



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



RENATA NATÁLIA CÂNDIDO DE SOUZA GAMA

**ANÁLISE MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE MELANCIA
COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

FEIRA DE SANTANA – BA
2011

RENATA NATÁLIA CÂNDIDO DE SOUZA GAMA

**ANÁLISE MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE
MELANCIA COM BASE EM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

FEIRA DE SANTANA – BA
2011

RENATA NATÁLIA CÂNDIDO DE SOUZA GAMA

**ANÁLISE MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE
MELANCIA COM BASE EM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos
Co-orientadora: Dra. Rita de Cássia Souza Dias

FEIRA DE SANTANA – BA
2011

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

R178a Gama, Renata Natália Cândido de Souza
Análise molecular de germoplasma de melancia com base em
marcadores microssatélites/ Renata Natália Cândido de Souza
Gama. – Feira de Santana, 2011.
63f. : il.

Orientador: Carlos Antonio Fernandes Santos

Co-orientadora: Rita de Cássia Souza Dias

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Estadual de Feira de
Santana, 2011.

1.*Citrullus lanatus*. 2.Melancia – Divergência. 3.SSR.
4.AMOVA. I.Santos, Carlos Antonio Fernandes. II. Dias, Rita de
Cássia Souza. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.
Título.

CDU: 635.61

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Aldete Justiniano da Fonseca Ferreira
(Embrapa Semiárido)

Prof. Dr. José Geraldo de Aquino Assis
(UFBA)

Prof. Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos
(Embrapa Semiárido)
Orientador e Presidente da Banca

Ao meu pai (*in memória*) que tão cedo partiu deixando um vazio enorme em nossas vidas, a minha mãe por ser exemplo de garra e perseverança e ao meu esposo por todo apoio e companheirismo e por compreender que muitas vezes para alcançarmos nossos objetivos a ausência se faz presente.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por estar sempre ao meu lado nos momentos em que mais preciso e por sua infinita misericórdia.

A toda minha família, tias, tios e primos essenciais em minha vida, especialmente a minha mãe, meu pai, meus irmãos Renato e Robinho, meu tio Pedro e ao meu esposo, minhas avós Raquel e Benedita por todo apoio, incentivo e por estarem sempre presentes e dispostos a me ajudarem sempre que preciso.

Ao meu orientador Dr. Carlos Antônio pela orientação, pelos finais de semana dedicados a correção deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e por me mostrar que apenas conhecer a técnica não é suficiente, é necessário antes de tudo se buscar o conhecimento literário.

À minha co-orientadora Dra. Rita de Cássia, grande incentivadora para que eu continuasse me especializando, por todos os ensinamentos no decorrer dos anos em que trabalhamos juntas, pela atenção, paciência e amizade, principalmente pelas injeções de ânimo sempre que necessárias.

À minha querida amiga Marciane por ter me ensinado a técnica PCR, pela presteza em me ajudar nos trabalhos sempre que necessário e pela amizade.

À Léia e Laerte pela ajuda nas extrações de DNA.

Ao professor Manoel Abílio de Queiróz pela orientação no estágio em docência, pelos ensinamentos que levarei comigo para sempre.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Proferssor José Ranieri. E ao secretário Alberto pelo apoio indispensável.

A todos os professores de RGV pelos conhecimentos transmitidos.

À Embrapa Semiárido por toda infra-estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

À técnica Weslanny e a toda a equipe do Laboratório de Genética: Daniele, Soniane, Samila, Hugo Leonardo e Ierla pelo companheirismo e amizade.

À minhas amigas e companheiras de todas as horas Rosi, Ana, Juliana, Graziela, Léia e Fátima pela amizade e companheirismo sempre.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões para melhoria e conclusão deste trabalho.

À Capes pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre”.

Louis L'Amour

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SIMILARIDADE ENTRE CULTIVARES DE MELANCIA COM BASE EM MARCADORES SSR	12
CAPÍTULO II – VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MELANCIA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES	34
CONCLUSÕES GERAIS	59
RESUMO	62
ABSTRACT	63

INTRODUÇÃO GERAL

A melancia pertence ao gênero *Citrullus* e à família Cucurbitaceae. Esse gênero é constituído de cinco espécies nativas diplóides ($2n = 22$): *C. ecirrhosus* Cogn., *C. colocynthis* (L.) Schrad., *C. rehmi* de Winter, *C. naudinianus* (Sond.) Hook.f. e *C. lanatus* (Thunb) Matsume & Nakai (Whitaker & Davis, 1962; Dane *et al.*, 2007). A espécie *Citrullus lanatus* inclui a melancia cultivada para consumo humano *C. lanatus* var. *lanatus*, de ampla distribuição mundial, e *C. lanatus* var. *citroides*, uma forma silvestre, cultivada principalmente para a alimentação animal (Whitaker & Davis, 1962; Mohr, 1986).

O Brasil é o quarto país maior produtor de melancia, com uma produção em 2008 de 1.950.000 toneladas/ano, o que contribui para o agronegócio do país com mais de R\$ 600 milhões de reais por ano (Agrianual, 2011). O Nordeste tem expressiva participação nesse agronegócio, onde seu cultivo tem grande importância sócio econômica, por ser cultivada principalmente por pequenos agricultores, sob condições irrigadas ou não, devido ao seu fácil manejo e baixo custo de produção (Dias *et al.*, 2001).

A melancia é uma planta anual, herbácea, de hábito rasteiro e com ramificações sarmentosas. As folhas são divididas em três ou quatro pares de lóbulos e com margens não crespas. É monóica, ou seja, com flores masculinas e femininas na mesma planta, contudo, algumas populações são andromonóicas, com flores hermafroditas e masculinas na mesma planta. As flores femininas e hermafroditas apresentam ovário súpero em formato similar à forma final do fruto. Este varia quanto ao formato, ao tamanho, cor, espessura da casca, cor da polpa e cor de sementes (Whitaker & Davis, 1962; Mohr, 1986). As flores abrem entre uma a duas horas após o aparecimento do sol e se fecham no mesmo dia à tarde, tendo ou não ocorrido polinização. O vento não é suficiente para transportar o pólen entre as flores. As abelhas são atraídas pelo néctar e pólen, e, ao visitarem as flores realizam polinização (Dias *et al.*, 2001). Sem o estímulo propiciado pela polinização, efetuada por abelhas, o fruto não se desenvolve (Filgueira, 2003). É necessário que pelo menos 1000 grãos de pólen sejam depositados sobre o estigma para que se desenvolva um fruto perfeito (Dias *et al.*, 2001).

É uma espécie alógama. No entanto, já se encontrou população segregante para expressão sexual apresentando 53,5% de plantas monóicas e 46,5% de plantas andromonóicas, apresentando um sistema misto de reprodução com taxa de autofecundação natural de 0,235 (Ferreira *et al.*, 2000; 2002).

