

**RAVIER VALCÁCER DE MEDEIROS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E REAÇÃO DE  
ACESSOS DE MELANCIA A *Didymella bryoniae***

MOSSORÓ-RN  
2015

**RAVIER VALCÁCER DE MEDEIROS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGIA, MOLECULAR E REAÇÃO DE  
ACESSOS DE MELANCIA A *Didymella bryoniae***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal Rural  
do Semi-Árido, como parte  
das exigências para  
obtenção do título de  
Mestre em Agronomia:  
Fitotecnia.

**Orientador:** D. Sc. RAFAELA PRISCILA ANTONIO  
Co-orientador: Glauber Henrique de Sousa Nunes

MOSSORÓ-RN  
2015

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

Medeiros, Ravier Valcácer De.

Caracterização morfológica, molecular e reação de acessos de melancia a *Didymella bryoniae* / Ravier Valcácer De Medeiros. - Mossoró, 2015.  
66f: il.

I. Título

RN/UFERSA/BOT/344-15  
M488c

CDD 635.615

**RAVIER VALCÁCER DE MEDEIROS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E REAÇÃO DE  
ACESSOS DE MELANCIA A *Didymella bryoniae***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal Rural  
do Semi-Árido, como parte  
das exigências para  
obtenção do título de  
Mestre em Agronomia:  
Fitotecnia.

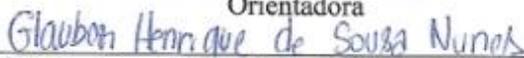
APROVADA EM: 12/02/2015

BANCA EXAMINADORA



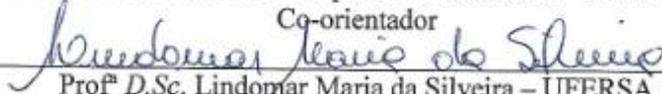
Profª D.Sc. Rafaela Priscila Antonio - Embrapa Semiárido/UFERSA

Orientadora



Profº D.Sc. Glauber Henrique de Sousa Nunes - UFERSA

Co-orientador



Profª D.Sc. Lindomar Maria da Silveira - UFERSA

Conselheira



D.Sc. Pedro Martins Ribeiro Júnior - Embrapa Semiárido

Membro Externo

A meu pai (em memória), João Rui de Medeiros, por ter sido a maior e melhor referência para minha vida.

## **DEDICO**

A minha mãe, Maria do Socorro de Medeiros, e à minha irmã, Ravena Valcácer de Medeiros, por serem as pessoas de fundamental importância para minha formação acadêmica e educação pessoal.

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por todas as graças ministradas em mim e meus entes queridos;

À Universidade Federal Rural do Semi-árido - UFERSA, pela oportunidade em participar do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores Rafaela Priscila Antônio, Glauber Henrique de Sousa Nunes e Lindomar Maria da Silveira, pela orientação, ensinamentos, ajuda e compreensão;

À minha noiva, Luiza Vieira, pela ajuda, paciência, amor, carinho e devoção;

Ao GERMEV (grupo de estudos de recursos genéticos e melhoramento vegetal), em especial a José Maria, John Victor, Erica Cristina, Ana Carolina, Anânkia Ricarte, Robson Gomes, Ana Kelly, Elaíne Welk, Dalila Regina e Leidianne Albuquerque, pela ajuda, incentivo e companheirismo;

Aos amigos e companheiros da casa 07 masculina, Jonatan Levi, Jackellison Oliveira, Manoel Salvador, Marinalvo Vicente, Samuel Oliveira, Rauny Oliveira, José Maria, Wlisses Câmara, Paulo Augusto, Dimas Paiva, Bernardo Júnior, Ciro Igor, João Luiz, Acácio Emanuel, Kadmo Leite e Lucas Leite, pelos momentos compartilhados de alegrias, pela paciência, amizade sincera, apoio e incentivos ao crescimento profissional;

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFERSA, pela importante colaboração na parte laboratorial;

Aos amigos e companheiros de convívio, Jonatan Levi, José Maria e Rauny Oliveira, pelos momentos compartilhados de alegrias, pela paciência, amizade sincera, apoio e incentivos ao crescimento profissional;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha qualificação, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO GERAL

MEDEIROS, Ravier Valcácer de. **Caracterização morfológica, molecular e reação de acessos de melancia a *Didymella bryoniae***. 2015. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar morfológica e molecularmente 24 acessos de melancia pertencentes à Coleção de Germoplasma de Cucurbitáceas do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e promover a seleção de fontes de resistência dentre estes acessos ao cretamento gomoso. Para a caracterização morfológica foram utilizados 24 acessos de melancia e duas cultivares comerciais como testemunhas, Crimson Sweet e Olímpia. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições e cinco plantas por parcela. A caracterização foi realizada utilizando descritores morfo-agronômicos apenas em caracteres do fruto. Realizou-se análise de variância e agrupamento das médias pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. Com estes dados foram obtidas as distâncias generalizadas de Mahalanobis ( $D^2_{ij}$ ) e os acessos agrupados pelo método baseado na ligação média (UPGMA) com confecção do dendograma e avaliação da contribuição relativa dos descritores para a divergência genética. A caracterização molecular foi realizada com marcadores RAPD. Os produtos das ampliações foram computados como ausência do alelo (0) e presença do alelo (1). A estimativa de similaridade genética entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Sorence-Dice. Cem *primers* SSR que foram desenvolvidos para melão tiveram sua transferibilidade avaliada para melancia. Para se observar a reação dos acessos a *D. bryoniae* o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições e os mesmos genótipos utilizados na caracterização. Cada parcela foi constituída de cinco plantas. A inoculação foi realizada em plântulas com 25 dias após o plantio, com a inserção de palitos colonizados com o isolado no colo das plântulas, e para testemunha palitos esterilizado sem presença de inoculo. As avaliações foram iniciadas sete dias após a inoculação e a partir de então, efetuadas a cada sete dias durante três semanas. A severidade da doença foi avaliada pela utilização de uma escala de notas variando de 0 a 4, tomando para análise as notas referentes ao último dia de avaliação. Os dados médios das notas por parcela foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Observou resultados significativos para os descritores massa do fruto (MF), comprimento (C) e largura do fruto (L), formato do fruto (FF), espessura da casca na região peduncular (EC1), sólidos solúveis (SS), cor da polpa (CP), padrão de listras (PL) e cor externa do fruto (CF). O agrupamento dos acessos a partir dos descritores morfológicos produziu tão somente três grupos de acessos. Sendo que os descritores que mais contribuíram para divergência genética foram L, FF, MF, PL, SS, C, CF e CP com 19.12%, 13.56%, 11.53%, 10.19%, 9.80%, 8.37%, 7.83% e 5.22%, respectivamente. O agrupamento realizado com os marcadores moleculares produziu cinco grupos. Nas análises de transferibilidade 77% dos *primers* SSR se mostraram promissores para serem utilizados em

trabalhos com melancia. Para reação a *Didymella bryoniae* verificou-se efeito significativo esses acessos, destacando-se A-1, A-6, A-10, A-11, A-14 com resistência. Promissores para etapas futuras em programas de melhoramento. Sendo assim, pode-se afirmar que existem diferenças morfológicas e moleculares nos acessos avaliados, como também possíveis fontes de resistência a *D. bryoniae*.

**Palavras-chaves:** Fontes de resistência, *Citrullus lanatus*, crestamento gomoso.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Ravier Valcácer de. **Morphological, molecular and reaction watermelon access to *Didymella bryoniae***. 2015. 66p. Thesis (MS in Agronomy / Plant ) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

The aim of this study was to characterize morphologically and molecularly 24 watermelon accessions belonging to the Cucurbitaceae Germplasm Collection of Plant Genetic Resources Laboratory at the Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA) and promote the selection of sources of resistance among these accesses gummy. For the morphological characterization were used watermelon 24 hits and two commercial cultivars as witnesses, Crimson Sweet and Olympia. The design was a randomized complete block design with three replications and five plants per plot. The characterization was performed using morphological and agronomic descriptors only in fruit characters. We conducted analysis of variance and clustering of means by Scott-Knott at 5% probability test. With these data were obtained generalized Mahalanobis distances ( $D^2_{ij}$ ) and access grouped by the method based on the average linkage (UPGMA) with tailoring dendrogram and evaluation of the relative contribution of descriptors for genetic divergence. Molecular characterization was performed using RAPD markers. The products of the amplifications were counted as absence of allele (0) and presence of the allele (1). The estimate of genetic similarity between each pair of genotypes was calculated by Sorence-Dice coefficient. One hundred primers SSR that were developed for melons were evaluated for their transferability watermelon. To observe the reaction of access to *D. bryoniae* the design was completely randomized with three repetitions and the same genotypes used in the characterization. Each plot consisted of five plants. Inoculation was accomplished in seedlings 25 days after planting, with the inclusion of colonized with toothpicks isolated on the lap of the seedlings, and to witness sticks sterilized without presence of inoculum. The evaluations were initiated seven days after inoculation and thereafter, performed every seven days for three weeks. Disease severity was assessed by using a grade scale ranging from 0 to 4, taking to review the notes for the last valuation date. The average data of notes per plot were subjected to analysis of variance (ANOVA) and averages grouped by Scott and Knott test at 5% probability. Observed significant results for the bulk of the fruit descriptors (MF), length (L) and width of fruit (L), fruit shape (FF), shell thickness in the stalk region (EC1), soluble solids (SS), color pulp (CP), pattern of stripes (PL) and external fruit color (CF). The grouping of hits from the morphological descriptors produced as only three access groups. Since the descriptors that most contributed to genetic divergence were L, FF, MF, PL, SS, C, CF and CP with 19:12%, 13:56%, 11:53%, 19.10%, 9.80% 8:37%, 7.83% and 5.22% respectively. The clustering performed with molecular markers produced five groups. In the analyzes of transferability 77% of SSR primers showed promise for use in work with watermelon. For reaction to *D. bryoniae* there was a significant effect of these hits, highlighting A-1, A-6, A-10, A-11, A-14 with resistance. Promising for future steps in breeding

programs. Thus, it can be said that there are morphological and molecular differences in accessions, as well as possible sources of resistance to *D. bryoniae*.

**Key words:** Sources of resistance, *Citrullus lanatus*, Gummy.

## LISTA DE TABELA

- Tabela 1- Local de coleta dos acessos de melancia (*C. lanatus*) pertencentes à Coleção de Germoplasma de cucurbitáceas da UFERSA. Mossoró, UFERSA, 2015. ....39
- Tabela 2 - Resumo da análise de variância para os descritores massa do fruto (MF); formato do fruto (FF); espessura da casca na região do pedúnculo (EC1); da inflorescência (EC2); da lateral 1 (EC3) e da lateral 2 (EC4); cor da polpa (CP); cor externa do fruto (CF); padrão de listras (PL); sólidos solúveis (SS); vitamina C (VC) e firmeza da polpa (FP) em 24 acessos e duas testemunhas de *C. lanatus*. Mossoró, UFERSA, 2015..47
- Tabela 3 - Teste de médias para os descritores quantitativos massa do fruto (MF); formato do fruto (FF); espessura da casca na região do pedúnculo (EC1); cor da polpa (CP); cor externa do fruto (CF); padrão de listras (PL) e sólidos solúveis (SS) em 24 acessos e duas testemunhas de *C. lanatus*. Mossoró, UFERSA, 2015.....46
- Tabela 4 - Contribuição relativa dos caracteres, massa do fruto (MF); formato do fruto (FF); espessura da casca na região do pedúnculo (EC1); da inflorescência (EC2); da lateral 1 (EC3) e da lateral 2 (EC4); cor da polpa (CP); cor externa do fruto (CF); padrão de listras (PL); sólidos solúveis (SS); vitamina C (VC) e firmeza da polpa (FP) para divergência pelo método de Singh (1981) utilizados na caracterização de 24 acessos e duas cultivares de melancia (*C. lanatus*). Mossoró, UFERSA, 2015.....49.
- Tabela 5 - Resumo da análise de variância sobre a incidência do *D. bryoniae* em acesso de melancia. Mossoró, UFERSA, 2015.....65
- Tabela 6 -Reação de acessos de melancia a *D. bryoniae*. Mossoró, UFERSA, 2015.....65

### LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação gráfica da divergência genética entre 24 acessos e duas cultivares de melancia (*C. lanatus*), obtida por meio do método hierárquico UPGMA, com base na distância generalizada de Mahalanobis. Mossoró, UFERSA, 2015.....48
- Figura 2 - Padrão eletroforético de genótipos de melancia amplificados com SSR de *C. melo* em gel de agarose a 3%.....50
- Figura 3 - Gel de agarose a 1%, contendo fragmentos de DNA amplificados com o marcador RAPD OPAA 03, a partir do DNA de 24 acessos e 2 cultivares de melancia. Mossoró – RN, UFERSA, 2013. ....52
- Figura 4 - Análise de agrupamento dos 26 genótipos de melancia por meio do marcador RAPD, obtida pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o índice de Dice. Mossoró-RN, UFERSA, 2015.....53

