

LEIDIANE BEZERRA ALBUQUERQUE

**REAÇÃO DE ACESSOS E CULTIVARES DE MELOEIRO A**  
*Pseudoperonospora cubensis* **E IDENTIFICAÇÃO DE**  
*Quantitative Trait Loci* **DE RESISTÊNCIA DO MELOEIRO**  
**AO MÍLDIO**

MOSSORÓ - RN

2014

LEIDIANE BEZERRA ALBUQUERQUE

**REAÇÃO DE ACESSOS E CULTIVARES DE MELOEIRO A  
*Pseudoperonospora cubensis* E IDENTIFICAÇÃO DE *Quantitative Trait*  
*Loci* DE RESISTÊNCIA DO MELOEIRO AO MÍLDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, como parte das exigências para obtenção do Grau de Mestre em Agronomia: Fitotecnia.

Orientadora: *D.Sc.* RAFAELA PRISCILA ANTONIO  
Coorientador: *D.Sc.* GLAUBER HENRIQUE DE SOUSA NUNES

MOSSORÓ - RN  
2014

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

A345r Albuquerque, Leidiane Bezerra.

Reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* e identificação de *Quantitative Trait Loci* de resistência do meloeiro ao míldio. / Leidiane Bezerra Albuquerque. -- Mossoró, 2014.

99f.: il.

Orientador: *D. Sc.* Rafaela Priscila Antonio.

Coorientador: *D. Sc.* Glauber Henrique de Sousa Nunes.

Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

1. *Cucumis melo* L.
  2. Germoplasma.
  3. Marcadores de DNA.
  4. Míldio.
- I. Título.

RN/UFERSA/BCOT /228-14

CDD: 636.39

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba

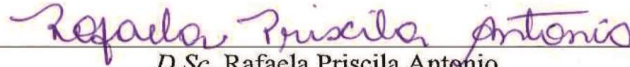
CRB-15/452

LEIDIANE BEZERRA ALBUQUERQUE

**REAÇÃO DE ACESSOS E CULTIVARES DE MELOEIRO A  
*Pseudoperonospora cubensis* E IDENTIFICAÇÃO DE *Quantitative Trait*  
*Loci* DE RESISTÊNCIA DO MELOEIRO AO MÍLDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, como parte das exigências para obtenção do Grau de Mestre em Agronomia: Fitotecnia.

APROVADA EM: 28/02/14



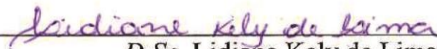
D.Sc. Rafaela Priscila Antonio  
Orientadora



D.Sc. Gláuber Henrique de Sousa Nunes  
Membro interno



D.Sc. Pedro Martins R. Júnior  
Membro externo



D.Sc. Lidiane Kely de Lima  
Membro interno

Aos meus pais, Antônio Albuquerque da Silva e Maria Fátima Bezerra Albuquerque que se doaram inteiramente, para que, os meus sonhos fossem realizados. A vocês, não bastaria um obrigada.

Ao meu noivo Diêgo Rodrigues Soares Nogueira, por sempre acreditar em mim.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu fiel companheiro, principal responsável por mais uma conquista em minha vida. Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em ti. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do mestrado e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora e amiga *D.Sc.* Rafaela Priscila Antonio, pelos ensinamentos transmitidos, por ser um exemplo e sempre me orientar com serenidade nos âmbitos, pessoal, acadêmico e profissional. A você (mestra) muito obrigada!

Ao meu Coorientador Glauber Henrique de Sousa Nunes, pela orientação, confiança e pelos ensinamentos.

Aos participantes da banca, Lidiane Kely de Lima e Pedro Martins Ribeiro Júnior, por toda a contribuição e valiosas sugestões para a melhoria desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, por contribuírem para a minha formação, especialmente à professora Márcia Michelle de Queiroz Ambrózio, pelas sugestões e apoio prestado a esta pesquisa e ao professor Vander Mendonça pela sua dedicação como coordenador do curso.

À professora Maria Auxiliadora dos Santos por todo incentivo, exemplo, carinho e pela torcida. Muito obrigada por tudo!

Aos produtores, Francisco de Assis, Ajax Dantas e ao Agrônomo Rosemberg Ferreira Senhor, o meu especial agradecimento pela prestatividade, ajuda e por disponibilizar suas áreas de produção para a realização das coletas do inóculo.

Aos funcionários da horta didática da UFERSA campus Mossoró, Seu Antônio, Nanam, Josimar e em especial ao Senhor Alderi, por seu empenho e disponibilidade para execução das etapas de campo.

Ao colega de curso e companheiro de pesquisa, Ravier Valcácer de Medeiros, pela dedicação e grande ajuda.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Adans Augustin Colman, pela disponibilidade e ajuda na identificação morfológica do fungo e a André da Silva Xavier, pelas dicas e sugestões para a melhoria desta pesquisa.

Aos amigos Hailton Barboza, José Rivanildo, Euriann Yamamoto, Kássya Jemima e Bernardo Júnior, pelos conselhos e pelo forte laço de amizade que formamos durante todos esses anos.

A todos os que fazem o Grupo de Estudos em Recursos Genéticos Vegetais (GERMEV) pelo convívio, amizade e ajuda.

Aos meus pais Antônio Albuquerque da Silva e Maria Fátima Bezerra Albuquerque e meus irmãos Adriana Bezerra Albuquerque, Alexsandro Bezerra de Albuquerque e Francisco Lidiney Bezerra de Albuquerque, pelo apoio incondicional durante todas as etapas percorridas até este momento em minha vida e por acreditarem em mim.

À pequena Ester Albuquerque Fernandes, minha sobrinha, que através de sua simplicidade e inocência deixa os meus dias mais alegres.

Ao meu noivo Diêgo Rodrigues Soares nogueira, pelo companheirismo, incentivo e carinho, por sempre me apoiar e acima de tudo por sempre acreditar em mim. Obrigada pela força indispensável, você foi e tem sido essencial, sempre me completando em cada momento da minha vida acadêmica e pessoal. Seu apoio foi fundamental para que eu pudesse estar dando continuidade ao meu sonho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz.”

Bill Gates



## RESUMO GERAL

ALBUQUERQUE, Leidiane Bezerra. **Reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* e identificação de *Quantitative Trait Loci* de resistência do meloeiro ao míldio.** 2014. 99f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2014.

O míldio, causado pelo fungo *Pseudoperonospora cubensis*, é uma das principais ameaças à produção do meloeiro em áreas úmidas em todo o mundo. Apesar de sua importância, são poucos os trabalhos envolvendo a avaliação de fontes de resistência, bem como a identificação de marcadores moleculares que estejam ligados a esta característica e que possam auxiliar os melhoristas na seleção assistida por marcadores (SAM). Diante disso, os objetivos deste trabalho foram promover a seleção de fontes de resistência ao míldio, a partir de acessos de meloeiro, coletados em diferentes estados da região Nordeste do Brasil e também identificar QTLs que co-segreguem com genes de resistência a este patógeno, utilizando progênies  $F_{2:3}$  obtidas dos genitores MR-1 e Védrantais, contrastantes para o caráter. Para a identificação de fontes de resistência, foram avaliados trinta e seis acessos e quatro cultivares comerciais em delineamento em blocos casualizados (DBC) com três repetições e sete plantas por parcela, cuja avaliação foi feita em campo. A avaliação se deu aos 24 dias após o transplântio das mudas para o campo, depois que 50% das plantas atingiram o estágio de floração, com o auxílio de uma escala diagramática. Observou-se que existe variabilidade no germoplasma de meloeiro para reação ao míldio. Os acessos A1, A4, A6, A9, A12, A17, A18, A23, A27, A35 e A36 foram considerados promissores para o uso em programas de melhoramento visando resistência a *P. cubensis*. Todas as cultivares comerciais analisadas foram altamente suscetíveis ao patógeno. Para identificação de marcadores ligados a QTLs de resistência, os genitores MR-1 e Védrantais foram cruzados e posteriormente foi obtida a geração  $F_2$ . Das 98 plantas obtidas foi extraído o DNA para avaliação molecular com *primers* microssatélites polimórficos selecionados a partir dos genitores contrastantes. Das plantas  $F_2$  foram obtidas 98 progênies  $F_{2:3}$  que foram utilizadas para as avaliações fenotípicas quanto a severidade provocada por *P. cubensis*, seguindo a mesma época de avaliação descrita no experimento anterior no período de abril a junho de 2013. O delineamento utilizado foi o látice simples 10 x 10. A eficiência do látice foi baixa (100,28%), por isso, os dados foram analisados em DBC. Foram identificadas diferenças genéticas significativas ( $P < 0,01$ ) entre as progênies. A estimativa de herdabilidade foi considerada alta (86,75%), indicando sucesso com a seleção. Foram encontrados 23 *primers* polimórficos. Treze amplificaram em toda a população e foram utilizados para as análises genotípicas. Destes, dez marcadores apresentaram valores abaixo do nível

crítico especificado pelo teste FDR. Para oito locos houve maior proporção de alelos do genitor Védrantais, enquanto que para dois locos houve maior proporção de alelos do genitor MR-1. Para os demais locos (três), as frequências alélicas não se alteraram. Os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos para os marcadores foram relativamente baixos na população. Pela regressão linear simples, os marcadores que mais explicaram a característica na população  $F_{2:3}$  foram CMBR 139 e CMMS 22-2, sendo os mesmos identificados pela regressão linear múltipla, podendo, portanto, serem utilizados na SAM.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L. Germoplasma. Marcadores de DNA. Resistência genética.

## GENERAL ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Leidiane Bezerra. **Reaction of cultivars and accessions of melon *Pseudoperonospora cubensis* and the identification of *Quantitative Trait Loci* for resistance to downy mildew of melon.** 2014. 99f. Dissertation (M. Sc. In Agronomy: Phytotechny) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN-Brazil, 2014.

Downy mildew, caused by the fungus *Pseudoperonospora cubensis*, is a major threat to the production of melons in wetlands worldwide. Despite its importance, there are few studies involving the assessment of sources of resistance, as well as the identification of molecular markers that are connected to this feature and that may help breeders in marker-assisted selection (MAS). Given this, the objectives of this work were promote the selection of sources of resistance to downy mildew, from melon accessions, collected from different states in the Northeast region of Brazil and to identify QTLs that co-segregate with the resistance gene of this pathogen, using the F<sub>2.3</sub> obtained from parents and Védraçais MR-1, contrasting to the register character. To identify sources of resistance, thirty-six accesses and four commercial cultivars in a randomized block design (RBD) were assessed with three replications and seven plants per plot, which evaluation was made on the field. The evaluation was carried out on 24 days after transplanting the seedlings to the field, when 50% of plants reached the stage of flowering, with the aid of a diagrammatic scale. It was observed that there is variability in melon germplasm for reaction to downy mildew. The accessions A1, A4, A6, A9, A12, A17, A18, A23, A27, A35 and A36 were considered promising for use in breeding programs aiming resistance to *P. cubensis*. All commercial cultivars analyzed were highly susceptible to the pathogen. To identify markers connected the resistance QTLs, MR-1 and Védraçais parents were crossed and subsequently the F<sub>2</sub> generation was obtained. It was extracted the DNA for evaluation molecular of the 98 plants obtained with microsatellite primers polymorphic selected from contrasting parents. Of F<sub>2</sub> plants were obtained 98 progenies F<sub>2.3</sub> that were used for the assessments phenotypic of the severity caused by *P. cubensis*, it was used the same time assessment described in the previous experiment, the period April-June 2013. The experimental design utilized was lattice simple 10 x 10. The efficiency of lattice was low (100.28%) thus data were analyzed in DBC. Significant genetic differences (P<0.01) between the progenies were identified. The estimated of heritability was considered high (86.75%), indicating successful selection. Were found 23 primers polymorphic, of this sum, thirteen amplified in all the population and were used for analyzes genotypic. Of these, ten markers presented values below level critical specified by FDR test. There was more proportion allele of parent Védraçais for eight loci, while there was more proportion allele the parent MR-1 for two loci. For other loci (three), frequencies allelic did not change. The values coefficients of determination

( $R^2$ ) obtained for the markers were relatively low in population. By regression simple linear, the markers explained the feature in population  $F_{2:3}$  the most were CMBR 139 and CMMS 22-2, being the same identified by regression multiple linear, thus they can also be used in SAM.

Keywords: *Cucumis melo* L. Germplasm. DNA markers. Resistance gene.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Local de coleta dos acessos de melão utilizados no presente trabalho. Mossoró – RN, UFERSA, 2014..... 55

Tabela 2 – Esquema da análise de variância (ANAVA) individual. Mossoró-RN, UFERSA, 2014 .....60

Tabela 3 – Resumo da análise de variância em DBC da reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* (IPD), coeficiente de variação (CV) e acurácia seletiva ( $\hat{r}_{EE}$ ), sob condições de campo. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.....62

Tabela 4 – Reação em campo de 40 genótipos de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.....64

### CAPÍTULO III

Tabela 1 – Resumo da análise de variância em DBC da reação de progênies de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* (IPD), coeficiente de variação (CV), estimativa de herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ), com os respectivos limites inferiores (LI) e superior (LS) e acurácia seletiva ( $\hat{r}_{EE}$ ). Mossoró-RN, UFERSA, 2014 .....84

Tabela 2 – Reação em campo de genitores (MR-1 e Védrantais) e suas respectivas progênies F<sub>2,3</sub> de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. Mossoró-RN, UFERSA, 2014. ....86

Tabela 3 - Características dos *primers* de microssatélite (SSR) polimórficos entre os genitores contrastantes para resistência ao míldio do meloeiro MR-1 e Védrantais. Mossoró-RN, UFERSA, 2014 .....90

Tabela 4 - Teste  $\chi^2$  para as frequências genotípicas, probabilidade FDR (%) e frequências alélicas da geração F<sub>2</sub> do cruzamento entre as linhagens MR-1 e Védraçais. Mossoró-RN, UFERSA, 2014 ..... 92

Tabela 5 - Resumo das análises de regressão linear simples, considerando os marcadores separadamente, e de regressão linear múltipla, com seleção de modelo pelo método *backward*, para resistência do meloeiro ao míldio, grupos de ligação e estimativa dos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) e de determinação ajustado (R<sup>2</sup><sub>aj</sub>) ....  
..... 93

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figura 1 – Fotografia realizada através de microscópio de luz, mostrando aspectos morfológicos do fungo *Pseudoperonospora cubensis*. (A) Esporângios. (B) Esporangióforo. Mossoró-RN, UFERSA, 2014..... 58

### CAPÍTULO III

Figura 1 - Número de indivíduos com base nas categorias de IPD: (AR) altamente resistente = 0%; (R) resistente 1–12%; (MS) moderadamente suscetível = 13– 25%; (S) suscetível = 26–50%; (AS) altamente suscetível > 50% .....88

Figura 2 - Distribuição de frequência da reação de progênies de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*..... 89

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
2.1 MÍLDIO DO MELOEIRO.....	20
2.2 A IMPORTÂNCIA DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS.....	23
2.3 FONTES DE RESISTÊNCIA A <i>Pseudoperonospora cubensis</i> .....	25
2.4 AVALIAÇÕES DA RESISTÊNCIA DE GERMOPLASMA DE MELÃO A <i>Pseudoperonospora cubensis</i> ATRAVÉS DE ESCALA DIAGRAMÁTICA.....	27
2.5 MARCADORES MOLECULARES NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS.....	28
<b>2.5.1 Identificação de QTLs e Mapeamento genético.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5.2 Marcadores moleculares mais utilizados na identificação de QTLs e no mapeamento genético.....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.3 Populações de mapeamento.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>50</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>50</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>51</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
<b>2.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....</b>	<b>54</b>
2.2 MATERIAL GENÉTICO UTILIZADO PARA REAÇÃO A <i>Pseudoperonospora cubensis</i> .....	54
2.3 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO PARA REAÇÃO A <i>Pseudoperonospora cubensis</i> EM CAMPO.....	56
2.4 REAÇÕES DE ACESSOS E CULTIVARES DE MELOEIRO A <i>Pseudoperonospora cubensis</i> .....	57
<b>2.4.1 Identificação morfológica do patógeno.....</b>	<b>57</b>
<b>2.4.2 Avaliação da reação de genótipos de meloeiro a <i>Pseudoperonospora cubensis</i>.....</b>	<b>59</b>
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS FENOTÍPICOS.....	60
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>71</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>71</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>73</b>



<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
2.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	77
2.2 MATERIAIS GENÉTICOS E OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES .....	77
2.3 AVALIAÇÕES GENOTÍPICAS DAS PLANTAS F <sub>2</sub> .....	78
<b>2.3.1 Extração do DNA das plantas F<sub>2</sub> e dos genitores.....</b>	<b>78</b>
<b>2.3.2 Pré-seleção dos pares de <i>primers</i> para genotipagem da população F<sub>2</sub> .....</b>	<b>79</b>
<b>2.3.3 Teste da alteração das frequências genotípicas na população segregante ....</b>	<b>80</b>
2.4 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA EM CAMPO DAS PROGÊNIES F <sub>2;3</sub> .....	81
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	81
<b>2.5.1 Identificação de QTLs por meio de regressão linear simples e múltipla .....</b>	<b>82</b>
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	84
3.1 AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS.....	84
3.2 AVALIAÇÕES GENOTÍPICAS .....	90
<b>3.2.1 Emprego de microssatélites na população segregante.....</b>	<b>90</b>
<b>3.2.2 Segregação dos marcadores na população segregante .....</b>	<b>91</b>
<b>3.2.3 Identificação de QTLs por meio de regressão linear simples e múltipla .....</b>	<b>93</b>
4 CONCLUSÕES .....	95
REFERÊNCIAS.....	96

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

As regiões produtoras de melão (*Cucumis melo* L.) do Nordeste brasileiro são caracterizadas por um período seco, compreendido de julho a novembro, alternado por um período chuvoso, compreendido de março a abril (ambos bem definidos). O cultivo do meloeiro, apesar de ser realizado durante todo o ano, é feito em sua quase totalidade no período seco (95%), exatamente em razão do elevado risco de perdas de produção e qualidade dos frutos devido a doenças oportunas como o míldio do meloeiro (CARDOSO et al., 2001).

O míldio, causado pelo fungo *Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley. & M. A. Curtis) Rostovzev (1903), é uma das mais importantes doenças do meloeiro no Brasil (CARDOSO et al., 2001). Além de sua ocorrência endêmica durante o período seco, esta doença limita a produção do meloeiro no período chuvoso. As infecções que ocorrem em genótipos suscetíveis durante o período endêmico, resultam em fonte de inóculo primário para o período epidêmico (BLANCARD et al., 1996; KUROZAWA; PAVAN, 1997). Trata-se de uma doença do tipo explosiva que, sob condições de umidade relativa elevada e água livre nas folhas, pode reduzir, sensivelmente, a área foliar e, conseqüentemente, a fotossíntese, provocando redução da produção e do teor de sólidos solúveis totais de 60% e 49%, respectivamente (KUROZAWA; PAVAN, 1997; CARDOSO et al., 2002a; CARDOSO et al., 2002b).