A melancia é originária das regiões quentes da África tropical, sendo hoje conhecida mundialmente. Sua domesticação ocorreu na África Central onde a melancia é cultivada há mais de 5000 anos (Whitaker & Davis, 1962). Foi introduzida no Brasil em duas fases distintas. A primeira, durante o tráfico de escravos, com germoplasma introduzido proveniente do centro primário de origem e diversidade – o continente africano, e envolveu materiais de base genética ampla, cultivados por agricultores familiares em diferentes regiões da África. Na segunda fase, foram introduzidas cultivares melhoradas, no Estado de São Paulo, provenientes dos Estados Unidos e do Japão, de base genética mais estreita, uma vez que, eram oriundas de programas de melhoramento desses países (Romão, 2000).

Vale salientar, que as cultivares introduzidas, não foram desenvolvidas para as condições climáticas do Brasil, principalmente as existentes no Semiárido nordestino. Somando-se a isso, a maioria das cultivares de melancia, desenvolvidas na América do Norte durante os últimos dois séculos, apesar da grande variabilidade de caracteres morfológicos, possui base genética estreita, o que pode ter contribuído para sua elevada susceptibilidade a doenças e pragas (Levi *et al.*, 2000, 2001), como, o oídio, a alternária, viroses e a antracnose (Silva, 2010).

Para que haja o desenvolvimento de programas de melhoramento da melancia é necessário o estudo da variabilidade genética disponível nos recursos genéticos desta espécie. Os recursos genéticos são definidos como a fração da biodiversidade que tem previsão de uso atual ou potencial. Assim, compreendem as variedades tradicionais, variedades melhoradas, linhas avançadas e espécies nativas (Giacometti, 1993).

O Nordeste brasileiro é considerado centro de diversidade secundário da melancia e têm apresentado grande variabilidade para diversos caracteres de planta, frutos e resistência a doenças (Queiróz, 1993; Romão, 1995; Dias *et al.*, 1996). A variabilidade encontrada na referida região serviu de base para a formação de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, cujo início ocorreu na década de 80, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina – PE (Queiróz, 1993; Silva *et al.*, 2010). Este banco engloba o Banco de Germoplasma de Melancia (BG CIA), Banco de Germoplasma de Melão (BGMEL) e o Banco de Germoplasma de Cucúrbita (BGC), e foi criado visando à conservação dos recursos genéticos das Cucurbitáceas, uma vez que, com a expansão da agricultura comercial, muitas raças locais têm sido perdidas. O BG CIA possui atualmente 870 acessos (Silva *et al.*, 2010), incluindo cultivares comerciais,

amostras da agricultura tradicional e alguns parentes silvestres da melancia (*C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis*).

O uso dos recursos genéticos, como fonte de criação de novas variedades, é fator de fundamental importância para a obtenção de produtividades mais elevadas e para as transformações tecnológicas verificadas no processo de modernização do agronegócio. Trata-se de um processo dinâmico, que necessita de contínuo enriquecimento e caracterização dos materiais mantidos nos bancos de germoplasma (Valls, 2007). Para utilização dos recursos genéticos são necessárias várias etapas: coleta ou introdução, multiplicação, caracterização/avaliação, preservação/conservação, e uso (Ramos, 2007).

Muitos estudos referentes ao uso dos recursos genéticos da melancia têm sido realizados, com acessos conservados no BGCIA com base em descritores morfológicos, o que têm permitido grandes avanços na descrição da divergência genética entre acessos (Queiróz *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2005). Os mesmos quando submetidos à caracterização em campo revelaram variabilidade para diferentes caracteres de planta, fruto e semente. Quando avaliados com relação à susceptibilidade aos principais patógenos que atingem a cultura indicaram a presença de genes de resistência ao oídio, viroses e à micosferela (Queiróz *et al.*, 1993, Dias *et al.*, 1996, Silveira, *et al.*, 2009). Os estudos realizados no BGCIA permitiram o desenvolvimento da cultivar resistente ao oídio, BRS Opara, (Dias *et al.*, 2007), e de cultivares com diferentes padrões de fruto, como as cultivares de polpa amarela BRS Soleil e BRS Kuarah (Souza *et al.*, 2007).

Romão (1995) estudou a dinâmica e variabilidade de populações de melancia em três regiões do Nordeste brasileiro utilizando 39 populações, 13 populações por região, coletadas no médio sertão maranhense, na depressão sertaneja e na região central da Bahia, onde concluiu que o Nordeste brasileiro é um centro de diversidade para a melancia. Descritores morfológicos também têm sido utilizados na proteção e lançamento de novas variedades. Entretanto, estes descritores podem ser influenciados por condições ambientais. Dessa forma, marcadores moleculares despontam como uma alternativa na caracterização de germoplasma e proteção de novas cultivares livre de interferência ambiental (Milach, 1999).

Além disso, informações moleculares podem complementar as informações ecológicas, morfológicas e agronômicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta, direcionar o enriquecimento da base genética, formar e validar coleções nucleares e de trabalho, analisar a diversidade e a pureza genética, identificar acessos duplicados e redundantes, auxiliar trabalhos de

classificação botânica e filogenia, subsidiar seleção de genitores, planejamento de cruzamentos e seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento (Faleiro, 2007).

Marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo de sequência de DNA, referente ao sítio conhecido ou anônimo no genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1995). As técnicas baseadas no DNA, introduzidas nas últimas duas décadas, são capazes de identificar polimorfismos nas seqüências de bases. Uma das vantagens é a ausência de interferência ambiental, podendo-se realizar estudo com plantas em qualquer estágio de desenvolvimento, utilizando-se pequenas quantidades de material genético. (Hodgkin *et al.*, 2001; Karp, 2002).

Existem vários tipos de marcadores moleculares, tais como: Izoenzimas, RAPD (“Random Amplified Polimorphic DNA”), RFLP (“Restriction fragment Length Polymorphism”), AFLP (“Amplified Fragment length Polymorphism”), Minissatélites, Microsatélites, ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”), DAF (“DNA Amplification Fingerprinting”), dentre outros.

Os marcadores Microsatélites também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”) consistem em unidades de cerca de um a seis nucleotídeos repetidos em sequência dentro do genoma de vários organismos (Goldstein & Scholtterer, 2001). Marcadores microsatélites foram desenvolvidos por causa da co-dominância e do alto polimorfismo adequado para estudar a diversidade e as relações intra-específicas (Duval *et al.*, 2005).

Ferreira (2001) menciona dois pontos principais sobre a utilidade das técnicas moleculares de análise genômica, incluindo os microsatélites: identificar variabilidade nas seqüências de DNA de indivíduos analisados com resolução várias vezes superior ao polimorfismo passível de detecção no plano morfológico e reduzir a enorme complexidade do genoma estudado a análises mendelianas dos segmentos de DNA detectados. Marcadores moleculares, tais como, RAPD e AFLP, têm sido utilizados para a avaliação e caracterização de germoplasma de melancia.

Levi *et al.* (2001) analisaram a diversidade genética entre cultivares de melancia americanas, com base em marcadores RAPD, verificaram similaridade entre 92 e 99,6% e concluíram que é necessário aumentar a base genética da melancia. Che *et al.* (2003) utilizaram oito combinações de ‘primers’ na análise da diversidade de 28 cultivares de melancia de diferentes origens e encontraram similaridade entre 82 e 99%. Entretanto, estes marcadores têm a desvantagem de serem dominantes, de difícil reprodutibilidade e

muito laboriosos (Esselink *et al.*, 2003). Em contraste a estes, os marcadores microssatélites, também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”), têm sido o melhor marcador para estudos de “fingerprinting” devido ao seu alto polimorfismo, co-dominância, confiabilidade e reprodutibilidade (Varshney, 2005).

