade genética em acessos de melancia provenientes da agricultura tradicional usando marcadores DAF

Maria Luciene da Silva ⁽¹⁾; Ana M. Benko-Issepon ⁽²⁾; Maria Aldete J. F. Ferreira ⁽³⁾; Aline da Silva Santos ⁽⁴⁾; Márcia Adriana Carvalho dos Santos ⁽⁵⁾ Manoel Abilio de Queiroz ⁽⁶⁾;

(1) Universidade Federal de Pernambuco ^(1, 2) Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 - msluciene@yahoo.com.br⁽¹⁾, ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br ⁽²⁾.

(2) Embrapa Semiárido ⁽³⁾ -BR428, Km 152 Zona Rural, CP 23, Petrolina - PE, 56302-970 - aldete.ferreira@cpatsa.embrapa.br ⁽³⁾.

(3) Universidade do Estado da Bahia ^(4, 5, 6) - DTCS campus III - Av. Edgard Chastinet Guimarães, s/n, Juazeiro - BA CEP: 48905-68 - aly_uneb@yahoo.com.br ⁽⁴⁾; marciagro3@yahoo.com.br ⁽⁵⁾; manoelabiliomaq@gmail.com⁽⁶⁾.

Non-Standard Abbreviations

CPATSA (Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido)

DAF (*DNA Amplified Fingerprinting*)

UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*)

Abstract

One hundred ninety-seven watermelon accessions were evaluated regarding the genetic variability, using sixteen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) primers. Two introduced accessions were also included. The data were analyzed to determine the similarity coefficient of Jaccard and used to obtain a dendrogram using UPGMA with NTSYS program, revealing high indices of polymorphism (65.27%). The markers revealed good precision in the separation of different species and have exhibited expressive genetic variability among the accessions collected in the traditional agriculture of Northeast Brazil. The analysis of molecular variation - AMOVA showed that the greater percentage of variation was found in the accessions collected within each state (86.11) and municipalities (76.16%) or group of near municipalities (73.11) indicating that there is a strong need to continue to rescue the watermelon germplasm from the traditional agriculture in the states, municipalities or group of municipalities in the Northeast Brazil not yet considered previously.

Terms for indexing: *Citrullus*, germplasm bank, genetic diversity, DAF markers

Resumo

Cento e noventa e sete acessos de melancia foram avaliados quanto à variabilidade genética, a partir do uso de dezesseis primers DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), incluindo-se dois acessos introduzidos da África. Os dados foram analisados para a determinação do coeficiente de similaridade de Jaccard e para a obtenção dos dendrogramas pelo método UPGMA no programa NTSYS, revelando altos índices de polimorfismo (65,27%), com nível de divergência genética entre acessos de melancia variando de 13% a 87%. Os marcadores DAF foram informativos na separação dos acessos em grupos e indicam que há variabilidade expressiva entre os acessos coletados na agricultura tradicional do Nordeste brasileiro. A análise de variação molecular - AMOVA revelou que a maior porcentagem de variação encontra-se nos acessos coletados dentro de cada estado (86,11%) e de municípios (76,16%) ou grupos de municípios próximos (73,11%) indicando que há necessidade imperiosa de continuar o resgate de germoplasma de melancia da agricultura tradicional nos estados e municípios ou grupos de municípios não contemplados previamente.

Termos para indexação: *Citrullus*, banco de germoplasma, divergência genética, marcadores DAF.

Introdução

A melancia [*Citrullus lanatus* var. *lanatus* (Thunb) Matsume & Nakai] constitui uma espécie de grande valor econômico no mundo. No Brasil, responde por uma produção de 1.995.206 toneladas/ano, tendo expressiva participação do Nordeste brasileiro (607.850 toneladas/ano) (IBGE, 2008). Contudo, diferentes patógenos limitam a produção de melancia na região, uma vez que não há cultivares melhoradas desenvolvidas para as condições nacionais. As variedades comerciais são cultivadas em sistema de cultivo irrigado, mas o cultivo tradicional da melancia é largamente conduzido em sistema de sequeiro, principalmente em consórcio com diferentes culturas (Queiroz, 1993).

Como recurso genético vegetal no Nordeste brasileiro, a espécie encontra-se localmente adaptada, tendo sido introduzida pelos escravos africanos há mais de 300 anos (Romão et al., 2008). Porém, encontra-se em constante ameaça de perda de genes úteis, devido à substituição das variedades locais por cultivares melhoradas, longos períodos de seca intensa e êxodo rural. Visando minimizar tais perdas na década de 1990 foi formado o Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, localizado na Embrapa Semiárido (Petrolina, Pernambuco - Brasil) local onde se encontram acessos de melancia provenientes da agricultura tradicional e estão preservados em câmara fria a 10°C e 40% de umidade relativa.

Estudos de caracterização de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas têm sido realizados com base em uns poucos descritores morfológicos (Silva et al., 2007; Romão et al., 2008). Muitos estudos têm sido realizados aplicando-se marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética da melancia (Levi et al., 2005; Dane et al., 2007; Djè et al., 2010), porém, apenas dois deles envolveram uma pequena amostra de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, porque em um deles apenas acessos coletados na ilha de São Luís foram analisados (Capeloto, 2003) e no outro foram estudados acessos de três regiões do Estado da Bahia (Silva et al., 2006).

Entre os diferentes marcadores moleculares existentes, o DAF (DNA *Amplified Fingerprinting*) difere do RAPD principalmente com relação às condições de reação utilizadas, sendo mais informativo. Segundo Caetano-Anollés (1993) os

fatores mais importantes que podem influenciar nas condições de reação envolvem a concentração do *primer*, enzima e cloreto de magnésio, além da temperatura de anelamento. Os *primers* DAF são variáveis em sequência de nucleotídeo e em comprimento (oito a 15 nucleotídeos), que quando submetidos à amplificação resulta em padrões claramente distintos, produzindo polimorfismo com alta reprodutibilidade (Caetano-Anollés, 1993).

O presente estudo teve por objetivo investigar a divergência genética entre acessos de melancia utilizando uma amostra representativa do BAG de Cucurbitáceas coletada em diferentes regiões do Nordeste brasileiro, pela amplificação do DNA com marcadores DAF, tendo em vista examinar como a variabilidade genética da espécie está distribuída nos diversos locais de coleta e, estabelecer estratégias futuras para o banco de germoplasma de melancia.

Materiais e Métodos

Material Vegetal

Os 197 acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas (Embrapa Semiárido, Petrolina - PE) selecionados para análise com o marcador DAF foram separados em três conjuntos conforme abaixo e respectivos locais de coleta (Tabela 1):

- 1) Conjunto de acessos introduzidos - Foram incluídos dois acessos introduzidos da África [*C. colocynthis* (T4339) e *C. lanatus* var. *citroides* (T213)].
- 2) Conjunto de acessos da agricultura tradicional - Correspondem aos 187 acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* e *C. lanatus* var. *citroides* (tipos cultivados e espontâneos) e dois acessos de *Cucumis melo* (melão, M1 e M5) como grupo externo, coletados em áreas de agricultura tradicional do Nordeste brasileiro, que correspondem a cinco Estados (Bahia, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Maranhão), 20 regiões e 42 municípios.
- 3) Conjunto de Cultivares Comerciais - Neste conjunto encontram-se as variedades comerciais representadas por oito acessos: “Charleston Gray”, “Sugar Baby”, “Smile”, “New Hampshire Midget”, “Peacock Improved Shipper”, “Mickellee”, “Riviera” e “Pérola”.