O principal método de controle desta doença é a aplicação de fungicidas, no entanto, esta estratégia tem sido comprometida pelo alto potencial de evolução do patógeno, selecionando raças resistentes a estes produtos (SHETTY et al., 2002; URBAN; LEBEDA, 2004; URBAN; LEBEDA, 2006; URBAN; LEBEDA, 2007). Além disso, os fungicidas têm sua eficácia reduzida em cultivares muito suscetíveis,

sob alta pressão de inóculo e em condições meteorológicas favoráveis ao patógeno (THOMAS, 1988; URBAN; LEBEDA, 2006). Soma-se a isto, o fato de aumentar substancialmente os custos de produção com a utilização deste método.

Uma alternativa que pode ser utilizada no controle do míldio do meloeiro é a resistência genética que, apesar de também ser comprometida pelo alto potencial de evolução do patógeno, ainda é a alternativa mais barata e segura para o controle da referida doença, pois reduz danos ao ambiente e proporciona maior segurança alimentar ao consumidor, podendo também ser utilizada de forma complementar ao controle químico, reduzindo os custos de produção (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003; STAMATAKIS, 2006; URBAN; LEBEDA, 2007; THINES; VOGLMAYR; GÖKER, 2009).

Infelizmente, a falta de cultivares resistentes ao míldio, ainda é um fator que impede a expansão do cultivo do melão no Nordeste brasileiro no período chuvoso.

Diversas fontes de resistência têm sido relatadas em países produtores (GÄUMANN, E. 1918; COHEN, 1981; KANG et al., 2010). Entretanto, no Brasil, o número de trabalhos relacionados a esta doença é ínfimo e os encontrados não relatam qual o controle genético da resistência do meloeiro a este patógeno ou mesmo o número de genes que participam da resistência. Muito dessa resistência tem sido encontrada em linhagens de melão, tais como MR-1 onde Cohen et al. (1985) encontraram dois genes, denominados *Pc-1* e *Pc-2* de dominância incompleta. O conhecimento sobre a herança dessa resistência é de suma importância para a criação de uma estratégia de melhoramento mais eficiente para resistência durável. Por isso, há a necessidade de se identificar fontes de resistência nos acessos de meloeiro dos bancos de germoplasma das regiões produtoras de melão do Nordeste do Brasil.

Apesar dessas informações, ainda são poucos os trabalhos de melhoramento visando resistência ao míldio em meloeiro. Uma razão para este pequeno número de trabalhos pode ser a dificuldade de avaliação da resistência ao míldio em campo, devido à influência do ambiente que determina o desenvolvimento da doença. Uma

possível solução para esta questão é a identificação de fontes de resistência utilizando marcadores de DNA.

Os marcadores de DNA são ferramentas úteis que podem ajudar a identificar as regiões cromossômicas envolvidas na resistência do meloeiro ao fungo *P. cubensis*. Em melão, genes de resistência a diversas doenças foram mapeados (PITRAT; LECOQ, 1980; BAUDRACCO-ARNAS; PITRAT, 1996; JOOBEUR et al. 2004; BROTMAN et al. 2005; MORALES et al. 2005; NIETO et al. 2006), no entanto, estes mesmos mapas não relatam locos de características quantitativas (QTLs) para míldio. Este conhecimento poderia levar a uma estratégia de criação de resistência durável mais eficiente em programas de melhoramento do meloeiro.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram, promover a seleção de fontes de resistência ao míldio a partir de acessos de meloeiro coletados em diferentes estados da região Nordeste do Brasil e também identificar (QTLs) que co-segrem com genes de resistência a este patógeno, utilizando progênies  $F_{2:3}$ , obtidas dos genitores MR-1 e Védraçais, contrastantes para o caráter.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MÍLDIO DO MELOEIRO

O míldio, causado pelo fungo *Pseudoperonospora cubensis* é uma das principais ameaças a produção de Cucurbitáceas em áreas úmidas do mundo (KENIGSBUCH; COHEN, 1992). Este patógeno possui uma ampla distribuição geográfica e tem sido relatado na cultura do meloeiro em mais de 50 países, incluindo ambientes que variam de clima semiárido à tropical (PALTI; COHEN, 1980).

Originalmente nomeado *Peronospora cubensis* quando descoberto em Cuba por Berkeley e Curtis (1868), *P. cubensis* foi reclassificado em 1903 depois de mais observações sobre a forma de germinação de seus esporângios (ROSTOVZEV, 1903). Cerca de 20 anos mais tarde, foi relatado no Japão (KUROSAWA, 1927). Desde então, se espalhou para quase todos os países onde espécies da família Cucurbitaceae são cultivadas comercialmente (PALTI; COHEN, 1980).

Além disso, *P. cubensis* possui uma ampla gama de hospedeiros, infectando mais de 49 espécies em 20 gêneros dentro da família das Cucurbitáceas, incluindo 19 espécies do gênero *Cucumis* (LEBEDA; WIDRLECHNER, 2003; PALTI; COHEN, 1980). Além do melão (*Cucumis melo* L.), as espécies hospedeiras mais frequentemente afetadas são o pepino (*Cucumis sativus* L), melancia (*Citrullus lanatus*), abóbora (*Cucurbita maxima*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*) (LEBEDA; WIDRLECHNER, 2003). Outras Cucurbitáceas hospedeiras de *P. cubensis* são *Luffa acutangula* L., *Lagenaria siceraria*, *Benincasa hispida*, *Momordica charantia* L. (PALTI; COHEN, 1980). Mudanças climáticas globais podem ser uma das principais causas do aumento da capacidade do patógeno de expandir sua gama de hospedeiros e território geográfico (GARRETT et al., 2006).

*P. cubensis* pertence a divisão Eukarya, reino Straminipila, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Peronosporales, família Peronosporaceae, gênero *Pseudoperonospora*. É um microorganismo biotrófico e produz estruturas de resistência conhecidas como esporângios, os quais garantem a sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis (SAVORY et al., 2011). Cópias assexuadas dos esporângios são produzidas em folhas infectadas e liberadas para o ambiente através de movimentos de contorção realizados pelos esporangióforos em condições de baixa umidade relativa do ar (LANGE et al., 1989). A liberação das maiores concentrações de esporângios é realizada no período da manhã e ao final da tarde quando mudanças de temperatura e umidade relativa do ar tendem a ocorrer (COHEN; ROTEM, 1971b).

Após sua dispersão, a sobrevivência dos esporângios pode ocorrer de 1 a 16 dias (COHEN, 1981; COHEN; ROTEM, 1971a) dependendo da temperatura, umidade relativa (THOMAS, 1996) e da radiação solar (KANETIS et al., 2010). Cópias assexuadas dos esporângios são produzidas em folhas infectadas e podem ser dispersas pelo ar a longas distâncias (LANGE et al., 1989). Embora a liberação e dispersão dos esporângios ocorram em condições de baixa umidade da folha, o molhamento foliar é necessário para o patógeno germinar e infectar a planta hospedeira com sucesso. A temperatura ótima para ocorrer a infecção é de 15°C. Quando altos níveis de inóculo estão presentes no hospedeiro, são necessárias apenas 2 horas de molhamento foliar para ocorrer à infecção (SAVORY et al., 2011). Os esporângios podem germinar e causar infecções em temperaturas que variam de 5 a 28°C (COHEN, 1981). O período de incubação pode variar de 4 a 12 dias e depende de fatores como temperatura, fotoperíodo, concentração do inóculo e do tempo em que a folha estiver úmida (COHEN, 1977b; THOMAS, 1996).

A germinação dos esporângios ocorre via clivagem citoplasmática, resultando na liberação de 2-15 zoósporos móveis e biflagelados (PALTÍ; COHEN, 1980), que na presença de água, nadam em busca de estômatos abertos e encistam (IWATA, 1949) formando tubos germinativos e produzindo apressórios. A penetração da hifa se dá a

partir de apressórios que entram no tecido foliar do hospedeiro através da abertura estomática (SAVORY et al., 2011). As hifas produzidas por *P. cubensis* possuem forma cenocítica e hialina e crescem entre as células do hospedeiro através de estruturas como o mesófilo e tecido paliçádico. A partir daí, haustórios são estabelecidos em células do mesófilo onde invaginam através da membrana celular (FRAYMOUTH, 1956; VOGLMAYR et al., 2004). Estas estruturas especializadas são responsáveis pela absorção de nutrientes do hospedeiro pelo patógeno (HAN; MENDGEN, 2001).

A parte do hospedeiro mais atacada por *P. cubensis* é a lâmina foliar e em alguns casos esta é a única parte afetada. Os sintomas da doença podem variar um pouco de acordo com a lâmina foliar de diferentes espécies de Cucurbitáceas e até mesmo entre variedades da mesma espécie (PALTÍ; COHEN, 1980). Quando em condições ambientais ideais, os sintomas da doença podem aumentar rapidamente, reduzindo sensivelmente a área foliar e, conseqüentemente, a fotossíntese, provocando danos à produção (KUROZAWA; PAVAN, 1997).

Na maioria dos hospedeiros, os primeiros sintomas são pequenas lesões encharcadas de água na parte abaxial da folha (PALTÍ; COHEN, 1980). Estas manchas são limitadas pelas nervuras que depois de certo tempo, adquirem coloração amarronzada (SAVORY et al., 2011).

A necrose ocorre mais rapidamente em tempo quente e seco (COHEN; ROTEM, 1971b). Folhas colonizadas por *P. cubensis* sofrem mudanças na temperatura e taxa de transpiração, que variam durante o curso da infecção e sobre a superfície foliar (LINDENTHAL et al, 2005; OERKE et al, 2006). Em baixas temperaturas ocorre retardamento dos sintomas, no entanto a colonização do tecido foliar ainda é promovido (COHEN, 1977b). Conforme a doença progride folhas inteiras podem morrer dentro de poucos dias (THOMAS, 1996). Em consequência da redução da parte aérea, o desenvolvimento do fruto é cessado e ocorre uma maior exposição dos frutos

ao sol, permitindo a escaldadura e apodrecimento secundário dos frutos (KEINATH et al., 2007).

Além disso, exposição dos frutos à intensa radiação solar na faixa equatorial provoca queima da epiderme e alterações bioquímicas que podem produzir efeitos deletérios à qualidade dos frutos (CARDOSO; SANTOS; VIDAL, 2002). Desta forma, a doença desempenha um papel crucial na determinação da quantidade e qualidade da produção de Cucurbitáceas (LEBEDA; COHEN, 2010; PERCHEPIED et al., 2005). Em infecções severas, ocorre queda precoce de folhas, raquitismo e produção de frutos mal formados e subdesenvolvidos (PERCHEPIED et al., 2005).

## 2.2 A IMPORTÂNCIA DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Com a expansão das fronteiras agrícolas da cultura do meloeiro no Nordeste brasileiro, trabalhos visando a conservação de recursos genéticos tornaram-se estrategicamente importantes, uma vez que estes materiais são portadores de genes de grande interesse para o melhoramento genético, como é o caso dos genes de resistência a patógenos.

O meloeiro é atacado por diversas doenças. Entre elas, destaca-se o míldio, considerada a principal doença fúngica desta cultura no período chuvoso nas regiões produtoras do Nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2003). No entanto, apesar de sua expressiva importância, ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos no Brasil, relacionados ao estudo de identificação de fontes de resistência do meloeiro ao míldio (SANTOS et al., 2009).

Dessa forma, ensaios envolvendo prospecção, conservação, caracterização e uso do germoplasma de melão são fundamentais para subsidiar a incorporação de



novos genótipos de meloeiro com características agronômicas desejáveis, como a resistência a doenças, aos programas de melhoramento genético.

Paiva et al. (2004), ao avaliarem a reação de 20 linhagens de meloeiro do tipo Cantaloupe, obtidas a partir de vários genótipos comerciais e de acessos de meloeiro, observaram que a linhagem denominada L49, originada do acesso PI 714423, comportou-se como resistente ao míldio em condições de campo. Santos et al. (2009) também buscaram identificar fontes de resistência a este patógeno. Para isso, estes autores analisaram a reação de 28 genótipos de meloeiro, dentre acessos de diversas origens e cultivares comerciais, e constataram que nenhum dos genótipos expressou resistência ao míldio.

A família Cucurbitaceae é conhecida pela sua versatilidade e valor alimentício dos frutos de algumas espécies do gênero *Cucumis* (GONZAGA et al.,1999), como é o caso do melão (*Cucumis melo* L.), que integra juntamente com outras espécies o cultivo tradicional de variedades crioulas nas mais diversas áreas do Nordeste brasileiro (QUEIROZ 1999a).

Parte da variabilidade genética do germoplasma de melão presente nesta região encontra-se em poder dos pequenos agricultores que fazem a seleção da própria semente a partir dos frutos que consideram ser de qualidade superior e as cultivam na safra seguinte.

Essa seleção, realizada por várias gerações, mesmo que de forma inconsciente, resultou em diversos tipos de genótipos de meloeiro com elevada rusticidade e adaptação às condições locais onde foram selecionados. Devido as suas características de rusticidade, essas variedades tornaram-se aptas ao cultivo em propriedades de reduzido nível tecnológico e em sistemas agroecológicos (NEITZKE et al., 2009).

No entanto, com o objetivo de aumentar a produtividade, os agricultores têm substituído as variedades crioulas por cultivares cada vez mais uniformes ou padronizadas e em extensas áreas, resultando na crescente substituição e degradação das variedades locais e dos ecossistemas naturais, caracterizando o processo

denominado de erosão genética (WALTER et al., 2007), que tem resultado na perda de vários alelos, os quais podem estar relacionados com os mais diversos tipos de caracteres de interesse econômico, como a resistência a doenças.

Considerando que muitas dessas variedades foram sendo parcialmente substituídas por cultivares comerciais e que muitas foram perdidas, torna-se necessária a realização de coletas e a caracterização dos mesmos a fim de se conhecer o grau de variabilidade genética que estes genótipos possuem. Isto deve ser realizado com o intuito de se indicar genótipos mais promissores para os trabalhos de melhoramento e também para melhorar as condições de cultivo e produção dos agricultores, permitindo o uso racional destes genótipos na agricultura familiar.

### 2.3 FONTES DE RESISTÊNCIA A *Pseudoperonospora cubensis*

A utilização de resistência genética ainda é a alternativa mais barata e segura para o controle do míldio em meloeiro, pois reduz danos ao ambiente e proporciona alimentos mais seguros ao consumidor, podendo também ser utilizada de forma complementar ao controle químico, reduzindo os custos de produção (SHETTY et al., 2002; URBAN; LEBEDA, 2004; URBAN; LEBEDA, 2006; URBAN; LEBEDA, 2007).

*P. cubensis* é um patógeno com alto potencial evolutivo (FANOURLAKIS et al., 2001; LEBEDA; URBAN, 2007). A morfologia desse oomiceto e, principalmente, a variabilidade patogênica é dependente do hospedeiro e das condições ambientais (LEBEDA; WIDRLECHNER, 2003). Especificidade hospedeiro-parasita e interações que envolvem *P. cubensis* apresentam significativa variação tanto em termos individuais quanto a nível populacional (SARRIS et al., 2009). A diferenciação da patogenidade de *P. cubensis* ao nível de patótipos foi esclarecida por Lebeda e

Widrlechner (2003). O hospedeiro mais promissor para a diferenciação de raças em *P. cubensis* é o meloeiro (LEBEDA et al., 2006; LEBEDA et al., 2007a) e a elucidação desse sistema hospedeiro-patógeno seria de suma importância para os estudos populacionais, que podem ser realizados utilizando tanto uma abordagem clássica quanto a molecular (LEBEDA et al., 2006).

Há poucos relatos sobre a identificação de fontes de resistência a *P. cubensis* no Brasil. No meloeiro, são conhecidas várias fontes de resistência ao míldio, incluindo PI 124111 (COHEN et al., 1985), PI 124111F (COHEN; EYAL., 1983), MR-1 (THOMAS, 1986), PI 144112 (COHEN, 1981; THOMAS, 1982). PI 414723 (EPINAT; PITRAT, 1989), PI 164323 (COHEN, 1981) e PI 165449 (COHEN, 1981). No entanto, em investigações pelos países produtores, três acessos, MR-1, PI 124111F e PI 124112, foram extensivamente estudados (THOMAS, 1988; KENIGSBUCH; COHEN, 1989; KENIGSBUCH; COHEN, 1992).

Ivanoff (1944), ao estudar a herança da resistência ao míldio, observou que quatro cultivares de meloeiro, de origem indiana, comportaram-se como resistentes em condições ambientais do sul do Texas e sugeriu que a resistência encontrada poderia ser parcialmente dominante. Ele também concluiu que o material mais resistente neste estudo foi a cultivar Smith's Perfect. No entanto, Thomas (1982), ao realizar pesquisas com esse mesmo propósito, observou que embora, esta mesma cultivar tenha sido a mais resistente a um patótipo de *P. cubensis*, quando testada com outro, a mesma se comportou como altamente suscetível. Ainda neste estudo, outro acesso de *C. melo* denominado PI 124111 exibiu um elevado nível de resistência ao míldio.

Ainda neste contexto, Thomas et al. (1986), estudando a herança da resistência na linhagem MR-1, observaram que a mesma possuía dois genes dominantes de herança incompleta denominados *Pc-1* e *Pc-2*. Esta linhagem foi desenvolvida a partir do híbrido 90319 e selecionada por conferir um alto nível de resistência ao míldio, cuja resistência foi mantida mesmo quando testado em folhas de diferentes idades.

#### 2.4 AVALIAÇÕES DA RESISTÊNCIA DE GERMOPLASMA DE MELÃO A *Pseudoperonospora cubensis* ATRAVÉS DE ESCALA DIAGRAMÁTICA

A herança da resistência ao míldio do meloeiro é descrita como uma característica quantitativa (THOMAS et al., 1988; EPINAT; PITRAT., 1989) por isso faz-se necessário quantificar a doença para se distinguir genótipos.

Ao se avaliar germoplasma em busca de fontes de resistência a doenças, o uso de métodos eficientes de avaliação da infecção torna-se necessário. Por isso, os métodos adequados para avaliação de doenças devem ser escolhidos de forma criteriosa, a fim de que se possibilite um melhor grau de acurácia, precisão e repetibilidade das avaliações (GAUNT, 1987). Esses métodos variam com o agente etiológico e com a característica espacial da doença (GAUNT, 1995).

Em princípio, para se medir a intensidade de doenças, o ideal é comparar a planta doente com a sadia e também com uma extremamente suscetível. Para isto estão disponíveis vários procedimentos, como chaves descritivas, área sob a curva de progresso da doença, sensoriamento remoto, uso da produção, componentes de resistência horizontal, taxa de infecção e escala diagramática (SANTOS, 2008).