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Importância Econômica .....	17
2.2 A cultura da Melancia e uso de germoplasma .....	17
2.3 Caracterização Morfológica e Molecular .....	20
2.4 Transferibilidade de <i>primers</i> .....	22
2.5 Crestamento gomoso na melancia .....	23
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO I.....	33
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE MELANCIA E TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS SSR DE MELÃO PARA MELANCIA .....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	36
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 Genótipos avaliados .....	39
2.2 Local e caracterização da área experimental .....	40
2.3 Caracterização morfológica dos acessos de melancia .....	40
2.3.1 Análises estatísticas .....	42
2.4 Caracterização molecular dos acessos de melancia .....	43
2.4.1 Extração do DNA .....	43
2.4.2 Amplificação de DNA de melancia com marcadores RAPD .....	44
2.4.3 Análise estatística.....	45
2.5 Transferibilidade de marcadores SSR de <i>C. melon</i> para <i>C. lanatus</i> .....	45
2.5.1 Análise estatística.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1 Análises dos descritores quantitativos .....	47
3.2 Análises descritivas para descritores qualitativos.....	47
3.3 Análises multivariadas para estudo da divergência genética.....	47
3.4 Transferibilidade de <i>primers</i> .....	49
3.5 Caracterização molecular com marcadores RAPD.....	51
4. CONCLUSÃO .....	54
REFERÊNCIAS.....	55
CAPÍTULO II.....	57
REAÇÃO DE ACESSOS DE MELANCIA A <i>Didymella bryoniae</i> .....	57
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
1. INTRODUÇÃO .....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	62

2.1 Instalação e Condução do experimento para reação de acessos a <i>D. bryoniae</i> .....	62
2.1.1 Produção do inóculo e inoculação .....	62
2.1.2 Análise estatística .....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
4. CONCLUSÕES .....	66
REFERÊNCIAS .....	67

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] pertence à família Cucurbitaceae, sendo cultivada em todo o mundo (ALVARENGA; RESENDE, 2002). A introdução da cultura da melancia na América do Sul foi decorrência da vinda de africanos para o Brasil por meio do tráfico de escravos, ocorrido no período de 1551 a 1857 (SALDANHA, 1989).

No Brasil, a melancia vem sendo cultivada até hoje na agricultura de sequeiro na região Nordeste, em pequenos estabelecimentos agrícolas. No entanto, existem riscos de perda desta variabilidade, principalmente, pela substituição das variedades locais por genótipos melhorados e pelo êxodo rural, dentre outros fatores (QUEIROZ, 1993; QUEIROZ et al., 1996).

O cultivo da melancia é uma exploração que demanda capital devido principalmente ao uso de sementes melhoradas, além de fungicidas e inseticidas. Anualmente, os custos com fungicidas e inseticidas na cultura da melancia chegam a responder por mais de 16% dos gastos operacionais totais. Torna-se imprescindível, portanto, que os produtores reduzam as despesas em todos os níveis de produção.

Entre as doenças causadas por fungos, o crestamento gomoso causado pela *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm é considerado a principal doença na cultura da melancia (KUROZAWA et al., 2005). Desta forma, a utilização de cultivar resistente ao crestamento gomoso pode reduzir sobremaneira os custos com defensivos agrícolas na cultura. Além de ser a alternativa de menor custo, é também a mais segura, pois reduz danos ao ambiente e proporciona maior segurança alimentar ao consumidor e ao produtor, que estará menos exposto aos efeitos dos fungicidas. Portanto, a falta de cultivares resistentes a esta importante doença pode ser considerada um dos entraves a expansão do cultivo da melancia no Nordeste brasileiro.

A variabilidade genética da melancia conservada no Banco de Acesso de Germoplasma tem possibilitado o desenvolvimento de programas de melhoramento

e identificação de acessos com caracteres importantes para este fim (QUEIROZ et al., 2000).

Para utilização do germoplasma existente na região Nordeste, é necessário que se faça primeiramente uma caracterização dos acessos disponíveis. Essa caracterização pode ser realizada utilizando descritores morfológicos, bioquímicos e marcadores de DNA. Os dados de caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia e a avaliação da distância genética entre eles servirão de auxílio aos melhoristas na tomada de decisões no planejamento de cruzamentos a partir do conhecimento da similaridade genética entre os acessos.

Dessa forma, pode-se dar início à identificação de acessos resistentes ao crestamento gomoso, adaptados às condições do Nordeste brasileiro, que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de linhagens altamente resistentes e também poderão ser utilizadas para síntese de híbridos visando aos mercados interno e externo.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar morfológica e molecularmente 24 acessos de melancia pertencentes à Coleção de Germoplasma de Cucurbitáceas do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e promover a seleção de fontes de resistência, dentre estes acessos, ao crestamento gomoso, além de testar a transferibilidade de *primers* de *Cucumis melon* para *Citrullus lanatus*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Importância Econômica**

A importância econômica da melancia é notória e o seu cultivo comercial é praticado em mais de 100 países, sendo a China o principal produtor, com mais de 70% da produção mundial. O Brasil está entre os maiores produtores de melancia, atingindo em 2011 mais de 2 milhões de toneladas de frutos (FAO, 2013). Segundo Santos (2010), no período de 2001/2005 a produção de melancia no Brasil aumentou 208%, passando de 600.000 toneladas em 2001 para 1.850.000 toneladas em 2005. O país é o quarto maior produtor, posicionando-se atrás apenas da China, com 69.000.000 toneladas (maior produtor), Turquia (3.800.000 toneladas) e Irã (2.150.000 toneladas). Esta cultura ocupou uma área de mais de 63 mil hectares no Brasil, com uma produção anual de 2.056.309 toneladas, sendo a região Nordeste o maior produtor, seguida pelas regiões Sul, Norte, Centro-Oeste e Sudeste, apresentando produtividade média de 21 toneladas (IBGE, 2014).

No estado do Rio Grande do Norte, a cultura da melancia é cultivada principalmente pela agricultura de sequeiro e nas regiões irrigadas, especialmente os municípios de Serra do Mel, Mossoró e Baraúna. Dados apresentados pelo IBGE (2014) (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) apontam que a produção de melancia nesse estado em 2012 foi cerca de 130 mil toneladas, superando safras anteriores.

Rocha (2010) destaca a atual importância da melancia como uma das principais frutas em volume de produção mundial e também estando dentre os dez produtos hortifrutícolas mais exportados, com um mercado estimado em mais de 1,7 milhão de toneladas por ano.

### **2.2 A cultura da Melancia e uso de germoplasma**

A melancia é uma planta herbácea, anual, que possui caule rastejante, fino, angular, provido de pelos e de gavinhas ramificadas. O sistema radicular é extenso, mais desenvolvido horizontalmente, concentrando-se nos primeiros 30 cm do solo.

O hábito de florescimento é monoico e tanto as flores masculinas como femininas se encontram nas ramas principais, na axila das folhas (FILGUEIRA, 2003). O fruto é uma baga indeiscente com variabilidade em forma (globular, esférica, oval, cilíndrica), sabor e cor da superfície externa (verde claro, verde escuro, com ou sem listras) e interna (vermelho, rosa, branco e amarelo). A coloração amarela dos frutos deve-se à presença de carotenos e xantofilas, e a vermelha é devido à presença de licopeno, um caroteno com elevada atividade antioxidante. As sementes podem apresentar tamanhos diversos e cores variando de cinza a preto, as quais ficam embebidas na placenta, principal parte comestível do fruto (PUIATTI; SILVA, 2005).

Aparentemente, os primeiros cultivos ocorreram há mais de 4.000 anos na região do Mediterrâneo, estendendo-se até a Índia (MOHR, 1986). A introdução da cultura da melancia na América do Sul foi decorrência da vinda de africanos para o Brasil por meio do tráfico de escravos, ocorrido no período de 1551 a 1857 (SALDANHA, 1989). Segundo Romão (1995), o Nordeste é um centro de diversidade da melancia. Durante sua ocupação, vários agricultores levavam consigo as sementes trazidas pelos escravos africanos, promovendo a dispersão da cultura. Fatores como fontes de água e alimento estão relacionados ao hábito alimentar e ao costume de cultivar a melancia, além de suas propriedades diuréticas.

Nessa região, evidentemente, encontra-se ampla variabilidade genética, como foi constatado em relação às principais características da planta e de frutos (ASSIS, 1999). Romão (1995) destaca o intercâmbio de sementes entre os agricultores, resultado de processos migratórios que influenciam no aumento da variabilidade, permitindo a entrada de alelos novos no sistema. Porém, os cultivares disponíveis no mercado são oriundos de outros países, sendo suscetíveis ao ataque de pragas e doenças.

A melancia introduzida no Brasil vem sendo cultivada até hoje na agricultura de sequeiro na região Nordeste, em pequenos estabelecimentos agrícolas. No entanto, existem riscos de perda desta variabilidade, principalmente

pela substituição das variedades locais por genótipos melhorados e pelo êxodo rural, dentre outros fatores (QUEIROZ, 1993; QUEIROZ et al., 1996).

Neste momento, devemos recorrer aos bancos de germoplasma existentes para buscar alternativas para manutenção desta variabilidade. Pointing et al. (1995 apud SILVA et al., 2001) falam sobre a importância dos bancos de germoplasma em coletar documentos e disponibilizar as informações destes acessos conservados pelos agricultores.

As atividades que caracterizam um banco de germoplasma são identificadas pelas fases sequenciais envolvidas na manutenção de recursos genéticos, como coleta, multiplicação, caracterização, avaliação e conservação (GIACOMETTI, 1988).

Ressalta-se que o trabalho de coleta, multiplicação e caracterização de acessos tem grande importância por dois aspectos: o primeiro está relacionado à preservação da variabilidade genética existente na agricultura tradicional, cuja intenção é manter essa variabilidade presente nas propriedades, conservando-a em bancos de germoplasma ou mesmo *in loco*, evitando, por conseguinte, a erosão genética pela introdução de cultivares melhoradas. Um segundo aspecto está relacionado aos programas de melhoramento genético, pois as variedades tradicionais são importantes, principalmente por constituírem fontes desejáveis de alelos (MEDEIROS, 2013).

O uso de recursos genéticos e as atividades de rotina em bancos de germoplasma são de importância incontestável (VALLS, 1988); todavia, a utilização de acessos dos bancos de germoplasma ainda é restrita no Brasil. A alternativa mais promissora para servir de ligação entre recursos genéticos vegetais e os programas de melhoramento é a intensificação das atividades relacionadas ao pré-melhoramento. O pré-melhoramento é o conjunto de atividades visando à identificação de caracteres e/ou genes de interesse, presentes em materiais não adaptados ou que não foram submetidos a qualquer processo de melhoramento, tendo sua posterior incorporação nos materiais adaptados de elevado valor produtivo (NASS; PATERNIANI, 2000).

Atividades de pré-melhoramento foram realizadas por Ferreira et al. (2003) observando caracteres como número dias para o aparecimento da primeira flor feminina, número de frutos por planta, peso de frutos por planta, cor e espessura da polpa, diâmetro longitudinal e transversal de frutos, teor de sólidos solúveis, número de sementes e peso de 100 sementes por frutos.

A variabilidade genética da melancia conservada nos Bancos de Acesso de Germoplasma (BAG) tem possibilitado o desenvolvimento de programas de melhoramento e identificação de acessos com caracteres importantes para este fim, como, por exemplo, o desenvolvimento de linhagens tetraplóides e linhagens diplóides para obtenção de melancia sem sementes (QUEIROZ et al., 2000).

### **2.3 Caracterização Morfológica e Molecular**

A caracterização morfológica de acessos possibilita o conhecimento da variabilidade genética conservada no banco, a identificação de descritores específicos e a indicação de acessos, tanto para pré-melhoramento como para o melhoramento genético da espécie (SILVA, 2004). Valls (1988) comenta que o processo de caracterização consiste na anotação de descritores botânicos facilmente visíveis e/ou mensuráveis e que são expressos em todos os ambientes.

Romão (1995) promoveu a caracterização morfológica de 39 acessos de melancia coletados na agricultura tradicional de diferentes regiões do Nordeste brasileiro (Maranhão, Depressão Sertaneja – BA e Região Central da Bahia), detectando grande variabilidade genética, tanto dentro de populações de uma mesma região como entre populações de regiões distintas. Com os resultados do trabalho, o pesquisador sugeriu uma lista com 22 descritores específicos para a cultura.