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de um *bulk* de dez folhas jovens, sendo uma de cada amostra de melancia e melão de acordo com Weising et al. (2005). Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biologia e Melhoramento Genético Vegetal (LBMGV) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB/DTCS, campus III, Juazeiro - BA). A quantificação do DNA foi realizada pelo método comparativo em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (5 µg/ml) usando-se diferentes concentrações de λ -DNA como referencial.

Reação de amplificação DAF

A reação de amplificação foi realizada com o emprego de 16 *primers* da Operon Technologies (Alameda, Cali, USA) previamente selecionados como mais informativos. A amplificação foi conduzida em um volume final de 13 µL, contendo de 0,1 a 1 ng DNA; conjunto de deoxinucleotídeos a 1 mM; Tampão da enzima 1X (10 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3); 3,33 µM de *primer*; 2,5 mM de MgCl₂ e 0,5U de Taq DNA polimerase, sendo utilizados dois ciclos de temperatura alternativos para amplificação. As condições de amplificação incluíram uma desnaturação a 96°C por 1 minuto; seguida da desnaturação a 94°C por 36 segundos; anelamento do *primer* a 42°C por 1 minuto; extensão inicial a 72°C por - 1 minuto e extensão final de 72°C por 2 minutos, com 39 ciclos de repetições em termociclador da Eppendorf (*Eppendorf Netheler-Hinz, Hamburg, Alemanha*).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,8% em tampão TBE 1x (0,09 M Tris; 0,09 M de ácido ascórbico e 2 mM de EDTA) com uma corrente elétrica de 80 volts. O gel foi corado com 0.5 ng/ml de brometo de etídeo, sendo fotografado sobre luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado pela comparação com DNA padrão de 1 kb Ladder.

Análises de dados

Os fragmentos produzidos foram interpretados como presença (1) ou ausência (0) de bandas para construção de uma matriz de dados. O programa NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy System*, version 2.0 - Rohlf, 1998) foi utilizado para calcular o Coeficiente de Similaridade de Jaccard's. O dendrograma foi gerado

empregando-se o método de agrupamento por pares de médias não ponderadas (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*) por meio do programa NTSys.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada por meio do programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier et al., 2005), investigando-se a variabilidade genética da melancia em áreas de agricultura tradicional em diferentes situações: dentro e entre Estados do Nordeste brasileiro; entre Estados, entre regiões dentro de Estados e dentro de Estados; entre regiões (grupos de municípios próximos), entre municípios dentro de regiões e dentro de regiões.

Resultados e Discussão

Perfil Molecular dos acessos de melancia revelado por meio do Marcador DAF

Dos 182 *primers* avaliados quanto à habilidade de detectar polimorfismo, 16 apresentaram número elevado de bandas polimórficas e maior reprodutibilidade no padrão das mesmas. Os produtos da amplificação relevaram 216 marcadores, com 65,27% de polimorfismo (Tabela 2). O número de produtos amplificados variou de sete (OPC06) a 23 (OPD18) e os fragmentos variaram em tamanho de 250 a 2160 pb, com média de nove bandas por *primer*. Os *primers* p15-10, OPB14, OPO15 e OPB15 revelaram maior número de bandas polimórficas (15, 9, 12 e 13, respectivamente), indicando que os marcadores DAF apresentaram potencial para caracterização de acessos de melancia e podem contribuir de modo significativo na determinação da diversidade genética de espécies intimamente relacionadas.

Informações baseadas em marcadores bioquímicos têm revelado pouca variação entre espécies do gênero *Citrullus*. Uma análise fenética baseada em isoenzimas separou as espécies do referido gênero em dois grupos principais, sendo o primeiro grupo composto por espécies de *C. colocynthis* e o segundo grupo formado com *C. lanatus* e *C. lanatus* var. *citroides* (Assis, 2000).

As isoenzimas têm revelado polimorfismo principalmente entre a subespécie de *C. lanatus* var. *citroides* que são cultivadas para alimentação animal (Navot & Zamir, 1987). Segundo Levi et al. (2001) os marcadores RAPD detectaram baixa variabilidade genética entre as melancia cultivadas cuja similaridade foi de 92%, indicando que novas fontes de variação necessitam ser exploradas tendo em

vista a importância socioeconômica da cultura no mundo e a falta de cultivares melhoradas para as condições nacionais.

Marcadores mais informativos têm sido igualmente aplicados no intuito de detectar polimorfismo entre espécies do gênero *Citrullus*. Katzir et al. (1996) detectaram polimorfismos apenas entre as variedades comerciais Sugar Baby e Malali (diploides) e Tri-X-313 (triploides) com base em sete marcadores microssatélites (SSR). Jarret et al. (1997) aplicando os mesmos marcadores detectaram diversidade genética entre plantas introduzidas de *Citrullus*, onde as plantas de *C. lanatus* var. *citroides* foram mais polimórficas do que as plantas de *C. lanatus* var. *lanatus*. Nimmakayala et al. (2009) detectaram 3089 bandas polimórficas (45%) entre 31 acessos de melancia a partir da combinação de 35 de *primers* AFLP, revelando um padrão de bandas específico para cada genótipo avaliado.

A divergência genética entre 197 acessos de melancia variou de 13 a 87%, revelando ampla faixa de variação entre acessos de melancia preservados no BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro (dados não mostrados). Diferindo consideravelmente dos resultados obtidos por Levi et al. (2005) que ao aplicar dados combinados de RAPD e ISSR em acessos de melancia e melão, observaram alta similaridade genética entre a melancia cultivada e plantas introduzidas de *C. lanatus* var. *lanatus* (82-87%), sendo que a maior distância genética foi identificada entre as plantas introduzidas de *C. lanatus* var. *lanatus* e *C. lanatus* var. *citroides* (55%), sendo a menor distância obtida entre *C. lanatus* var. *lanatus* e *C. colocynthis* (25%).

Análise de Agrupamento dos acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas

A Figura 1 mostra um esquema do dendrograma agrupando os 197 acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, cujos detalhes da distribuição dos mesmos foram mostrados na Tabela 4. O dendrograma apresentou dois principais grupos. O grupo I foi formado por dois acessos coletados na África [*C. colocynthis* (T4339) e *C. lanatus* var. *citroides* (T213)] que foram introduzidos no BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro devido, principalmente às características de resistência a patógenos. A espécie *C. colocynthis* é nativa do deserto africano (centro primário de diversificação), sendo conhecida como maçã amarga e muito

utilizada como medicinal desde os tempos mais remotos. A referida espécie apresenta diferentes linhagens, que migraram da África para Ásia tropical e Mediterrânea e se encontra amplamente distribuída em regiões filogeográficas da África ao Oriente Médio. A essência de linhagens divergentes é atribuída à restrita migração e fluxo gênico entre populações de regiões distantes e às diferenças no tamanho das populações de haplótipos divergentes com padrão diferencial de adaptação ambiental (Dane et al., 2007).

Segundo Assis et al. (2000), a subespécie *C. lanatus* var. *citroides* é originária da África meridional, sendo um híbrido natural entre *C. lanatus* e *C. colocynthis*, com ocorrência no Brasil.