Neste contexto, o uso da escala diagramática, principal ferramenta na avaliação da severidade de patógenos foliares, é muito importante para quantificação de doenças e na caracterização da resistência varietal (AMORIM, 1995).

Um dos procedimentos mais eficientes para se realizar este tipo de avaliação consiste no uso do método de escala diagramática, que corresponde à ilustração da parte da planta afetada com várias intensidades de doença (SANTOS, 2008). Entre as características de uma boa escala diagramática estão a facilidade de uso, a sua aplicabilidade sob ampla extensão de condições com resultados reproduzíveis e a existência de intervalos que representem todos os estádios de desenvolvimento da doença (BERGER, 1980).

Existem escalas diagramáticas para avaliação da severidade de várias doenças em Cucurbitáceas, como o míldio do meloeiro (MICHEREFF et al., 2009), oídio em meloeiro (AZEVEDO, 1998), mancha de cercospora em melancia (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006), crestamento gomoso em melancia (DUSI et al., 1994), oídio em abóbora (AZEVEDO; LEITE, 1996), mancha alvo do pepineiro (TERAMOTO et al., 2011), entre outras, que têm colaborado para avaliações de importantes doenças em plantas desta família.

## 2.5 MARCADORES MOLECULARES NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS

A resistência das plantas aos patógenos é resultante do processo evolucionário que ocorre espontaneamente em suas populações. Por isso, ao longo da sua evolução, as plantas têm desenvolvido diversos mecanismos de defesa contra o ataque dos mais variados tipos de patógenos.

Entre os eventos celulares, que caracterizam a resposta do hospedeiro por meio destes mecanismos, estão à expressão dos genes de defesa os quais são conhecidos como genes de resistência (R-genes) (DE WIT, 1995).

O primeiro modelo de interação patógeno-hospedeiro foi proposto por Flor (1947), como resultado de seus estudos com o patossistema linho (*Linum usitatissimum*) – ferrugem do linho (*Melampsora lini*). A partir de seus resultados, o autor formulou a famosa teoria gene a gene, na qual a resistência de determinada cultivar de linho a uma raça do fungo é o resultado da interação entre um gene de avirulência dominante no patógeno e um gene de resistência correspondente (R), também dominante na planta hospedeira. Após o pioneiro trabalho de Flor, resultados semelhantes têm sido obtidos em outros patossistemas, envolvendo parasitas

biotróficos e hemibiotróficos, incluindo fungos, bactérias, vírus e nematóides (AGRIOS, 2005).

Desta forma, o número de genes R, bem como o mapeamento de tais genes tem sido determinado para diferentes patossistemas (PRYOR; ELLIS, 1993).

No caso do patossistema míldio – meloeiro sabe-se que o controle genético da resistência é devido a dois genes de efeitos complementares denominados de *Pc-1* e *Pc-2* (THOMAS, 1988; KENIGSBUCH; COHEN, 1989, 1992), os quais têm sido descritos em alguns genótipos de meloeiro, como é o caso do acesso MR-1 (COHEN et al., 1985).

Uma das estratégias preconizadas no manejo de doenças e pragas consiste no uso de cultivares resistentes. No entanto, a introgressão de alelos de resistência via melhoramento convencional, dependendo da cultura, pode levar muitos anos (ANTONIO, 2011). Esse processo de transferência de alelos de resistência pode ser consideravelmente acelerado com o uso de marcadores de DNA. Esses marcadores, se estreitamente ligados aos alelos de resistência, podem ser usados na seleção assistida por marcadores (SAM.) particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento (ALZATE-MARIN et al., 2005). Além disso, esta ferramenta torna possível e mais rápida, a triagem molecular de populações segregantes para o fenótipo resistência a doenças (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991), o que levaria muito tempo e trabalho intensivo via método tradicional. O uso dos marcadores de DNA é também justificado em situações em que a avaliação fenotípica se torna um tanto quanto subjetiva e de difícil mensuração (ALZATE-MARIN et al., 2005). Como é o caso da resistência a *P. cubensis* que é determinada pela avaliação visual de folhas com o sintoma da doença. Outra vantagem, do uso desta ferramenta no melhoramento de plantas visando resistência a doenças, é possibilitar a seleção de plantas resistentes em estágio de plântula, tão logo produza quantidade suficiente de DNA para a realização das análises, independente das condições do ambiente (MATIELLO; BARBIERI; CARVALHO, 1997).

A resistência, na maioria das vezes é classificada como poligênica ou de caráter quantitativo, normalmente envolvendo uma série de genes, com efeitos diferenciados, associados a um pronunciado efeito do ambiente, o que leva a uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro (ALZATE-MARIN et al., 2005). O que tem sido comprovado com os experimentos de sequenciamento e mapeamento genético que mostram que os genes de reação à patógenos estão geralmente organizados em blocos gênicos ou *clusters* (GEFFROY et al., 1999).

Para grande parte das espécies comerciais, um grande número de alelos de resistência tem sido isolado e os marcadores moleculares têm sido extensivamente utilizados por facilitar a introdução desses alelos em cultivares comerciais (ANTONIO, 2011) como, por exemplo, vírus do mosaico PRSV-W (TEIXEIRA, 2004), oídio (TEIXEIRA et al., 2008), entre outros, no entanto, são poucos os relatos de marcadores ligados à locos de resistência em melão a *P. cubensis*.

O uso destas ferramentas associadas a genes de resistência a doenças, em programas de melhoramento, requer a identificação prévia desses marcadores em cultivares de interesse (CORRÊA et al., 2001), sendo sua maior utilidade empregada no estudo de caracteres quantitativos, dadas as dificuldades envolvidas no processo de seleção. Desta forma, para que as informações fornecidas pelos marcadores moleculares sejam úteis no processo de seleção, a primeira etapa é a identificação de marcadores associados à QTLs (*Quantitative Trait Loci*) envolvidos no controle do caráter de interesse.

A identificação de QTLs de resistência, portanto, é uma forma de utilizar marcadores para auxiliar na seleção de genótipos resistentes ao míldio do meloeiro. Um estudo de mapeamento de QTLs foi conduzido para a fonte de resistência parcial de melão PI 124112 onde foram detectados nove QTLs envolvidos no controle da resistência. Um QTL derivado da linhagem PI 124112 explicou de 12 a 38% de toda a variação fenotípica para a resistência a *P. cubensis*, baseada na avaliação realizada por meio de escalas semi quantitativas (PERCHEPIED et al., 2005).

### **2.5.1 Identificação de QTLs e Mapeamento genético**

Entre as várias ferramentas da genética molecular disponíveis para o melhoramento de plantas, os mapas genéticos têm se revelado como um recurso de grande valor em diversos aspectos da pesquisa e aplicações da genômica (BORÉM; CAIXETA, 2009). Desta forma, uma das aplicações mais importantes desta ferramenta consiste na localização de genes que controlam características de importância econômica, como é o caso da resistência a doenças que resulta da ação cumulativa de um conjunto de genes (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Tais características são denominadas de quantitativas ou de herança poligênica e os locos que as controlam são conhecidos como locos controladores de características quantitativas ou QTLs (TANKSLEY, 1993).

O primeiro estudo demonstrando a ligação entre um gene marcador e um QTL foi realizado por Sax (1923). No entanto a base de apoio para a elucidação desta técnica foi mais bem proposta por Thoday (1961), o qual sugeriu a idéia do uso de marcadores de genes individuais para caracterizar e mapear poligenes controladores de QTLs. A partir de então, a metodologia proposta para o mapeamento de QTLs baseia-se na hipótese de que, se a segregação de um gene marcador pode ser usada para detectar e estimar o efeito de um poligene ligado e se genes marcadores estiverem espalhados ao longo do genoma de uma espécie, foi possível mapear e caracterizar todos os poligenes que afetam um dado caráter (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

A localização de genes e regiões genômicas que controlam características de interesse econômico, sejam elas qualitativas ou quantitativas, têm sido realizada eficientemente através do emprego de marcadores moleculares organizados em mapas de ligação (TANKSLEY et al., 1989), no caso de caracteres quantitativos, naturalmente controlados por vários genes, os marcadores constituem uma ferramenta diferenciada, pois permitem a identificação e a análise de cada um dos genes



envolvidos na característica, ou pelo menos daqueles de maior importância (BORÉM; CAIXETA, 2009), por isso, o advento dos marcadores moleculares, tornou viável o mapeamento e a caracterização de poligenes responsáveis por caracteres de interesse em populações naturais (TANKSLEY, 1993), além disso, a descoberta dos marcadores de DNA tornou o mapeamento genético efetivamente ilimitado a todas as espécies (BOSTEIN et al., 1980). Esta ferramenta possibilitou também o aumento do número de estudos de mapeamento de diferentes genes R (KELLY; MIKLAS, 1998). A partir de então, mapas genéticos que levaram décadas para serem desenvolvidos devido à restrita disponibilidade de marcadores morfológicos e isoenzimáticos foram amplamente saturados com o uso de marcadores moleculares (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

A eficiência na detecção de QTLs depende do número de QTLs, magnitude do seu efeito, herdabilidade da característica, interações entre os genes, tipo e tamanho da população segregante avaliada, tamanho do genoma, frequência de recombinação entre o QTL e o marcador, saturação do mapa e eficiência da avaliação fenotípica (BORÉM; CAIXETA, 2009).

O mapeamento de QTLs não se trata apenas de determinar a posição destes no genoma, mas trata-se também da quantificação e da caracterização de seus efeitos, além do grau de dominância de cada QTL bem como das interações alélicas. Essas interações podem ser epistáticas e pleiotrópicas (BEARZOTI, 2000).

Visto que os genótipos desses locos controladores de caracteres quantitativos são desconhecidos, uma alternativa é estimar os efeitos de QTLs fixados em posições intermediárias de marcadores moleculares genotipados que não têm efeito sobre o caráter em estudo, utilizando a informação do mapa desses marcadores.

Os pré-requisitos e os passos para o mapeamento de QTLs são:

a) delineamento genético ou populações de mapeamento adequado: populações do tipo  $F_2$ , retrocruzamentos, linhagens recombinantes ou RILs (*Recombinant Inbred Lines*), dentre outras;

- b) genotipagem das plantas;
- c) mapa genético;
- d) dados dos caracteres de interesse (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Uma vez que a associação entre as características de interesse e os marcadores seja feita com a análise de QTLs, a SAM pode ser feita tendo duas grandes vantagens sobre os métodos tradicionais de seleção: marcadores não são influenciados pelo ambiente e a detecção é possível em todas as fases de desenvolvimento da planta (ANTONIO, 2011), além disso, é possível selecionar os indivíduos com base no fenótipo do marcador, sem que haja a necessidade de avaliar o fenótipo da característica (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

### **2.5.2 Marcadores moleculares mais utilizados na identificação de QTLs e no mapeamento genético**

Marcadores de DNA foram inicialmente utilizados como ferramentas de auxílio ao melhoramento genético na década de 80 (SOLLER; BECKMANN, 1983). Conceitualmente, são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder de análise genética das plantas (BORÉM; CAIXETA, 2009). O grande potencial do uso de marcadores moleculares no melhoramento reside no fato de serem praticamente ilimitados em número, de fácil detecção e se comportarem como “caracteres” de herança simples e previsíveis, não sendo afetados pelo meio (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Atualmente, existe uma grande variedade de marcadores moleculares que podem ser utilizados em mapeamento genético de espécies vegetais (BORÉM; CAIXETA, 2009). No entanto, os principais foram descritos a seguir com suas características, vantagens e desvantagens.

O marcador molecular *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP) é uma técnica que associa a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e a praticidade da amplificação desses fragmentos por reação de polimerase em cadeia (PCR) (VOS et al., 1995). Nesta técnica o DNA a ser analisado é clivado por enzimas de restrição e às suas extremidades são ligados adaptadores, que servem de sítios de ligação para *primers* em reação de PCR.

Entre as vantagens do uso de marcadores AFLP, estão o elevado grau de polimorfismo e o mais alto número de marcadores obtidos por gel analisado.

Apesar de ser um tipo de marcador muito útil para a realização de *fingerprinting* de DNA, seu uso no melhoramento de plantas tem sido limitado devido a dificuldades metodológicas inerentes à técnica e ao seu elevado custo (ALZATE-MARIN, et al., 2005).

Microsatélites ou *Simple Sequence repeats* (SSR) são baseados na presença, em genomas eucarióticos, de várias classes de sequências arbitrárias repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos em *tandem* (BORÉM; CAIXETA, 2009). As sequências que flanqueiam essas regiões são conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, permitindo que se construam *primers* que amplifiquem, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (BORÉM; CAIXETA, 2009). Para amplificar locos de microsatélites utiliza-se um par de *primers*, cada um com um sítio de anelamento localizado em um dos lados da região repetitiva. O polimorfismo encontrado é do tamanho dos fragmentos e se deve ao número diferente de repetições dos microsatélites (sequências repetitivas) (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Resumidamente esta técnica consiste na clonagem, sequenciamento e amplificação a partir de *primers* que flanqueiam as regiões de interesse sequencialmente, os produtos de amplificação são separados por eletroforese (ALZATE-MARIN, 2005).

Cada microsatélite, independente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constitui um loco genético altamente variável e multialélico. Apresentam como

vantagens, sua ampla distribuição no genoma eucariótico, codominância. Tem sido utilizado em estudos evolutivos, *fingerprints*, teste de paternidade, estudos de genética de populações, proteção de cultivares, avaliação de pureza de sementes, utilização ou conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos quantitativos (QTLs), análise de *pedigree* e seleção assistida por marcadores. Marcadores microssatélites também têm sido utilizados na construção de mapas de ligação, os quais têm sido desenvolvidos e saturados para meloeiro (PÉRIN et al., 2002; PERCHEPIED et al., 2005; FUKINO et al., 2008; YUSTE-LISBONA et al., 2011).

Esses marcadores estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente, devido a sua reprodutibilidade via PCR e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

A grande limitação dos microssatélites é a necessidade dos mesmos serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de “*primers* universais”. Além disso, o desenvolvimento desses marcadores envolve um processo demorado, trabalhoso e com elevado custo. No entanto, estas desvantagens são compensadas pela facilidade e eficiência do uso desses marcadores pela comunidade científica. Uma vez desenvolvidos, eles podem ser utilizados com a facilidade e a rapidez típicas da técnica de PCR (BORÉM; CAIXETA, 2009).

### 2.5.3 Populações de mapeamento

Para se conduzir com sucesso a identificação de QTLs e o mapeamento de genes, torna-se necessário considerar alguns critérios, o primeiro é a escolha dos genitores, de modo a maximizar a probabilidade de se encontrar polimorfismo. Também é necessário que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação (TANKSLEY, 1993). O ideal é que os genitores sejam geneticamente distantes e fenotipicamente contrastantes para um maior número possível de características. Genitores geneticamente divergentes também possuem a vantagem de facilitar o processo de genotipagem, ou preferencialmente, da construção do mapa genético de ligação (BORÉM; CAIXETA, 2009). Quanto mais divergentes os genitores, maior a proporção de marcas polimórficas, simplificando a etapa de genotipagem e permitindo, seguramente maior cobertura genômica e consequentemente maior eficiência na identificação, no mapeamento e na análise de genes de interesse (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Nos indivíduos  $F_1$  o desequilíbrio de ligação é máximo e nas populações derivadas a partir desses indivíduos procura-se explorar esse desequilíbrio. As populações segregantes que podem ser utilizadas são: população  $F_2$ , retrocruzamentos (RCs), RILs (*Recombinant Inbred Lines* ou linhagens recombinantes) e duplo-haplóides (TANKSLEY, 1993). Essa etapa é considerada crítica para o sucesso da construção do mapa (STAUB; SERQUEN; GUPTA, 1996). Em casos cujo polimorfismo é baixo, podem-se utilizar cruzamentos interespecíficos para obter maior número de locos informativos (TANKSLEY et al., 1992), o que é, entretanto, de menor utilidade para o melhoramento, cujo objetivo é utilizar as populações com máxima adaptação.

Após a obtenção da população de interesse, na maioria das vezes, utiliza-se uma população  $F_2$ , os indivíduos da população devem ser tanto “genotipados”, ou seja,

submetidos ao processo de construção do mapa genético, quanto fenotipados, ou seja, devem ser levados ao campo, em condições ideais de cultivo, para que cada indivíduo seja devidamente avaliado em termos fenotípicos (BORÉM; CAIXETA, 2009). Esta é uma etapa importante, pois o sucesso do mapeamento dos genes depende em grande parte da eficiência do processo de avaliações fenotípicas (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Como vantagens de sua utilização, podem-se destacar a facilidade e rapidez de sua obtenção. No mapeamento de QTLs estão disponíveis as informações de três genótipos (AA, Aa e aa), o que aumenta a precisão da estimativa dos componentes genéticos (ZAMIR; TADMOR, 1986).

No entanto, uma desvantagem da utilização da  $F_2$  é a necessidade de avaliar as características com base em cada indivíduo *per se*. Portanto, a eficiência dessa geração é relativa, restringindo-se mais aos caracteres qualitativos ou, ainda, aos quantitativos tipicamente de alta herdabilidade. Esse problema pode ser contornado pela utilização de populações  $F_{2,3}$ , em que as plantas são genotipadas na geração  $F_2$  e as características fenotipadas são medidas em progênies  $F_3$ , permitindo assim o uso de repetições. Os dados das médias das progênies  $F_3$  são geralmente utilizados como valor fenotípico das plantas  $F_2$  que deram origem a essas progênies (BORÉM; CAIXETA 2009). A obtenção de progênies segregantes provenientes de algumas dezenas de indivíduos é necessária para que se tenha uma amostra representativa de eventos meióticos (SOUZA JÚNIOR, 1993).

Numa próxima etapa, os indivíduos dessa população são avaliados quanto aos caracteres de interesse. Utilizando-se progênies  $F_2$ , diferentes modelos podem ser ajustados de forma a estimar separadamente contribuições de efeitos aditivos e dominantes dos QTLs. O máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população  $F_2$  e marcadores codominantes (STAUB; SERQUEN; GUPTA, 1996). Os caracteres mapeados devem distribuir-se de acordo com um padrão de segregação mendeliana. Este padrão pode ser verificado através do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ )

(BEARZOTI, 2000). Quando este não é verificado diz-se que os locos apresentam Distorção de Segregação, ou simplesmente DS.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635 p
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, p. 333-342, jul-ago. 2005.
- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIM FILHO, A.; H. KIMATI, L. Amorim (Eds). **Manual de Fitopatologia**, vol. 1, 3ª Ed. São Paulo, Ceres, p. 647.
- ANTONIO, R. P. **Identificação de QTLs de resistência ao mofo branco e de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em feijoeiro**. 2011. 155f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.
- AZEVEDO, L. A. S.; LEITE, O. M. C. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Ciba Agro, 1996. 73 p
- BAUDRACCO-ARNAS, S; PITRAT, M. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. **Theor Appl Genet**, v.93, p.57–64, July, 1996.
- BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: JORNADA EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 2000. p. 63-223.
- BERGER, R.D. Measuring disease intensity. In: Teng, P.S. & Krupa, S.V. (Eds.). Crop Loss Assessment which Constrain Production and Crop Improvement in Agriculture and Forestry. St. Paul. University of Minnesota, 1980. pp.28-31.
- BERKELEY, M.S.; CURTIS, A. (1868) *Peronospora cubensis*. Bot. J. **Linn. Soc.**10, 363



BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de lãs cucurbitáceas: observar, identificar y luchar**. Madrid: Mundi-Prensa, 1996.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2. Ed. Viçosa: UFV, 2009. 532p.

BOSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLINICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal human genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, May. 1980.

BROTMAN, Y., et al. Molecular markers linked to papaya ring spot virus resistance and *Fusarium* race 2 resistance in melon. **Theor Appl Genet**, v. 110, n. 2, p. 337-345, Nov. 2005.

CARDOSO, J. E. et al. Eficiência de Tiofanato Metílico e Clorotalonil no controle do míldio do meloeiro. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado Técnico**, 55. 2001.

CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. dos.; VIDAL, J. C. Perdas na produção do meloeiro devido ao míldio. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 2, p. 187-191, abr-jun. 2002a.

CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A.; VIDAL, J. C. Efeito do míldio na concentração de sólidos solúveis em frutos do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 378-383, jul-ago. 2002b.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.

COHEN, Y. Downy mildew of cucurbits. Pages 341-353 in: *The Downy Mildews*. D. M. Spencer, ed. Academic Press, New York. 1981.

COHEN, Y. The combined effects of temperature, leaf wetness, and inoculum concentration on infection of cucumbers with *Pseudoperonospora cubensis*. **Can. J. Bot.**, v. 55, p. 478-487, 1977b.

COHEN, Y.; COHEN, S.; EYAL, H.; THOMAS, C. E. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI 124111. **Curcubit Genet. Coop. Rep.** v. 8, p. 36-38, 1985.

COHEN, Y.; EYAL, H. (1983) Preliminary observations on resistance of *Cucumis melo* to *Sphaerotheca fuliginea* and *Pseudoperonospora cubensis* (Abstr.) **Phytoparasitica**, 11:224.

COHEN, Y.; ROTEM, J. Field and growth chamber approach to epidemiology of *Pseudoperonospora cubensis* on cucumbers. **Phytopathology**, v. 61, p. 736-737, 1971a.

COHEN, Y.; ROTEM, J. Rate of lesion development in relation to sporulating potential of *Pseudoperonospora cubensis* in cucumbers. **Phytopathology**, v. 61, p. 265-268, 1971b.

CORRÊA, R. X. et al. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n.1, p. 27-32, mar. 2001.

DE WIT, P. L. G. M. Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unraveling the molecular basis of gene-for-gene interactions. **Advances in Botanical Research**, Cingapura, v. 21, n. 1, p. 147-185, 1995.

DUSI, A. N. TASAKI, S. VIEIRA, J. V Metodologia para avaliação de resistência a *Didymella bryoniae* em melão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 43-44, 1994.

EPINAT, C.; PITRAT, M. Inheritance of resistance of three lines of muskmelon (*Cucumis melo*) to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). Pages 133-135 in: **Proceedings of Cucurbitaceae 89: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germoplasm**. C. E. Thomas, ed. U.S. Dep. Agric. Agric. Res. Serv. Charleston, SC.

FANOURAKIS, N. E. 2001. New sources of resistance against the populations of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of cucumber in Greece. In: **2<sup>nd</sup> International Symposium on Cucurbits**, 28th September-1<sup>st</sup> October, 2001, Epochal, Tsukuba, Japan. 21 (abstract).

FLOR, H. H. Inheritance of reaction to rust in fax. *J. Agric. Research*, Washington, v. 74, p. 241-262, 1947.

FRAYMOUTH, J. (1956) Haustoria of the *Peronosporales*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v. 39, p.79–107.

FUKINO, N. et al. Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 118, n. 1, p. 165-175, Dec. 2008.

GARRETT, K. A. et al. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annu Rev Phytopathol*, v. 44, p. 489–509, 2006.

GÄUMANN, E. Über die Formen der *Peronospora parasitica* (Pers.) Fries. Ein Beitrag zur Speciesfrage bei den parasitischen Pilzen. *Bot. Centralblatt. Beihefte*, v. 35, p. 395-533, 1918.

GAUNT, R. E. Measurement of disease and pathogens. In: TENG, P. S. (Ed.) *Crop Loss Assessment and Pest Management*. St. Paul: APS Press, p. 6-18, 1987.

GAUNT, R. E. The relationship between plant disease and severity and yield. *Annual Review of Phytopathology*, v. 33, p. 119-144, Sept. 1995.

GONZAGA, V. et al. Intercâmbio de germoplasma de cucurbitáceas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 17, p. 06-09, Dez. 1999.

GEFFROY, V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 12, n. 9, p. 774-784, Sept. 1999.

HAHN, M.; MENDGEN, K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant–fungus interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol*, v. 4, p. 322–327, 2001.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da mancha-de-cercospora em melancia. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, n. 1, p. 46-50, jan-fev. 2006.

- IVANOFF, S. C. Resistance of cantaloupes to downy mildew and the melon aphid. *J. Hered.*, v. 35, n. 2, p. 35-39, 1944.
- IWATA, Y. Studies on the invasion of cucumber plants by downy mildew. (In Japanese, with English summary). *Ann. Phytopathol. Soc. Jp.*, v.13, p. 60–61, 1949.
- JOUBEUR, T. et al. The fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J.*, v. 39, p. 283–297, 2004.
- KANETIS, L.; HOLMES, G.J.; OJIAMBO, P.S. Survival of *Pseudoperonospora cubensis* sporangia exposed to solar radiation. *Plant Pathology*, v. 59, n.2, p. 313–323, Apr. 2010.
- KANG, S. et al. The promise and pitfalls of sequence-based identification of plant-pathogenic fungi and oomycetes. *Phytopathology*, v. 100, n. 8, p. 732-737, Aug. 2010.
- KEINATH, A. P. Evaluation of combinations of chlorothalonil with azoxystrobin, harpin, and disease forecasting for control of downy mildew and gummy stem blight on melon. *Crop Prot.*, v. 26, n. 2, p. 83–88, Feb. 2007.
- KELLY, J. D.; MIKLAS, P. N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular Breeding*, v. 4, n. 1, p. 1-11, Feb. 1998.
- KENIGSBUCH, D.; COHEN, Y. Inheritance of resistance to downy mildew in a gynoeocious muskmelon. *Plant Dis.*, v. 73, n. 12, p. 994-996, 1989.
- KENIGSBUCH, D.; COHEN, Y. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI 124112 and commonality of resistance genes with PI 124111F. *Plant Dis.*, v. 76, p. 615-617, June. 1992.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. **Doenças das cucurbitáceas (abóbora, abobrinha, chuchu, melancia, melão, moranga, pepino)**. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. (Eds.). Manual de Fitopatologia. São Paulo, SP, Editora Agronômica Ceres. 1997, p. 325-337.
- LANGE, L; EDEN, U; OLSON, L.W. Zoosporogenesis in *Pseudoperonospora cubensis*, the causal agent of cucurbit downy mildew. *Nord. J. Bot.*, v. 8, n. 5, p. 497–504, Feb. 1949.

LEBEDA, A.; COHEN, Y. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)—biology, ecology, epidemiology, host–pathogen interaction and control. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, n. 2, p. 157-192, Feb. 2011.

LEBEDA, A.; URBAN, J. Temporal changes in pathogenicity and fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis* populations. **Acta Hort**, v. 731, p. 327–336, 2007.

LEBEDA, A.; WIDRLECHNER, M. P. A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. **J Plant Dis Protect**, v. 110, n. 4, p. 337–349, June. 2003.

LEBEDA, A.; WIDRLECHNER, M. P.; URBAN, J. Individual and population aspects of interactions between cucurbits and *Pseudoperonospora cubensis*: pathotypes and races. In: Holmes GJ. (ed) **Proceedings of Cucurbitaceae 2006**. Raleigh, NC, USA, Universal Press, 2006, pp 453–467.

LINDENTHAL, M., et al. Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. **Phytopathology**, v. 95, n. 3, p.233–240, Mar. 2005.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 161-168, jan/mar. 1997.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MICHEREFF, S. J. et al. Diagrammatic scale to assess downy mildew severity in melon. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 76-79, Jan/Mar. 2009.

MORALES, M. et al. A physical map covering the *nsv* locus that confers resistance to melon necrotic spot virus in melon (*Cucumis melo* L.). **Theor Appl Genet**, v. 111, n. 5, p. 914–922, Oct. 2005.

NEITZKE, R. S. et al. Caracterização morfológica e dissimilaridade genética entre variedades crioulas de melão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n.4, p. 534-538, out/dez. 2009.

NIETO, C. et al. An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. **Plant J**, v. 48, n. 3, p. 452–462, Nov. 2006.

OERKE, E.C. et al. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. **J. Exp. Bot**, v. 57, n. 9, p. 2121–2132, May. 2006.

PAIVA, W. O. **Melhoramento genético do melão Cantaloupe na Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 53p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 21).

PALTI, J.; COHEN, Y. Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*). The fungus and its hosts, distribution, epidemiology, and control. **Phytoparasitica**, v. 8, n. 2, p. 109–147, June. 1980.

PERCHEPIED, L.; BARDIN, M.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M. Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping. **Phytopathology**, v. 95, n. 5, p. 556-565, May. 2005.

PÉRIN, C. et al. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 6-7, p. 1017-1034, May. 2002.

PITRAT, M.; LECOQ, H. Inheritance of resistance to cucumber mosaic virus transmission by *Aphis gossypii* in *Cucumis melo*. **Phytopathology**, v. 70, n. 10, p. 958–961, Mar. 1980.

PRYOR, T.; ELLIS, J. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, v. 10, p. 281-305, 1993.

QUEIROZ, M. A. de. Os recursos genéticos vegetais e os melhoristas de plantas no Nordeste do Brasil. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, R. R., ed. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. (on line). Versão 1.0. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, out. 1999a. Disponível em: <[www.cpatia.embrapa.br](http://www.cpatia.embrapa.br)> Acessado em 16 de fev de 2014.

- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylo genetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.
- ROSTOVZEV, S. I. Beitrage zur Kenntnis der Peronosporeen. **Flora**, v. 92, p. 405–430, 1903.
- SANTOS, A. A. et al. Efeito do início de ocorrência do míldio na produção de frutos do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, n. 5, p. 548-551, set/out. 2003.
- SANTOS, G. R. et al. Reaction of melon genotypes to the gummy stem blight and downy mildew. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 160-165, Apr/June. 2009.
- SANTOS, J. B. dos. Melhoramento de plantas visando resistência à doenças. Lavras, UFLA, 2008.
- SARRIS, P. et al. Molecular polymorphisms between populations of *Pseudoperonospora cubensis* from Greece and the Czech Republic and the phytopathological and phylogenetic implications. **Plant Pathol**, v. 58, n. 5, p. 933–943, Oct. 2009.
- SAVORY, S. et al. The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 3, p. 217–226, Apr. 2011.
- SAX, K. The Association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, Baltimore, v.8, p. 552-560, May. 1923.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2. Ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 568 p.
- SHETTY, N. V. et al. Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe, and North America. **Sci Hort**, v. 94, n. 3-4, p. 231–239, Jan. 2002.
- SOLLER, M; BECKMANN, J. S. Genetic polymorphisms in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics**, v. 67, n. 1, p. 25-33, Nov. 1983.

SOUZA JÚNIOR, C. L. Sample size required to detect linkage between a marker and QTL. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 2, p. 419-430, Feb. 1993.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688-2690, Aug. 2006.

STAUB, J. E.; SERQUEN, F.C.; GUPTAM. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, v. 31, n. 5, p. 729-741, Sept. 1996.

TANKSLEY, S. D. et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n. 4, p. 1141-1160, Dec. 1992.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 205-233, 1993.

TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Bio/technology**, v. 7, p. 257-264, 1989.

TEIXEIRA, A. P. M. **Identificação de marcadores moleculares ligados a gene de resistência ao vírus do mosaico (PRSV-W) em melão (*Cucumis melo* L.)**. 2004. 50f. (Dissertação em Agronomia) - Escola Superior de agricultura Luis de Queiroz. Universidade de São Paulo Piracicaba. 2004.

TEIXEIRA, A. P. M.; BARRETO, F. A. S.; CAMARGO, L. E. A. Na AFLP marker linked to the Pm-1 gene that confers resistance to *Podospaera xanthii* race 1 in *Cucumis melo*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 547-550, 2008.

TERAMOTO, A. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo em folhas de pepineiro. **Pesq. agropec. Trop.** Goiânia, v. 3, n. 3, p. 439-445, jul/set, 2011.

THINES, M.; VOGLMAYR, H.; GÖKER, M. 2009. Taxonomy and phylogeny of the downy mildews (Peronosporaceae). Pages 47-75 in: Oomycete Genetics and Genomics. K. Lamour and S. Kamoun, eds. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.



- THODAY, J. M. Location of polygenes. **Nature**, v. 191, p. 368-370, 1961.
- THOMAS, C. E. Downy and powdery mildew resistant muskmelon breeding line MR-1. **HortScience**, v. 21, p. 329, 1986.
- THOMAS, C. E. Resistance to downy mildew in *Cucumis melo* **Plant Dis**, v. 66, p. 500-502, 1982.
- THOMAS, C. E. **Downy mildew**. In: *Compendium of Cucurbit Diseases* (Zitter, T.A., ed.), pp. 25–27. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1996.
- THOMAS, C. E. et al. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo*. **Plant Dis**. V. 72, p. 33-35, 1988.
- THOMAS, C. E. Physiological specialization in downy and powdery mildews of cucurbits. In: *Cucurbitaceae 88*, 1988, France. **Proceedings ... Avignon-Montfavet**: Institut National de La Recherche de la Agronomie 1988. p. 51-56.
- THOMAS, C. E. (1996) Downy mildew. In: *Compendium of Cucurbit Diseases* (Zitter, T.A., ed.), pp. 25–27. **Ithaca**, NY: Cornell University Press.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, 22:4673-4680, 1994.
- URBAN J.; LEBEDA, A. Resistance to fungicides in population of cucurbit downy mildew in the Czech Republic. **Acta fytotechnica et zootechnica**, v. 7, p. 327–329, 2004b.
- URBAN, J.; LEBEDA, A. Differential sensitivity to fungicides in Czech population of *Pseudoperonospora cubensis*. In: Lebeda A, Paris HS (eds), *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004*, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Olomouc, Czech Republic, Palacky University in Olomouc, 2004a, pp. 275–280. 2004.

URBAN, J.; LEBEDA, A. Fungicide resistance in cucurbit downy mildew methodological, biological and population aspects. **Annals of Applied Biology**, v. 149, n. 1, p. 63–75, Aug. 2006.

URBAN, J.; LEBEDA, A. Variation of fungicide resistance in Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 3, p. 143–51, Mar. 2007.

VOGLMAYR, H., et al. Phylogenetic relationships of Plasmopara, Bremia and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. **Mycol. Res**, v.108, p. 1011–1024, 2004.

VOS, P. R. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.23, n. 21, p. 4407-4414, Nov. 1995.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTE, T. B. C.; BIANCHETTI, L. B. Princípios sobre coleta de germoplasma vegetal, In. NASS, L. L (Ed.) **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 193-229.

YUSTE-LISBONA, F. J. et al. Genetic linkage map of melon (*Cucumis melo* L.) and localization of a major QTL for powdery mildew resistance. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 181-192, Feb. 2011.

ZAMIR, D.; TADMOR, Y. Unequal segregation of nuclear genes in plants. **Botanical Gazette**, New York, v. 147, n. 3, p. 355-358, Mar. 1986.

## CAPÍTULO II

### Reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*

#### RESUMO

O fungo *Pseudoperonospora cubensis* é o responsável por uma das principais doenças da parte aérea do meloeiro no período chuvoso da região Nordeste do Brasil. Uma das alternativas mais promissoras para o controle deste patógeno é a resistência genética, que para ser utilizada, torna necessária a busca por fontes de resistência. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de acessos e cultivares de meloeiro a *P. cubensis* a partir do germoplasma coletado em diferentes estados da região Nordeste do Brasil. Para isso foram avaliados trinta e seis acessos e quatro cultivares comerciais, em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com três repetições e sete plantas por parcela. Para garantir a infecção, além do inóculo já existente em campo foi realizada a aplicação de uma suspensão de inóculo, coletados a partir de folhas de meloeiro com sintomas da doença em plantas suscetíveis da bordadura semeadas 30 dias antes da montagem do ensaio definitivo. Visando fornecer as condições ideais de umidade necessárias ao desenvolvimento do patógeno utilizou-se da instalação de aspersores por toda a área experimental. A avaliação ocorreu aos 24 dias após o transplante, depois que 50% das plantas atingiram o estágio de floração, avaliando-se quinze folhas por planta com o auxílio de uma escala diagramática variando de zero a cinco em um total de setenta e cinco folhas analisadas (5 plantas x 15 folhas/planta). A partir das notas obtidas, foi calculado o Índice de Porcentagem da Doença (IPD) para cada genótipo. Concluiu-se que existe variabilidade no germoplasma de meloeiro para reação a *P. cubensis*, sendo os acessos A1, A4, A6, A9, A12, A17, A18, A23, A27, A35 e A36 com menor IPD e avaliados promissores para uso em programas de melhoramento genético do meloeiro visando resistência a *P. cubensis*.

Palavras-chave: Severidade. Míldio. Genótipos. Resistência.

## Reaction of accessions and melon cultivars to *Pseudoperonospora cubensis*

### ABSTRACT

The fungus *Pseudoperonospora cubensis* is responsible for one of the major foliar diseases of melon in the rainy season in the Northeast region of Brazil. One of the most promising alternatives for the control of this pathogen is genetic resistance, which to be used, it is necessary to search for sources of resistance. Therefore, the aim of this study was to evaluate the reaction of accessions and cultivars of melon to *P. cubensis* from germplasm collected in different states in the Northeast region of Brazil. For this, thirty-six accessions and four commercial cultivars were evaluated in randomized block design (RBD) with three replications and seven plants per plot. To ensure the infection, in addition to the inoculum existing in the field, an application of a suspension of inoculum collected from melon leaves with symptoms of the disease in susceptible plants of the surrounding seeded 30 days before to final implementation of the definite assay was performed. In order to provide the ideal of necessary humidity conditions for development of the pathogen sprinkler were installed throughout the experimental area. The evaluation occurred 24 days after transplanting, after 50% of the plants reached the flowering stage, fifteen leaves per plant were evaluated with the aid of a diagrammatic scale ranging from zero to five for a total of seventy-five leaves analyzed (5 plants x 15 leaves/plant). Based on the grades obtained, Index Percent Disease (IPD) was calculated for each genotype. It was concluded that there is variability in melon germplasm for reaction to *P. cubensis*, with accessions A1, A4, A6, A9, A12, A17, A18, A23, A27, A35 and A36 with lower IPD and considered promising for the use in breeding programs of melon for resistance to *P. cubensis*.