No Brasil, a aplicação de marcadores moleculares em melancia resume-se a estudos de divergência genética entre e dentro acessos de bancos de germoplasma, como os trabalhos realizados por Capeloto *et al.* (2004), Silva *et al.* (2006), com marcador RAPD e mais recentemente por Silva (2010) com marcadores DAF e ISSR.

Silva *et al.* (2007) reportaram, com base em análise de variância, ampla variabilidade genética dentro e entre acessos do BGCIA, destacando a importância desse BAG para fins de melhoramento da espécie. Capeloto *et al.* (2004), realizaram estudo de divergência genética entre e dentro de 18 acessos de melancia coletados no estado do Maranhão com 59 primers RAPD, concluindo, com base em análises de agrupamento, da existência de considerável divergência genética entre e dentro acessos. Silva *et al.* (2006), realizaram caracterização morfológica e com marcador molecular RAPD de 43 acessos do BGCIA, oriundos de diferentes regiões do Estado da Bahia, concluindo com base nos agrupamentos formados a existência de variabilidade genética entre os acessos e a inexistência de agrupamentos específicos por região de origem dos acessos. Silva (2010) identificou, com base em análises de agrupamentos de dados de marcadores DAF e ISSR, ampla variabilidade genética em 291 acessos do BGCIA. Neste mesmo estudo a análise molecular de variância, por meio de marcador DAF revelou variação entre e dentro de estados e entre regiões dentro de estados de 0,263.

Apesar da disponibilidade de marcadores microssatélites para melancia, ainda não foi proposto um número mínimo desse tipo de marcador para auxiliar na proteção de cultivares e dirimir disputas comerciais. Também não foi realizado nenhum estudo no BGCIA utilizando esses marcadores para a análise da variabilidade genética dos acessos conservados.

Jarret *et al.* (1996) verificaram variação genética entre acessos de *C. lanatus* var. *lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis* usando sete marcadores SSR. Guerra-Sanz (2002) reportou que 18 marcadores SSR foram identificados com habilidade de detectar polimorfismo entre variedades de melancia, raças locais, *C. colocynthis* e híbridos interespecíficos. Joobeur *et al.* (2006) reportaram 36 ‘primers’ SSR, capazes de detectar polimorfismo em oito acessos e quatro variedades de melancia. Kwon *et al.* (2010) avaliaram 63 pares de ‘primers’ SSR para discriminação em 49 variedades comerciais de

melancia e destes, 30 apresentaram polimorfismo. No entanto, ainda segundo esses autores, existem muitas variedades de melancia que não foram diferenciadas por meio de marcadores SSR.

No presente trabalho, analisou-se a variabilidade genética entre 40 acessos do BGCIA, oriundos de oito regiões do Nordeste brasileiro e entre 17 cultivares comerciais de melancia com marcadores microsátélites para subsidiar estratégias de preservação e utilização da variabilidade genética da espécie, bem como gerar um banco de dados de referência e apoio à proteção de cultivares e eventuais disputas comerciais no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2011. p. 351-354.

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: 5 ago. 2010.

CHE, K. P.; LIANG, C. Y.; WANG, Y. G.; JIN, D. M.; WANG, B. Genetic assessment of watermelon germplasm using the AFLP technique. **HortScience**, Alexandria, v. 38, p. 81–84, 2003.

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

DIAS, R. de C. S.; COSTA, N. D.; QUEIRÓZ, M. A. de; FARIA, C. M. B. de. **Cultura da melancia**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2001. 20 p.il. (Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica, 63).

DIAS, R. de C. S.; QUEIRÓZ, M. A. de; COSTA, N. D.; SOUZA, F. F.; ALMEIDA, M. C. B.; ARAUJO, H. M.; LIBERALINO FILHO, F.; PEREIRA, A. B.; BAHIA, J.; LIMA, R. N. S.; ANJOS, J. B. dos; PEREIRA, F. A.; ALVES, D. C.; ARAUJO, J. P. **BRS Opara: melancia resistente ao oídio**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 1 Folder.

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

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.

ESSELINK, G. D.; SMULDERS, M. J. M.; VOSMAN, B. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 277-286, 2003.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p. il.

FERREIRA, M. A. J. da F.; QUEIROZ, M. A. de; VENCOVSKY, R.; BRAZ, L. T.; VIEIRA, M. L. C.; BORGES, R. M. E. Sexual expression and mating system in watermelon: implications for breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, n. 1, p. 39-48, 2002.

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

FERREIRA, M. E. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARAY, I. E. G.; DIAS, B. F. S. **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. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.

FILGUEIRA, A. L. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2003. 412 p.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa–CNPMPF, 1993. p. 13-27.

GOLDSTEIN, B. D.; SCHLOTTERER, C. **Microsatelites: evolution and applications**. Orford: Orford University Press, 2001. 352 p.

GUERRA-SANZ J. M. Citrullus simple sequence repeats markers from sequence databases. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 223–225, 2002.

HODGKIN, T.; ROVIGLIONI, R.; DE VICENTI, M. C.; DUDNICK, N. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 546, p. 107-118, 2001.

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.

JOOBEUR, T.; GUSMINI, G.; ZHANG, A.; LEVI, A.; XU, Y.; WEHNER, T. C.; OLIVER, M.; DEAN, R. A. Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or Arabidopsis genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 8, p. 1553-562, 2006.

KARP, A. The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity. In: ENGELS, J. M. M.; RAMANATHA, R. V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Ed.). **Managing plant genetic diversity**. Wallingford: CAB International, 2002. cap. 4, p. 43-56.

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.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; KEINATH, A. P.; WEHNER, T. C. Estimation of genetic diversity among *Citrullus* accessions using RAPD markers. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 510, p. 385-390, 2000.

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

MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/index.html>>. Acesso em: 4 abr. 2011

MOHR, H. C. Watermelon breeding. In: BASSET, M. J. **Breeding vegetables crops**. Westport: Avi, 1986. p. 33-66.

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

QUEIRÓZ, M. A. de; RAMOS, S. R. R.; DIAS, R. de C. S. Divergencia genética entre linhagens de melancia parcialmente endogâmicas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, n. 2, jul. 2001. Suplemento. 1 CD-ROM.

RAMOS, S. R. R.; QUEIRÓZ, M. A. de; PEREIRA, T. N. S. Recursos genéticos vegetais: manejo e uso. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, p. 265-273, 2007.

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

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

SILVA, A. F.; SANTOS, C. A. F.; ARAUJO, F. P. de; LIMA NETO, F. P.; MOREIRA, J. N.; FERREIRA, M. A. J. F.; LEÃO, P. C. de S.; DIAS, R. de C. S.; ALBUQUERQUE, S. G. de. Recursos genéticos vegetais conservados na Embrapa Semiárido. In: SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). **Semiárido brasileiro**: pesquisa, desenvolvimento e inovação. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. cap. 8, p. 274-315.