A caracterização baseada em caracteres morfológicos implica na descrição da variabilidade genética de acessos conservados em bancos de germoplasma, fornecendo informações sobre a variabilidade intra e interpopulacional e organização da coleção para conservação em longo prazo no sentido de reduzir

duplicatas ou o número de acessos, agrupando aqueles que são mais similares (RITSCHER et al., 1999).

Ferreira (2001) menciona dois pontos principais sobre a utilidade das técnicas moleculares de análise genômica, incluindo os microssatélites: identificar variabilidade nas sequências de DNA de indivíduos analisados com resolução várias vezes superior ao polimorfismo passível de detecção no plano morfológico e redução da enorme complexidade do genoma estudado a análises mendelianas dos segmentos de DNA detectados.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), os descritores morfológicos e bioquímicos sofrem influência do ambiente, principalmente aqueles controlados por muitos genes, sendo, por essa razão, bem mais limitada na discriminação de acessos do que os marcadores de DNA. Entre os marcadores mais utilizados, tem-se o RAPD. Os marcadores moleculares, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), são baseados na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Reação em cadeia da polimerase), na qual sequências de DNA genômico são amplificadas ao acaso a partir de iniciadores de seqüências arbitrárias (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Apesar do caráter dominante (não diferenciam entre heterozigotos de homozigotos), o RAPD é polimórfico e de menor custo quando comparado com outros marcadores, apresentando menor número de etapas e, conseqüentemente, consumindo menos tempo para obtenção dos resultados. Além disto, é de mais fácil implementação, podendo ser utilizado para auxiliar na caracterização da variabilidade genética de acessos de bancos de germoplasma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; LEE et al., 1996).

Na melancia, os marcadores RAPD têm sido utilizados no estudo de diversidade genética. Lee et al. (1996) utilizaram 39 acessos de melancia cultivada. Neste estudo, foram utilizados 15 *primers* que amplificaram fragmentos de DNA. Cada *primer* produziu de três a sete fragmentos por genótipo. Dos 162 fragmentos detectados, 100 (62%) foram polimórficos. Como resultado do relacionamento genético entre as cultivares, o autor descreve uma média de 0,303, sendo que a maior média foi de 0,913 entre as cultivares 8 ('Shindoen nwa') e 30 ('T4-1-49').

O dendrograma construído revelou quatro grupos (A, B, C, e D), sendo que os genótipos do grupo A são intimamente relacionados quanto à característica de produção. Nos grupos B, C e D ficaram os genótipos mais intimamente relacionados do que os que formaram o grupo A.

Capeloto et al. (2004) realizaram a caracterização molecular de 18 acessos de melancia por meio de RAPD-PCR, utilizando 59 *primers*, observando variabilidade entre os acessos avaliados. Com os resultados, verificou-se que a maioria dos acessos apresentou considerável divergência entre as amostras tomadas, podendo ser observada a variabilidade existente dentro do genótipo. O agrupamento dos genótipos formou dois grupos distintos. Já nas análises dentro dos 18 genótipos, foi possível observar variabilidade entre as 20 progênies utilizadas.

Outro marcador utilizado na caracterização molecular é o microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) em virtude de ser prático, utilizar *primers* específicos, ser multialélico, codominante e ter alta reprodutibilidade. Marcadores microssatélites foram desenvolvidos por causa da codominância e do alto polimorfismo, adequado para estudar a diversidade e as relações intraespecíficas (DUVAL et al., 2005).

No entanto, para a cultura da melancia ainda não foram desenvolvidos *primers* específicos. Entretanto, muitos estudos têm mostrado a possibilidade de usar pares de *primers* desenvolvidos para uma espécie em outra espécie do mesmo gênero ou de gêneros diferentes (ROA et al., 2000).

#### **2.4 Transferibilidade de *primers***

Considerando o alto custo para o desenvolvimento de marcadores microssatélites, a estratégia de análise de transferibilidade desses marcadores de uma espécie para outra é bastante oportuna. Assim, *primers* desenvolvidos em grande número para melão podem ter sua transferibilidade testada para a cultura da melancia e então utilizados para estudos de divergência genética.

A estratégia de transferibilidade de microssatélites de uma espécie para outra é uma estratégia bastante usada, pois os custos para o desenvolvimento de *primers* de SSRs são bastante elevados e um grande número deles está disponível apenas para culturas importantes (SANTOS et al., 2009).

Estes marcadores encontram-se bem relacionados entre muitas espécies, tornando possível a transferência de uma espécie para outra, podendo visualizar o grau de semelhança entre estas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Para muitas espécies dentro do mesmo gênero, a taxa de transferência de marcadores tem sido elevada (SARDAGMA et al., 2001; MARTINS et al., 2006).

Muitas transferências de marcadores microssatélites realizados tiveram resultados positivos, dentre estas a transferibilidade para espécies da mesma família, como o melão e a melancia (LAMAS et al., 2007). Jarret et al. (1996) verificaram variação genética entre acessos de *C. lanatus* var. *lanatus*, *C. lantatus* var. *citroides* e *C. colocynthis*, usando sete marcadores SSR.

Gama (2011) avaliou 17 cultivares de melancia, utilizando 36 pares de *primers* microssatélites, dos quais 10 apresentaram amplificações polimórficas de fácil interpretação. Outro ensaio bem sucedido foi realizado por Lira et al. (2008), no qual 153 *primers* SSR desenvolvidos para melão tiveram sua transferibilidade testada em bucha (*Luffa operculata* e *Luffa cilíndrica*), observando amplificação em 38 *primers*. Mesmo considerando o alto custo, esses resultados são satisfatórios e demonstram potencial de utilização.

## 2.5 Crestamento gomoso na melancia

O crestamento gomoso, causado por *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm, é uma das principais doenças fúngicas da cultura da melancia. Esta doença tem grande importância pela dificuldade no controle deste patógeno, devido ao reduzido número de fungicidas que o controlem efetivamente e à inexistência de cultivares resistentes (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

A doença causada por este fungo é também conhecida por podridão gomosa, podridão negra, podridão de micosferela e cancro das hastes (SANTOS et

al., 2005a). O fungo, agente causal desta doença, é um parasita necrotrófico facultativo de plantas da família Cucurbitaceae (SVEDELIUS, 2002). Pertence à subdivisão *Ascomicotyna*, ordem *Dothiales* e classe *Coelomycetes* (KRUGNER e BACCHI, 1995). Foi descrito pela primeira vez na França em 1891, na fase anamórfica, com o nome de *Ascochyta cucumis* Fautr & Roum, e mais tarde na fase teleomórfica como *Didymella melonis* Pass (WIANT, 1945; CHIU e WALKER, 1949). Atualmente, a fase teleomórfica recebe a denominação *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehn. A primeira descrição e ilustração da fase teleomórfica do fungo *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehn foi feita no Brasil por Santos e Café Filho (2006) no Projeto Formoso, no Estado do Tocantins.

Há relatos deste patógeno nos seis continentes, em todas as regiões produtoras de cucurbitáceas, principalmente em regiões de clima tropical. Tem como hospedeiros ao menos 12 gêneros e 23 espécies de cucurbitáceas (SANTOS et al., 2005a). No Brasil, esta doença vem despertando preocupação nos perímetros irrigados da região norte (SANTOS et al., 2005b) e nordeste do Brasil (DIAS et al., 1996), principalmente pelos danos causados à produção e à qualidade dos frutos (SANTOS et al., 2009).

O sintoma mais importante dessa doença aparece nas ramas. No entanto, também podem ser visualizadas alterações nas folhas e nos frutos, quando a doença ocorre de forma mais severa (EMBRAPA, 2010). Os sintomas provocados podem diferir de acordo com a planta hospedeira afetada e da fase em que se encontra a cultura. Em plântulas, ocorrem manchas escurecidas e arredondadas nos cotilédones, que passam ao hipocótilo, causam sua necrose e o circundam, causando posterior tombamento. Nas folhas, as lesões inicialmente apresentam-se com aspecto aquoso, depois progridem para uma mancha necrótica circular, podendo, de acordo com a evolução dos sintomas, em ataques mais severos, ocasionar a morte da plântula (SANTOS et al., 2005a).

No início da doença, é comum observar nas ramas, geralmente próximo ao solo, o aparecimento de pontos de aspecto aquoso e descoloridos. Observam-se também gotículas de exsudatos. Posteriormente, esta região torna-se escurecida por causa da presença das estruturas reprodutivas do patógeno, que, na maioria das

vezes, é acompanhada de exsudado gomoso de coloração marrom avermelhada. Os sintomas nos frutos caracterizam-se pela presença de podridões moles na região peduncular, que também pode vir acompanhando os frutos, principalmente na fase de pós-colheita (EMBRAPA, 2010).

Para o controle da doença, recomenda-se a adoção de técnicas de manejo integrado, incluindo práticas culturais, controle químico e uso do controle genético com a utilização de genótipos tolerantes (SANTOS et al., 2011).

No manejo integrado do cretamento gomoso, recomenda-se evitar o plantio na mesma área por três vezes consecutivas, fazer rotação com culturas, eliminação de plantas daninhas e hospedeiras, evitar o excesso de umidade no solo, evitar irrigação por aspersão, utilizar sementes sadias, espaçamento adequado, evitar ferimentos nas plantas durante os tratamentos culturais, não fazer a prática da amontoa e controlar os insetos que danificam as folhas (SANTOS et al., 2005a).

Segundo Santos et al. (2011), a principal forma de controle tem sido o uso de fungicidas. Porém, na grande maioria das vezes o controle químico tem apresentado baixa eficiência, devida à rápida infecção das folhas pelo patógeno, quando as condições são favoráveis (ARNY e ROWE, 1991; VAN STEEKELENBURG, 1995). Esse fato ocorre devido à resistência e/ou insensibilidade do fungo a determinados princípios ativos, entre os quais o grupo químico dos benzimidazóis e estrobilurina (MALATHRAKIS e VAKALOUNAKIS, 1983; KEINATH, 2009).

Atualmente, existe uma procura por materiais que apresentem resistência genética. Santos et al. (2011) ressaltam a falta de materiais comerciais resistentes e de estabilidade de resistência em alguns genótipos testados, deixando em aberto uma área de pesquisa promissora. Contudo, a utilização de acessos dos bancos de germoplasma ainda é restrita no Brasil. O mesmo se aplica aos trabalhos realizados buscando a identificação de materiais resistentes a *D. bryoniae*. Sowell e Pointer (1962) identificaram o genótipo PI 189225 como fonte de resistência ao cretamento gomoso do caule na melancia. Norton e Cosper (1985) confirmaram esta resistência e comentaram que, além deste, o genótipo PI 271778 possui potencial para utilização em programas de melhoramento por meio de

retrocruzamentos que resultarão no lançamento de cultivares de melancia resistentes ao crestamento e outras doenças.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A. R.; RESENDE, G. M. **Cultura da melancia**. Lavras: Editora UFLA, 2002.
- ARNY, C. J.; ROWE, R. C. Effects of temperature and duration of surface wetness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. *Phytopathology*, n. 81, p. 206-209. 1991.
- ASSIS, J. G. A. **Caracterização isoenzimática e variabilidade genética de populações de melancia (*Citrullus lanatus*) do nordeste brasileiro**. 1999. 76f. Tese (doutorado) Piracicaba: ESALQ, 1999. 76 p.
- BORÉM, A.; CAIXETA, T. E. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG. 2006.
- CAPELOTO, A.; UNEDA, S. H. T.; MAURO, A. O. Caracterização molecular entre e dentro de acessos de melancia através de RAPD – PCR. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, SP, v. 3, n. 5, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/agro05/artigos/artigo01/artigo01.htm>>. Acesso em: 20 set. 2014.
- CASALI, V. W. D. Banco de germoplasma de hortaliças. In: SEMINÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA. Viçosa, MG: UFV, 1969. 8p.
- CHIU, W. F.; WALKER, J. C. Physiology and pathogenicity of the cucurbit blackrot fungus. **Journal of Agricultural Research**, n. 78, p. 589-615, 1949.
- DIAS, R. C. S.; QUEIROZ, M. A.; MENEZES, M. Identificação de fontes de resistência em melancia a *Didymella bryoniae*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 15-17, 1996.
- DIAS, R. C. S.; COSTA, N. D.; QUEIROZ, M. A.; RESENDE, G. M.; ALVES, R.; OLIVEIRA, C. A. V. Densidade de plantio em melancia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 38, Petrolina-PE, 1998. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, 1999.
- DUVAL, M. F.; BUNEL, J.; SITBON, C.; RISTERUCCI, M. Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica* L.). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 824–826, 2005.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. – EMBRAPA. **Sistema de produção da melancia**. 2010. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes\\_HTML/Melancia](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Melancia)>. Acesso em: 04/dez/20014.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. *Countries by commodities - Top Production – Watermelons*. 2013. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

FAZZA, A. C. **Caracterização e ocorrência de agentes causais de oídio em cucurbitáceas no Brasil e reação de germoplasma de meloeiro**. 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa/CENARGEN, 1998.