O grupo II foi constituído por todos os acessos coletados em áreas de agricultura tradicional, sendo dividido em dois subgrupos. O subgrupo I foi dividido em dois pequenos grupos, um contendo nove acessos de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* coletados em Mirangaba (BA) (T180 a T185, T187 e T190) e mais três acessos da subespécies *C. lanatus* var. *lanatus*, sendo um comercial (T192 - New Hampshire Midget; 195 - Barreiros, BA e T198 - Petrolina, PE). O outro grupo foi constituído por sete acessos, sendo dois da subespécie *C. lanatus* var. *citroides* e cinco de *C. lanatus* var. *lanatus*, todos originários da região de Mirangaba - BA. Este padrão de agrupamento revela que possivelmente acessos de *C. lanatus* contém genes de *C. lanatus* var. *citroides*, como relatado por Assis et al. (2000).

O marcador DAF apresentou habilidade em separar os genótipos de *C. lanatus* var. *citroides* adaptados às condições do Nordeste brasileiro dos acessos introduzidos da África, revelando nível de divergência que variou de 47% (T213 x T187) a 67% (T213 x T180). Essa divergência pode ser atribuída ao fato das diferentes subespécies de *C. lanatus* encontrarem-se no Nordeste brasileiro há mais de 300 anos, sendo submetidas a tratos culturais e seleção artificial diferenciados por parte dos pequenos agricultores de áreas de cultivo tradicional (Romão et al., 2008).

No subgrupo II há duas subdivisões. A primeira subdivisão comporta dois conjuntos de acessos. O primeiro conjunto foi formado por acessos que constituíram grupos individuais e que foram coletados em diferentes estados do Nordeste brasileiro, sendo quatro do Maranhão (T95, T96, T98 e T110), quatro da

Bahia (T45, T46, T79 e T154), quatro do Piauí (T134, T136, T140 e T141) e dois do Rio Grande do Norte (T144 e T147) (Figura 1).

Já o segundo conjunto de acessos foi constituído por 121 acessos que foram separados em quatro pequenos grupos. No primeiro grupo foram alocados dezessete acessos, entre esses oito foram coletados na década de 80 em Petrolina - PE e municípios próximos e que estão preservados no BAG de Cucurbitáceas há 29 anos. Estes acessos apresentaram distância genética que variou 39 a 62% comparativamente a acessos que foram recentemente coletados em Massaroca, distrito de Juazeiro - BA, cuja distância entre regiões é de 61 km, indicando que o germoplasma de melancia dessas localidades sofre forte pressão de seleção por parte dos agricultores, tendo em vista que se trata de regiões onde o cultivo de melancia para fins comerciais é expressivo.

Romão et al., (2008) descreveram uma pesquisa anterior onde foram caracterizados trinta e nove acessos coletados na BA, MA e Depressão Sertaneja, revelando ampla variabilidade entre os acessos de melancia com relação às características de fruto, planta e semente. Entre os acessos caracterizados pelos autores 11 participam do presente estudo, confirmando a variabilidade genética inicialmente indicada pelo referido autor. A importância da caracterização morfológica implica na detecção de caracteres de interesse agrônomo, contudo a avaliação molecular complementa os referidos estudos eliminando principalmente efeitos de ambiente.

A fase de caracterização morfológica dos acessos de melancia tem revelado importantes caracteres agrônomo. Nos estudos realizados por Romão *et al.* (2008) foram relatados não só os descritores de maior relevância na discriminação dos acessos de melancia, como também a contribuição relativa dos mesmos para a variabilidade genética da espécie. Vale salientar que muitos dos genes descritos até então para melancia (Guner & Wehner, 2004) apresentaram-se de forma dispersa no Nordeste brasileiro, como o gene *golden* (*go*) que confere fruto de casca amarela, podendo servir como indicador da maturação dos mesmos. Entre os acessos selecionados para análise que apresentaram este gene citam-se: T128 coletado em São Luís Gonzaga (MA) e T239 resgatado em Massaroca (BA) (Tabela 1).

Caracteres mais complexos também têm sido estudados, como de frutos partenocárpicos (Lima Neto e Queiroz, comunicação pessoal), tamanho de frutos, cor de polpa e resistência a vários patógenos (Borges, 1996; Dias et al., 1999; Oliveira et al., 2002; Silveira, 2009). Vale salientar que genes de resistência a diferentes patógenos têm sido identificados entre os acessos de melancia conservados no BAG de Cucurbitáceas. A partir dos resultados de Oliveira *et al.* (2002), Silveira et al. (2005) avaliaram acessos de melancia coletados em Petrolina - PE (87-019; 87-029), Bahia (91-043 - Itaguaçu) e Maranhão (91-080 - Paraibano), bem como acessos introduzidos (*C. colocynthis* e *C. lanatus* var. *citroides*) para identificação de fontes de resistência a três potyvirus, sendo detectadas plantas não infectadas com PRSV-W nos acessos 87-019, 91-080 e em quatro plantas introduzidas; plantas não infectadas com WMV nos acessos 87-019 e 87-029 e plantas não infectadas com o ZYMV nos acessos 87-029, 91-080, 91-043 e em três plantas introduzidas.

Lima Neto (2009) avaliou genótipos de melancia quanto à expressão de alternariose (*Alternaria cucumerina*) em dois ambientes, revelando a existência de interação G x A na avaliação de genótipos de melancia quanto à resistência à alternariose no submédio São Francisco, sendo a maior parte da variância fenotípica observada atribuída a fatores genéticos (74,5%). O acesso 91-0043, coletado na Bahia foi indicado como fonte consistente para resistência à alternariose, sendo frequentemente observadas entre o acesso plantas com resistência ao patógeno.

No segundo conjunto de acessos de melancia do subgrupo II foram alocados 34 acessos coletados principalmente no Piauí (quatro acessos), Rio Grande do Norte (oito) e Maranhão (19 acessos), o que pode refletir o efeito fundador, considerando que poucos genótipos foram introduzidos na época do Brasil Colônia, tornando-se dispersos com a ocupação do Nordeste brasileiro (Romão et al., 2008). O terceiro e o quarto conjunto de acessos do subgrupo II foram constituídos por 23 e 46 acessos, respectivamente, de melancia coletados predominantemente na Bahia e seis acessos oriundos de pequenos municípios do Maranhão.

Já no topo do dendrograma observa-se o agrupamento de acessos de melancia coletados em diferentes pólos de cultivo, em Massaroca (BA) e em outros

municípios vizinhos a Juazeiro (BA), sendo divididos em três grupos de acessos quanto ao local de coleta.

No primeiro grupo, quatro acessos de melancia se destacam dos demais, por apresentar caracteres morfológicos diferenciados (T200, T201, T203 e T204), sendo as sementes semelhantes às de abóbora em forma, cor e tamanho. As plantas de modo geral apresentam características contrastantes com relação ao tamanho das folhas e flores, que nos quatro acessos foram hermafroditas. O desenvolvimento diferenciado dos acessos de melancia remete a uma condição poliploide, sendo maiores e mais robustos que os diploides, sendo indicada análise citogenética para confirmação (Souza & Queiróz, 2004).

O agrupamento dos acessos coletados em Massaroca separado dos outros acessos coletados em Juazeiro reflete certa tendência a uniformidade genética muito comum em áreas de cultivo intenso. Em Massaroca os agricultores promovem a seleção das sementes para o próximo plantio, prática que ocorre há mais de 40 anos (Queiróz, 1993).

No presente estudo o marcador DAF foi importante para a caracterização de acessos de melancia, com a indicação de que os mesmos apresentam ampla variabilidade genética.