SILVA, M. L. **Avaliação molecular da variabilidade genética do Banco ativo de germoplasma de melancia do Nordeste brasileiro**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, M. L.; QUERÍÓZ, M. A. de; FERREIRA, M. A. J. F.; ARAGÃO, C. A. Variabilidade genética de acessos de melancia. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, p. 93-100, 2007.

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

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

SOUZA, F. F.; DIAS, R. de C. S. 2007. **BRS soleil e BRS Kuarah**: melancias de polpa amarela. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 1 folder.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. de; DIAS, R. de C. S. Divergência genética em linhagens de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 2, p. 179-183, 2005.

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

VARSHNEY, R. K.; GARNER, A.; SORELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 48–63, 2005.

WHITAKER, T .W.; DAVIS, G. N. **Cucurbits**: botany, cultivation, and utilization. London: L. Hill, 1962. 250 p.

**CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SIMILARIDADE ENTRE
CULTIVARES DE MELANCIA COM BASE EM MARCADORES SSR**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos o estabelecimento de padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas para 17 cultivares de melancia e um acesso de *Citrullus colocynthis*, baseados em marcadores microssatélites, de forma a gerar um banco de dados de referência e apoio à proteção de cultivares e eventuais disputas comerciais, bem como orientar programas de melhoramento e recursos genéticos da espécie. Para visualização da similaridade genética, utilizou-se o dendrograma UPGMA gerado da matriz de distâncias do coeficiente de Jaccard, com base em 32 alelos de dez locos microssatélites. O DNA total foi extraído pelo método CTAB 2x e os produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida desnaturante 6% e corados com nitrato de prata. O número de pares de bases foi estimado pelo método da mobilidade inversa, com base na regressão de produtos de tamanho conhecido. Dos 36 pares de 'primers' microssatélites utilizados apenas dez apresentaram amplificações polimórficas de fácil interpretação. As cultivares apresentaram coeficiente de similaridade entre 34 e 100%, o que reflete a alta variabilidade genética das cultivares analisadas. Os 32 alelos não foram suficientes para distinguir as cultivares de melancia, "Sugar Baby" e "Omaru Yamato", "Charleston Gray" e "Sunshade", "Crimson Sweet" e "Nova Crimson" que apresentaram 100% de similaridade. Dois grupos foram observados entre as cultivares de melancia, no ponto de corte de 0,42 de similaridade, com *Citrullus colocynthis*, posicionando-se fora desses grupos. Um dos grupos foi formado predominantemente por cultivares derivadas de "Crimson Sweet" e outro grupo com cultivares de diferentes tipos, como "Sugar Baby", "Charleston Gray" e "Pérola".

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*. Microssatélites. Divergência. Proteção de cultivares. Dendrograma.

ABSTRACT

The objectives of this work were to establish allelic patterns and to estimate genetic distances in 17 watermelon cultivars and one accession of *Citrullus colocynthis*, based on microsatellite marker, in order to generate a reference database to support the plant variety protection, as well as to guide improvement programs and genetic resources of this species. For visualization of the genetic similarity, the dendrogram UPGMA generated by the matrix of distances of the coefficient of Jacquard was used, based on 32 alleles of ten microsatellite loci. The total DNA was extracted by the CTAB 2x method, and PCR products were analyzed in denaturing polyacrylamide 6% gels, stained with silver nitrate. The number of base pairs was estimated by the method of inverse mobility, based on known size products regression. Among the 36 tested microsatellites primers only ten presented polymorphic amplification of easy interpretation. The cultivars presented a similarity coefficient between 34 and 100%, which reflected the high genetic variability. The 32 alleles were not enough to distinguish all 17 watermelon cultivars, with “Sugar Baby” and “Omaru Yamato”; “Charleston Gray” and “Sunshade”, “Crimson Sweet” and “Nova Crimson” presenting a 100% of similarity. Two groups were observed at the cut point of 0.42 of similarity, with *Citrullus colocynthis*, positioned as an out group. One watermelon group was formed predominately by cultivars derived from Crimson and another group formed by cultivars of different types as “Sugar Baby”, “Charleston Gray” and “Pérola”.

Keywords: *Citrullus lanatus*. Microsatellite. Divergence. Plant variety protection. Dendrogram.

INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado descritores morfológicos para registro e lançamento de novas variedades. Ainda que a caracterização de cultivares feita desta forma continue sendo predominante e importante, as limitações deste tipo de descritor têm gerado a necessidade de se buscar alternativas. Uma delas tem sido os descritores de DNA, baseados no genótipo do indivíduo, que tem se destacado, especialmente pelo seu potencial de distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados. Marcadores moleculares despontam como uma alternativa na caracterização de germoplasma e proteção de novas cultivares livre de interferência ambiental. Sendo o termo “fingerprinting” utilizado para descrever o padrão molecular de um genótipo (Millach, 1999).

Diferentes marcadores moleculares, tais como, RAPD (“Random Amplified Polimorphic DNA”) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), tem sido utilizados para a avaliação e caracterização de germoplasma de melancia. Levi *et al.* (2001) analisaram a diversidade genética entre cultivares de melancias americanas, com base em marcadores RAPD, e verificaram similaridade entre 92 e 99,6% e concluíram que é necessário aumentar a base genética da melancia. Che *et al.* (2003) utilizaram oito combinações de ‘primers’ AFLP na análise da diversidade de 28 cultivares de melancia de diferentes origens e encontraram similaridade entre 82 e 99%. Entretanto, estes marcadores têm a desvantagem de serem dominantes, de difícil reprodutibilidade e muito laboriosos (Esselink *et al.*, 2003). Em contraste a estes, os marcadores microssatélites, também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”), têm sido o melhor marcador para estudos de “fingerprinting” devido ao seu alto polimorfismo, co-dominância, confiabilidade e reprodutibilidade (Varshney, 2005).

Jarret *et al.* (1996), verificaram variação genética entre acessos de *Citrullus lanatus* var. *lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis* usando sete marcadores SSR. Guerra-Sanz (2002) reportou que 18 marcadores SSR foram identificados com habilidade de detectar polimorfismo entre variedades de melancia, raças locais, *C. colocynthis* e híbridos interespecíficos. Joobeur *et al.* (2006) reportaram 36 ‘primers’ SSR, capazes de detectar polimorfismo em oito acessos e quatro variedades de melancia. Kwon *et al.* (2010) avaliaram 63 pares de ‘primers’ SSR para discriminação em 49 variedades comerciais de melancia e destes, 30 apresentaram polimorfismo. No entanto, ainda segundo esses

autores, existem muitas variedades de melancia que não foram diferenciadas por meio de marcadores SSR.

Jufen *et al.* (2009) reportaram que três marcadores SSR entre 73 avaliados foram capazes de distinguir dois híbridos de melancia das suas linhas parentais e que 200 'primers' RAPD e 30 ISSR não puderam diferenciar os mesmos. Os autores ainda identificaram dois marcadores SSRs capazes de distinguir os dois híbridos avaliados, reforçando o potencial desse tipo de marcador para trabalhos de proteção de cultivares de melancia e disputas comerciais.