FERREIRA, M. E. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARAY, I. E. G.; DIAS, B. F. S. (org.). **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001. p. 233-267.

FERREIRA, M. A. J. F.; QUEIRÓZ, M. A.; BRAZ, L. T.; VENCOVSKY, R. Correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente entre dez caracteres de melancia e suas implicações para o melhoramento genético. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 438-442, 2003.

FILGUEIRA, F. A. R. *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 2ª edição revista e ampliada. Viçosa, 2003.

GAMA, R. N. C. S. **Análise molecular de germoplasma de melancia com base em marcadores microssatélites**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, 2011.

GIACOMETTI, D. C. Descritores para caracterização e avaliação de germoplasma. *anais*. In: I ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, Jaboticabal, 1988. p. 129- 147

HALLAUER, A. R.; MIRANDA, J. B. Germplasm. In: \_\_\_\_\_(org.). **Quantitative genetics in maize breeding**. 1988. 2. ed., cap.11, p. 375-396.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 93, 2009.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores conjunturais: produção agrícola/ agricultura**. 2010.

JARRET, R. L.; MERRICK, L. C.; HOLMS, T.; EVANS, J.; ARADHYA, M. K. Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai). **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 433-441, 1996.

KEINATH, A. P. Sensitivity to azoxystrobin in *Didymella bryoniae* isolates collected before and after use of strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, n. 65, p. 1090-1096, 2009.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4ª Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 293-310.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3ª Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 46-96.

LAMAS, N. S.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. S.; VIEIRA, J. V.; FERREIRA, M. A. J. F.; BUSO, G. S. C. Detecção de polimorfismo em melancia com primers microssatélites de melão. In: 47 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2007, PORTO SEGURO. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**. Brasília: Associação Brasileira de Horticultura, v. 25, p. 94-94, 2007.

LEE, S. J.; SHIN, J. S.; PARK, K. W.; HONG, Y. P. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf] *Germplasm*. *Theor Appl Genet*, v. 92, p. 719-725, 1996.

LIMA NETO, I. S.; QUEIRÓZ, M. A.; PEIXOTO, A. R.; BORGES, I. V.; SILVEIRA, L. M.; SILVA, M. L. Reação de acessos de melancia a queima de alternaria. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 24, n. 1, p. 1488-1491, ago. 2006.

LIRA, M. T. R.; PEIXOTO, A. A. P.; FERREIRA, M. A.; FERREIRA, M. A. J. F.; AMARAL, Z. P. S.; BUSO, G. S. C. Transferibilidade, otimização e caracterização de marcadores microssatélites de melão para bucha. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS. Brasília, 2008.

MALATHRAKIS, N. E.; VAKALOUNAKIS, D. J. Resistance to benzimidazole fungicides in the gummy stem blight pathogen *Didymella bryoniae* on cucurbits. **Plant Pathology**, v. 32, p. 395-399, 1983.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil.

(Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 957-989, 2006.

MEDEIROS, A. C. **Reação de acessos de meloeiro a *Macrophomina phaseolina* utilizando diferentes métodos de inoculação**. 2013. 47f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 581-587, 2000.

NORTON, J. D.; COSPER, R. D. Breeding watermelons for disease resistance. **Phytopathology**, v. 75, p. 1178-1178, 1985.

PUIATTI, M.; SILVA, D. J. H. Cultura da melancia. In: FONTES, P. C. R. (org.). **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 2005.

QUEIROZ, M. A. Potencial do germoplasma de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v. 11, p. 7-9, 1993.

QUEIRÓZ, M. A.; ROMÃO, R. L.; DIAS, R. C. S.; ASSIS, J. G. A.; BORGES, R. M. E.; FERREIRA, M. A. J. F.; RAMOS, S. R. R.; COSTA, M. S. V.; MOURA, M. C. C. L. (1996) Watermelon germplasm bank for northeast of Brazil, an integrated approach. In: GÓMEZ-GUILLAMÓN, M. L.; SORIA, C.; CUARTERO, J.; TORÉS, J. A.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. (eds), Cucurbits Towards 2000. Proc Euc Meet Cucurbit Genetic Breed, Málaga. p. 97-103.

QUEIROZ, M. A.; DIAS, R. C. S.; SOUZA, F. F.; FERREIRA, M. A. J. F.; BORGES, R. M. E. Watermelon breeding in Brazil. *Acta Horticulturae*, n. 510, p. 105-112, 2000.

RHODES, B.; ZHANG, X. Gene list for watermelon (*Citrullus lanatus*). **Report Cucurbit Genetics Cooperative**, Madison, n. 18, p. 68-84, 1995.

RITSCHER, P. S.; THOMAZELLI, L. C.; HUAMÁN, Z. Caracterização morfológica do germoplasma de batata-doce mantido pela EPAGRI. Brasília: Embrapa-CNPq, 1999.

ROA, A. C. et al. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany*, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, 2000.

ROCHA, M. R. **Sistema de cultivo para a cultura da melancia**. 2010. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2010.

ROMÃO, R. L. **Dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. em três regiões do nordeste brasileiro.** 1995. 75f. Dissertação. Piracicaba: ESALQ, 1995.

SANTOS, L. B. **Caracterização agrônômica e físico-química de famílias de melancia tipo Crimson Sweet selecionados para reação de resistência ao Papaya ringspot vírus (PRSV-W).** 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, 2010.

SANTOS, G. R.; CAFÉ FILHO, A. C. Reação de genótipos de melancia ao crestamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 945-950, 2005.

SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, L.; RESENDE, J. A. M.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças da melancia. Viçosa, 1968.

SCHENCK, N. C. Epidemiology of gummy stem blight (*Mycosphaerella citrulina*) on watermelon: ascospore incidence and disease development. **Phytopathology**, v. 58, p. 1420-1422, 2005a.

SANTOS, G. R.; CAFÉ FILHO, A. C.; LEÃO, F. F.; CÉSAR, M.; FERNANDES, L. E. Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 228-232, abr./jun. 2005b.

SANTOS, G. R.; CAFÉ FILHO, A. C. Ocorrência do crestamento gomoso do caule em melancia no Tocantins causado por *Didymella bryoniae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 208-209, 2006.

SANTOS, G. R.; CASTRO NETO, M. D.; RAMOS, L. N.; CAFÉ-FILHO, A. C.; REIS, A.; MOMENTÉ, V. G.; PELÚZIO, J. M.; IGNÁCIO, M. Reaction of melon genotypes to the gummy stem blight and the downy mildew. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 160-165, 2009.

SANTOS, G. R.; LEÃO, E. U.; CASTRO, H. G.; NASCIMENTO, I. R.; SARMENTO, R. A.; SARMENTO-BRUM, R. B. C. Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 52-58, mai. 2011.

SARAIVA, J. P. B. **Efeito de fungos micorrízicos arbusculares frente à tolerância de cucurbitáceas a *Monosporascus cannonballus* em função do tempo de cultivo.** 2013. 85f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-árido, UFERSA, Mossoró, 2013.

SARDAGMA, A. A.; WELTER, L.; BOITEAUX, L.; BUSO, G. S. C.; FERREIRA, M. E. Conservação de regiões flanqueadoras de locos hipervariáveis do gênero *Capsicum* spp em outros gêneros da família Solanaceae. In:

CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47. 2001, Águas de Lindoia. A genética no século XXI: desafios: [anais]. [S.I.]: Sociedade Brasileira de Genética, 2001.

SILVA, D. J. H.; MOURA, M. C. C. L.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 108-114, jul. 2001.

SILVA, M. L. **Caracterização Morfológica e Molecular de Acessos de melancia [Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum & Nakai]**. 2004. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Pernambuco. Recife, 2004.

SOWELL, G. J. R.; POINTER, G. R. Gummy stem blight resistance of introduced watermelons. **Plant Disease Report**, v. 46, p. 883-885, 1962.

SVEDELIUS, G. Effects of environmental factors and leaf age on growth and infectivity of *Didymella bryoniae*. **Mycological Research**, v. 97, p. 885-889, 2002.

VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. *Anais*. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 1988, p. 106-128.

VAN STEEKELEMBURG, N. A. M. Influence of humidity on incidence of *Didymella bryoniae* on cucumber leaves and growing points under controlled environmental conditions. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 91, p. 253-264, 1995.

WIANT, J. S. Mycosphaerella black rot of cucurbits. **Journal of agricultural Research**, v. 71, p. 193-213, 1945.

## **CAPÍTULO I**

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE MELANCIA E TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS SSR DE MELÃO PARA MELANCIA**

## RESUMO

MEDEIROS, Ravier Valcácer de. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia e transferibilidade de primers SSR de melão para melancia.** 2015. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

A melancia é uma olerícola bastante apreciada em todo o Brasil, com ênfase na região Nordeste. Mas, atualmente a maioria dos materiais cultivados são do tipo Crimson Sweet, o que ocasiona uma perda da variabilidade existente nessa região. Por este motivo, devemos recorrer aos Bancos de Germoplasma existentes para buscar alternativas para manutenção desta variabilidade. Cabe aos Bancos de Germoplasma documentar e disponibilizar as informações adquiridas, e nesse processo podemos destacar as caracterizações morfológica e molecular. A caracterização morfológica é realizada por meio de descritores fenotípicos, porém estão sujeitos a influências do ambiente. Os marcadores de DNA apresentam uma maior exatidão nesse processo e por isso também têm sido utilizados na caracterização da diversidade genética entre genótipos. Entre os marcadores utilizados na caracterização molecular destacam-se o microssatélite ou SSR, que apesar de não ter sido desenvolvido para a melancia podem ser transferidos da cultura do melão, e o marcador RAPD. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos realizar caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia pertencentes a Coleção de Germoplasma da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e testar a transferibilidade de primers de *C. melon* para *C. lanatus*. Para a caracterização morfológica foram utilizados 24 acessos de melancia e duas cultivares comerciais como testemunhas, Crimson Sweet e Olímpia. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições e cinco plantas por parcela. A caracterização foi realizada utilizando descritores morfo-agronômicos apenas em caracteres do fruto. Com estes dados foram obtidas as distâncias generalizadas de Mahalanobis ( $D^2_{ij}$ ) e os acessos agrupados pelo método baseado na ligação média (UPGMA) com confecção do dendograma e avaliação da contribuição relativa dos descritores para a divergência genética. A caracterização molecular foi realizada com marcadores RAPD. Os produtos das ampliações para RAPD foram computados como ausência do alelo (0) e presença do alelo (1). A estimativa de similaridade genética entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Sorence-Dice com o auxílio do programa GENES. Cem *primers* SSR que foram desenvolvidos para melão tiveram sua transferibilidade testada para melancia. Observou resultados significativos para os descritores massa do fruto (MF), comprimento (C) e largura do fruto (L), formato do fruto (FF), espessura da casca na região peduncular EC1, sólidos solúveis (SS), cor da polpa (CP), padrão de listras (PL) e cor externa do fruto (CF). O agrupamento dos acessos a partir dos descritores morfológicos produziu tão somente três grupos de acessos. Sendo que os descritores que mais contribuíram para divergência genética foram L, FF, MF, PL, SS, C, CF e CP com 19.12%, 13.56%, 11.53%, 10.19%, 9.80%, 8.37%, 7.83% e 5.22%, respectivamente. Já o agrupamento realizado com os marcadores moleculares produziu cinco grupos. Nas análises de transferibilidade

77% dos *primers* SSR se mostraram promissores para serem utilizados em trabalhos com melancia. Observou-se alta diversidade tanto morfológica como molecular nos acessos pertencentes a Coleção de Cucurbitáceas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, para serem exploradas em programas de melhoramento.