Estrutura da variabilidade genética existente no BAG de Cucurbitáceas

As populações de melancia no conjunto do centro de cultivo (agricultura tradicional) foram estruturadas em função do local de coleta, principalmente dentro e entre locais de coleta em diferentes níveis hierárquicos (níveis, 1, 2 e 3) (Tabela 3). Comparando-se os resultados, observa-se menor variação sempre entre os locais de coleta [Estados (13,89%), regiões (20,40%) e municípios (10,48%)]. Dois processos evolutivos podem estar associados aos resultados: deriva genética e fluxo gênico.

Segundo (Romão et al., 2008) a melancia foi introduzida no Brasil há cerca de 300 anos com os escravos africanos, sendo mantida na agricultura tradicional, principalmente por ação antrópica. Desta forma, considera-se que as populações de melancia mais recentes ainda estejam sob a influência do efeito fundador, com menor variação genética entre populações de melancia entre os respectivos locais de coleta. O hábito de cultivar melancia de modo tradicional em

geral ocorre em áreas pequenas, onde o processo de endogamia é favorecido e com isto a deriva genética pode levar a maior divergência entre roças.

Os maiores índices de variação genética foram observados dentro dos diferentes níveis hierárquicos: Dentro dos estados - 86,40%; dentro dos estados quando se consideraram suas regiões, seja dos municípios ou grupo de municípios vizinhos - 73,70% e Dentro de municípios ou grupos de municípios - 72,16%), confirmando os resultados obtidos com os estudos iniciais feitos com amostra reduzida de acessos e baseados em caracteres morfológicos (Ferreira et al., 2002; Romão et al., 2008) ou com estudos moleculares, (Capeloto, 2003; Silva et al., 2006).

Esses resultados indicaram claramente a necessidade de se continuar com os processos de coleta de germoplasma de melancia no Nordeste brasileiro, principalmente em áreas ainda não contempladas (Paraíba, Ceará, Alagoas e Sergipe), para que o BAG de melancia para o Nordeste Brasileiro seja representativo da variabilidade genética da melancia existente nas diversas regiões.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Semiárido e ao Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) pelo acesso aos materiais depositados em seus bancos genéticos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) agradecemos pelo apoio na forma de auxílio financeiro ou bolsas.

Referências

- Assis, J.G.A., Queiróz, M.A., Araújo, S. M. C., Bandel, G., Martins, P. S., 2000 Implications of the introgression between *Citrullus colocynthis* and *C. lanatus* traits in the taxonomy, evolutionary dynamics and breeding of watermelon. Plant Genetic Resources Newsletter 121:15-19.
- Borges, R.M.E. 1996. Estudo da herança ao oídio *Sphaerotheca fuliginea* (Schechte ex. Fr.) em melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.]. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 71p.
- Caetano-Anollés, G. 1993 Amplifying DNA with Arbitrary Ollgonucleotide Primers Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 1054-9803/93, 3:85-94.
- Capeloto, A., 2003 Caracterização molecular entre e dentro de acessos de melancia através de RAPD-PCR. (Dissertação Mestrado), UNESP/Universidade Estadual do Paulista. Jaboticabal, 70 p.
- Dane, F., Liu, J., Zhang, C. 2007 Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. Genetic Resources and Crop Evolution 54:327-336.
- Dias R. C.S., Queiroz, M.A.; Menezes, M., Borges, R.M.E., 1999. Avaliação de resistência a *Sphaerotheca fuliginea* e a *Didymella bryoniae* em melancia. Horticultura Brasileira 17:13-19.
- Djè, Y., Tahi, C.G., Zoro, A.I., Baudoin, J.P., Bertin, P., 2010. Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded *Citrullus lanatus* landraces. Scientia Horticulturae 124:159-164.
- Excoffier, L., Laval, G, Schneider, S., 2006 Arlequin ver 3.1 An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. URL: <http://cmpg.unibe.ch/~software/Arlequin3>.

- Ferreira, M.A.J.F., Braz, L.T., Queiróz, M.A., Vencovsky, R., 2002 Capacidade de combinação em sete populações de melancia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37:963-970.
- Guner, N., Wehner, T., 2004 The genes of watermelon. *HortScience* 39:1175-1182.
- IBGE. *Produção Agrícola*. Disponível: site Sistema IBGE de recuperação Automática - SIDRA (2008). Disponível no site: <[http:// www.sidra.ibge.gov.br/cginbin](http://www.sidra.ibge.gov.br/cginbin)>. Consultado em: 20/10/09
- Jarret, R.L., Merrick, L.C., Holms, T., Evans, J., Aradhya, M.K., 1997 Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai]. *Genome* 40:433-441.
- Katzir, N., Danin-Poleg, T., TZURI, G., KARCHI, Z., 1996 Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theoretical and Applied Genetic* 93:1282-1292.
- Levi, A., Thomas, C.E., Wehner, T.C., Zhang, X., 2001 Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. *HortScience* 36:1096-1101.
- Levi, A., Thomas, C.E., Simmons A.M., Thies, J.A., 2005 Analysis based on RAPD and ISSR markers reveals closer similarities among *Citrullus* and *Cucumis* species than with *Praecitrullus fistulosus* (Stocks) Pangalo. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:465-472.
- Lima Neto, I.S., 2009 Interação genótipo x ambiente na reação de progênes de melancia à alternariose no Submédio São Francisco. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN. 73p.

- Navot, N., Zamir, D., 1987 Isozyme and seed protein phylogeny of the genus *Citrullus* (Cucurbitaceae). *Plant Systematic Evolution* 156:61-67.
- Nimmakayala, P., Tomason, Y.R., Jeong, J., Ponniah, S.K., Karunathilake, A. Levi, A., Perumal, R., Umesh, K., 2009 Genetic reticulation and interrelationships among *Citrullus* species as revealed by joint analysis of shared AFLPs and species-specific SSR alleles. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 1-10.
- Oliveira, V.B., Queiróz, M.A., Lima, J.A.A., 2002 Fontes de resistência em melancia aos principais potyvirus isolados de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. *Horticultura Brasileira* 20:589-592.
- Queiróz, M.A., 1993 Potencial do Germoplasma de Cucurbitáceas no Nordeste Brasileiro. *Horticultura Brasileira* 11:7-9.
- Rohlf, F. J., 1998 NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. Exeter software Setauket, 32:97-127.
- Romão, R. L., Assis, J. G. A., Queiroz, M. A., 2008 Melancia: História africana de dar água na boca. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. (ed.) Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, pp.553-573.
- Silva, M.L.S., Queiroz, M.A., FERREIRA, M.A.J.F., BUSO, G.S.C., 2006 Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. *Horticultura Brasileira* 24:405-409.
- Silva, M.L., Queiróz, M.A., Ferreira, M.A.J.F., Aragão, C.A., 2007 Variabilidade genética de acessos de melancia coletados em três regiões do estado da Bahia. *Caatinga* 20:93-100.

- Silveira, L.M., Queiróz, M.A., Lima, J.A.A., NEGREIROS, M.Z., Ramos, N.F., Nascimento, A.K.Q., 2005 Seleção de acessos e progênies de *Citrullus* spp. para resistência a três potyvirus. *Fitopatologia Brasileira* 30:394-399.
- Silveira, L.M., Queiróz, M.A., Lima, J.A.A., Nascimento, A.K.Q., Lima Neto, I.S., 2009 Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. *Tropical Plant Pathology* 34:123-126.
- Souza, F.F., Queiróz, M.A., 2004 Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. *Horticultura Brasileira* 22:516-520.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G., 2005 DNA fingerprinting in plants. Principles, Methods and Applications. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Cold Spring Harbour, New York, USA, 444 pp.