Keywords: Severity. Downy mildew. Genotypes. Resistance.

## 1 INTRODUÇÃO

O míldio, causado pelo oomiceto *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M. A. Curtis) Rostovzev, é uma das principais doenças que ocorrem na cultura do meloeiro no período chuvoso quando são observadas temperaturas mais amenas, situadas na faixa de 16 a 22°C (KUROZAWA; PAVAN, 1997) e maior umidade relativa do ar como algo em torno de 90% (ROTEM et al., 1978). Apesar da importância desta doença, são poucos os trabalhos envolvendo a identificação de fontes de resistência a *P. cubensis* no Brasil (SANTOS et al., 2009).

O controle do míldio é feito principalmente pelo uso de fungicidas. No entanto, esta estratégia tem sido comprometida pelo alto potencial de evolução dos patógenos, selecionando raças cada vez mais resistentes a estes produtos (URBAN; LEBEDA, 2004; URBAN; LEBEDA, 2007).

O uso de cultivares resistentes para controle de doenças é a estratégia mais eficaz e econômica, impedindo ou dificultando seu estabelecimento na lavoura (NOJOSA et al., 2004), além disso, este método de controle tem sido considerado seguro e acessível. O uso da resistência genética reduz danos ao ambiente e proporciona maior segurança alimentar ao consumidor, podendo também ser utilizada de forma complementar ao controle preventivo, reduzindo custos de produção (BARBOSA et al., 2010). Desta forma, torna-se necessária a busca por fontes de resistência ao míldio, uma vez que este patógeno impede a expansão do cultivo do meloeiro no Nordeste brasileiro durante o período chuvoso.

Uma das primeiras ações para o controle via resistência a um determinado patógeno consiste na identificação de fontes de resistência. A busca pelos alelos de interesse ocorre no germoplasma disponível da espécie estudada, para isso, torna-se imprescindível a realização de coletas e a caracterização dos acessos disponíveis, a fim de se conhecer o grau de variabilidade genética contida no germoplasma da espécie em

questão. Isto deve ser realizado, com o intuito de indicar genótipos mais promissores para os trabalhos de melhoramento que visam o desenvolvimento de cultivares com características que atendam as necessidades dos agricultores e as exigências do mercado consumidor.

Em meloeiro, estudos sobre fontes de resistência ao míldio têm sido realizados. Cohen et al. (1995) avaliaram oito linhagens de meloeiro quanto a resistência ao míldio em dois experimentos e observaram que duas dessas linhagens (P22a e P6a-3) foram relativamente tolerantes a *P. cubensis* exibindo um menor índice da doença em ambos os experimentos realizados. Pan e More (1996) avaliaram a reação de 72 genótipos de meloeiro ao míldio e encontraram resistência em três destes materiais, que foram: *Cucumis figarei*, phoot (*Cucumis melo* var. *Momordica*) um semi-sobremesa de origem Indiana e Iroquis um acesso de origem americana e. Thomas (1999) realizou avaliações em campo para resistência ao míldio em 1076 genótipos de meloeiro e observou que 68 exibiram comportamento resistente.

O meloeiro é a espécie mais polimórfica dentre as Cucurbitáceas, com variabilidade para características de fruto e resistência a patógenos (LUAN et al., 2010). A descoberta de germoplasma resistente tem estimulado à criação de programas de melhoramento voltados a resistência genética a este patógeno. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de acessos e cultivares de meloeiro a *P. cubensis* utilizando-se do germoplasma coletado em diferentes estados da região Nordeste do Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Os ensaios de campo foram conduzidos na área experimental da Horta Didática, do Departamento de Ciências Vegetais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), campus Mossoró-RN. A Horta Didática, está localizada na região noroeste do Estado a 5° 12' 26" de latitude sul, 37° 19' 04" de longitude oeste, a 18 m de altitude.

O clima local, segundo a classificação de Köppen é do tipo BSw<sup>h</sup>' (quente e seco), caracterizado por temperatura média anual de 27°C, precipitação anual de 673 mm e umidade relativa média de 68,9%, com estação de chuva no verão atrasando-se para o outono (CARMO FILHO; OLIVEIRA, 1995).

O solo da área experimental foi classificado como Argissolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 1999) com relevo plano. Foram retiradas amostras de solo, cuja análise química foi processada no Laboratório de Análises de solo, água e planta da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S/A – EMPARN.

### 2.2 MATERIAL GENÉTICO UTILIZADO PARA REAÇÃO A *Pseudoperonospora cubensis*

Foram avaliados 36 acessos de meloeiro coletados em diferentes estados de região Nordeste do Brasil, (Tabela 1) e as cultivares comerciais Iracema e Olympic Express da empresa Agroflora/Sakata além de Amaral e Mabel da empresa Rijk Zwaan que serviram como testemunhas suscetíveis ao míldio.

Entre os acessos são encontrados melões *momordica* [*C. melo* L. Grupo. *momordica* (Roxb.) Duthie et Fuller], também denominados de *snapmelo*, os quais são nativos da Índia e segundo Dhillon et al. (2007) são conhecidas fontes de resistência genética a pragas e doenças, como por exemplo, *Fusarium oxysporum* Schldt. fsp. *melonis* Snyder et Hansen, *Podosphaera xanthii* (Castagne) Braun et Shishkoff e também a *P. cubensis*. As principais características desses frutos são o baixo teor de sólidos solúveis e rachadura em frutos maduros não possuindo valor comercial para a fruticultura nordestina.

Tabela 1 - Local de coleta dos acessos de melão utilizados no presente trabalho. Mossoró – RN, UFERSA, 2014.

<b>Acesso</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Acesso</b>	<b>Local de coleta</b>
A 1	Mossoró – RN	A 24	Arapiraca – AL
A 3	Baraúna – RN	A 25	Cururipe – AL
A 4	Baraúna – RN	A 26	Lagarto – SE
A 5	Baraúna – RN	A 27	São Luis – MA
A 6	Assú – RN	A 28	São João dos Patos – MA
A 7	Quixeré – CE	A 29	Paraibano – MA
A 9	Quixeré – CE	A 30	São José do Mipibu – RN
A 11	Petrolina – PE	A 32	Itabuna – BA
A 12	Petrolina – PE	A 34	Juazeiro – BA
A 13	Patos – PB	A 35	Muribeca – SE
A 14	Sousa – PB	A 36	Jaboatão – PE
A 15	Arapiraca – AL	A 37	Areia Branca – RN
A 16	Juazeiro – BA	A 39	Irecê – BA
A 17	Barra dos Mendes – BA	A 41	Paulistana – PI
A 18	Picos – PI	A 42	Brumado – BA
A 19	Parnaíba – PI	A 43	Itapecurú – MA
A 22	São Luis – MA	A 44	Serra Talhada – PE
A 23	Ipanguassu – RN	A 45	Messejana – CE



### 2.3 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO PARA REAÇÃO A *Pseudoperonospora cubensis* EM CAMPO

A montagem do ensaio foi realizada em área com histórico da doença. Para isto, o preparo do solo constou de uma aração e uma gradagem, seguida de sulcamento em linhas, espaçadas de 2,0 m com profundidade de aproximadamente 20 cm, onde foi realizada a adubação de fundação, utilizando-se 4,0 t ha<sup>-1</sup> de 27 polifétil e 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Os adubos foram aplicados nos sulcos de plantio e incorporados com enxada manual.

Em seguida os camalhões foram construídos manualmente, ao mesmo tempo em que o sistema de irrigação foi montado. Para isso, fitas de gotejamento de 16 mm com vazão de 1,6 litros por hora foram colocadas sobre os camalhões. Utilizou-se a cobertura de solo plástica (*mulching* preto/preto com 1,2 metros de largura) sobre as linhas.

As sementes dos acessos/cultivares foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido com 128 células compostas do substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, sendo o transplantio realizado quando as mudas apresentaram um par de folhas definitivas (15 dias após a semeadura). O experimento foi conduzido em blocos casualizados com três repetições. A unidade experimental foi composta por uma linha com sete plantas. O espaçamento da cultura foi de 2,0 m entre linhas por 0,3 m entre plantas.

As adubações de cobertura foram realizadas via fertirrigação, com início sete dias após o transplantio. Foram utilizadas as seguintes fontes: Uréia e ácido nítrico: 126,7 kg ha<sup>-1</sup>; cloreto de potássio: 252,2 kg ha<sup>-1</sup> e ácido fosfórico: 66,1 kg ha<sup>-1</sup>. A partir da segunda semana foram feitas adubações foliares, semanalmente, junto com os defensivos, empregando, 40 mL por 20,0 L de solução dos produtos contendo: 0,6 g L<sup>-1</sup> de Mg; 0,8 g L<sup>-1</sup> de Ca; 0,05 g L<sup>-1</sup> de B; 0,3 g L<sup>-1</sup> de Zn; 0,2 g L<sup>-1</sup> de Mn e 0,01 g L<sup>-1</sup> de Mo.

Devido à irregularidade de chuvas na região, tornou-se necessário instalar aspersores entre as linhas para propiciar umidade favorável para o desenvolvimento do fungo. O sistema era acionado duas vezes ao dia por 1,5 h/turno, cada turno, com uma vazão média de 68 L h<sup>-1</sup>.

Foi aplicado semanalmente o inseticida Abamectin para controle da mosca-minadora (*Liriomyza trifolii* L.). Além disso, procedeu-se a realização de duas capinas manuais aos cinco e vinte dias após o transplante. As demais práticas culturais e manejo obedeceram às necessidades da cultura no estado (NUNES et al., 2006).

## 2.4 REAÇÕES DE ACESSOS E CULTIVARES DE MELOEIRO A *Pseudoperonospora cubensis*

### 2.4.1 Identificação morfológica do patógeno

Folhas com sintomas da doença foram coletadas em fazendas produtoras de melão localizadas nas cidades de Assú e Mossoró (RN) e Icapuí (CE), acondicionadas em um isopor com gelo e conduzidas imediatamente ao laboratório de Fitopatologia da UFERSA para a identificação morfológica das estruturas de *P. cubensis*. Após a confirmação do patógeno, uma suspensão contendo as estruturas do mesmo foi preparada. Para tanto, o material contaminado foi lavado com água destilada e a suspensão obtida foi imediatamente inoculada com auxílio de borrifadores manuais, em plantas suscetíveis da bordadura semeadas 30 dias antes da montagem do ensaio definitivo. A inoculação foi feita ao final da tarde, quando as temperaturas são mais amenas. Esta medida foi tomada para garantir a presença do inóculo em campo.

Ao se observar os primeiros sintomas da doença na área experimental, folhas de diferentes acessos de meloeiro foram coletadas, devidamente herborizadas e encaminhadas para a clínica de doenças de plantas da Universidade Federal de Viçosa

– MG. A partir dessas amostras foram realizadas observações da morfologia de *P. cubensis*, por meio de lâminas contendo as estruturas representativas do fungo montadas em lactofenol ou lactofucsina. Para observação das estruturas fúngicas e preparo das lâminas foram realizados cortes a mão livre ou quando necessário foram feitos cortes em criomicrotomo (Leitz, Kriomat), com espessuras de 20 e 30  $\mu\text{m}$ . Observações da morfologia e ilustrações foram feitas sob microscópio de luz Olympus BX 51 equipado com DIC, câmera clara e uma câmera fotográfica Olympus E330 (Figura 1). A partir da confirmação morfológica da presença do patógeno na área experimental deu-se continuidade ao experimento com a avaliação da severidade da doença.

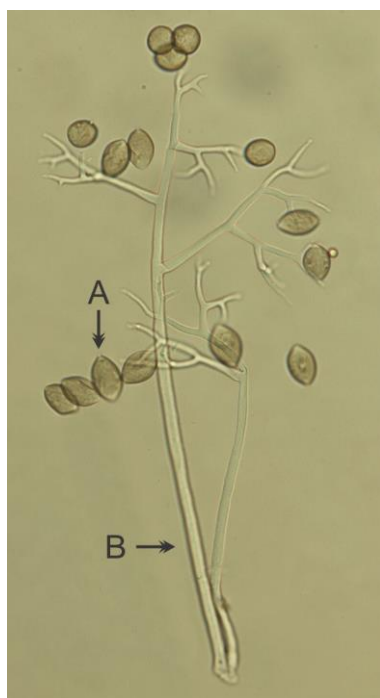


Figura 1 – Fotografia realizada através de microscópio de luz, mostrando aspectos morfológicos do fungo *Pseudoperonospora cubensis*. (A) Esporângios. (B) Esporangióforo. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

#### 2.4.2 Avaliação da reação de genótipos de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*

Para avaliação da reação dos acessos e cultivares a *P. cubensis*, foram tomadas aleatoriamente 15 folhas no terço médio das cinco plantas que compunham a área útil de cada tratamento em cada uma das três repetições. Esta avaliação foi realizada na época, de floração das plantas, ou seja, aos 24 DAT. Foi utilizada a escala diagramática proposta por Michereff et al. (2009), com modificações. Após alterações, a escala passou a ser composta por notas que variaram de zero a cinco, onde, zero = sem sintoma; 1 = menos de 10 pontos isolados na área foliar; 2 = 11 a 20 pontos isolados; 3 = manchas e 30% da área foliar afetada; 4 = manchas necróticas e 50% da área foliar afetada; 5 = manchas necróticas e mais de 50% da área foliar afetada.

Os dados das notas por acesso com a média das 75 folhas (5 plantas com 15 folhas/planta) foram utilizados para o cálculo do índice de porcentagem de doença IPD, proposto por McKinney (1923), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{IPD} = \frac{\sum (\text{grau da escala} \times \text{frequência})}{(\text{n}^\circ \text{ total de folhas} \times \text{grau máximo da escala})} \times 100$$

Com base no IPD foram propostas cinco categorias para o agrupamento dos tratamentos: (1) 0 = altamente resistente (AR); (2) 1–12 = resistente (R); (3) 13–25 = moderadamente suscetível (MS); (4) 26–50 = suscetível (S); (5) > 50 = altamente suscetível (AS).

## 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS FENOTÍPICOS

Com as notas médias das parcelas de ambos os experimentos, obtidas pela avaliação da resistência de acessos e progênies ao míldio (tratamentos), foram realizadas análises de variância individuais (ANAVA) para cada ensaio, utilizando-se o programa computacional GENES (CRUZ, 2006), com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + b_{k(j)} + r_j + p_i + e_{ijk},$$

Onde:

$Y_{ijk}$ : observação referente ao tratamento  $i$  no bloco  $k$ , dentro da repetição  $j$ , sendo:  $i = 1, 2, 3, \dots, 225$ ;  $k = 1, 2, \dots, 15$ ; e  $j = 1, 2, 3$ ;

$\mu$ : média geral;

$b_{k(j)}$ : efeito aleatório do bloco  $k$ , na repetição  $j$ ,  $b_{k(j)} \cap N(0, \sigma_b^2)$ , sendo  $\sigma_b^2$  a variância do efeito de blocos dentro de repetição;

$r_j$ : efeito fixo da repetição  $j$ ;

$p_i$ : efeito aleatório dos tratamentos  $i$ ,  $p_i \cap N(0, \sigma_p^2)$ , sendo  $\sigma_p^2$  a variância do efeito dos tratamentos;

$e_{ijk}$ : efeito aleatório do erro experimental,  $e_{ijk} \cap N(0, \sigma^2)$ .

O esquema da análise de variância (ANAVA) está representado na Tabela 2.

Tabela 2 - Esquema da análise de variância (ANAVA) individual.

Análises Individuais		
FV	QM	F
Repetições	Q1	
Bl/rep (aj.)	Q2	
Tratamentos (aj.)	Q3	Q3/Q4
Erro Efetivo	Q4	

As médias dos tratamentos para ambos os experimentos a partir da análise individual foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 1% de probabilidade para separar as progênies quanto à reação a *P. cubensis*.

Foi estimado o coeficiente de variação (CV) para ambos os experimentos pela expressão:

$$CV = \sqrt{\frac{Q_{\text{Merro}}}{\bar{X}}}$$

Em que:

$\bar{x}$ : média geral do experimento

Com o objetivo de verificar a precisão experimental, procedeu-se com o cálculo da estimativa da acurácia seletiva. Esta estimativa tem a função de informar sobre a eficácia da inferência acerca do valor genotípico. A acurácia depende da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação, além do número de repetições (RESENDE, 2002). Conforme Resende e Duarte (2007), a avaliação da precisão experimental por meio da acurácia seletiva, varia de 0 a 1, sendo que, apresentando estimativa de 0,9 a 1,0 a classificação é dita muito alta; de 0,7 a 0,89 precisão alta; 0,5 a 0,69 precisão moderada e valores de acurácia de 0,1 a 0,49 é dita como precisão baixa. Para cada experimento foi estimada a acurácia seletiva ( $\hat{r}_{\hat{E}E}$ ) de acordo com a seguinte expressão:

$$\hat{r}_{\hat{E}E} = \sqrt{1 - \frac{1}{F}}$$

Em que:

F: valor do teste F de *Snedecor* para o efeito de tratamentos da análise de variância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância referente às notas da reação de acessos e cultivares de meloeiro a *P. cubensis*, encontra-se na Tabela 3. A partir do valor do coeficiente de variação (22,77%), pode-se associar uma boa precisão do experimento. Santos et al. (2009) encontraram CV de 10,8% em avaliação da reação de 28 genótipos dentre acessos e cultivares de meloeiro ao míldio por escala de notas em condições de campo.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância em DBC da reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* (IPD), coeficiente de variação (CV) e acurácia seletiva ( $\hat{r}_{EE}$ ), sob condições de campo. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
<b>Blocos</b>	2	266,70
<b>Tratamentos</b>	39	208,36**
<b>Resíduo</b>	78	77,70
<b>Média</b>		16,93
<b>CV (%)</b>		22,77
<b><math>\hat{r}_{EE}</math> (%)</b>		62,74

\*\* : Significativo pelo teste F ( $p < 0,01$ ).

Pesquisas demonstram que há restrições quanto ao uso do CV para se avaliar a precisão experimental, pois tal medida é muito influenciada pela média (CARGNELUTTI FILHO; STORK, 2007; RESENDE; DUARTE, 2007). Por este motivo, foi calculado o valor da acurácia seletiva ( $\hat{r}_{EE}$ ), que correlaciona o valor genotípico verdadeiro do experimento com o predito a partir da informação fenotípica. O valor da acurácia seletiva obtida para esta pesquisa foi de 62,74% podendo ser

associado a uma precisão moderada, o que atesta uma boa precisão experimental na avaliação do ensaio.