**Palavras-chaves:** Germoplasma, variabilidade, Cucurbitáceas.

### ABSTRACT

MEDEIROS, Ravier Valcácer de. **Morphological and molecular characterization of watermelon access and transferability of SSR primers for melon watermelon.** 2015. 66p. Thesis (MS in Agronomy / Plant) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

Watermelon is a crop well appreciated throughout Brazil, with emphasis on the Northeast. But these days most cultivated materials are of the Crimson Sweet, which causes a loss of variability in this region. For this reason, we should use existing germplasm banks to seek alternatives for maintaining this variability. It is up to Genebank document and pass on information acquired, and in the process, we highlight the morphological and molecular characterizations. The morphological characterization is performed by phenotypic descriptors, but are subject to environmental influences. DNA markers are more accurate in this process and so have been used in the characterization of genetic diversity among genotypes. Among the markers used in molecular characterization, stand out from the microsatellite or SSR, who despite not having been developed for watermelon can be downloaded from the melon crop, and the RAPD marker. Given the above, this study aimed to perform morphologic and molecular characterization of watermelon accesses from the Germplasm Collection of the Federal Rural University of the Semi-Arid and test the transferability of *C. melon* primers for *C. lanatus*. For the morphological characterization were used watermelon 24 hits and two commercial cultivars as witnesses, Crimson Sweet and Olympia. The design was a randomized complete block design with three replications and five plants per plot. The characterization was performed using morphological and agronomic descriptors only in fruit characters. With these data were obtained generalized Mahalanobis distances ( $D_{2ij}$ ) and grouped by access method based on average linkage (UPGMA) with making the dendrogram and evaluation of the relative contribution of descriptors for genetic divergence. Molecular characterization was performed using RAPD markers. Products of amplification for RAPD were counted as absence of allele (0) and presence of the allele (1). The estimation of genetic similarity between each pair of genotypes was calculated by Sorence-Dice coefficient with the help of the GENES program. One hundred primers SSR that were developed for melons had their transferability tested for watermelon. Observed significant results for the bulk of the fruit descriptors (MF), length (L) and width of fruit (L), fruit shape (FF), shell thickness in the stalk region EC1, soluble solids (SS), pulp color (CP), pattern of stripes (PL) and external fruit color (CF). The grouping of hits from the morphological descriptors produced as only three access groups. Since the descriptors that most contributed to genetic divergence were L, FF, MF, PL, SS, C, CF and CP with 19:12%, 13:56%, 11:53%, 19.10%, 9.80% 8:37%, 7.83% and 5.22% respectively. Since the grouping carried out with the molecular markers produced five groups. In the analyzes of transferability 77% of SSR primers showed promise for use in work with watermelon. There was a high diversity of both morphological and molecular us access belonging to Cucurbitaceae Collection of the Federal Rural University of the Semi-Arid, to be explored in breeding programs.

**Key words:** Germplasm, Variability, Cucurbitaceae.

## 1. INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus*) é uma olerícola apreciada em todo o Brasil. Essa região é considerada como o centro de diversidade da melancia, pois durante a ocupação desta região vários agricultores levavam consigo as sementes trazidas pelos escravos africanos promovendo a dispersão da cultura. O hábito de se alimentar e o costume de cultivar a melancia podem ser atribuídos às suas propriedades diuréticas, além de ser considerada como fonte de água e alimento (ROMÃO, 1995).

A maioria dos materiais cultivados na região Nordeste é do tipo Crimson Sweet, o que ocasiona perda da variabilidade existente nesta região. Com o estreitamento da base genética, ocorre aumento na vulnerabilidade dos materiais cultivados e essa só pode ser revertida com variabilidade, a qual depende dos recursos genéticos disponíveis, ou seja, do germoplasma da espécie (CASALI, 1969).

Neste momento, podemos recorrer às coleções e Bancos de Germoplasma existentes para buscar alternativas para manutenção desta variabilidade. Cabe aos Bancos de Germoplasma documentar e disponibilizar as informações adquiridas, e nesse processo pode-se destacar as caracterizações morfológica e molecular. Porém, apesar de muito utilizada, a caracterização morfológica está sujeita à influência do ambiente, principalmente características controladas por muitos genes. Neste sentido, os marcadores de DNA apresentam maior exatidão nesse processo.

A caracterização morfológica é realizada por meio da utilização de descritores morfo-agronômicos, ao passo que a molecular é realizada com marcadores de DNA.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo realizar caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia pertencentes à Coleção de Germoplasma do Laboratório de Recursos Genéticos da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e avaliar a transferibilidade de *primers* de *Cucumis melon* para *Citrullus lanatus*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Genótipos avaliados

Foram utilizados 24 acessos de melancia conservados na Coleção de Germoplasma de Cucurbitáceas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, além de duas cultivares comerciais como testemunhas, Crimson Sweet e Olímpia (Tabela 1).

**Tabela 1** – Acessos e cultivares de melancia (*Citrullus lanatus*) caracterizados morfológica e molecularmente. Mossoró, UFERSA, 2015.

Acesso <sup>1</sup>	Local de coleta	Acesso	Local de coleta
A-1	Apodi	A-14	Apodi
A-2	Apodi	A-15	Apodi
A-3	Apodi	A-16	Apodi
A-4	Apodi	A-17	Apodi
A-5	Apodi	A-18	Apodi
A-6	Apodi	A-19	Apodi
A-7	Apodi	A-20	Apodi
A-8	Apodi	A-21	Apodi
A-9	Apodi	A-22	Apodi
A-10	Apodi	A-23	Apodi
A-11	Apodi	A-24	Apodi
A-12	Apodi	Crimson Sweet	Testemunha
A-13	Apodi	Olímpia	Testemunha

<sup>1</sup> código do acesso

As principais características das cultivares utilizadas são: a) cultivar Crimson Sweet apresenta fruto uniforme, coloração interna vermelha intensa e massa média dos frutos de 6 a 12 kg. A planta é resistente a *Fusarium* sp. b) híbrido Olímpia possui frutos elípticos e coloração interna vermelho intensa com massa média de 10 a 12 kg (SAKATA, 2012). Não há informações quanto à reação dessas duas cultivares a *D. bryoniae*.

## **2.2 Local e caracterização da área experimental**

A caracterização morfológica foi realizada no campo experimental do Departamento de Ciências Vegetais. As avaliações moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular do mesmo departamento, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, localizada em Mossoró/RN. O município de Mossoró está situado na latitude Sul 5° 11', longitude 37° 20' a oeste de Greenwich e com altitude de 18 m. O clima, segundo a classificação de Koppen, é 'BSWh' (muito seco, com estação de chuva no verão atrasando-se para o outono) (CARMO FILHO; OLIVEIRA, 1989).

## **2.3 Caracterização morfológica dos acessos de melancia**

As sementes foram semeadas em bandejas plásticas (200 células). As bandejas foram previamente preenchidas com substrato para hortaliças (Plantmax®), permanecendo em casa de vegetação, com sombrite de 50%, até as plântulas apresentarem a primeira folha definitiva (aproximadamente 15 dias após a semeadura), quando foram transplantadas para o campo experimental da UFERSA.

O solo foi previamente preparado por meio de aração, gradagem e sulcamento em linhas. O espaçamento foi de 3,0 m entre fileiras e 0,80 m entre plantas e a irrigação, localizada.

O experimento foi conduzido em blocos casualizados, com cada acesso representando um tratamento com três repetições. As parcelas foram constituídas por cinco plantas espaçadas nas dimensões citadas.

Foi realizada uma adubação de fundação de acordo com a análise do solo da área experimental. As adubações de cobertura foram realizadas via fertirrigação, com início sete dias após o transplantio. Utilizadas as seguintes fontes: ureia 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 realizadas 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.

Os acessos foram caracterizados a partir dos seguintes descritores morfo-agronômicos qualitativos e quantitativos, como segue:

a) Descritores quantitativos

**1) Massa dos frutos (MF)** - obtido com auxílio de uma balança eletrônica com precisão de 0,01g. Mensurado em todos os frutos colhidos na planta. Expresso em kg.fruto<sup>-1</sup>;

**2) Largura do fruto (L)** - medida com régua graduada em cm na direção transversal. Expressa em centímetros (cm);

**3) Comprimento do fruto (C)** - medido com régua graduada em cm na direção longitudinal. Expresso em cm;

**4) Espessura da casca na região peduncular (EC1)** - obtida pela mensuração da espessura da parte externa da casca até o início da polpa na região próxima a inserção do pedúnculo em frutos após serem seccionados longitudinalmente. Mensurada com auxílio de paquímetro digital. Expressa em milímetros (mm);

**5) Espessura da casca na região da inflorescência (EC2)** - obtida pela mensuração da espessura da parte externa da casca até o início da polpa na região inferior (oposta ao pedúnculo) em frutos após serem seccionados longitudinalmente. Mensurado com auxílio de paquímetro digital. Expresso em milímetros (mm);

**6) Espessura da casca na lateral 1 (EC3)** - obtida pela mensuração da espessura da parte externa da casca até o início da polpa na região lateral da casca (lateral esquerda). Mensurada com auxílio de paquímetro digital. Expressa em milímetros (mm);

**7) Espessura da casca na região lateral 2 (EC4)** - obtida pela mensuração da espessura da parte externa da casca até o início da polpa na região lateral da casca (lateral direita). Mensurada com auxílio de paquímetro digital. Expressa em milímetros (mm);

**8) Sólidos solúveis (SS)** - mensurado com auxílio de um refratômetro digital. Expresso em graus Brix (°Brix);

**9) Vitamina C (VC)** - O teor de vitamina C foi determinado por titulometria com solução de DFI (2,6 dicloro-fenol-indofenol 0,02%) até coloração rósea claro permanente. Pesaram-se 10 g de polpa, diluída em 100 mL de ácido oxálico (0,5%), modificado por Strohecker e Henning (1967). Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/100 gramas de polpa;

**10) Firmeza da polpa (FP)** - foi determinada no mesocarpo pela resistência à penetração, utilizando-se penetrômetro manual TR FT 110, 11 lb, com valor máximo de leitura e haste de ponta cilíndrica de 8,0 mm de diâmetro. O fruto foi dividido longitudinalmente em duas partes, sendo que em cada uma delas procederam-se a duas leituras na região mediana da polpa para estimativa da firmeza. Os resultados foram obtidos em lb.pol-2 e convertidos para Newton (N) multiplicando-se por 4,45;

b) Descritores qualitativos

**1) Formato do fruto (FF)** - Obtido por meio de uma escala diagramática propostas por UPOV (2004, com modificações), onde: 1- Bloco; 2- Redondo; 3- Funil e 4- Cabaça;

**2) Cor da polpa (CP)** - mensurada com o auxílio de escala de notas como segue: 1 - vermelha; 2 - rosa intenso; 3 - rosa médio; 4 - rosa claro e 5 - branca;

**3) Cor externa do fruto (CF)** - Obtida por meio de escala de notas variando de 1 a 4, sendo a nota 1 – verde escuro; 2 - verde médio; 3 - verde claro e 4 - amarelo,

**4) Padrão de listras (PL)** - Obtido por meio de uma escala de notas, sendo a nota 1 - sem listras; 2 - listras largas; 3 - listras estreitas e 4 - mosqueado.

### 2.3.1 Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir dos caracteres quantitativos foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Os dados obtidos por descritores qualitativos foram submetidos à análise descritiva.

A partir da matriz com as médias de cada característica para cada acesso e a matriz de variância-covariância residual, foram calculadas as distâncias generalizadas de Mahalanobis ( $D^2_{ij}$ ), conforme descrição por Cruz et al. (2004).

A análise de agrupamento foi realizada com a matriz de distâncias de Mahalanobis utilizando o método de agrupamento baseado na ligação média (UPGMA). Posteriormente, foi confeccionado o dendograma.

Utilizou-se o critério de Singh, descrito por Cruz et al. (2004), para identificar a contribuição relativa de cada caráter para a divergência genética.

Todas as análises foram processadas no programa GENES (CRUZ, 2013).

## **2.4 Caracterização molecular dos acessos de melancia**

### **2.4.1 Extração do DNA**

O DNA de cada um dos genótipos foi extraído a partir do protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), com modificações. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos estéreis de 2 mL. O tampão de extração foi preparado contendo 100  $\mu$ L de Tris-HCl (100  $\mu$ M), 280  $\mu$ L de NaCl (1,4M), 400  $\mu$ L de EDTA (20mM), 300 mL de CTAB (2,0%), 0,01 g de PVP40 (1,0%), 278  $\mu$ L água Miliq e 2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (0,2%), após, pipetou-se 700  $\mu$ L desse tampão de extração, os quais foram colocados nos microtubos. Os microtubos foram vertidos e colocados em banho-maria a temperatura de 65 °C durante 40 minutos, sendo estes, agitados a cada 10 minutos.

Em seguida, foram adicionados 800  $\mu$ L de álcool isoamílico (24:1) nos microtubos, os quais foram vertidos e centrifugados a 14.000 x g, durante 7 minutos e, em seguida, transferiu-se a fase superior (aquosa) para novo microtubo, sendo esta etapa repetida mais uma vez. Logo depois, adicionaram-se à fase aquosa 400  $\mu$ L de isopropanol gelado, homogeneizando a solução até a formação do pellet. As amostras foram colocadas em congelador por 2 horas e posteriormente centrifugadas a 14.000 x g durante 10 minutos. Para limpeza do pellet, adicionou-se 1 mL de etanol 70% no microtubo, sendo centrifugado a 14.000 x g durante 5 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol

90% aos microtubos, os quais foram centrifugados novamente a 14.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente, deixando apenas o pellet no microtubo. As amostras foram colocadas em estufa a 70 °C durante 20 minutos, e logo depois, adicionaram-se 50 µL de RNase nos microtubos, os quais foram incubados a 37 °C em banho-maria. A quantificação de DNA foi realizada em géis de agarose a 1% (p/v), comparando-se visualmente a intensidade das bandas do DNA dos genótipos extraído com bandas de peso molecular conhecido de 1 kb. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura e foram padronizadas em 10 ng µL<sup>-1</sup> para ser utilizadas nas reações de PCR.