Anexos

Tabela 1. Acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas avaliados com marcadores DAF, com respectivos grupos, locais de coleta (estados, regiões e municípios), número de acessos de cada região e espécies

Grupo	Estado/País	Região	Municípios	Nº de acessos	Espécies
Conjunto 1	África	região 1	Turkmeskistan	1	<i>C. colocynthis</i>
			South Africa	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
Conjunto 2	PI	região 1	União	2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			José de Freitas	3	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Altos	2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Monseñor Gil	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 2	Agricolândia	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Regeneração	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
	PE	região 3	Petrolina	4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Barreiros	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Lagoa dos Cavalos	2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 4	Ouricuri	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
	MA	região 5	Paraibano	2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Pastos Bons	3	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 6	São Luís	13	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 7	Turiçu	4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 8	Codó	8	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			São L. Gonzaga	5	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 9	Nova Iorque	2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 10	Fortaleza dos Nogueira	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 11	Frechal Mirinzal	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
	BA	região 12	Jacobina	18	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Mirangaba	22	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>
			Ouroândia	4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 13	Ibititá	2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Ibipeba	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Canarana	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Barro Alto	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Am. Dourada	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 14	Pres. Dutra	3	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			São Gabriel	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 15	Uauá	1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 16	Canoa	3	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Oliveira	5	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		Juazeiro	Papagaio	4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Curral Novo	2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Lagoinha	4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Caldeirão do Tibério	5	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Massaroca	16	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			UNEB	4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
			Melancia/Abóbora	4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 17	Vitória da Conquista	10	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
		região 18	Itaguaçu	8	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
	RN	região 19	Mossoró	10	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>
Conjunto 3					Pérola
Comerciais					<i>C. sweet</i>
					Smile
				8	Sugar Baby
					<i>C. Gray</i>
					New Hampshire Midge
					Peacock Improved
					Mickelee
Total	5	20	42	197	

Tabela 2. *Primers* DAF selecionados para amplificação do DNA de 197 acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, com suas respectivas sequências, número de bandas monomórficas e polimórficas.

Primer	Sequência	Monomórficas	Polimórficas	Total de Bandas
OPA19	3'-CAAACGTCGG-5'	8	7	15
OPA01	3'-CAGGCCCTTC-5'	5	8	13
OPB14	3'-TCCGCTCTGG-5'	3	9	11
OPC06	3'-GAACGGACTC-5'	0	7	7
OPF16	3'-GGAGTACTGG-5'	4	9	13
OPE01	3'-CCCAAGCTCC-5'	4	4	8
OPE14	3'-TGCGGCTGAG-5'	3	7	10
OPO15	3'-TCGCCTCCTT-5'	3	12	15
OPO07	3'-CAGCACTGAC-5'	6	6	12
OPAX14	3'-CACGGGCTTG-3'	3	11	14
OPS18	3'-CTGGCGAACT-5'	5	6	11
OPO10	3'-TCAGAGCGCC-5'	4	9	13
OPB15	3'-GGAGGGTGTT-5'	0	13	13
OPC15	3'-GACGGATCAG-5'	4	12	16
OPD18	3'-GAGAGCCAAC-5'	17	6	23
P15-10	AGGTCTTGGGTATAA	7	15	22
Total		75	141	216

Tabela 3. Análise de variância molecular de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas coletados em áreas de agricultura tradicional do Nordeste brasileiro em diferentes níveis hierárquicos, obtida com marcador DAF

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Nível 1				
Entre Estados	4	481,237	3,811 va	13,89
Dentro de Estados	181	4276,94	23,629 vb	86,11
Total	185	4.758,177	27,441	
Fixation Index	FST:	0,13891		
Nível 2				
Entre Estados	4	480,183	1,606 va	5,91
Entre regiões e dentro de Estados	14	935,786	5,544 vb	20,40
Dentro de Estados	168	3365,99	20,036 vc	73,70
Total	186	4781,96	27,187	
Fixation Index		FSC:0,217	FST: 0,263	FCT: 0,059
Nível 3				
Entre Regiões	18	1415,96	4,62 va	17,37
Entre municípios e dentro de regiões	15	428,437	2,787 vb	10,48
Dentro de Regiões	153	2937,56	19,199 vc	72,16
Total	186	4781,96	26,608	
Fixation Index		FSC: 0,127	FST: 0,278	FCT: 19,199

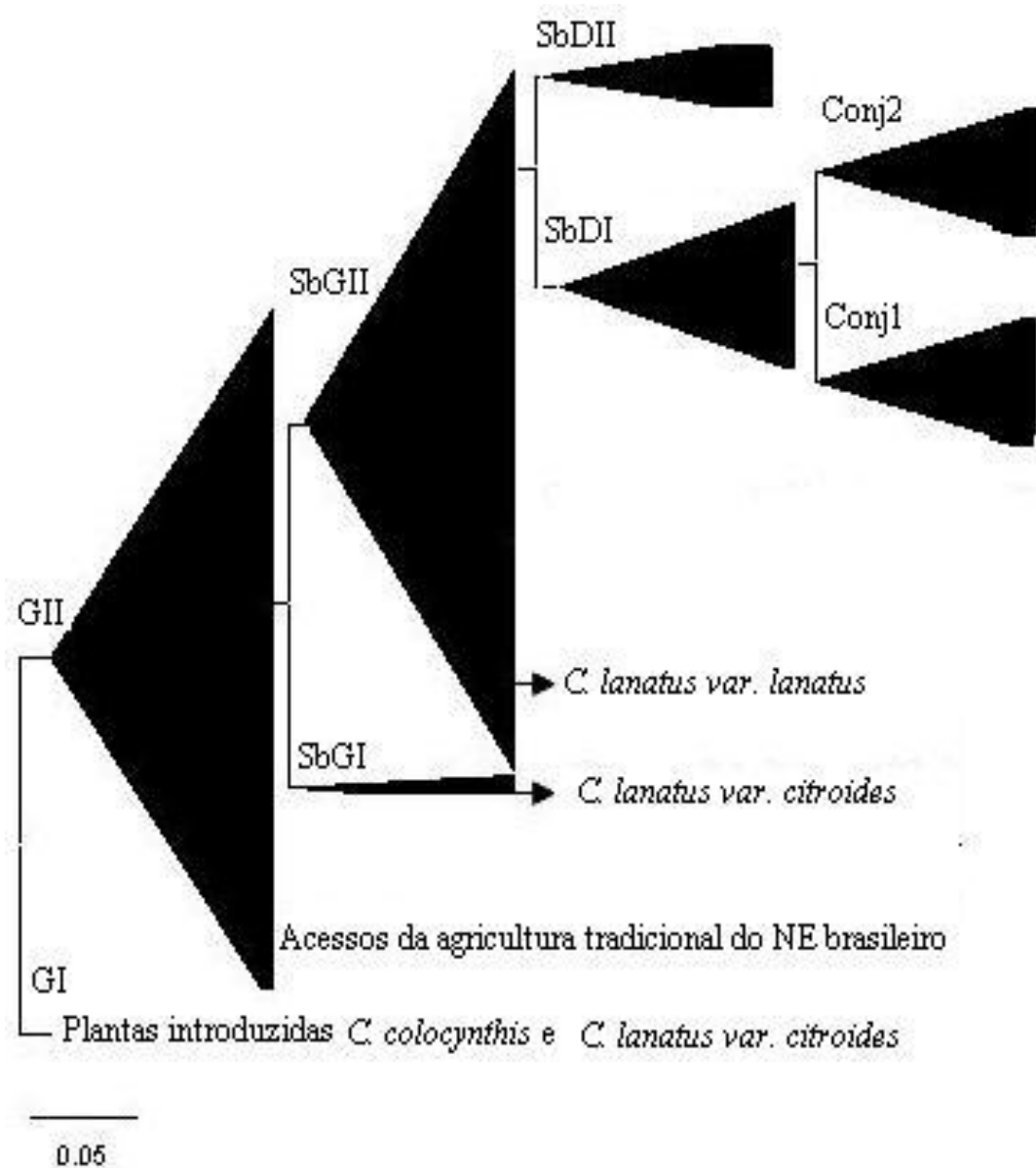


Figura 1. Esquema do dendrograma DAF de 197 acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro.