Houve diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os genótipos avaliados em relação à severidade da doença, o que leva a inferir que existe um comportamento heterogêneo entre estes frente à respectiva característica. Este resultado comprova a existência de variabilidade genética e possível sucesso com a seleção de genótipos resistentes ao míldio.

A média obtida no experimento foi de 16,93. Este resultado mostra que a maioria dos genótipos comportou-se em campo, conforme a classificação do IPD, como moderadamente suscetível a infecção causada pelo míldio.

De acordo com o teste de Scott e Knott demonstrado na Tabela 4, as notas da reação dos genótipos variaram de 6,1 a 40,4%, sendo os acessos A17 e A37 classificados como mais resistente e suscetível ao míldio, respectivamente. Dentre as cultivares, as notas variaram de 27,5 a 29,2, com média de 28,4%.

O resultado do teste de médias permitiu a classificação dos genótipos em três categorias: R = Resistente; MS = Moderadamente Susceptível e S = Suscetível.

Nenhum dos genótipos avaliados comportou-se como altamente resistente à infecção causada por *P. cubensis*. Por outro lado, os acessos A1, A4, A6, A9, A12, A17, A18, A23, A27, A35 e A36 expressaram comportamento resistente ao patógeno. Outros autores também encontraram resistência ao míldio em acessos de meloeiro. Thomas (1999) avaliou a reação de 1076 acessos em campo e observou que 68 destes genótipos expressaram comportamento resistente a este patógeno, sendo os acessos PI 271329 e PI 401644, os que apresentaram maior resistência com índice de doença de 2,6 e 2,8 respectivamente. Fontes de resistência ao míldio também foram encontradas por Cohen et al. (1995), ocasião em que os autores avaliaram a reação de oito linhagens de meloeiro (D 17-2, D17-5, P6a-1, P6a-2, P6a-3, P15a, P20a, P22a) e observaram tolerância ao míldio em duas dessas linhagens (P22a e P6a-3).



Tabela 4 - Reação em campo de 40 genótipos de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

Genótipos	Míldio		Genótipos	Míldio	
	IPD <sup>(1)</sup> (%)	Reação <sup>(2)</sup>		IPD (%)	Reação
A1	10,4b	R	A26	12,2b	MS
A3	17,0b	MS	A27	11,3b	R
A4	10,1b	R	A28	18,5b	MS
A5	17,7b	MS	A29	15,9b	MS
A6	11,6b	R	A30	13,9b	MS
A7	17,4b	MS	A32	27,5a	S
A9	9,9b	R	A34	14,3b	MS
A11	17,0b	MS	A35	10,0b	R
A12	9,0b	R	A36	11,7b	R
A13	15,3b	MS	A37	40,4a	S
A14	13,6b	MS	A39	24,4a	MS
A15	17,9b	MS	A41	34,4a	S
A16	25,6a	S	A42	38,3a	S
A17	6,1b	R	A43	17,5b	MS
A18	8,8b	R	A44	22,0a	MS
A19	13,8b	MS	A45	25,3a	MS
A22	23,6a	MS	AMARAL	29,2a	S
A23	10,9b	R	IRACEMA	27,9a	S
A24	15,6b	MS	MABEL	27,5a	S
A25	15,0b	MS	OLIMP	28,9a	S

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup> AR = Altamente resistente; R = Resistente; MS = Moderadamente Suscetível; S = Suscetível; AS = Altamente suscetível.

Outras pesquisas também foram desenvolvidas com este mesmo propósito por Santos et al. (2004) e Santos et al. (2009). No entanto, em nenhuma dessas avaliações foram encontradas fontes de resistência a *P. cubensis*. Discrepâncias entre as pesquisas citadas e os resultados encontrados neste trabalho eram esperadas. Uma possível razão seria a diferença entre os grupos de genótipos avaliados, uma vez que Santos et al. (2004) avaliaram um conjunto de 20 híbridos comerciais, enquanto Santos et al.

(2009), analisaram a reação de 28 genótipos, entre eles estavam cultivares comerciais, acessos coletados no Brasil e outros de diferentes origens. Enquanto que os genótipos utilizados no presente trabalho tratam-se, em sua maioria, de acessos coletados em pequenas propriedades da agricultura de subsistência do Nordeste brasileiro, com maior adaptação às condições edafoclimáticas predominantes do clima seco desta região. No processo seletivo empregado pelos agricultores, é possível que tenha sido feita a seleção para determinados patógenos, mesmo que não intencional. O fato de 30,55% dos acessos serem classificados como resistentes, reforça essa hipótese.

Verificou-se ainda, que os genótipos em geral, comportaram-se de forma moderadamente suscetível. Este resultado é um indicativo de que os acessos avaliados podem conter genes de resistência. Portanto, a hibridização entre os mesmos poderá produzir cultivares resistentes ou moderadamente suscetíveis ao míldio, o que pode vir a contribuir para a redução do uso de agrotóxicos utilizados durante a produção desta cultura (COHEN et al., 1995).

Ainda de acordo com a Tabela 4, pôde-se observar que todas as cultivares comerciais apresentaram comportamento suscetível ao míldio, não diferindo quanto ao nível de suscetibilidade. Segundo a literatura, são encontradas poucas cultivares apontadas como resistentes a este patógeno, e estas são, principalmente, do tipo Cantaloupe (McCREIGHT et al., 1993), *momordica* e gália (PAIVA et al., 2004), o que aumenta a necessidade de avaliação de germoplasma destes tipos de melões, em busca de fontes de resistência a este patógeno. Ressalta-se que parte dos acessos avaliados nesta pesquisa é do tipo *momordica*.

Com relação aos genótipos classificados como resistentes, inicialmente, podem ser considerados como promissores para utilização em programas de melhoramento genético, visando resistência a *P. cubensis*. Não obstante, em razão de variações experimentais entre outros fatores, os referidos acessos deverão ser investigados em trabalhos posteriores para verificar a estabilidade da resistência. Além disso, esses

materiais poderão ser usados como genitores para geração de populações segregantes em estudos de herança.

#### **4 CONCLUSÕES**

Os acessos de meloeiro A1, A4, A6, A9, A12, A17, A18, A23, A27, A35 e A36 apresentaram resistência e são promissores para futuras utilizações em programas de melhoramento visando resistência ao míldio do meloeiro.

Existe variabilidade no germoplasma de meloeiro coletado em diferentes estados da região Nordeste brasileira quanto à reação à *P. cubensis*.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA, M. A. G. et al. Sistemas de Produção, 5 ISSN 1807-0027 Versão Eletrônica. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melao/SistemaProducaoMelao/doencas.html>> Acessado em: 16 de fev 2014.

CARGNELUTTI FILHO, A. C. Estatísticas de avaliação da precisão experimental em ensaios de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 17-24, jan. 2007.

CARMO F. F.; OLIVEIRA O. F. **Mossoró**: um município do semi-árido nordestino características e aspectos florísticos. Mossoró: ESAM, 1995. 62p. (Coleção Mossoroense, série B).

COHEN, R.; SCHREIBER, S.; NERSON, H. Response of melon breeding lines to powdery mildew, down mildew, Fusarium wilt and sudden wilt. **Plant Disease**. v. 79, n. 6, p. 616-619, June. 1995.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: Estatística experimental e matrizes. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285 p.

DHILLON, N. P. S. et al. Diversity among landraces of Indian snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 6, p. 1267-1283. Sept. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa Produções de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). Manual de fitopatologia: volume 2: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: CERES, 1997. p. 315.

LUAN,F.; SHENG, Y.; WANG, Y.; STAUB, J.E. Performance of melon hybrids derived from parents of diverse geographic Origins. **Euphytica**, Wageningen, v. 173, n.1, p. 1-16, May. 2010.

McCREIGHT, J. D. et al. Ed. **Genetic improvement of vegetable crops**. 1993, NewYork: Pergamom Press, 530 p.

McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agriculture Research**, Washington, v.26, n. 9, p. 195–217, Nov. 1923.

MICHEREFF, S. J. et al. Diagrammatic scale to assess downy mildew severity in melon. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 76-79, Jan/Mar. 2009.

NOJOSA, G. B. A.; FARIA, M. V.; SILVA, L. H. C.P. **Melhoramento genético visando o controle de doenças**. In: SILVA, L. H. C.P; CAMPOS, J. R; NOJOSA, G. B. A. Manejo integrado-doenças e pragas em hortaliças. UFLA, MG, 2004, p. 241-243.

NUNES, G.H.S. et al. Estabilidade fenotípica de híbridos de melão amarelo avaliados no Pólo Agroindustrial Mossoró-Assu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 57-67, set. 2006.

PAIVA, W. O. **Melhoramento genético do melão Cantaloupe na Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 53p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 21).

PAN, R. S.; MORE, T. A. Screening of melon (*Cucumis melo* L.) germplasm for multiple disease resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 88, n. 2, p. 125-128, Aug. 1996.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 182-194, set. 2007.

ROTEM, J.; COHEN, Y.; BASHI, E. Host environmental influences on sporulation in vivo. Annu. **Rev. Phytopathol**, v.16, p. 83-101, Sept. 1978.

SANTOS, A. A.; CRISÓSTOMO, J. R.; CARDOSO, J. W. Avaliação de híbridos de melão quanto as principais doenças nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2004.

SANTOS, G. R. et al. Reaction of melon genotypes to the gummy stem blight and the downy mildew. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 160-165, Abr/Jun. 2009.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Mar. 1974

THOMAS, C. E. Additional evaluations of *Cucumis melo* L. germplasm for resistance to downy mildew. **HortScience**, v. 34, n. 5, p. 920-921, Aug. 1999.

URBAN J.; LEBEDA, A. Resistance to fungicides in population of cucurbit downy mildew in the Czech Republic. **Acta fytotechnica et zootechnica**, v. 7, p. 327–329, 2004b.

URBAN, J.; LEBEDA, A. Variation of fungicide resistance in Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 3, p. 143–151, Mar. 2007.

### CAPÍTULO III

#### Identificação de QTLs associados à resistência a *Pseudoperonospora cubensis* em meloeiro

#### RESUMO

O míldio, causado pelo oomiceto *Pseudoperonospora cubensis*, é uma das mais importantes doenças do meloeiro. No entanto, há grande dificuldade de avaliação da resistência ao míldio em campo devido à influência do ambiente. Uma possível solução para esta questão é a identificação de fontes de resistência utilizando marcadores de DNA. Desta forma, este trabalho teve como objetivo identificar marcadores do tipo microssatélite (SSR) ligados a *Quantitative Trait Loci* (QTLs) de resistência ao míldio do meloeiro, em uma população derivada do cruzamento entre as linhagens de meloeiro MR-1 e Védraçais, contrastantes para o caráter. Para isso, os genitores foram cruzados e posteriormente foi obtida a geração F<sub>2</sub> da qual foram tomadas 98 plantas. De cada planta F<sub>2</sub> foi extraído o DNA para avaliação molecular, com *primers* microssatélites polimórficos selecionados nos genitores. A partir da geração F<sub>2</sub> foram obtidas 98 progênies F<sub>2,3</sub> utilizadas para as avaliações fenotípicas em campo. As progênies foram avaliadas no delineamento em látice simples 10 x 10. Uma vez que a eficiência do látice foi baixa (100,28%), a análise estatística foi realizada em delineamento em blocos casualizados (DBC). Entre as progênies foram detectadas diferenças genéticas significativas (P<0,01) no período avaliado. A estimativa de herdabilidade foi alta, 86,57% para as progênies F<sub>2,3</sub>. Nenhuma das progênies comportou-se como altamente resistente ou resistente à infecção causada por *P. cubensis*. No entanto, 19,59% das famílias apresentaram suscetibilidade moderada. Dos 77 *primers* utilizados inicialmente, 23 foram polimórficos entre os pais. Dos quais 13 amplificaram em todos os indivíduos da progênie. Os valores das frequências genotípicas foram submetidos ao teste  $\chi^2$  para verificar se houve segregação distorcida. Dez dos treze marcadores apresentaram valores abaixo do nível crítico especificado pelo teste FDR. Como a população é derivada de dois genitores, cada genitor deveria ter contribuído com a mesma frequência alélica. No entanto, para oito locos houve maior proporção de alelos do genitor Védraçais enquanto que para dois locos houve maior proporção de alelos do genitor MR-1. Para os demais locos (três) as frequências alélicas não se alteraram. Na identificação de QTLs, pela regressão linear simples e múltipla, os valores dos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) obtidos para os marcadores foram relativamente baixos na população. Pela regressão linear simples os marcadores que mais explicaram a característica na população F<sub>2,3</sub> foram CMBR 139 e CMMS 22-



2 com  $R^2$  de 16,40 e 10,18%, respectivamente. Os mesmos marcadores foram identificados pela regressão linear múltipla. Estes marcadores poderão ser utilizados na SAM em futuros trabalhos de resistência do meloeiro ao míldio.

Palavras-chave: Míldio. *Cucumis melo* L.. Marcadores SSR. Progenie.

## Identification of QTLs associated with resistance to *Pseudoperonospora cubensis* in muskmelon

### ABSTRACT

Downy mildew, caused by the oomycete *Pseudoperonospora cubensis*, is one of the most important diseases of melon. However, it is very difficult to assess resistance to mildew in the field due to the influence of the environment. One possible solution to this issue is to identify sources of resistance using DNA markers. Thus, this study aimed to identify microsatellite markers (SSR) linked to Quantitative trait loci (QTLs) for resistance to downy mildew of melon in a population derived from crosses between the provenances melon MR-1 and Védreantais, contrasting character. For this, parents were crossed and then the F<sub>2</sub> generation was obtained, of which 98 plants were taken. Each F<sub>2</sub> plant was extracted DNA for molecular evaluation, with polymorphic microsatellite primers selected on parents. From the F<sub>2</sub> generation were obtained 98 progeny F<sub>2,3</sub> used for phenotypic evaluations in field. The progenies were evaluated in simple lattice design in 10 x 10. Since the efficiency of the lattice was low (100.28%), statistical analysis was performed in a randomized block design (RBD). We detected significant differences between the progenies (P<0.01) during the study period. The heritability estimate was high 86.57% for the progeny F<sub>2,3</sub>. None of the progenies showed highly resistant or resistance to infection caused by *P. cubensis*. However, 19.59% of families were moderately susceptible. Of the 77 primers used initially, 23 were polymorphic between the parents. Of which 13 are amplified in all individuals of the progeny. The values of genotypic frequencies were subjected to  $\chi^2$  to determine whether there was segregation distortion. Ten of the thirteen markers showed values below the critical level specified for the test. As the population is derived from both parents, each parent should have helped with the same allele frequency. However, for the eight loci there was a greater proportion of the parent alleles of the Védreantais while for two loci there was a greater proportion of the parent alleles MR-1. For other loci (three) the allele frequencies did not change. In the identification of QTL by the simple and multiple linear regressions, the values of determination coefficients (R<sup>2</sup>) obtained for the markers were relatively low in the population. Through the simple linear regression the markers that most explained the feature in F<sub>2:3</sub> population were CMBR 139 and CMMS 22-2 with R<sup>2</sup> of 16.40 and 10.18%, respectively. The same markers were identified by multiple linear regression. These markers may be used in MAS in future studies of resistance to downy mildew of melon.

Keywords: Downy mildew. *Cucumis melo* L.. SSR markers. Progeny.

## 1 INTRODUÇÃO

A suscetibilidade a patógenos foliares é um dos fatores que reduz significativamente a produtividade do meloeiro. Alguns destes patógenos, como o míldio induz lesões necróticas nas folhas podendo matar as plantas mesmo na fase adulta (PERCHEPIED et al., 2005).

O míldio caracteriza-se por ser um parasita obrigatório, por isso a avaliação da severidade causada por este patógeno, em genótipos de meloeiro, torna-se bastante subjetiva uma vez que deve ser realizada em condições de campo obstando a avaliação da resistência.

A dificuldade de avaliação fenotípica, especialmente quando se trata de plantas individuais, associada a erros experimentais, tem sido um dos grandes problemas que acometem o melhoramento para resistência de plantas à patógenos foliares como o míldio. Por essa razão, ainda são escassos os trabalhos nesse sentido. Assim, são necessárias alternativas para melhorar a eficiência da seleção de genótipos de meloeiro resistentes a este patógeno.

Uma das alternativas mais eficientes para este tipo de avaliação tem sido a utilização de marcadores moleculares, que permitem selecionar indivíduos superiores com base no genótipo, uma vez que não são afetados pelo meio e não variam com o ciclo de vida do indivíduo. Além disso, o uso destas ferramentas permite eliminar as dificuldades de análise da severidade do patógeno e de avaliação fenotípica das plantas por meio da identificação direta de genótipos resistentes. Isso é possível quando se utilizam marcadores moleculares que segreguem conjuntamente com os alelos de resistência (MELO et al., 2002).

A resistência genética ao míldio está sob controle genético complexo, sendo de difícil compreensão. Esses caracteres são controlados por vários genes (EPINAT; PITRAT, 1994 I; EPINAT; PITRAT, 1994 II; PERCHEPIED et al., 2005) e as regiões

do genoma onde eles ocorrem podem ser acessados por marcadores de DNA sendo denominadas de locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs).

Vários mapas de ligação genética foram construídos em melão, mas poucos traços de locos quantitativos para resistência ao míldio foram relatados (PERCHEPIED et al., 2005).

Um dos primeiros trabalhos, a ter esta finalidade, foi realizado por Perchepped et al. (2005), ocasião em que estes autores identificaram nove QTLs de resistência ao míldio em progênies de meloeiro obtidas do cruzamento entre PI 124112 e Védrantais. Este fato demonstra a complexidade e natureza quantitativa de resistência desta espécie ao fungo fitopatogênico *P. cubensis*. Estes QTLs foram identificados em seis grupos de ligação, que foram 2, 4, 6, 8, 11 e 12. Embora, nesta pesquisa, tenham sido encontrados QTLs relativamente estáveis em condições de clima temperado, alguns QTLs não se expressam em condições de clima diferentes daqueles onde foram identificados

Desta forma, há a necessidade de identificação de QTLs que se expressem nas condições de cultivo da região onde a cultura será produzida. Uma vez identificados, os marcadores que definem esses locos podem ser utilizados para auxiliar na seleção assistida por marcadores (SAM). Assim sendo, no desenvolvimento de cultivares resistentes de meloeiro, a partir da identificação destes QTLs, torna-se possível a identificação direta de genótipos resistentes.