#### **2.4.2 Amplificação de DNA de melancia com marcadores RAPD**

Cada reação com *primers* RAPD constou de um volume final de 12µl, sendo seus componentes: 4,29µl de água ultra pura; 1,2µl de tampão de reação (1M de Tris-HCl pH 8; 1M de MgCl<sub>2</sub>; 125mg.ml<sup>-1</sup> de soro albumina bovina; 1M de KCl); 0,96µl de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,4µl de *primer*; 0,15µl da enzima taq DNA polimerase (Pharmacia) e 3µl de DNA na concentração de 10ng/µl. Foram utilizados 12 *primers* com dez bases de sequência arbitrária, obtidos da “Operon Technologies” (Califórnia - EUA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700, programado para 45 ciclos nas seguintes condições: um primeiro ciclo a 94°C por cinco minutos, 45 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 15 segundos, temperatura de anelamento de 36°C por 30 segundos e temperatura de alongação de 72°C por um minuto, além de um último ciclo de manutenção a 72°C por cinco minutos. Após a amplificação, os produtos de cada reação aplicados em gel de agarose 1% para sua separação por eletroforese. O tampão do tanque utilizado foi TBE 0,5x (0,045M de Tris-borato; 0,001µl de EDTA pH 8) e as condições de corrida de 50V por três horas. Terminada a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/ml), visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotografados com câmera digital.

### 2.4.3 Análise estatística

As bandas polimórficas (marcadores) foram classificadas como intensa, média ou fraca, considerando-se a resolução e grau de amplificação. Somente bandas classificadas como intensas ou médias foram incluídas na análise.

Os produtos das amplificações para RAPD foram computados como ausência do alelo (0) e presença do alelo (1). A estimativa de similaridade genética entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Sorence-Dice, como recomendado por Duarte (1998), com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2006). Os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method*), obtendo-se, dessa forma, um dendrograma (ROHLF, 1992). Os erros associados a cada similaridade foram estimados segundo Skroch et al. (1992). Para todas as análises, foram aplicadas as correlações cofenéticas.

### 2.5 Transferibilidade de marcadores SSR de *C. melon* para *C. lanatus*

Como para melancia não foram descritos *primers* SSR, foram utilizados *primers* propostos para o melão. Desta forma, 100 *primers* SSR que foram desenvolvidos para melão tiveram sua transferibilidade testada para melancia.

Para cada reação, foram utilizados 5,75 µl de água ultrapura, 1,2 µl de tampão de reação, 1,0 de DNTP nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,0 µl *primer*, 0,25 µl da enzima taq DNA polimerase e 2 µl de DNA na concentração de 10ng/µl. O volume final para cada reação é de 12,2 µl. A amplificação é realizada em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, em que é empregado o seguinte programa: cinco minutos, a 95°C, para desnaturação do DNA; oito ciclos, em que serão usados 20 segundos, com 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 uma hora a 80 V em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídio

(0,5µg/ml), visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotografados com câmera digital para verificação do perfil eletroforético obtido.

### **2.5.1 Análise estatística**

Para análise dos géis, adotaram-se os critérios estabelecidos por Kuleung et al. (2004). Desta forma, procedeu-se à construção de um *score* para os *primers* que amplificaram fragmentos de tamanho esperado de acordo com a intensidade do sinal e a facilidade de avaliação, sendo (1) sinal forte e facilidade de avaliação; (2) sinal fraco e facilidade de avaliação; (3) sinal fraco e de difícil avaliação e (4) ausência de sinal.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises dos descritores quantitativos

A análise de variância revelou diferenças significativas para cinco dos dez descritores aplicados, mostrando variabilidade genética entre os acessos coletados. As exceções foram para os descritores espessura da casca na região da inflorescência (EC2), da lateral 1 (EC3) e da lateral 2 (EC4), firmeza da polpa (FP) e vitamina C (VC) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Resumo da análise de variância para os descritores massa do fruto (MF); espessura da casca na região do pedúnculo (EC1); da inflorescência (EC2); da lateral 1 (EC3) e da lateral 2 (EC4); sólidos solúveis (SS); vitamina C (VC) e firmeza da polpa (FP) em acessos de cultivares de melancia. Mossoró, UFERSA, 2015.

Caracteres	Quadrados Médios		Média	CV
	Acessos (25)	Resíduo (75)		
MF	5,68**	0,87	2,98	31,44
C	107,05**	22,79	27,76	17,20
L	19,05**	1,78	14,13	9,43
EC1	0,04*	0,03	0,30	49,60
EC2	0,05 <sup>ns</sup>	0,03	0,33	53,47
EC3	0,02 <sup>ns</sup>	0,02	0,24	58,34
EC4	0,02 <sup>ns</sup>	0,02	0,26	60,14
SS	5,85**	1,06	6,60	15,62
VC	0,01 <sup>ns</sup>	0,01	0,36	11,04
FP	23,84 <sup>ns</sup>	18,52	10,01	42,97

\*\* , \* = significativo a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste de F, <sup>ns</sup> = não-significativo.

Observa-se que apesar de os resultados serem significativos para os descritores MF e EC1 eles apresentaram valores altos de coeficiente de variação. Isto pode ter ocorrido em virtude da variabilidade nos descritores apresentada pelos indivíduos dentro de cada acesso.

Pimentel Gomes (1985) descreve que valores de CV inferiores a 10% são baixos; médios de 10% a 20%; altos de 20% a 30%; e muito altos acima de 30%. Porém, essa classificação é muito ampla e não leva em consideração as particularidades da cultura estudada, quanto menos dos caracteres avaliados (GARCIA, 1989; SCAPIM et al., 1995; COSTA et al., 2002).

**Tabela 3** - Teste de médias para os descritores quantitativos massa do fruto (MF); comprimento do fruto (C); largura do fruto (L); espessura da casca na região do pedúnculo (EC1); sólidos solúveis (SS) em acessos e cultivares de melancia. Mossoró, UFERSA, 2015.

Genótipos	MF	C	L	EC1	SS	Genótipos	MF	C	L	EC1	SS
A-1	3.00c	26.76b	14.69b	0.44a	6.99b	A-14	2.96c	24.07b	14.67b	0.31b	6.60b
A-2	2.34c	30.63a	12.11c	0.33b	5.75b	A-15	1.29c	21.18b	11.53c	0.24b	5.53b
A-3	2.07c	28.86a	11.61c	0.32b	5.82b	A-16	1.72c	22.76b	12.09c	0.22b	5.66b
A-4	4.08b	34.89a	15.71b	0.29b	8.33a	A-17	2.80c	25.42b	14.47b	0.30b	6.12b
A-5	3.90b	33.40a	15.54b	0.34b	7.63a	A-18	1.94c	19.40b	13.70c	0.19b	4.80b
A-6	4.15b	35.01a	15.16b	0.52a	8.19a	A-19	3.46b	33.71a	15.21b	0.60a	8.02a
A-7	3.82b	29.86a	15.73b	0.28b	7.62a	A-20	2.84b	30.72a	12.45c	0.20b	5.68b
A-8	2.49c	25.92b	12.53c	0.33b	6.15b	A-21	3.36b	32.82a	14.68b	0.24b	8.00a
A-9	1.60c	27.72b	11.22c	0.22b	4.88b	A-22	2.61c	31.25a	13.42c	0.29b	7.06a
A-10	1.87c	21.68b	13.22c	0.27b	5.59b	A-23	4.14b	36.98a	14.63b	0.21b	6.53b
A-11	1.80c	19.08b	13.36c	0.20b	4.72b	A-24	4.18b	32.29a	16.43b	0.21b	7.49a
A-12	2.18c	24.77b	11.91c	0.30b	4.94b	Crimson Sweet	4.92a	22.22b	19.00a	0.28b	7.99a
A-13	1.75c	23.48b	12.39c	0.32b	7.02a	Olímpia	6.23a	26.87b	19.98a	0.29b	8.49a

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Os acessos de melancia apresentaram massa de fruto variando de 1,3 kg a 6,3 kg, mas em sua maioria apresentaram massa de fruto inferior a 4 kg (dados não apresentados). Dados semelhantes foram encontrados por Silva (2004), obtendo média de 4 kg a partir das análises sobre 42 acessos de Melancia. Ambos os resultados diferem do padrão comercial (8,70kg), de acordo com Silva et al. (2007).

Assim, considerando a tendência do mercado consumidor por frutos menores, encontraram-se nesse material acessos com potencial para compor programas de melhoramento genético visando à demanda de mercado por frutos menores. Para sólidos solúveis, ocorreu variação de 4,4 °Brix (acesso 4) a 9,62° Brix (acesso 9), atingindo valores superiores àqueles observados por Romão (1995) e Silva et al. (2006). Vale salientar que o acesso A-9 apresentou °Brix bem próximo ao apresentado pelo cultivar testemunha Crimson Sweet, que foi de 10,6 °Brix.

Os descritores Comprimento e Largura do fruto estão intimamente relacionados ao formato do fruto. Neste estudo, apenas o formato bloco não foi verificado. A-11 e A-14 apresentaram o mesmo formato redondo das cultivares comerciais Crimson Sweet e Olímpia.

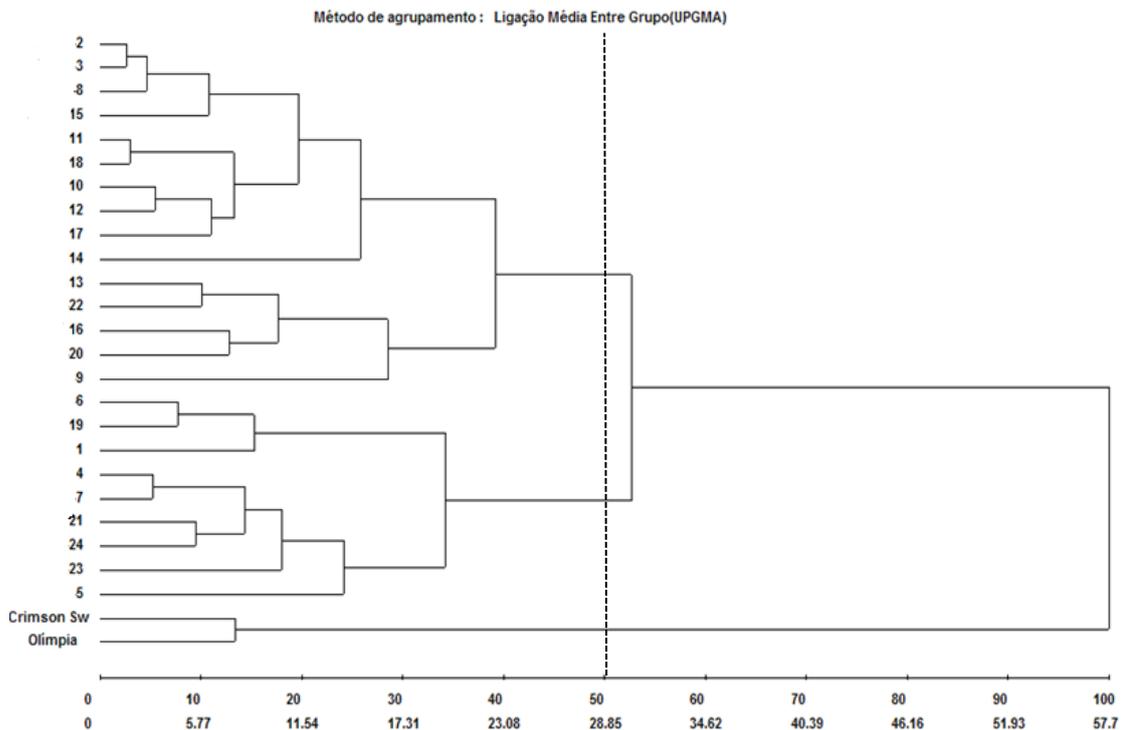
### **3.2 Análises descritivas para descritores qualitativos**

Observaram-se diversas cores de polpa, variando de branca a vermelha. A cor externa variou de verde-claro a verde-escuro. Para o padrão de listras, os acessos A-4, A-5, A-7, A-13, A-16, A20, A-22 e A-23 apresentaram o mesmo padrão de listras das cultivares comerciais.