Tabela 4. Distribuição dos acessos de melancia em grupo, subgrupos, subdivisões e conjuntos, segundo o dendrograma produzido por meio do marcador DAF no programa NTSYs

Acessos GI		Acessos GII														
	Subgrupo I									Subgrupoll						
		Subdivisão I														
											Subdivisão II					
		Conj 1	Conj 2													
			Conj.2.1.1	Conj. 2.1.2			Conj. 2.1.3		Conj. 2.1.4		Conj. 1	Conj. 2		Conj.3		
<i>C. lanatus</i> 213	<i>C. l. citroides</i> 180	<i>C. lanatus</i> 110	<i>C. lanatus</i> 229	<i>C. lanatus</i> 117	<i>C. lanatus</i> 128	<i>C. lanatus</i> 231	<i>C. lanatus</i> 68A	<i>C. lanatus</i> 90	<i>C. lanatus</i> 31	<i>C. lanatus</i> 39	<i>C. lanatus</i> 200	<i>C. lanatus</i> 253	<i>C. lanatus</i> 204	<i>C. lanatus</i> 108	<i>C. lanatus</i> 1	
<i>C. colocynthis</i> 4339	<i>C. l. citroides</i> 181	<i>C. lanatus</i> 154	<i>C. lanatus</i> 226	<i>C. lanatus</i> 119	<i>C. lanatus</i> 129	<i>C. lanatus</i> 232	<i>C. lanatus</i> 68B	<i>C. lanatus</i> 93	<i>C. lanatus</i> 37	<i>C. lanatus</i> 33	<i>C. lanatus</i> 201	<i>C. lanatus</i> 254		<i>C. lanatus</i> 255	<i>C. lanatus</i> 2	
	<i>C. l. citroides</i> 182	<i>C. lanatus</i> 134	<i>C. lanatus</i> 223	<i>C. lanatus</i> 142	<i>C. lanatus</i> 120	<i>C. lanatus</i> 233	<i>C. lanatus</i> 61	<i>C. lanatus</i> 94	<i>C. lanatus</i> 24	<i>C. lanatus</i> 53	<i>C. lanatus</i> 203	<i>C. lanatus</i> 251		<i>C. lanatus</i> 13		
	<i>C. l. citroides</i> 183	<i>C. lanatus</i> 136	<i>C. lanatus</i> 222	<i>C. lanatus</i> 143	<i>C. lanatus</i> 109	<i>C. lanatus</i> 234	<i>C. lanatus</i> 62	<i>C. lanatus</i> 80	<i>C. lanatus</i> 48	<i>C. lanatus</i> 28		<i>C. lanatus</i> 247		<i>C. lanatus</i> 15		
	<i>C. l. citroides</i> 184	<i>C. lanatus</i> 95	<i>C. lanatus</i> 224	<i>C. lanatus</i> 150	<i>C. lanatus</i> 116	<i>C. lanatus</i> 235	<i>C. lanatus</i> 56B	<i>C. lanatus</i> 81	<i>C. lanatus</i> 49	<i>C. lanatus</i> 25		<i>C. lanatus</i> 248		<i>C. lanatus</i> 20		
	<i>C. l. citroides</i> 185	<i>C. lanatus</i> 96	<i>C. lanatus</i> 221	<i>C. lanatus</i> 153	<i>C. lanatus</i> 111	<i>C. lanatus</i> 227	<i>C. lanatus</i> 57	<i>C. lanatus</i> 82	<i>C. lanatus</i> 51	<i>C. lanatus</i> 26		<i>C. lanatus</i> 249		<i>C. lanatus</i> 16		
	<i>C. l. citroides</i> 187	<i>C. lanatus</i> 98	<i>C. lanatus</i> 193	<i>C. lanatus</i> 148	<i>C. lanatus</i> 104	<i>C. lanatus</i> 228	<i>C. lanatus</i> 55	<i>C. lanatus</i> 83	<i>C. lanatus</i> 41	<i>C. lanatus</i> 27		<i>C. lanatus</i> 238		<i>C. lanatus</i> 12		
	<i>C. l. citroides</i> 190	<i>C. lanatus</i> 78	<i>C. lanatus</i> 194	<i>C. lanatus</i> 149	<i>C. lanatus</i> 132	<i>C. lanatus</i> 75		<i>C. lanatus</i> 87	<i>C. lanatus</i> 42	<i>C. lanatus</i> 29		<i>C. lanatus</i> 252		<i>C. lanatus</i> 4		
	<i>C. lanatus</i> 198	<i>C. lanatus</i> 140	<i>C. lanatus</i> 177	<i>C. lanatus</i> 146	<i>C. lanatus</i> 112	<i>C. lanatus</i> 69		<i>C. lanatus</i> 88	<i>C. lanatus</i> 54	<i>C. lanatus</i> 22		<i>C. lanatus</i> 250		<i>C. lanatus</i> 5		
	<i>C. lanatus</i> 192	<i>C. lanatus</i> 141	<i>C. lanatus</i> 179	<i>C. lanatus</i> 151	<i>C. lanatus</i> 115	<i>C. lanatus</i> 63		<i>C. lanatus</i> 89	<i>C. lanatus</i> 46	<i>C. lanatus</i> 23		<i>C. lanatus</i> 244		<i>C. lanatus</i> 7		
	<i>C. lanatus</i> 195	<i>C. lanatus</i> 178	<i>C. lanatus</i> 174	<i>C. lanatus</i> 152	<i>C. lanatus</i> 107	<i>C. lanatus</i> 64		<i>C. lanatus</i> 79	<i>C. lanatus</i> 47	<i>C. lanatus</i> 21		<i>C. lanatus</i> 245		<i>C. lanatus</i> 3		
	<i>C. lanatus</i> 60	<i>C. lanatus</i> 147	<i>C. lanatus</i> 175	<i>C. lanatus</i> 145	<i>C. lanatus</i> 105	<i>C. lanatus</i> 66		<i>C. lanatus</i> 84	<i>C. lanatus</i> 43	<i>C. lanatus</i> 32		<i>C. lanatus</i> 246		<i>C. lanatus</i> 17		
	<i>C. l. citroides</i> 58B	<i>C. lanatus</i> 144	<i>C. lanatus</i> 161	<i>C. lanatus</i> 137	<i>C. lanatus</i> 100	<i>C. lanatus</i> 65		<i>C. lanatus</i> 85	<i>C. lanatus</i> 40			<i>C. lanatus</i> 239		<i>C. lanatus</i> 10		
	<i>C. lanatus</i> 56A	<i>C. lanatus</i> 44	<i>C. lanatus</i> 162	<i>C. lanatus</i> 135	<i>C. lanatus</i> 101	<i>C. lanatus</i> 67		<i>C. lanatus</i> 86	<i>C. lanatus</i> 38			<i>C. lanatus</i> 243		<i>C. lanatus</i> 11		
	<i>C. lanatus</i> 58A	<i>C. lanatus</i> 45	<i>C. lanatus</i> 164	<i>C. lanatus</i> 138	<i>C. lanatus</i> 102	<i>C. lanatus</i> 70		<i>C. lanatus</i> 76	<i>C. lanatus</i> 36			<i>C. lanatus</i> 241		<i>C. lanatus</i> 18		
	<i>C. lanatus</i> 50A		<i>C. lanatus</i> 157	<i>C. lanatus</i> 106	<i>C. lanatus</i> 103	<i>C. lanatus</i> 74		<i>C. lanatus</i> 77	<i>C. lanatus</i> 34			<i>C. lanatus</i> 240		<i>C. lanatus</i> 9		
	<i>C. lanatus</i> 52		<i>C. lanatus</i> 158	<i>C. lanatus</i> 127				<i>C. lanatus</i> 30	<i>C. lanatus</i> 35			<i>C. lanatus</i> 236		<i>C. lanatus</i> 19		
	<i>C. l. citroides</i> 58A											<i>C. lanatus</i> 237		<i>C. lanatus</i> 8		