Kwon *et al.* (2010) reportaram a aplicação de 30 SSRs para diferenciar 49 cultivares de melancia coreanas e norte-americanas, verificando a formação de cinco grupos, com similaridade variando de 15 a 100% entre as cultivares. Levi *et al.* (2009) reportaram a aplicação de 40 SSR gênicos em acessos e cultivares de melancia encontrando maior diversidade entre os acessos do que entre as cultivares avaliadas. Lee *et al.* (2007) reportaram que a aplicação de 15 SSR foram suficientes para diferenciar 26 cultivares coreanas e norte-americanas de melancia, separando-as em dois grupos, sem, contudo, observarem associações morfológicas e fisiológicas entre os grupos formados.

No Brasil, a aplicação de marcadores moleculares resume-se a estudos de divergência genética entre e dentro acessos de bancos de germoplasma, como os estudos realizados por Capeloto *et al.* (2004), Silva *et al.* (2006), com marcador RAPD e mais recentemente por Silva (2010) com marcadores DAF e ISSR.

Apesar da disponibilidade de marcadores microssatélites para melancia, ainda não foi proposto um número mínimo desse tipo de marcador para auxiliar na proteção de cultivares e dirimir disputas comerciais. This *et al.* (2004) propuseram sete microssatélites como o mínimo para análises de cultivares de videira, estabelecendo alelos de referências. Leão *et al.* (2009) empregaram esse conjunto de microssatélites para caracterizar a coleção de videira da Embrapa Semiárido. Ribeiro (2011) empregou e sugeriu 12 SSR para diferenciar 103 acessos de mangueira, estabelecendo o padrão alélico para os acessos avaliados.

O presente trabalho teve como objetivos o estabelecimento de padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas para 17 cultivares comerciais de melancia, com base em marcadores microssatélites, de forma a gerar um banco de dados de referência e apoio à proteção de cultivares e eventuais disputas comerciais, bem como orientar programas de melhoramento e recursos genéticos da espécie.

MATERIAL E METÓDOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de genética da Embrapa Semiárido e foram analisadas 17 cultivares de melancia e um acesso de *Citrullus colocynthis*, como ‘fora do grupo’ (Tabela 1). As sementes foram obtidas no Banco de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro, localizado na Embrapa Semiárido. Estas foram semeadas em bandejas de poliestireno, contendo substrato comercial para hortaliças, a base de vermiculita e cinzas vegetais e mantidas em casa de vegetação.

Para extração do DNA total, foram coletadas, após o aparecimento da terceira folha definitiva, amostras foliares de cinco plantas para representar cada cultivar. Essas foram armazenadas em freezer a -80°C , até o momento da extração.

Extração e Quantificação do DNA: O DNA foi extraído pelo método CTAB 2x (Doyle & Doyle, 1990), com algumas modificações. 1) a maceração mecânica foi realizada na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó muito fino; 2) O macerado vegetal de cada amostra foi transferido para tubos duplicados de eppendorf (2 mL), contendo cada um 950 μL de tampão CTAB 2x; 3) As amostras foram colocadas em banho Maria a 60°C por 30 min, com inversão destes a cada 10 min; 4) Adicionou-se 950 μL de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) em cada tubo, seguida de centrifugação 7.500 rpm, por 10 min; 5) 700 μL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf (1,5 mL), sendo adicionado 467 μL de álcool isopropílico ‘gelado’, seguido de suaves inversões dos tubos, estes foram mantidos em gelo por 20 min; 6) Após esse período a solução foi centrifugada a 10000 rpm para deposição do ‘pellet’ no fundo do tubo, descartando-se o sobrenadante em béquer em capela de exaustão de gases; 7) o ‘pellet’ foi ressuspensionado em 30 μL Tris-EDTA, permanecendo a 6°C por 24h em geladeira para completa dissolução do ‘pellet; 8) a solução foi tratada com RNase durante 45 min em banho maria a 37°C para remoção dos RNAs co-extraídos.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, pela comparação visual da intensidade das bandas do DNA extraído com bandas do DNA do fago Lambda, de concentrações conhecidas e carregadas no mesmo gel das amostras. A integridade das amostras de DNA foi avaliada pela presença ou ausência de ‘rastros’ de DNA. As amostras de DNA foram diluídas para 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ e armazenadas a -20°C .

Reação, amplificação do DNA e resolução em géis de poliacrilamida: foram utilizados 36 pares de ‘primers’ microssatélites (Joobeur *et al.*, 2006). Inicialmente foi feita uma

avaliação dos pares de 'primers' utilizando quatro cultivares (Charleston Gray, Sunshade, Crimson Sweet e Smile), distintas morfológicamente, para seleção daqueles de melhor resolução polimórfica em géis de poliacrilamida. As reações de amplificação de PCR ('Polymerase Chain Reaction') foram realizadas conforme metodologia de Joobeur (2004), com algumas modificações, para um volume final de 12 μ L, contendo 50 ng de DNA, 5 μ M de cada 'primer', 0,1 mM de dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1x tampão de PCR e 0,75 unidades da enzima Taq DNA polimerase. A programação do termociclador para as amplificações consistiu de: a) um ciclo inicial de 94°C durante 2 min, seguido 30 ciclos a 94°C durante 15s, a 56°C durante 30s e a 72°C durante 2 min. e um ciclo final a 72°C por 30 min.

À solução da reação de PCR foi adicionado metade do volume do tampão desnaturante de formamida 98% (EDTA pH 8,0 10 mM, 1 mg/mL de Xilene Cyanol e 1 mg/mL de Bromofhenol blue), seguido da completa desnaturação a 94°C por 5 min em termociclador e logo após colocadas imediatamente no gelo até a aplicação no gel de poliacrilamida.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6% [acrilamida/bisacrilamida (19:1), 7,5 M de uréia e tampão TBE 5x], preparado em placa de vidro tipo sanduíche com capacidade para 60 poços. As placas de vidro foram limpas com o auxílio de um lenço de papel embebido com etanol. A placa grande (de adesão do gel) foi tratada com 1,1 mL de uma solução contendo 95% de Etanol + 0,5% de Ácido Acético e 1 μ L de Bind silane (Bioscience). Essa solução foi espalhada em toda a superfície da placa com um auxílio de um lenço de papel, o excesso foi retirado com um lenço umedecido com álcool etílico. A placa pequena (repulsão do gel) foi tratada de acordo como descrito anteriormente, porém, substituindo-se a solução contendo Bind silane por um produto usado para a limpeza de vidros de automóveis com nome comercial de Waterlux (Luxcar).

Uma pré-corrída de 30 minutos a 40 W foi realizada antes da aplicação das amostras de PCR. Foi aplicado 2,5 μ L da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 6%, sendo a corrída de eletroforese realizada por um período de aproximadamente 3h, com potência constante de 40 W. O Marcador de peso molecular Ladder 50pb (Fermentas) foi carregado na extremidade lateral de cada gel.