O meloeiro é uma espécie com genoma considerado pequeno, estimado em aproximadamente 375 Mb (GARCIA-MAS et al., 2012). Onde 211 genes de resistência a doenças foram identificados (SANSVERINO et al., 2010). Supõe-se que estas características facilitem à obtenção de marcadores moleculares ligados a resistência distribuída por todos os cromossomos, o que aumentaria a possibilidade de detecção dos QTLs, pois, podem-se conseguir mais facilmente mapas genéticos altamente saturados (MELO et al., 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar marcadores do tipo Microsatélite (SSR) ligados a QTLs de resistência ao míldio do meloeiro, em uma população derivada das linhagens MR-1 e Védraçais, contrastantes para o caráter.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

As avaliações fenotípicas e os cruzamentos para obtenção das populações segregantes foram conduzidos na área experimental da Horta Didática, do Departamento de Ciências Vegetais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e as avaliações genotípicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do mesmo departamento.

### 2.2 MATERIAIS GENÉTICOS E OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES

As linhagens de meloeiro MR-1 e Védrantais foram os genitores utilizados. A linhagem MR-1 foi desenvolvida nos Estados Unidos por Thomas (1986), a partir de um acesso de origem indiana, denominado PI 124111. A linhagem MR-1 é do tipo *momordica*, seus frutos são oblongos ou achatados. Possui coloração de casca amarela com nervuras verde-escura e polpa creme. Caracteriza-se principalmente por possuir dois genes de efeitos complementares denominados *Pc-1e Pc-2* que conferem resistência a *P. cubensis*. No entanto, não possui valor comercial para a fruticultura nordestina.

A cultivar Védrantais pertence ao grupo Cantaloupensis, tipo Charentais (*Cucumis melo* subsp. *melo*). Caracteriza-se por ser uma cultivar pertencente ao grupo dos melões aromáticos, sua casca é lisa, verde-clara e reticulada, forma arredondada e às vezes achatada, polpa com coloração salmão. No entanto, apresenta suscetibilidade ao míldio.

Os genitores foram cruzados em campo para obtenção da geração  $F_1$  e posteriormente foi obtida a geração  $F_2$ , da qual, foram tomadas 98 plantas. De cada planta  $F_2$  foi extraído o DNA para avaliação genotípica e obtida uma progênie  $F_{2,3}$  para as avaliações fenotípicas.

## 2.3 AVALIAÇÕES GENOTÍPICAS DAS PLANTAS $F_2$

### 2.3.1 Extração do DNA das plantas $F_2$ e dos genitores

O DNA de cada planta  $F_2$  foi extraído a partir do protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), com modificações.

As folhas foram maceradas com nitrogênio líquido adicionando-se posteriormente 10 ml de tampão de extração (2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 20 mM de EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% PVP (polivinilpirrolidona) a 65°C em um almofariz. Ao material macerado foi adicionado 30  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, em seguida a solução foi colocada em um tubo falcon de 50 ml a qual foi incubada por cerca de trinta minutos em banho-maria a 65°C homogeneizando-se a suspensão a cada 10 minutos. Após esta etapa foi adicionada uma mistura de clorofórmio: álcool isoamil, na proporção de 24:1 em volume igual ao do tampão de extração. Depois de homogeneizada, as fases orgânicas e aquosas foram separadas por centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos e posteriormente procedeu-se a coleta do sobrenadante. Em seguida, os ácidos nucleicos foram precipitados com 30 ml da mistura de 6 partes de álcool 95%: 1 parte de acetato de amônia 7,5M e colocados no freezer por 24 horas. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga e reidratados em tampão TE (1mM TRIS, 0.1mM EDTA). Após a primeira etapa, realizou-se uma segunda extração com clorofórmio-fenol-álcool isoamil 20:20:1 onde a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos e coletado

o sobrenadante, colocando-se em microtubos de 2 ml, acrescentando-se 900 µl da solução de 20 partes de álcool a 95%: para 1 parte de acetato de sódio 3M e mantida no freezer por mais 24 horas. Novamente a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos e após a precipitação, o DNA foi reidratado em tampão TE e quantificado. A quantificação de DNA foi realizada em Nanodrop<sup>®</sup> 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.). Após a quantificação, as amostras foram diluídas em TE e padronizadas em 10 ng µL<sup>-1</sup> para serem utilizadas nas reações de PCR.

### 2.3.2 Pré-seleção dos pares de *primers* para genotipagem da população F<sub>2</sub>

Foram realizadas preliminarmente, reações com os genitores (MR-1 e Védraçais), para a seleção dos *primers* polimórficos. Foram utilizados 77 pares de *primers* descritos em Chiba et al. (2003), Ritschel et al. (2004), Gonzalo et al. (2005), Fernandez-Silva et al. (2008), Katsir et al. (1996), Danin-Poleg et al. (2001), Fazio et al. (2002).

Para cada reação foram utilizados 20 ng de DNA, 100 µM de cada um dos dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase, tampão composto de 50 mM de TRIS pH 8,3, 20 mM de KCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 10µg de BSA, 0,25% de Ficoll 400, 10mM de tartrazine e água pura. O volume final para cada reação foi composto de 12µl. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, em que foi empregado o seguinte programa: cinco minutos, a 95°C, para desnaturação do DNA; oito ciclos, em que foram usados 20 segundos, à temperatura de 94°C para desnaturação; 20 segundos para anelamento do *primer*, cujas temperaturas variaram de 46°C a 68°C de acordo com o *primer*; 1 minuto a 72°C para extensão de DNA; 24 ciclos que diferiram dos primeiros apenas na temperatura de anelamento de 52°C a 65°C e uma extensão final, por quatro minutos, a 72°C.



Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal por 2 horas a 80 V em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio a 10 mg mL<sup>-1</sup> e fotografado com câmera digital. Após a verificação do polimorfismo nos genitores os *primers* considerados polimórficos foram utilizados para genotipar a população F<sub>2</sub> de 98 plantas. Os fragmentos de DNA amplificados por cada par de *primer* foram identificados na progênie como: 0, para a banda proveniente do genitor suscetível, 1 para a banda proveniente do genitor resistente e 2 para a progênie que possui as bandas dos dois genitores.

### 2.3.3 Teste da alteração das frequências genotípicas na população segregante

Para todos os marcadores foi considerado como “A<sup>1</sup>” o fragmento de DNA (alelo) proveniente do genitor resistente e “A<sup>2</sup>” ao alelo proveniente do genitor suscetível. Em cada loco foi testada a alteração das frequências alélicas, utilizando o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) considerando a frequência de 0,5 para cada um, por se tratar de uma população F<sub>2</sub> sem seleção.

A segregação dos marcadores foi avaliada aplicando-se o teste estatístico  $\chi^2$  (P<0,05 e P<0,01) que permite verificar se as frequências observadas desviam casualmente ou não das esperadas. As frequências esperadas para a geração F<sub>2</sub> foram estimadas para cada loco, em função das frequências alélicas. Isso foi realizado porque em alguns locos as frequências alélicas poderiam se desviar do valor esperado de 0,5. A expressão geral foi representada por:

$$\chi^2 = \sum \frac{(FO - FE)^2}{FE}$$

Onde:

$FO_i$  é a frequência observada da classe  $i$ .

$FE_i$  é a frequência esperada na ausência de seleção da classe  $i$ .

A correção do erro tipo I, ou seja, aceitar uma diferença estatística quando na realidade ela não é verdadeira, foi realizada com o emprego do teste FDR, ou razão de falsas descobertas (BENJAMIN; HOCHBERG, 1995) com o auxílio do programa GQMOL versão 2006.9.1 (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

#### 2.4 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA EM CAMPO DAS PROGÊNIES $F_{2,3}$

A partir das plantas  $F_2$  foram obtidas 98 progênies  $F_{2,3}$  que foram avaliadas em campo, juntamente com os genitores MR-1 e Védrantais, no período de abril a junho de 2013. Foi utilizado o delineamento látice simples 10 x 10, com parcela constituída de uma linha com cinco plantas.

O experimento foi conduzido no sistema convencional de plantio de acordo com o item 2.3 do capítulo II deste trabalho e as avaliações de reação das progênies a *P. cubensis* foram realizadas de acordo com o item 2.4.2 do capítulo II deste trabalho.

#### 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas referentes a análise de variância (ANAVA), coeficiente de variação (CV) e acurácia seletiva ( $\hat{r}_{EE}^2$ ) foram realizadas de acordo com o item 2,5 do capítulo II desta pesquisa.

A estimativa de herdabilidade para a análise de variância individual foi obtida por meio da expressão:

$$h^2 = (Q3 - Q4)/Q3$$

Os estimadores dos limites inferior (LI) e superior (LS) da herdabilidade foram os seguintes (KNAPP; STROUP; ROSS, 1985):

$$LI = \{1 - [Q3/Q4]F_{1-\alpha/2; GL\ prog\ênies; GL\ erro}^{-1}\}$$

$$LS = \{1 - [Q3/Q4]F_{\alpha/2; GL\ prog\ênies; GL\ erro}^{-1}\}$$

Onde:

$F_{1-\alpha/2}$  e  $F_{\alpha/2}$ : valores tabelados da distribuição de F, sendo  $\alpha = 0,05$ .

As médias das progênies a partir da análise individual foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 1% de probabilidade para separar as progênies quanto à reação a *P. cubensis*. Além disso, histogramas foram confeccionados com auxílio do software SISVAR 4.6. (FERREIRA, 2008), com distribuição dos grupos de progênies, de acordo com as diferentes IPD da reação a *P. cubensis*.

### 2.5.1 Identificação de QTLs por meio de regressão linear simples e múltipla

Para as análises de regressão linear simples e múltipla, com os marcadores moleculares e os dados de notas de doença, foram utilizados procedimentos que consideraram os marcadores moleculares como variáveis independentes. A identificação foi realizada em duas etapas. Na primeira, foram considerados todos os marcadores segregantes obtidos. Nessa fase, a identificação de ligação entre QTLs e marcadores foi realizada utilizando o programa SAS, versão 9.0, a partir do procedimento *backward*. Por meio desse procedimento, todos os marcadores foram inseridos no modelo inicialmente e o marcador de menor F e que não apresentou significância a 1% foi eliminado. Os marcadores remanescentes foram então submetidos ao mesmo processo de eliminação até que todos os marcadores do modelo apresentassem F parcial significativo (FERREIRA, 1995). Foram obtidas as

estimativas de  $R^2$  (coeficiente de determinação) e  $R^2_{aj}$  (coeficiente de determinação ajustado). O valor do coeficiente de determinação da regressão é a proporção da variação fenotípica da característica, explicada pelo marcador. Nas análises de regressão foram utilizadas as médias das notas de doença por progênie.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS

Inicialmente foi executada uma análise do experimento para avaliação da eficiência do látice. Como a eficiência do látice, relativo ao Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), foi baixa as comparações entre as parcelas foram realizadas sem preocupação da existência de efeitos de blocos dentro de repetição onde as parcelas estavam alocadas. Ou seja, a análise de variância de cada progênie foi executada segundo o DBC, uma vez que a eficiência da análise do modelo em látice foi baixa (100,28%).

O resumo da análise de variância referente às notas da reação das progênes  $F_{2:3}$  de meloeiro à *P. cubensis* está demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância em DBC da reação de progênes de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* (IPD), coeficiente de variação (CV), estimativa da herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ), com os respectivos limites inferior (LI) e superior (LS) e acurácia seletiva ( $\hat{r}_{EE}$ ). Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

FV	GL	QM
Progênes	99	1163,44**
Erro Efetivo	99	81,90
Média		51,07
CV (%)		17,72
$h_a^2$ (%)		86,57
$(L_I^2 - L_S^2)$		(85,35 – 92,72)
$\hat{r}_{EE}$ (%)		93,00

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

A estimativa de acurácia seletiva foi muito alta, com valor de (92,96%) indicando boa precisão experimental na avaliação da reação das progênies de meloeiro à *P. cubensis*.

O coeficiente de variação obtido foi baixo, com valor de 17,72%, indicando boa precisão experimental e está abaixo dos encontrados por Horejsi et al. (2000) que obtiveram CVs de 19,6 e 28,1% em experimentos utilizando escalas de notas para avaliação da resistência à *P. cubensis* a partir de progênies F<sub>3</sub> de pepino originadas dos cruzamentos entre as linhagens WI 1983G x Straight 8 e Zudm x Straight 8, respectivamente.

A avaliação da severidade da doença em condições naturais de ocorrência do patógeno foi eficiente em detectar diferenças genéticas ( $P < 0,01$ ) entre as progênies do cruzamento entre MR-1 e Védraçais em resposta ao patógeno *P. cubensis* (tabela 1). Parte dessa significância pode ser atribuída às elevadas diferenças entre os genitores. Este resultado indica a possibilidade de sucesso com a seleção para a característica avaliada e também para a identificação de QTLs.

A estimativa de herdabilidade, assumiu um valor elevado de 86,57% para as progênies F<sub>2,3</sub>. Este resultado reforça a hipótese de que o caráter resistência ao míldio tem um alto grau de herdabilidade e pode ser herdado de maneira expressiva de uma geração para outra. Resultados próximos a este foram encontrados por Perchepped et al. (2005) ao avaliarem este mesmo caráter em 120 linhagens recombinantes (RILs) de meloeiro, derivadas do cruzamento entre Védraçais x PI 124112. Esses autores encontraram valores de herdabilidade que variaram de 64 a 95%. Epinat e Pitrat. (1994 I) também obtiveram valores de herdabilidade similares a este ( $h^2 = 82$  e 88%), ao avaliarem a resistência ao míldio a partir progênies derivadas de cruzamentos dialélicos entre oito linhagens de meloeiro, sendo quatro dessas de origem indiana, dentre elas o acesso MR-1 e outras de diferentes origens.

Ressalta-se que os limites inferior e superior de herdabilidade foram positivos (tabela 1), confirmando a maior confiança nessas estimativas como indicadores de sucesso com a seleção.

O resumo do teste de médias aplicado com base no IPD expresso pelos genitores e suas respectivas progênes está representado na Tabela 2.

Tabela 2 - Reação em campo de genitores (MR-1 e Védraçais) e suas 98 progênes F<sub>2:3</sub> de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

<b>Genótipos</b>	<b>IPD<sup>(1)</sup></b>	<b>Genótipos</b>	<b>IPD</b>	<b>Genótipos</b>	<b>IPD</b>	<b>Genótipos</b>	<b>IPD</b>
MR-1	20,8d	P24	75,5a	P49	39,2c	P74	50,4c
Véd	84,8a	P25	75,5a	P50	65,2b	P75	30,4d
P1	40,3c	P26	21,2d	P51	57,3b	P76	24,9d
P2	22,4d	P27	87,2a	P52	34,4c	P77	21,6d
P3	79,5a	P28	50,0c	P53	38,8c	P78	60,4b
P4	72,7a	P29	93,9a	P54	41,1c	P79	87,3a
P5	41,9c	P30	78,8a	P55	37,1c	P80	94,5a
P6	76,5a	P31	63,7b	P56	60,0b	P81	84,8a
P7	21,7d	P32	22,7d	P57	28,7d	P82	85,1a
P8	28,9d	P33	75,3a	P58	21,7d	P83	24,8d
P9	84,4a	P34	64,5b	P59	36,4c	P84	74,5a
P10	70,3b	P35	28,4d	P60	22,1d	P85	87,5a
P11	73,7a	P36	19,6d	P61	56,5b	P86	42,0c
P12	26,0d	P37	65,5b	P62	46,7c	P87	52,4c
P13	70,0b	P38	15,9d	P63	40,5c	P88	37,6c
P14	13,1d	P39	17,1d	P64	30,3d	P89	58,1b
P15	39,9c	P40	18,9d	P65	78,7a	P90	42,3c
P16	18,0d	P41	83,6a	P66	28,3d	P91	26,9d
P17	14,7d	P42	57,3b	P67	80,0a	P92	31,3d
P18	82,0a	P43	59,2b	P68	78,9a	P93	28,8d
P19	29,6d	P44	86,4a	P69	41,1c	P94	72,7a
P20	25,9d	P45	85,3a	P70	56,0b	P95	43,6c
P21	19,2d	P46	23,2d	P71	92,5a	P96	54,4b
P22	47,6c	P47	48,3c	P72	31,6d	P97	82,7a
P23	68,7b	P48	67,1b	P73	39,9c	P98	70,3b

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 1% de probabilidade.

Os dois genitores, como esperado, diferiram quanto à expressão do caráter. De acordo com o teste de Scott e Knott a 1% de probabilidade, as linhagens MR-1 e Védraçais obtiveram IPD de 20,8 e 84,8%, ou seja, comportando-se como resistente e suscetível respectivamente. A linhagem MR-1 é conhecida fonte de resistência, sendo utilizada em diversos trabalhos, que visam passar este caractere não apenas para o meloeiro, mas também para outras espécies do gênero *Cucumis* com características agrônomicas favoráveis (EPINAT; PITRAT, 1994 I; LEBEDA et al., 1996).

O teste aplicado permitiu a formação de quatro grupos. Este resultado é um indicativo de que as progênies diferem geneticamente quanto à reação a *P. cubensis* possibilitando sucesso com a seleção para esta característica e também a possibilidade de identificação de QTLs.

A nota média do IPD entre as progênies variou de 13,1 a 94,5, com média geral de 51,07 evidenciando a existência de diferentes níveis de resistência entre as progênies avaliadas.

Um total de 31 progênies apresentou menor sensibilidade ao míldio, com notas que variaram de 13,1 (progênie 14) a (progênie 72) 31,6%. As progênies P14, P16, P17, P21, P36, P38, P39 E P40 apresentaram médias de IPD menores que a linhagem resistente MR-1.

As progênies mais sensíveis ao míldio apresentaram médias que variaram de 72,7 (progênies 4 e 94) a 94,5% (progênie 80), sendo 27 progênies pertencentes a este grupo.

Desta forma, a identificação de progênies que apresentam resistência ao míldio é um passo importante para o melhoramento genético visando resistência a este patógeno, uma vez que depois de identificadas, essas progênies poderão ser combinadas com cultivares que possuem características agrônomicas favoráveis ou cruzadas entre si, com o intuito de aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis, selecionando progênies com níveis cada vez mais favoráveis de resistência



e com uso potencial em programas de melhoramento genético do meloeiro visando resistência a *P. cubensis*.

Visando classificar as progênes, para melhor entendimento da reação expressa por cada uma dessas, os dados médios do IPD submetidos ao teste de médias foram agrupados em três das cinco categorias propostas, como demonstrado na Figura 1 expressa abaixo.