Anexo 7

Instruções para autores da Revista *Crop Science*

Instructions to Authors of Manuscripts for *Crop Science* (2007)

General Requirements

Full papers must be either reports of original research, critical reviews, or interpretive articles. The journal also publishes crop registration papers, short communications, book reviews, and letters to the editor. Submissions to *Crop Science* must not be previously published in or simultaneously submitted to any other scientific or technical journal. For the policy regarding publishing in nontechnical outlets, see *Publications Handbook and Style Manual* (ASA-CSSA-SSSA, 2004).

Scope

Crop Science is the normal channel for publication of papers in plant genetics; breeding; cytology; metabolism; physiology; ecology; turfgrass; weed science; crop quality, production, and utilization; genomics, molecular genetics, and biotechnology; and plant genetic resources.

Articles reporting experimentation or research in field crops or reviews or interpretation of such research will be accepted for review as papers. For research involving controlled environments, see https://www.crops.org/publications/forms_resources/ for guidelines. Short articles concerned with experimental techniques, apparatus, or observation of unique phenomena will be accepted for review as short communications. Letters to the editor are welcomed and are published subject to review and approval of the editor. When letters concern previous articles, the authors will be invited to reply; letter and reply are published together.

Submission Procedures and Preparation

Full-Length Manuscripts and Reviews

All manuscripts should be submitted through the online submission tool (<http://mc.manuscriptcentral.com/crop>). Detailed instructions can be found at this site, along with instructions related to logging on to the *Crop Science* Manuscript Central system.

Creating the manuscript files. Submit the main text document in a common word processing file. LaTeX or other typeset formats are not allowed. Manuscript Central will convert your original files into PDF format; please check this PDF “proof” before submitting. Check any Greek characters and figures carefully. If you have a character conversion, fix your word processing file by embedding fonts (in Word, go to Tools/Options/“Save” tab, and check “Embed TrueType Fonts”). If there is an error in the PDF you cannot fix, mention it in the cover letter so the editors and eventually Headquarters will be aware of the problem.

On the first page, give the title, a byline with the names of all authors, an author–paper documentation footnote, a list of all nonstandard abbreviations used in the paper (standard abbreviations available on p. 22 of the style manual, <https://www.crops.org/publications/style/>), and any other necessary footnotes. An abstract is required and is normally the second manuscript page. After the title page and abstract, the usual order of sections is an untitled introduction (which includes the literature review), Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions (optional), Acknowledgments (optional), and References, followed by any figure captions and

the tables. Results and Discussion may be combined and conclusions can be given at the close of the Discussion section. Start each section (including figure captions and tables) on a new page and number all pages.

Figures. Submit figures in high-resolution, individual files (one figure per file). All panels of one figure need to be in the same single file and on the same page if possible. Check your figures in the PDF proof generated by Manuscript Central, as the figures in the PDF may be used for publication. TIFF or EPS files are best for resolution (don't insert these files into a word processing document because this will reduce resolution). Width of figures should approximate desired print size, i.e., 3 ¼ inches for a one column figure, 7 inches for a two column figure. *PowerPoint files should be avoided.* Photographs and drawings for graphs and charts should be prepared with good contrast of dark and light. Give careful attention to the width of lines and size and clarity of type and symbols. Variables (e.g., *r*, *x*, *y*) should be italicized.

A figure caption should be brief, but sufficiently detailed to tell its own story. Specify the crop or soil involved, the major variables presented, and the place and year. Identify curves or symbols in a legend within the figure itself, not in the caption. Define abbreviations in the caption. Define symbols used in the caption or in the legend. Be sure to indicate the scale for micrographs, either in the illustration or the caption.

Tables. Prepare tables with the tables feature in your word processor; do not use tabs, spaces, or graphics boxes. Each datum needs to be contained in an individual cell. Number tables consecutively. Table heads should be brief but complete and self-contained. Define all variables and spell out all abbreviations. Tables should be placed at the end of the main text document.

The *, **, and *** are always used in this order to show statistical significance at the 0.05, 0.01, and 0.001 probability levels, respectively, and cannot be used for other notes. Significance at other levels is designated by a supplemental note. Lack of significance is usually indicated by NS.

For table footnotes, use the following symbols in this order: †, ‡, §, ¶, #, ††, ‡‡,.... Cite these symbols just as you would read a table—from left to right and from top to bottom, and reading across all spanner and subheadings for one column before moving on to the next.

An exponential expression (e.g., $\times 10^{-3}$) in the units line is often necessary to keep the length of data values reasonably short. This ambiguous expression must be referenced with an explanatory note.

Title and byline. A title gives the reader a clear idea of what the article is about; it should be brief and informative. Use common names for crops and avoid abbreviations. The usual limit for titles is 10 to 12 words (not counting “and,” “of,” and similar conjunctions and prepositions). Titles in a numbered series of articles may be longer.

Below the title, list the names of all authors. Place an asterisk after the name of the corresponding author (i.e., the person from whom reprints are to be requested).

Author–paper documentation. The author–paper documentation is a single paragraph. The first sentence lists the authors (without professional titles) and their complete, current addresses. If a paper has only one author, or if all authors are from the same department and institution, omit the names (i.e., give the address only).

The second sentence lists institutional sponsors, with the institutional article number of similar contribution acknowledgment. Add such an acknowledgment if an author has moved and using the current address leaves no other mention of the involvement of the former institution. Other information such as granting, funding, or dissertation status may follow.

End the author–paper documentation paragraph with these two statements: “Received _____.” *Corresponding author (e-mail).” The date received will be filled in by an editor.

Abbreviations. Prepare a list in alphabetical order of abbreviations used in your article. Do not include SI units, chemical abbreviations, or most common abbreviations such as those listed in the style manual.

Footnotes. Footnotes are discouraged in text, but may be used when needed (typically for a product disclaimer). Number any footnotes consecutively.

Abstract. Abstracts are a single self-contained paragraph of no more than 1500 characters – including word spaces – for papers or 750 characters for Notes. Abstracts should contain the rationale, objectives, methods, results, and their meaning or scope of application. Be specific. Identify the crops or organisms involved, the soil type, chemicals, and other details that are pertinent to the results. Do not cite references.