### **3.3 Análises multivariadas para estudo da divergência genética**

O agrupamento dos acessos a partir dos descritores morfológicos produziu três grupos de acessos (Figura 1): Grupo 1, composto somente pelas cultivares Crimson Sweet e Olímpia; Grupo 2, composto pelos acessos A-2, A-3, A-8, A-15,

A-11, A-18, A-10, A-12, A-17, A-14, 1-13, A-22, A-16, A-20, A-9) e Grupo 3, A-6, A-19, A-1, A-4, A-7, A21, A-24, A-23, A-5. No segundo grupo, há prevalência de acessos com cor de polpa que variaram de branca a amarela, frutos menores, de menor peso e menor °Brix e no terceiro grupo a cor da polpa variou de rósea a vermelha, havendo acessos com frutos maiores, mais pesados e maior °Brix.



**Figura 1** - Representação gráfica da divergência genética entre 24 acessos e duas cultivares de melancia (*Citrullus lanatus*), obtida por meio do método hierárquico UPGMA, com base na distância generalizada de Mahalanobis. Mossoró, UFERSA, 2015.

Considerando a variabilidade encontrada nos acessos coletados em Apodi, percebe-se que o uso do germoplasma local como fonte de matéria prima para o melhoramento de melancia surge como alternativa promissora, com grande potencial para a obtenção de linhagens em programas de melhoramento para caracteres como produção e sólidos solúveis.

As variáveis que mais contribuíram para a divergência genética foram L, FF, MF, PL, SS, C, CF e CP, com 19.12, 13.56, 11.53, 10.19, 9.80, 8.37, 7.83 e 5.22% de contribuição para a variabilidade entre os acessos, respectivamente (Tabela 4). As variáveis EC3 e EC4 poderiam ser descartadas em um próximo estudo de variabilidade genética em melancia.

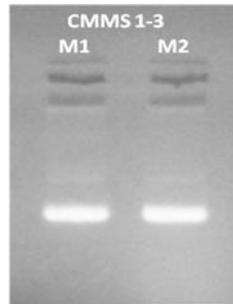
**Tabela 4.** Contribuição relativa dos caracteres, massa do fruto (MF); formato do fruto (FF); comprimento do fruto (C); largura do fruto (L); espessura da casca na região do pedúnculo (EC1); da inflorescência (EC2); da lateral 1 (EC3) e da lateral 2 (EC4); cor da polpa (CP); cor externa do fruto (CF); padrão de listras (PL); sólidos solúveis (SS); vitamina C (VC) e firmeza da polpa (FP) para divergência pelo método de Singh (1981) utilizados na caracterização de 24 acessos e duas cultivares de melancia (*C. lanatus*). Mossoró, UFERSA, 2015.

<b>Descritor</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>MF</b>	11.53
<b>FF</b>	13.56
<b>C</b>	8.37
<b>L</b>	19.12
<b>EC1</b>	3.06
<b>EC2</b>	2.64
<b>EC3</b>	1.84
<b>EC4</b>	1.86
<b>CP</b>	5.22
<b>CF</b>	7.83
<b>PL</b>	10.19
<b>SS</b>	9.80
<b>VC</b>	2.64
<b>FP</b>	2.29
<b>Total</b>	100

### **3.4 Transferibilidade de *primers***

Nesta pesquisa, somente os *scores* 1 e 2 foram considerados como amplificação positiva. Na análise realizada, aproximadamente 80% dos *primers* testados produziram um perfil de bandas em ao menos um dos genótipos de

melancia. A grande maioria das bandas amplificadas apresentou excelente padrão de amplificação. Somente as bandas mais nítidas foram analisadas.



**Figura 2** - Padrão eletroforético de genótipos de melancia (*Citrullus lanatus*) amplificados com SSR de *C. melo* em gel de agarose a 3%.

Para o conjunto de *primers* de melão (*C. melo*) otimizados até o momento para melancia (*C. lanatus*), 77% mostraram-se promissores. Esse valor de transferibilidade é maior que o encontrado por (LAMA et al., 2006) de aproximadamente 49% testando a transferibilidade de *primers* entre essas mesmas espécies. Outros trabalhos estimaram a transferibilidade de melão para outras espécies da família *Cucurbitaceae* e obtiveram taxas de transferibilidade de 21, 50, 60% respectivamente, (LIRA et al., 2008; DANIN-POLEG et al., 2001; LEITE et al., 2007).

Kwon et al. (2010) avaliaram 63 pares de '*primers*' SSR para discriminação em 49 variedades comerciais de 6 melancia e destes, 47% apresentaram polimorfismo. Ainda nesse trabalho os autores mencionam que existem muitas variedades de melancia que não foram diferenciadas por meio de marcadores SSR. Resultado menos expressivo foi relatado por Gama (2011) com valores em torno de 36%, porém são resultados que comprovam a possibilidade de transferibilidade.

Tais resultados demonstram que o nível de transferibilidade no gênero *Cucumis* se assemelha a outras comparações intra-genus como em trigo onde observou-se que até 17% de microssatélites desenvolvidos para esta espécie foram transferidos para centeio (KULEUNG et al., 2003).

Os resultados deste trabalho poderão facilitar estudos de variabilidade, mapeamento e genética comparativa. Da mesma forma, a possibilidade de utilização de marcadores SSR de melão para acesso ao polimorfismo de DNA em espécies de cucurbitáceas representa uma redução significativa de custo e tempo no desenvolvimento de marcadores.

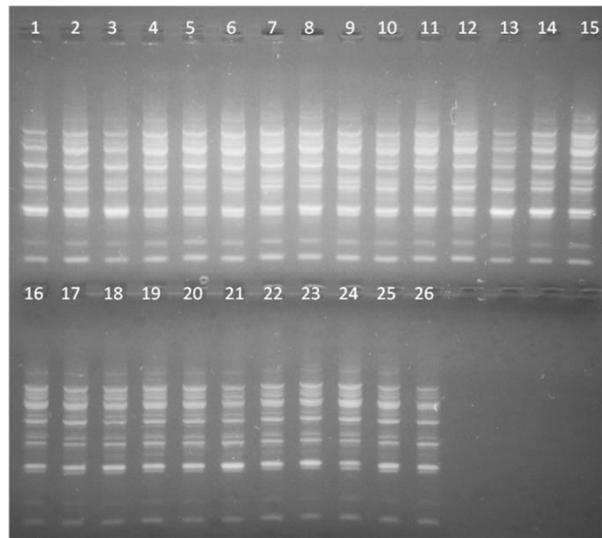
### **3.5 Caracterização molecular com marcadores RAPD**

Para as análises moleculares realizou-se uma triagem entre 12 *primers* RAPD testados inicialmente, dos quais 10 apresentaram bom perfil de amplificação e destes, nove detectaram e revelaram polimorfismo entre os 26 genótipos de melancia.

De acordo com os dados obtidos pela amplificação, o maior número de bandas foi gerado pelo primer OPAA 04 e o menor número foi gerado pelo primer OPF 02, com 286 e 110 bandas no total para os 26 genótipos testados respectivamente.

A avaliação realizada utilizando o marcador RAPD mostrou que esta é uma importante ferramenta para estudos de polimorfismo em acessos e cultivares de melancia. Do total de 167 bandas amplificadas com os 10 *primers*, 97 bandas apresentaram-se monomórficas e 70 apresentaram polimorfismo. Elevados níveis de polimorfismo também foram encontrados por (SILVA et al., 2006) ao utilizarem seis primers RAPD em genótipos de melancia, sendo 42 acessos e uma cultivar.

Os 10 *primers* selecionados pela triagem apresentaram bom perfil de amplificação permitindo a identificação de bandas consistentemente polimórficas. Devido ao padrão apresentado, apenas as bandas mais intensas foram analisadas (Figura 3).



**Figura 3** - Gel de agarose a 1%, contendo fragmentos de DNA amplificados com o marcador RAPD OPAA 03, a partir do DNA de 24 acessos e 2 cultivares de melancia (*Citrullus lunatus*). Mossoró – RN, UFERSA, 2013.

Santana (2009) avaliou 20 *primers* RAPD em 29 genótipos de melancia, e apenas seis geraram produto de amplificação.

Os resultados de diferenciação das amostras avaliadas dos 26 acessos de melancia foram analisados a partir de distâncias genéticas derivadas dos perfis de amplificação gerados pelos *primers* RAPD.

A análise de agrupamento pelo método UPGMA com base nesses marcadores distribuiu os acessos e as duas cultivares em 10 grupos a um corte de 60% (Figura 4).



#### **4. CONCLUSÃO**

A caracterização morfológica e molecular permitiu identificar diversidade entre e dentro dos acessos pertencentes à Coleção de Cucurbitáceas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sendo considerados promissores para ser explorados em programas de melhoramento.

## REFERÊNCIAS

- CARMO FILHO, F.; OLIVEIRA O. F. **Mossoró**: um município do semi-árido nordestino características e aspectos florísticos. Mossoró: ESAM, 1989. 62p. (Coleção Mossoroense, B, n. 672).
- CASALI, V. W. D. Banco de germoplasma de hortaliças. In: SEMINÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA. Viçosa, MG: UFV, 1969. 8p.
- COSTA, N. H. A. D.; SERAPHIN, J. C.; ZIMMERMANN, F. J. P. Novo método de classificação de coeficientes de variação para a cultura do arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 243-249, mar. 2002.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES**: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV, 2013.
- DOYLE, I. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.
- GARCIA, C. H. **Tabelas para classificação do coeficiente de variação**. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1989. 12 p. (Circular Técnica, 171).
- KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferibility of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 1147, 2004.
- KWON, Y. S.; OH, Y. H.; YI, S. I.; KIM, H. Y.; AN, J. M.; YANG, S. G.; OK, S. H.; SHIN, J. S. Informative SSR markers for commercial variety discrimination in watermelon (*Citrullus lanatus*). **Genes & Genomics**, New York, v. 32, p. 115-122, 2010.
- LAMAS, N. S.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. S.; VIEIRA, J. V.; FERREIRA, M. A. J. F.; BUSO, G. S. C. Detecção de polimorfismo em melancia com primers microssatélites de melão. In: 47 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2007, PORTO SEGURO. Revista da Associação Brasileira de Horticultura. Brasília: Associação Brasileira de Horticultura, 2007. v.25, p.94-94.
- LIRA, M. T. R.; PEIXOTO, A. A. P.; FERREIRA, M. A.; FERREIRA, M. A. J. F.; AMARAL, Z. P. S.; BUSO, G. S. C. Transferibilidade, otimização e caracterização de marcadores microssatélites de melão para bucha. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS. Brasília, 2008.

OLIVEIRA, A. C. B.; SEDIYAMA, M. A. N.; SEDIYAMA, T.; FINGER, F. L.; CRUZ, C. D. Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 576-582, 2002.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Esalq, 1985.

ROMÃO, R. L. **Dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. em três regiões do nordeste brasileiro**. Dissertação. 1995. 75f. Piracicaba: ESALQ, 1995.

SANTANA, C. V. S. **Reação de genótipos de melancia à *Monosporascus cannonballus* e caracterização molecular por meio de marcadores RAPD**. 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural do Semi-árido. Mossoró, 2009.

SCAPIM, C. A. S.; CARVALHO, C. G. P.; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 683-686, maio 1995

SILVA, M. L. **Caracterização Morfológica e Molecular de Acessos de melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]**. 2004. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Pernambuco. Recife, 2004.

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

SILVA, M. L.; QUEIROZ, M. A.; FERREIRA, M. A. J. F.; ARAGÃO, C. A. Variabilidade genética de acessos de melancia coletados em três regiões do estado da bahia. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 4, p. 93-100, out./dez. 2007.

**CAPÍTULO II**  
**REAÇÃO DE ACESSOS DE MELANCIA A *Didymella bryoniae***

## RESUMO

MEDEIROS, Ravier Valcácer de. **Reação de acessos de melancia a *Didymella bryoniae***. 2015. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

O fungo fitopatogênico *Didymella bryoniae* é o causador da principal doença fúngica da melancia, o crestamento gomoso, tendo grande importância devido à dificuldade no controle do patógeno. A resistência genética é uma das alternativas de controle que, aliadas a outras práticas, podem reduzir o efeito dessa enfermidade. Uma das primeiras ações para o controle via resistência a determinado patógeno é a identificação de fontes de resistência. Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar a reação de acessos de melancia a *D. bryoniae* utilizando-se do germoplasma disponível na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Para isso, foram avaliados 24 acessos com 2 cultivares comerciais, com delineamento em blocos inteiramente casualizados com três repetições e cada parcela constituída de cinco plantas. O isolado foi obtido a partir de plantas com sintomas da doença, repicado e multiplicado em laboratório. A inoculação foi realizada em plântulas com 25 dias após o transplante das mudas, com a inserção de palitos colonizados com o isolado no colo das plântulas, e para testemunha, palitos esterilizados sem presença de inóculo. Após a inoculação, as plântulas ficaram por 12 h em câmara úmida. As avaliações iniciaram-se sete dias após a inoculação e, a partir de então, efetuadas a cada sete dias, utilizando escala de notas variando de 0 a 4. Os dados médios das notas por parcela foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias são agrupadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Concluiu-se que existe variabilidade no germoplasma de melancia (acessos) para reação a *D. bryoniae*, sendo que os acessos A-1, A-6, A-10, A-11, A-14 apresentaram resistência e são promissores para o uso como fontes de resistência em futuros programas de melhoramento visando à resistência ao fungo *D. bryoniae*.