Os géis foram corados com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Creste *et al.* (2001), com algumas modificações: 1) a placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo etanol absoluto 10% e ácido acético 1% por 20 min sob leve agitação; 2) lavagem com água destilada sob agitação por 1 min, 3) Pré-tratamento foi

realizado em solução de ácido nítrico 0,2 mol.L⁻¹ por 3 min, seguida de nova lavagem do gel com água destilada por 1 min, sob lenta agitação, 4) A impregnação do gel foi realizada com solução de nitrato de prata 0,2% por 20 min, seguida de duas lavagens de 30 s com água destilada sob leve agitação, 5) o gel foi imerso em solução de revelação contendo carbonato de sódio 2,4% e formaldeído 37%, sendo utilizado metade da solução reveladora na primeira lavagem, até o início do aparecimento das bandas, 6) a placa com gel foi transferida para uma segunda bandeja contendo o restante da solução e corado até o aparecimento do padrão das bandas desejado, 7) uma nova lavagem do gel foi realizada com ácido acético 5% por 3 min. seguida de uma lavagem final com água por 1 min, sob agitação lenta. A placa com o gel corado foi colocada em posição vertical até a secagem em temperatura ambiente para posterior análise dos fragmentos e digitalização em scanner Epson GT-15000.

Anotação e análise dos dados de microssatélites: os locos que apresentaram polimorfismo de fácil interpretação foram selecionados para genotipagem das 17 cultivares de melancia e um acesso de *C. colocynthis*. A estimativa do tamanho em pares de base (pb) para cada alelo, para a construção do padrão alélico de cada germoplasma, foi obtida pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50bp da Fermentas (EUA).

Os microssatélites foram anotados para a presença (1) versus ausência (0) de alelos, para construir uma matriz de similaridade do índice de Jaccard. O dendrograma com as distâncias das cultivares foi gerado pelo método de agrupamento UPGMA (Método de Agrupamento não Ponderado com base na Média Aritmética). A avaliação do ajuste do fenograma foi realizada pela correlação co-fenética, ou seja, a correlação entre as distâncias reais e as representadas graficamente. Para estas análises utilizou-se o aplicativo computacional NTSYSpc versão: 2.1 (Rophlf, 2000).

As estimativas das frequências dos principais alelos, número de genótipos, diversidade do gene, heterozigosidade e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os microssatélites utilizados, foram realizados com auxílio do programa PowerMarker (Liu & Muse, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 36 pares de ‘primers’ utilizados, apenas dez apresentaram ampliações polimórficas de fácil interpretação: MCPI-04, MCPI-05, MCPI-07, MCPI-11, MCPI-14,

MCPI-16, MCPI-21, MCPI-26, MCPI-33, MCPI-39 (Figura 1). Joobeur *et al.* (2006), ao avaliarem a capacidade de detectar polimorfismo, desses 36 ‘primers’, reportaram que todos eles foram polimórficos em oito acessos de melancia, incluindo cinco acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* e três de *C. lanatus* var. *citroides*. Essa diminuição no número de SSR em detectar polimorfismo, pode ser devido ao fato de que, no presente trabalho esses microssatélites foram avaliados quanto à capacidade de detectar polimorfismo em cultivares comerciais de melancia, todas pertencentes à subespécie *C. lanatus* var. *lanatus*.

Foram detectados 32 alelos nos dez microssatélites analisados, onde o número de alelos por loco variou de dois a cinco, com média de 3,2 alelos por microssatélite nas 17 cultivares de melancia e um acesso de *C. colocynthis* genotipadas. A média descrita foi semelhante aos resultados reportados por Guerra-Sanz (2002), Joobeur *et al.* (2006) e Kwon *et al.* (2010), que encontraram média de alelos de 3,6, 2,77 e 3,9 alelos por locos, respectivamente. No entanto, esses resultados foram abaixo da média encontrada por Jarret (1996), que encontrou média de 4,7 alelos por loco, ao avaliar sete SSR em 33 acessos de melancia, incluindo *Citrullus lanatus* var. *lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis*.

O tamanho dos alelos variou de 462 pb no MCPI-05 a 1064 pb no MCPI-39 (Tabela 2), diferente dos tamanhos reportados por Kwon *et al.* (2010), que utilizaram os mesmos marcadores microssatélites e reportaram tamanho de alelos de 135 pb no MCPI-42 a 298 pb no MCPI-39.

Os locos MCPI-05 e MCPI-16 podem estar ligados ao padrão de listras nos frutos, uma vez que, todas as cultivares que possuem listras bem definidas apresentaram o mesmo padrão de alelos (Tabela 2). No entanto, são necessários futuros trabalhos, em populações segregantes, para associar os referidos ‘primers’ ao gene responsável pelo padrão de listras nos frutos de melancia.

Um resultado muito importante desse trabalho, inclusive com uma grande utilidade para o registro de cultivares, é que alguns locos foram capazes de distinguir a cultivar Crimson Sweet de suas derivadas. A saber: os locos MCPI_11, MCPI_26 e MCPI_33 distinguiram a cultivar BRS Opara, da cultivar Crimson Sweet e suas derivadas. É importante ressaltar que a “BRS Opara” é uma variedade brasileira, lançada pela Embrapa Semiárido em 2007, que possui resistência ao oídio, um dos principais fungos que atacam a cultura da melancia. A cultivar é oriunda de cruzamentos e retrocruzamentos de “Crimson Sweet” com uma fonte de resistência ao oídio conservada no BGCIA. Os locos MCPI_11 e MCPI_39 foram capazes de distinguir o híbrido Top Gun de “Crimson

Sweet” e suas derivadas. E o locus MCPI_14 foi capaz de distinguir “Crimson Select” de “Crimson Sweet” (Tabela 2). Vale salientar que todas essas cultivares são morfológicamente muito semelhantes e geneticamente aparentadas. Marcadores moleculares capazes de distinguir cultivares geneticamente aparentadas são muito importantes, pois poderão ser utilizados para o registro de novas cultivares. Como no Brasil, a preferência do mercado consumidor é por frutos com padrões externos semelhantes aos padrões de “Crimson Sweet”, os programas de melhoramento usam essa cultivar na obtenção de novas cultivares. Dessa forma, os locos acima citados, capazes de distinguir “Crimson Sweet” de suas derivadas, serão de extrema relevância no momento do registro de novas cultivares.

Os valores de PIC, que reflete a diversidade alélica e a taxa de frequência entre as variedades, não foram uniformemente altas para todos os locos microssatélites testados. A média do PIC foi de 0,402, onde os maiores valores foram observados nos locos MCPI_04 (0,597), MCPI_05 (0,583) e MCPI_16 (0,707), e o menor valor foi observado no MCPI_14 (0,104) (Tabela 3). Kwon *et al.* (2010), ao caracterizarem 49 cultivares coreanas e norte-americanas, também reportaram esses microssatélites como alguns dos que apresentaram maior informação polimórfica. Entre as cultivares coreanas e norte-americanas o MCPI_14, também foi um dos que apresentaram maior informação polimórfica, diferindo do observado no presente estudo. Esses resultados indicam que os locos microssatélites mais polimórficos encontrados por Kwon *et al.* (2010) e no presente trabalho, não serão necessariamente os mais informativos para todas as cultivares de melancia, tanto coreanas e norte-americanas quanto de outros países, sendo recomendável uma contínua caracterização molecular das cultivares de melancia existentes.