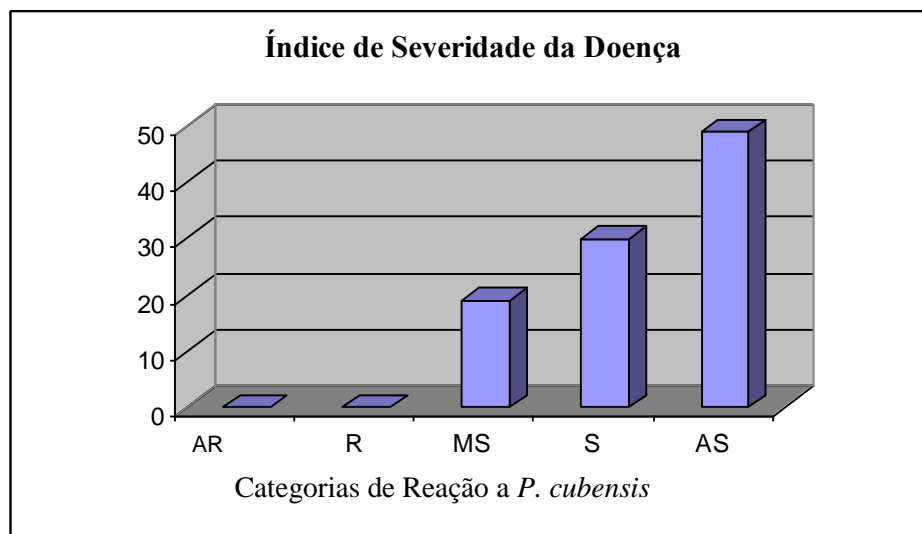


Figura 1 - Número de indivíduos com base nas categorias de IPD: (AR) altamente resistente = 0%; (R) resistente 1–12%; (MS) moderadamente suscetível = 13– 25%; (S) suscetível = 26–50%; (AS) altamente suscetível > 50%. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

De acordo com a análise realizada, nenhuma das famílias avaliadas foi altamente resistente à infecção causada pelo míldio. Também não foram encontradas famílias resistentes. Esses resultados não se diferenciam dos encontrados por Paiva et al. (2004), quando avaliaram a reação de progênes de melão cantaloupe ao míldio, ocasião em que também não detectaram progênes resistentes.

No entanto, 19,56% das progênes foram avaliadas como moderadamente suscetível o que demonstra a possível presença de alelos de resistência nesses

genótipos. É provável que progênies classificadas nesta categoria possam ter herdado alelos do pai resistente MR-1.

O fato de terem sido identificadas progênies em diferentes categorias evidencia a ocorrência de segregação entre as famílias.

Entretanto, a maioria das progênies avaliadas (48,45%) comportou-se como altamente suscetível ao patógeno em questão, o que justifica a preocupação com o desenvolvimento de cultivares de meloeiro resistentes ao míldio.

O histograma de frequências com pontos médios das classes de IPD da reação das progênies F<sub>2,3</sub> de meloeiro a *P. cubensis*, está representado na Figura 2.

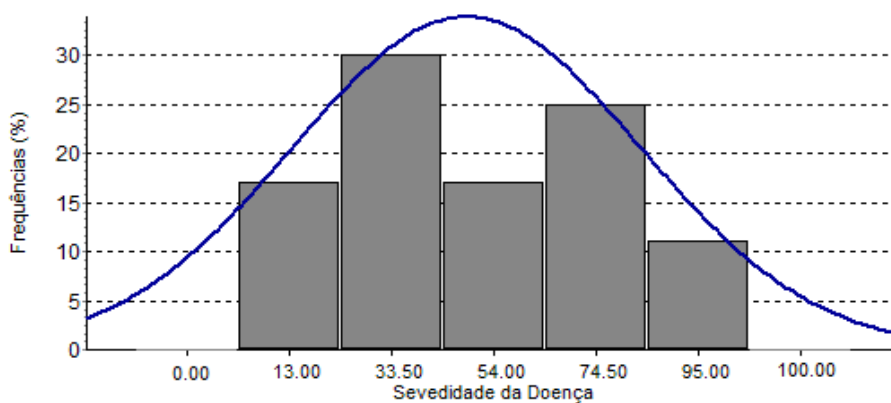


Figura 2 - Distribuição de frequência da reação de progênies de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

Foi observada uma variação contínua sugerindo a existência de vários genes controlando a expressão dessa característica. Este resultado é consistente com o encontrado por Perchepied et al. (2005), onde estes autores concluíram sobre a existência de vários genes controlando a resistência em meloeiro à *P. cubensis*.

## 3.2 AVALIAÇÕES GENOTÍPICAS

### 3.2.1 Emprego de microssatélites na população segregante

Foram utilizados inicialmente 77 pares de *primers* SSR, dos quais 23 (29,875%) foram polimórficos entre os genitores MR-1 e Védrantais (tabela 3). Essa elevada taxa de polimorfismo já era esperada, uma vez que o meloeiro é uma espécie na qual naturalmente, se encontra grande variabilidade genética (STAUB et al., 2002), principalmente quando se utiliza genitores muito contrastantes. Dos 23 *primers*, treze amplificaram em toda a população e foram utilizados para identificação dos QTLs.

Tabela 3 - Características dos *primers* de microssatélite (SSR) polimórficos entre os genitores contrastantes para resistência ao míldio do meloeiro MR-1 e Védrantais. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
CMMS 33-2 F	GCTACTTTTATGGCGGCAGTGACG
CMMS 33-2 R	ATTCGGATGATTATTCTTCGCAGTT
CMMS 30-3 F	TCCCACCAGCCCAACGGACACACT
CMMS 30-3 R	GAGATACAGAAACGACGACTAACCT
CMMS 22-2 F	CGTTATACAAGATAGAGATAGAGAG
CMMS 22-2 R	TTCAACTAATCCCCAAGACAAACAA
CMMS 15-4 F	GTCCGCCATCGCCACTACAAATCAA
CMMS 15-4 R	CTCCGTAAAACCTTCTTCCTCTCTC
CMMS 35-4 F	ACGGATACATCGAGGAGACTTCATG
CMMS 35-4 R	GTCAGCTTCAACCCTTTACTTTTTTC
CSWCT02B F	TTCTGCATACCCTCTCCT
CSWCT02B R	GAAACAAAAGCCTCCATTG
CMGAN94 F	GAGAGAGAGAGAGAGATCTAAAC
CMGAN94 R	GTCATGTCCGGTTATCTTGT
CMTCN62 F	AAGATCGCCTCTATCACAG
CMTCN62 R	ATTTGTAATCCCAACGCATC
CMBR139 F	AAACGCATCTTCCAGTTAGGA

“...continua...”

“TABELA 3, continua”

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
CMBR139 R	TCCAAACCCATCTCCATTTC
CMBR143 F	ACAAACCGCATCTTCCATT
CSWCT 10 F	AGATCGGAATTGAAAAAG
CSWCT 10 R	AAAGGGGCTTCCTCTCTA
CAPS-Dde I F	GCCCAACCTTCAACTCGATA
CAPS-Dde I R	TTGAATCTCATTTCCTGTTGCAT
CMTCN14 F	TATATTGGCTTTGGCTCTCG
CMTCN14 R	GATTCGTTATCTCGACCAAC
CSWCT29 F	TGGACGAGTTGCTCTTGTAAGCCT
CSWCT29 R	ATCAAACCTGGCATGTGGCATGAC
CSWCT01 F	TTCTGATCAACGACGAAG
CSWCT01 R	GAAACAAAAGCCTCCATTG
CMCTN19 F	GAATGATTGGAGCAACCAGT
CMCTN19 R	GCTTTTTGAATTTGTGCAGGG
CMCTN7 F	AATGACACTGCCACATTCT
CMCTN7 R	AGGTTTTTCAATGGAGGGGA
CMTCN67 F	TCTCTTACAACCTTTTGTCG
CMTCN67 R	GGTCAAGGATTCATCGTTG
CMCTN53 F	CCACATTTGATGGAAATCTT
CMCTN53 R	CATTTTATAGCTTATCTTCCG
CMTC163 F	CTAAAACCTAACTCTTTTCC
CMTC163 R	TTTGTGGGACTCGTTGAATGA
CMGAN 73 F	ATCCAACCTCGACCAAGAAAC
CMGAN 73 R	CAGCTCTACAACAACATCTG
CMAGN 68 F	GGAAGGAAATTAGCATGCAC
CMAGN 68 R	GCCACTCTGTCTTTCTTCC
CMMS 24-3 F	GAGGGAGAGAGTTTGTAATAAATG
CMMS 24-3 R	TCGCCAATTACATTACAACCTTTTC

### 3.2.2 Segregação dos marcadores na população segregante

Os valores das frequências genotípicas foram submetidos ao teste  $\chi^2$  a 1% de probabilidade (para verificar se houve segregação distorcida em relação à esperada e para controlar a taxa da falsa descoberta (*False Discovery Rate* ou FDR), foi aplicado o

método de Benjamim e Hochberg (1995). Foi obtido um nível crítico para o critério FDR de 0,40%. Dez dos treze marcadores apresentaram valores abaixo do nível crítico especificado, ou seja, dez marcadores apresentaram segregação distorcida (Tabela 4).

Tabela 4 - Teste  $\chi^2$  para as frequências genóticas, probabilidade FDR (%) e frequências alélicas da geração F<sub>2</sub> do cruzamento entre as linhagens MR-1 e Védrañtais. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

Marcador	Distorção de segregação					Frequência alélica	
	Frequência Genotípica					f(A <sup>1</sup> )	f(A <sup>2</sup> )
	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	$\chi^2$	FDR (%)		
CMBR 139	26	47	25	0,184 <sup>ns</sup>	91,22 <sup>ns</sup>	0,50	0,50
CSWCT 01	22	21	55	54,22 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,33	0,67
CMBR 143	22	3	73	138,45 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,24	0,76
CMGAN 94	30	46	22	1,67 <sup>ns</sup>	43,31 <sup>ns</sup>	0,54	0,46
CMCTN19	29	23	46	33,49 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,40	0,60
CAPS DdeI	40	16	42	44,53 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,50	0,50
CMCCA 145	13	14	71	118,65 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,20	0,80
CMMS 35-4	25	28	45	26,16 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,41	0,59
CMMS 2-3	31	14	53	29,88 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,39	0,61
CMMS 33-2	44	12	42	55,10 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,50	0,50
CMMS 15-4	67	14	17	101,02 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,75	0,25
CMMS 22-2	28	35	35	9,0 <sup>**</sup>	1,11 <sup>ns</sup>	0,46	0,54
CMMS 30-3	23	25	50	38,90 <sup>**</sup>	0,0 <sup>*</sup>	0,35	0,65

A<sup>1</sup>A<sup>1</sup> homozigoto semelhante ao genitor MR-1; A<sup>1</sup>A<sup>2</sup> heterozigoto com alelos do genitor MR-1 e Védrañtais; A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> homozigoto semelhante ao genitor Védrañtais.  $\chi^2$  das frequências genóticas, onde \*,\*\* significativo a 5% e 1% e <sup>ns</sup>= não significativo; Critério FDR, em que: \*Valor abaixo do nível crítico especificado a 1%, para segregação esperada de 1:2:1; <sup>ns</sup>= não significativo (marcadores que não apresentaram distorções).

As frequências alélicas observadas na população estão também descritas na Tabela 5. Como a população é derivada de dois genitores, cada genitor contribui com a mesma frequência alélica. Assim, na ausência de seleção, migração e mutação, espera-se que a frequência de cada alelo do marcador seja 0,5. Para oito locos houve maior proporção de alelos do genitor Védrañtais enquanto que para dois locos houve maior

proporção de alelos do genitor MR-1. Para os demais locos (três) as frequências alélicas não se alteraram.

### 3.2.3 Identificação de QTLs por meio de regressão linear simples e múltipla

Os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos para os marcadores foram relativamente baixos na população (Tabela 5).

Tabela 5 - Resumo das análises de regressão linear simples, considerando os marcadores separadamente e de regressão linear múltipla, com seleção de modelo pelo método *backward*, para resistência do meloeiro ao míldio, grupos de ligação e estimativa dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e de determinação ajustado ( $R^2_{aj.}$ ). Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

<b>Tipo de Análise</b>	<b>Marcador</b>	<b>Pr&gt;F</b>	<b>R<sup>2</sup>(%)</b>	<b>R<sup>2</sup>aj.(%)</b>
<b>Simple</b>	CMBR 139	0,0001	16,40	15,52
	CSWCT01	0,1607	2,10	1,00
	CMBR 143	0,4323	0,00	0,00
	CMGAN94	0,4335	0,00	0,00
	CMCTN 19	0,0670	3,49	2,47
	CAPS D I	0,2189	1,59	0,50
	CMCCA 145	0,7678	0,00	0,00
	CMMS 35-4	0,5579	0,00	0,00
	CMMS 2-3	0,1060	2,73	1,70
	CMMS 33-2	0,2518	1,38	0,34
	CMMS 15-4	0,3878	0,00	0,00
	CMMS 22-2	0,0014	10,18	9,23
	CMMS 30-3	0,3947	0,00	0,00
<b>Múltipla</b>	CMBR 139 + CMMS 22-2	0,0001	29,52	28,02

Para regressão linear simples os marcadores que mais explicaram a característica na população  $F_{2,3}$  foram CMBR139 e CMMS 22-2, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 16,40 e 10,18%, respectivamente (tabela 5). Mesmo sendo considerados baixos esses coeficientes de determinação estão dentro dos encontrados por outros autores ao estudarem o caráter resistência a doença. Fukino et al. (2008) também identificaram dois QTLs de resistência a oídio em uma população de meloeiro que explicavam 22 e 28% da variação fenotípica. Perchepied et al. (2005), estudando a relação entre QTLs de resistência ao míldio e ao oídio, identificaram também dois QTLs de resistência explicando de 12 a 38% da variação fenotípica.

Quando os marcadores foram avaliados utilizando a regressão múltipla de *Backward* (Tabela 5), pôde-se observar que os locos selecionados pela regressão linear simples também foram selecionados pelo método de *Backward* explicando uma boa parcela da variação fenotípica observada ( $R^2 = 29,52\%$ ). Um dos objetivos do presente estudo foi identificar QTLs associados à resistência ao míldio que pudessem ser utilizados na seleção indireta para essa característica. Desta forma, a partir dos marcadores identificados neste estudo, existe a possibilidade de utilização de uma combinação de marcadores associados à resistência ao míldio, por exemplo, CMBR 139 e CMMS 22-2 que juntos explicam 29,52% da variação fenotípica observada. Estes marcadores podem auxiliar na seleção, quando empregados na fase inicial de avaliação da população segregante, para auxiliar na seleção das progênies que reunirem o maior número de QTLs promissores. Dessa forma, no desenvolvimento de cultivares resistentes, podem-se eliminar, pelo menos no início do programa, as dificuldades de inoculação do patógeno e de avaliação fenotípica das plantas por meio da identificação direta de genótipos resistentes.

#### **4 CONCLUSÕES**

Dois marcadores, CMBR 139 e CMMS 22-2, foram identificados como potenciais para seleção indireta, visando à resistência ao míldio.

Foi confirmada a herança quantitativa da resistência do meloeiro ao míldio, controlada, pelo menos, pelos dois QTLs identificados.



## REFERÊNCIAS

BENJAMIN, Y.; HOCHEBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 57, n. 1, p. 289-300, May 1995.

CHIBA, N. et al. Development of Microsatellite Markers in Melon (*Cucumis melo* L.) and Their Application to Major Cucurbit Crops. **Breeding Science**, v. 53, n.1, p. 21-27, Aug. 2003.

DANING-POLEG, Y.; REIS, N.; KATSIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. **Theor Appl Genet**, Berlin, v. 102, p. 61-72, Jan. 2001.

DOYLE, I.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p.13-15, 1990.

EPINAT, C.; PITRAT, M. Inheritance of resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) in muskmelon (*Cucumis melo*). I. Analysis of a 8x8 diallel table. **Agronomie**, v. 14, n. 4, p. 239-248, 1994.

EPINAT, C.; PITRAT, M. Inheritance of resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) in muskmelon (*Cucumis melo*). II. Generation means analysis of 5 genitors. **Agronomie**, v. 14, n. 4, p. 249-257, 1994.

FAZIO, G.; STAUB, J. E.; CHUNG, M. Development and characterization of PCR markers in cucumber. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, Alexandria, v. 127, n. 4, p. 545-557, July. 2002.

FERNANDEZ-SILVA, I. et al. Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). **Theor Appl Genet**, v. 118, n. 1, p. 139-150, Dec. 2008.

FERREIRA, D. F. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares através de simulação.** 1995. 210 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1995.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, jul./dez. 2008.

FUKINO, N. et al. Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). **Theor Appl Genet**, Berlin, v. 118, n. 1, p. 165-175, Dec. 2008.

GARCIA-MAS, J. et al. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 29, p. 11872- 11877, July. 2012.

GONZALO, M. J. et al. Simple sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). **Theor Appl Genet**, Berlin, v.110, n. 5, p.802–811, Mar. 2005.

HOREJSI, T.; STAUB, J. E.; THOMAS, C. Linkage of RAPD markers for downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**, v. 115, n. 2, p. 105-113, Jan. 2000.

KATZIR, N. et al. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several cucurbitaceae species. **Theor Appl Genet**, Berlin, v. 93, n. 8, p. 1282-1290, Dec. 1996.

KNAPP, S. J.; STROUP, W. W.; ROSS, W. M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 1, p. 192-194, Jan/Feb. 1985.

LEBEDA, A.; KRSITKOVÁ, E.; KUBA-LÁKOVÁ, M. Interspecific hybridization of *Cucumis sativus* x *Cucumis melo* as a potential way to transfer resistance to *Pseudoperonospora cubensis*. In: GÓMEZ-GUILLAMÓN, M. L.; SORIA, C.; CUARTERO, J.; TORÉS, J. A.; FERNÁNDEZ-MUNOZ, R. (ed.) **Cucurbits Towards 2000**. Proceedings of the VIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. 1996, Malaga (Spain), May 28-30, p. 31-37.

MELO, L. C.; SANTOS, J. B.; FURTADO, D. F. Mapeamento de QTLs para reação ao oídio e mancha angular do feijoeiro-comum em diferentes locais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p.1115-1126, Ago. 2002.

PAIVA, W. O. **Melhoramento genético do melão Cantaloupe na Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 53p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 21).

PERCHEPIED, L.; BARDIN, M.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M. Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 5, p. 556-565, Jan. 2005.

RITSCHHEL, P. S. et al. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **Biomed Central Plant Biology**, London, v. 4, n. 9, p. 235-246, May 2004.

SANSEVERINO, W. et al. PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 38, pp. D814-D821, Jan. 2010.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 568 p.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Mar. 1974

STAUB, J. E.; ROBBINS, M. D.; LÓPEZ-SESÉ, A. I. Molecular methodologies for improved genetic diversity assessment in cucumber and melon. In: J. D. Creight, ed., Proceedings XXVI IRC. Horticulture: Art and science for life- Advances in vegetable Breeding. **Acta Horticulturae**, n. 642, p.41-47, 2002.

THOMAS, C. E. **Downy mildew**. In: Compendium of Cucurbit Diseases (Zitter, T.A., ed.), pp. 25–27. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1996.

THOMAS, C.E. Downy and powdery mildew resistant muskmelon breeding line MR-1. **HortScience**, v.21, n. 2, p.329, 1986.