Nomenclature and identification of materials. Give the complete binomial and authorities at first mention (in Abstract or text) of plants, pathogens, and insects or pests.

Units of measure. The SI system (Système International de Unités) is required in *Crop Science*. Other units may be indicated in parentheses after the SI unit if this helps understanding or is needed for replication of the work.

References. The author–year notation system is required; do not use numbered notation. In the list, arrange references alphabetically by author. All single-author entries precede multiple-author entries for the same first author. Use chronological order only within entries with identical authorship (alphabetizing by title for same-author, same-year entries). Add a lowercase letter a, b, c, etc. to the year to identify same-year entries for text citation. Do this also for any multiple-author entries that would otherwise result in identical citations in the text.

Cover submissions. If you have any images which highlight your paper, you may submit them along with your paper in the Manuscript Central system. Please be sure to label as “image” (not “figure”). Cover images need to be at least 300 dpi at actual size; further electronic image specifics can be found at https://www.crops.org/publications/forms_resources/. Otherwise, a slide or glossy print provides high resolution and can be submitted directly to the Headquarters office on acceptance of your manuscript (attn: Managing Editor, *Crop Science*, 677 S. Segoe Road, Madison, WI 53711–1086). Be sure to label it with the manuscript number and title and provide a descriptive caption which will aid in the selection process.

Supplemental materials. If you wish to include supplemental materials, you need to include these files with your submission. Please label the file as “Supplemental File” when you upload.

Revisions. All revisions to the manuscript during the review process will be made by the author only, and revisions will be given the same manuscript number, with an R number on the end (e.g., CROP-2006–04–0017-ORA.R1). Each revision has the opportunity for another round

of review—the manuscript status “awaiting reviewer selection” is automatic and does not indicate a resubmission.

Publication Charges and Length of Manuscript

Full-length manuscripts accepted for publication in *Crop Science* are assessed a publication charge of \$450 for members and \$700 for nonmembers for the first seven pages; a charge of \$50 per page after seven pages is also assessed. Authors are charged \$10 per illustration, \$10 per table, and \$500 per page of color.

Membership in the Society is not a requirement for publishing in *Crop Science*; however, there is a differential in page charges for members and nonmembers. For manuscripts submitted on or after 1 Jan. 2008, to qualify for member rates, the corresponding author must be an active, emeritus, certification, sustaining member representative, graduate student, or dues-paying undergraduate student member of the Crop Science Society of America on the date the manuscript is accepted for publication.

Accepted Manuscripts

When your manuscript is accepted, you will receive notification from your technical or associate editor, and the accepted files (word processing, PDF, and figure files in any format) will automatically be sent to Headquarters. You will hear from Headquarters on receipt of your files. A hard copy is no longer required; the figure files submitted will be used for press. The only item you will need to send to Headquarters on acceptance is the completed Publish and Republish form (https://www.crops.org/publications/forms_resources/).

Useful References

- ASA–CSSA–SSSA. 2004. Publications handbook and style manual. 3rd ed. [Online]. Available at <https://www.crops.org/publications/style/> [verified 2 Feb. 2006]. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Crop Science Society of America, Terminology Committee. 1992. Glossary of crop science terms. Available at www.crops.org/cropgloss/ [verified 2 Feb. 2006]. CSSA, Madison, WI.
- USDA-ARS-National Genetic Resources Program. 2005. Germplasm Resources Information Network (GRIN) database. Available at www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxgenform.pl [verified 2 Feb. 2006]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, MD.
- USDA-NRCS Soil Survey Division. 2005. USDA-NRCS Official Soil Series Descriptions Enter By Name. Available at <http://ortho.ftw.nrcs.usda.gov/cgi-bin/osd/osdname.cgi> [verified 2 Feb. 2006].

15 Oct. 2007

9. PUBLICAÇÕES

Resumos

- Silva, ML; Queiroz, MA; Benko-Iseppon, AM; Amorim, L.L.B; Silveira, L. M. **Divergência genética entre espécies de *Citrullus*** (I Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2010);
- Silva, ML; Queiroz, MAC; Queiroz, MA; Santos, AL; Oliveira, RS; Silveira, LM; Ferreira, MAJF; Wenzel, O; Neto, ISL; Benko-Isepon, AM **Comportamento de acessos de maxixe quanto à germinação de sementes.** (54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008);
- Silva, ML; Queiróz, MA; Benko-Iseppon, AM; Cansanção, IF; Ferreira, MAJF; Lima Neto, IS; Silveira, LM. **Otimização do marcador DAF (DNA Amplification Fingerprinting) para análise de linhas avançadas de melancia.** (53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007);
- Lima Neto, IS; Queiróz, MA; Silveira, LM; Silva, ML.
 - Reação de acessos de melancia às queimas foliares provocadas por oídio e alternária;
 - Estimativa da heterose em populações F1's de *Citrullus lanatus* com *Citrullus lanatus* var. *citroides*;
 - Comportamento de acessos de melão do banco de germoplasma de cucurbitáceas do Nordeste brasileiro para resistência a *Alternaria* sp.;
 - Pegamento de frutos de melancia, *Citrullus lanatus* e *Citrullus lanatus* var. *citroides* em polinizações controladas;(4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007, São Lourenço – MG)
- Silva, ML; Queiróz, MA; Lima Neto, IS; Silveira, LM. **Multiplicação e avaliação preliminar de acessos de melancia coletados no município de Lajedão - BA.** (2º Workshop de Recursos Genéticos Vegetais do Estado da Bahia, 2006, Ilhéus - BA);
- Silva, ML; Queiróz, MA; Ferreira, MAJF; Silveira, LM; Lima Neto, IS; Buso, GSC. **Avaliação da variabilidade genética de melancia coletada em três regiões do Estado da Bahia por meio de marcadores RAPD.** (2º Workshop de Recursos Genéticos Vegetais do Estado da Bahia, 2006, Ilhéus-BA).

Artigos

- Lima Neto, Izaias da Silva; Queiróz, Manoel Abilio; Romão, Roberto Lisboa; Silveira, Lindomar Maria; Silva, Maria Luciene. Caracterização morfológica e divergência genética entre acessos de melancia. **Magistra**, v. 21, p. 321-330, 2008.
- Silva, Maria Luciene; Queiróz, Manoel Abilio; Ferreira, Maria Aldete J. F.; Aragão, Carlos A.; Variabilidade genética de acessos de melancia coletados em três regiões do Estado da Bahia. **Caatinga**, v 20, p. 93-100, 2007;
- Silva, Maria Luciene; Queiróz, Manoel Abilio, Ferreira, Maria Aldete, J. F.; Buso, Gláucia, S. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira** [Online], v. 24, p. 405-409, 2006.

10. Memorial do Aluno

Maria Luciene da Silva nasceu no dia 15 de novembro em Recife – PE. Coursou o ensino fundamental na escola pública Embaixador Gilberto Amado (Recife) e no ano de 1999 concluiu o ensino médio na escola Técnica Estadual Professor Agamêmnon Magalhães, com habilitação Técnica em Química. Graduou-se em Licenciatura Plena e Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco no ano 2001. Defendeu a dissertação de Mestrado em Genética através do Programa de Pós-Graduação em Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco em 2004, seguindo para o doutoramento em genética pela mesma instituição no ano de 2006, concluído em outubro de 2010.