A média da heterozigidade foi de 0,189, com o maior valor observado no MCPI_04 (1,0) e o menor valor (0) nos MCPI_11, MCPI_21 e MCPI_26 (Tabela 3). O PIC e a heterozigidade representam a existência de variabilidade, pois cada indivíduo diplóide pode ter até dois alelos por loco (Weir, 1996), em que a variabilidade é maior com a maior frequência de heterozigotos e PIC, sendo os microssatélites que se enquadrem nessa situação considerados como os mais indicados para estudos de diversidade (Ribeiro, 2011).

A correlação entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz das distâncias de similaridade foi 0,86, indicando que o dendrograma apresentado (Figura 2) apresenta um bom ajuste nos agrupamentos das cultivares de melancia com os 32 alelos dos dez locos microssatélites analisados. Três grupos foram observados, no ponto de corte de 0,42 de

similaridade: grupo I – Minipool, Peacock, Pérola, BRS Kuarah, Omaru Yamato, Sugar Baby, Emperor Charleston Bonanza, Charleston Gray e Sunshade; grupo II – Smile, BRS Soleil, Top Gun, BRS Opara, Crimson Sweet, Crimson Select, Nova Crimson e Fairfax, e grupo III - *C. colocynthis* (Figura 2).

Levi *et al.* (2000), ao caracterizarem acessos de melancia com marcadores RAPD relataram à formação de três grupos, sendo que no primeiro ficaram agrupadas cultivares comerciais, no segundo, acessos de *C. lanatus* var. *citroides*; e, no terceiro *C. colocynthis*. Os resultados obtidos por estes autores, demonstraram maior variabilidade genética entre acessos de *C. lanatus* var. *citroides* e de *C. colocynthis* quando comparados com as cultivares comerciais (*C. lanatus* var. *lanatus*). Kwon *et al.* (2010) reportaram a formação de seis grupos ao caracterizarem 49 cultivares de melancia coreanas e norte-americanas com marcadores microssatélites.

Silva *et al.* (2006), ao caracterizarem 43 acessos de melancia pertencentes ao Banco de Germoplasma de Melancia (BGCIA), localizado na Embrapa Semiárido, com marcadores RAPD, verificaram a formação de 28 grupos. O grupo I foi constituído por 25,6% dos acessos, sendo quatro acessos originários da Chapada Diamantina, dois de Irecê e cinco de Vitória da Conquista. O grupo II foi formado por dois acessos, um da Chapada Diamantina e outro de Vitória da Conquista; o grupo III, por três acessos, um de cada local de coleta e, o grupo IV, por dois acessos, um da Chapada Diamantina e outro de Vitória da Conquista. Os 24 grupos restantes foram formados por acessos únicos, incluindo a cultivar Crimson Sweet.

Ao comparar a formação de grupos entre cultivares comerciais e acessos conservados no BGCIA, pode-se verificar que a variabilidade encontrada nestes é maior do que a encontrada entre as cultivares. De acordo com Romão (1995), existe uma forte troca de sementes entre agricultores. Além disso, na agricultura tradicional do Nordeste brasileiro é contínua, e a seleção praticada pelos agricultores tende a fixar tipos distintos em determinadas regiões, o que pode explicar o aparecimento de grupos específicos, muitas vezes formados por um único acesso.

Para Navot & Zamir (1987), a melancia é uma cultura de base genética estreita, devido à seleção recorrente e endogamia contínua durante 5000 anos de cultura. Essa afirmação pode ser constatada pelo baixo polimorfismo encontrado por Navot & Zamir (1987) entre cultivares e acessos de melancia com base em marcadores izoenzimáticos, bem como por Levi *et al.* (2001), que ao caracterizarem 46 cultivares de melancia americanas encontraram similaridade genética entre 92% e 99,6%, por meio de marcadores

RAPD. Che *et al.* (2003) reportaram coeficiente de similaridade entre 82% e 99% em acessos de melancia originados da Ásia e dos Estados Unidos, utilizando marcadores AFLP e ISSR.

Os resultados do presente estudo, contudo indicam alta variabilidade genética entre as cultivares analisadas, pois o coeficiente de similaridade variou de 34 a 100%. Resultados similares são relatados por Kwon *et al.* (2010), que ao caracterizarem 49 cultivares de melancia coreanas e norte-americanas, com base em marcadores SSR encontraram similaridade entre 13 e 100%.

Comparando os resultados encontrados com marcadores RAPD, AFLP, ISSR e SSR pode-se perceber o alto poder discriminante dos marcadores microssatélites até mesmo entre materiais geneticamente aparentados. Os resultados obtidos no presente não validam a hipótese de que a melancia é uma cultura de base estreita, corroborando com os resultados de Kwon *et al.* (2010).

Apesar da variabilidade encontrada no presente trabalho entre as cultivares testadas, os 32 alelos dos dez locos SSR não foram suficientes para separar todas as 17 cultivares de melancia, sugerindo que as variedades “Sugar Baby” e “Omaru Yamato”, “Charleston Gray” e “Sunshade”, “Crimson Sweet” e “Nova Crimson”, são geneticamente iguais para os locos analisados. Vale ressaltar que essas cultivares são, morfológicamente, muito distintas. Em algumas situações, marcadores moleculares tipo SSR podem apresentar informações adicionais quando descritores morfológicos são insuficientes para distinguir cultivares de uma espécie que apresenta base genética estreita (Priolli *et al.*, 2002). Nas situações em que não for possível distinguir acessos de uma dada espécie com um conjunto de marcadores preestabelecidos, Jakse *et al.* (2005) sugerem que marcadores adicionais sejam utilizados para revelar polimorfismos. ‘Primers’ adicionais, além dos testados neste trabalho, podem ser obtidos em Guerra-Sanz (2002) e Jarret *et al.* (1996) ou até mesmo ajustes na temperatura de anelamento do protocolo PCR de alguns dos microssatélites testados no presente trabalho.

Marcadores moleculares do tipo SSR não tem sido muito utilizado na caracterização de variedades comerciais de melancia, porque existe um número limitado desses marcadores desenvolvidos para esta olerícola (Kwon *et al.*, 2010).

O padrão alélico e as estimativas de pares de bases para os 32 alelos nos dez locos microssatélites, revelados neste trabalho, são um primeiro esforço para o emprego de marcadores microssatélites em situações de proteção de cultivares para o agronegócio da

melancia no Brasil, podendo também ser utilizado em situações de disputas comerciais referentes à certificação ou não das principais cultivares de melancia usadas no país.

CONCLUSÕES

1. Foram estabelecidos padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas baseados em marcador microssatélites para 17 cultivares de melancia, com a similaridade variando entre 34 e 100%.
2. Foi observada formação de três grupos no dendrograma com os genótipos analisados, no ponto de corte de 42% de similaridade.
3. Os 32 alelos dos 10 locos analisados não foram suficientes para distinguir as cultivares “Sugar Baby” e “Omaru Yamato”, “Charleston Gray” e “Sunshade”, “Crimson Sweet” e “Nova Crimson”.
4. Os locos mais indicados para estudos de diversidade e “fingerprinting” em melancia foram: MCPI_04, MCPI_05 e MCPI_16.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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: 5 ago. 2010.