**Palavras Chave:** Crestamento gomoso, *Citrullus lanatus*, Resistência genética.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Ravier Valcácer de. **Reaction of watermelon access to *Didymella bryoniae***. 2015. 66p. Thesis (MS in Agronomy / Plant) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

The plant pathogenic fungus *Didymella bryoniae* is the main cause of fungal disease of watermelon, gummy, and has great importance because of the difficulty in pathogen control. Genetic resistance is one of the control alternatives that, combined with other practices, can reduce the effect of this disease. One of the first actions to control via resistance to a particular pathogen is the identification of resistance sources. The present study aimed to evaluate the reaction of the D. watermelon access *bryoniae* using the germplasm available at the Federal Rural University of the Semi -Arid (UFERSA). For that they we assessed 24 accesses with two commercial cultivars, with completely randomized block design with three repetitions and each plot constituted of five plants. The isolate was obtained from plants with symptoms of the disease peaked multiplied in the laboratory. Inoculation was accomplished in seedlings 25 days after transplantation, using mycelium disks obtained on PDA attached to the stem by means of a sterile pin 3.0 cm above the soil line. After inoculation, the seedlings stayed for 12 hours in a humid chamber. Evaluations started up seven days after inoculation and thereafter, performed every seven days using scale of notes with notes ranging from 0 to 4. The average data of notes per plot were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the Scott and Knott test at 5% probability group the averages. It was concluded that there is variability in watermelon germplasm (hits) for reaction to *D. bryoniae*; and the A-1 access, A-6, A-10, A-11, A-14 showed resistance and are promising for use as sources of resistance in future breeding programs for resistance to the fungus *D.bryoniae*.

**Key words:** Gummy, *Citrullus lanatus*, Genetic resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

A redução da produtividade e qualidade dos frutos da melancia pode ocorrer devido à presença de inúmeros fatores, dentre os quais podemos destacar aqueles causados por doenças. O crestamento gomoso, causado pela *Didymella bryoniae*, é considerado uma das principais doenças fúngicas da cultura (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

Os sintomas provocados por este patógeno podem diferir de acordo com a planta hospedeira afetada e a fase em que se encontra a cultura. Em plântulas, ocorrem manchas escurecidas e arredondadas nos cotilédones, que passam ao hipocótilo, necrosando-o e circundando-o, causando posterior tombamento. Nas folhas, as lesões inicialmente apresentam-se com aspecto aquoso, depois progridem para uma mancha necrótica circular, podendo, de acordo com a evolução dos sintomas, em ataques mais severos, ocasionar a morte da plântula (SANTOS et al., 2005).

Atualmente, a principal forma de controle do crestamento gomoso tem sido o uso de fungicidas, porém sem resultados expressivos no controle dessa enfermidade. O uso de genótipos resistentes a *D. bryoniae* pode ser adotado como alternativa eficaz para redução significativa de fungicidas. No entanto, apesar de o uso da resistência genética ter se mostrado promissor, há poucos materiais comerciais resistentes, deixando em aberto uma área de pesquisa promissora (SANTOS, et al. 2011).

A melancia é conhecida por sua grande aceitabilidade pelo mercado consumidor. No entanto, o número de cultivares comerciais não é grande e estas possuem base genética muito estreita: quase todas são variações da cultivar *Crinsom Sweet*, a mais cultivada no Brasil, contribuindo com a suscetibilidade a diversas doenças. Desta forma, vê-se a necessidade de buscar e selecionar acessos resistentes ao crestamento gomoso, adaptados às condições do Nordeste e que poderão ser usados em programas de melhoramento para desenvolver linhagens resistentes.

Diante do exposto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a reação de acessos de melancia a *D. bryoniae* em 24 acessos pertencentes à Coleção de Cucurbitáceas do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Instalação e Condução do experimento para reação de acessos a *D. bryoniae***

Os materiais usados (acessos e cultivares comerciais) estão descritos no item 2.1 do capítulo I. As sementes de todos os acessos foram semeadas em bandejas com substrato comercial (Plantmax®). Após a semeadura, as mudas permaneceram em casa de vegetação, com sombrite de 50%. Quando as plântulas apresentarem a primeira folha definitiva (aproximadamente 15 dias após a semeadura), foi realizado o transplântio para vasos plásticos de 1,5 L preenchidos com substrato esterilizado na proporção 2:1, sendo duas partes de solo e uma de esterco. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o fim do experimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições e cada parcela foi constituída de 5 plantas em vasos individualizados.

#### **2.1.1 Produção do inóculo e inoculação**

O isolado foi obtido a partir de plantas com sintomas da doença. Para o isolamento, as áreas lesionadas foram cortadas em pequenos pedaços com estilete. Inicialmente, realizou-se uma desinfestação dos tecidos doentes em uma solução de álcool etílico (50%) por 30 segundos. Em seguida, os tecidos foram imersos por um minuto em solução de hipoclorito de sódio (1%). Os segmentos de tecido foram lavados com água estéril para remoção do excesso de hipoclorito. Posteriormente, os fragmentos colocados em placas de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) autoclavado a 120°C por 20 minutos a 1,5 ATM; as placas com os fragmentos foram incubadas por uma semana, sob fotoperíodo de 12 h luz e temperatura de 29° ± 4°C, até o crescimento do fungo.

Após a obtenção da cultura pura do isolado, foram retirados quatro discos (5 mm de diâmetro) contendo estruturas (micélio e escleródios do fungo) e repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e palitos de dentes

previamente esterilizados. O isolado foi incubado durante 20 dias, até que o crescimento micelial envolvesse a área completa dos palitos contidos na placa. Posteriormente, foi realizada a inoculação do isolado por meio da inserção direta do palito contendo estruturas do fungo no caule, próximo ao colo da planta. Para a testemunha, foram inseridos palitos sem inóculo (VERZIGNASSI et al., 2004).

A inoculação foi realizada 25 dias após o plantio, com a inserção de palitos colonizados com o isolado no colo das plântulas, e para testemunha, palitos esterilizados sem presença de inóculo. Após a inoculação, as plântulas ficaram por 12 h em câmara úmida.

Foram realizadas três avaliações, iniciando-se sete dias após a inoculação do isolado e, a partir de então, efetuadas a cada sete dias. A severidade da doença foi avaliada pela utilização de uma escala de notas adaptada de Dusi et al. (1994), variando de 0 a 4 (0 = ausência de sintomas visíveis; 1= lesão encharcada na haste da planta até 1cm de diâmetro; 2= lesão encharcada na haste da planta com mais de 1cm de diâmetro; 3= lesão parcialmente necrosada na haste com murcha parcial da planta e 4= necrose da haste com murcha total e morte da planta).

### **2.1.2 Análise estatística**

Os dados médios das notas por parcela foram submetidos à análise de variância (ANAVA), utilizando-se o programa computacional GENES (CRUZ, 2006). As médias dos genótipos a partir da análise individual agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 1% de probabilidade para separar as progênies quanto à reação a *D. bryoniae*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na reação dos genótipos a *D. bryoniae*, observou-se efeito significativo para os acessos com coeficiente de variação considerado baixo, como mostra o resumo da análise de variância (Tabela 5).

**Tabela 5** - Resumo da análise de variância da reação de acessos de melancia (*C. lunatus*) a *D. bryoniae*. Mossoró, UFERSA, 2015.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
<b>Acessos</b>	25	26.24*
<b>Resíduo</b>	52	0.10
<b>Média</b>	3.13	
<b>CV (%)</b>	9.96	

\*= significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Os primeiros sintomas de crestamento gomoso foram encontrados aos sete dias da inoculação, igualmente ao relatado por Verzignassi et al. (2004), evoluindo para necrose ou morte da planta. Pode-se observar a reação de cada acesso a *D. bryoniae* na Tabela 6.

**Tabela 6** - Reação de acessos de melancia (*Citrullus lunatus*) a *D. bryoniae*. Mossoró, UFERSA, 2015.

<b>ACESSO*</b>	<b>Reação<sup>1</sup></b>	<b>ACESSO*</b>	<b>Reação<sup>1</sup></b>
<b>A-1</b>	R	<b>A-14</b>	R
<b>A-2</b>	MS	<b>A-15</b>	MS
<b>A-3</b>	MS	<b>A-16</b>	S
<b>A-4</b>	MS	<b>A-17</b>	AS
<b>A-5</b>	S	<b>A-18</b>	S
<b>A-6</b>	R	<b>A-19</b>	MS
<b>A-7</b>	MS	<b>A-20</b>	MS
<b>A-8</b>	MS	<b>A-21</b>	AS

<b>A-9</b>	MS	<b>A-22</b>	MS
<b>A-10</b>	R	<b>A-23</b>	MS
<b>A-11</b>	R	<b>A-24</b>	MS
<b>A-12</b>	MS	<b>Olímpia**</b>	AS
<b>A-13</b>	MS	<b>Crimson Sweet**</b>	S

<sup>1</sup>R = Resistente; MS = Moderadamente Susceptível; S = Suscetível; AS = Altamente suscetível; \*código do acesso na coleção de germoplasma do laboratório de recursos genéticos vegetais (UFERSA); \*\*cultivares comerciais.

Os acessos que apresentaram resistência a *D. bryoniae* foram coletados no município de Apodi, indicando variabilidade entre os genótipos presentes nesta região. Os resultados são contrastantes aos observados por Santos et al. (2013), que avaliaram 50 genótipos, todos apresentando diferentes graus de suscetibilidade.

Dias et al. (1996 apud SANTOS; CAFÉ FILHO, 2005) examinaram 70 acessos de melancia quanto à resistência a *D. bryoniae*, incluindo PI 189225, o qual apresentou reação variável (suscetível a resistente) em diferentes ensaios. A cultivar Crimson Sweet, uma das mais plantadas no Brasil, foi utilizada como padrão de susceptibilidade. Esses autores encontraram seis fontes de resistência para uso em futuros trabalhos de melhoramento, sendo PI 189255 uma delas.

Existe a busca pela resistência a *D. bryoniae* em outras espécies da família cucurbitáceas. Braz et al. (2011) avaliaram 33 genótipos de cucurbitáceas (melões, abóboras, pepinos, morangas, melancias, buchas e outros), selecionando como resistente ou tolerantes: Abóbora “Goianinha”, Abóbora “Brasileirinha”, Abóbora “Maranhão” e o Híbrido “Keij”. Esses resultados evidenciam que existem fontes promissoras de resistência genética para a *D. bryoniae* em diferentes espécies da família cucurbitácea.

#### 4. CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética entre os acessos da Coleção de Cucurbitáceas da UFERSA para reação a *D. bryoniae*, de modo que os acessos A-1, A-6, A-10, A-11, A-14 apresentaram resistência e são promissores para o uso como fontes de resistência em futuros programas de melhoramento visando à resistência ao fungo *D. bryoniae*.

## REFERÊNCIAS

- BRAZ, L. T.; ITO, L. A.; GAION, L. A.; CAMARGO, M. Avaliação de genótipos de cucurbitáceas quanto à resistência à *Didymella bryoniae*. *Horticultura Brasileira*, v. 29, S1327-S1334, 2011.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES**: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV, 2006.
- 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.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**: Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005. p. 293-310.
- SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, L.; RESENDE, J. A. M.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças da melancia. Viçosa, 70p. Schenck, N. C. (1968), Epidemiology of gummy stem blight (*Mycosphaerella citrulina*) on watermelon: ascospore incidence and disease development. **Phytopathology**, v. 58, p. 1420-1422, 2005.
- SANTOS, G. R.; CAFÉ FILHO, A. C. Ocorrência do crestamento gomoso do caule em melancia no Tocantins causado por *Didymella bryoniae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 208-209, 2006.
- SANTOS, G. R.; LEÃO, E. U.; CASTRO, H. G.; NASCIMENTO, I. R.; SARMENTO, R. A.; SARMENTO-BRUM, R. B. C. Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 52-58, maio 2011.
- SANTOS, G. R.; LEÃO, E. U.; GARCIA, M. M. V.; MALUF, W. R.; CARDON, C. H.; GONÇALVES, C. G.; NASCIMENTO, I. R. Reação de genótipos experimentais de melancia ao crestamento gomoso do caule. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 540-548, 2013.
- VERZIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; GASPAROTTO, F.; CORTEZ, G. L. S.; LORENZETTI, E. R.; FARIA, G. S.; TESSMANN, D. J.; SEVERINO, J. J. Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão nobre e pepino “japonês”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 51-54, 2004. Suplemento.