CHE, K. P.; LIANG, C. Y.; WANG, Y. G.; JIN, D. M.; WANG, B. Genetic assessment of watermelon germplasm using the AFLP technique. **HortScience**, Alexandria, v. 38, p. 81–84, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, p. 299-306, 2001.

DIAS, R. de C. S.; BARBOSA, G. S.; SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. de; RESENDE, G. M. de; COSTA, N. D. Cultivares. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. de; COSTA, N. D. (Ed.). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido,

2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/cultivares.htm>. Acesso em: 6 maio 2011.

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

ESSELINK, G. D.; SMULDERS, M. J. M.; VOSMAN, B. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 277-286, 2003.

GUERRA-SANZ J. M. Citrullus simple sequence repeats markers from sequence databases. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 223–225, 2002.

ISLA SEMENTES. **Híbrido Emperor Charleston Bonanza**. 2011. Disponível em: <http://www.isla.com.br/cgi-bin/detalhe.cgi?id=164>. Acesso em: 6 maio 2011.

JAKSE, J.; MARTIN, W.; MCCALLUM, J.; HAVEY, M. J. Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 130, 912-917, 2005.

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.

JOUBEUR, T.; GUSMINI, G.; ZHANG, A.; LEVI, A.; XU, Y.; WEHNER, T. C.; OLIVER, M.; DEAN, R. A. Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or Arabidopsis genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 8, p. 1553-562, 2006.

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

JUFEN, L.; LING, X.; GUOBIN, M. Identification of watermelon hybrid purity by molecular markers. **Acta Agriculturae Shanghai**, v. 25, n. 1, p. 72-75, 2009.

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.

LANE-AG CENTER. **Watermelon cultivars**. 2009. Disponível em: <<http://www.lane-ag.org/wm-world/Cultivars/cultivars.htm>>. Acesso em: 6 maio 2011.

LEÃO, P. C. de S.; RIAZ, S.; GRAZIANI, R.; DANGL, G. S.; MOTOIKE, S. Y.; WALKER, M. A. Characterization of a brazilian grape germplasm collection using microsatellite markers. **American Journal of Enology and Viticulture**, Reedley, v. 60, p. 517-524, 2009.

LEE, H. J.; CHO, H. J.; LEE, K. A.; LEE, M. S.; SHIN, Y. S.; HARN, C. H.; YANG, S. G.; NAHM, S. H. Development of sequence-based DNA markers for evaluation of phylogenetic relationships in korean watermelon varieties. **Journal of Crop Science Biotechnology**, New York, v. 10, n. 2, p. 98 -105, 2007.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; KEINATH, A. P.; WEHNER, T. C. Estimation of genetic diversity among *Citrullus* accessions using RAPD markers. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 510, p. 385-390, 2000.

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

LEVI, A.; WECHTER, P.; DAVIS, A. EST-PCR markers representing watermelon fruit genes are polymorphic among watermelon heirloom cultivars sharing a narrow genetic base. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Cambridge, v. 7, n. 1: 16–32, 2009.

LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 2128-2129, 2005.

MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/index.html>>. Acesso em: 4 abr. 2011.

NAVOT, N.; ZAMIR, D. Isozyme and seed protein phylogeny of the genus *Citrullus* (Cucurbitaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 156, p. 61-67, 1987.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 185-193, 2002.

RIBEIRO, I. C. N. dos S. **Análise da divergência genética em acessos de *Mangifera indica* com base em descritores agro-morfológicos e marcadores microssatélites**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

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

ROPHLF, F. J. **NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 2.10m. Setauket: Exeter Software, 2000.

SILVA, M. L. **Avaliação molecular da variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de melancia do Nordeste brasileiro**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

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

SOUZA, F. F.; DIAS, R. de C. S.; QUEIRÓZ, M. A. de. Aspectos botânicos. In: SOUZA, F. de F. (Ed.). **Cultivo da melancia em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008. p. 82-95.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; CONSTANTINI, L. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, p. 1448–1458, 2004.

VARSHNEY, R. K.; GARNER, A.; SORELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 48–63, 2005.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**: methods for discrete population genetic data. 2. ed. rev. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

Tabela 1. Caracteres e procedência das cultivares genotipadas com dez marcadores SSR. Petrolina-PE, 2011.

Cultivares	Formato do fruto	Cor da casca	Cor da polpa	Procedência das sementes
Minipool	Circular	Verde-claro com listras difusas muito estreitas	Vermelho	Hazera
Pérola	Elíptico largo	Verde-claro com listras difusas muito estreitas	Vermelho	BGCIA
Smile	Circular	Verde-médio com listras definidas escuras médias	Vermelho	BGCIA
BRS Soleil	Circular	Verde-médio com listras definidas escuras médias	Amarelo	BGCIA
BRS Kuarah	Circular	Verde-médio com listras difusas muito estreitas	Amarelo	BGCIA
BRS Opara	Elíptico	Verde-claro com listras definidas escuras e largas	Vermelho	BGCIA
Crimson Sweet	Elíptico	Verde-claro com listras definidas escuras e largas	Vermelho	Hortivale
Crimson select	Elíptico	Verde-claro com listras definidas escuras e largas	Vermelho	Hollar
Nova Crimson	Elíptico	Verde-claro com listras definidas escuras e largas	Vermelho	Topsed
Top Gun ¹	Elíptico	Verde-claro com listras definidas escuras e largas	Vermelho	Syngenta
Omaru Yamato	Circular	Verde-claro com listras difusas muito estreitas	Vermelho	BGCIA
Sugar Baby	Circular	Verde muito escuro com listras muito estreitas indistintas	Vermelho	BGCIA
Fairfax	Alongado	Verde-claro com listras definidas verde-escuro	Vermelho	Feltrim
Emperor Charleston Bonanza ¹	Alongado	Verde-claro com listras difusas muito estreitas	Vermelho	Isla sementes
Charleston Gray	Alongado	Verde-claro com listras difusas muito estreitas	Vermelho	Isla sementes
Peacock	Oblongo	Verde-escuro	Vermelho	BGCIA
Sunshade	Oblongo	Verde claro	Vermelho	BGCIA
C. colocynthis	Circular	Verde claro com listras definidas escuras	Branco	BGCIA

¹Híbrido F₁; BGCIA = Banco Ativo de germoplasma de Melancia da Embrapa Semiárido.

Fonte: Dados da Embrapa Semiárido e adaptação de Dias *et al.* (2010); Isla sementes (2011); Lane Agriculture Center (2009), Souza (2008).

Tabela 2. Padrão alélico, em pares de bases, estimado para 17 cultivares e um acesso de melancia, genotipados com dez marcadores microssatélites. Petrolina-PE, 2011.

Cultivares	Locos MCPI									
	4	5	7	11	14	16	21	26	33	39
Minipool	736/774	556/556	742/742	738/738	683/683	810/810	480/480	640/640	870/870	965/965
Pérola	774/779	556/556	742/742	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	856/856	965/965
Smile	774/779	462/462	623/623	738/738	683/683	469/742	475/475	640/640	856/856	965/965
BRS Soleil	736/774	462/462	623/623	738/738	683/683	469/742	475/475	640/640	870/870	965/965
BRS Kuarah	736/774	556/556	623/623	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	870/870	965/965
BRS Opara	736/774	462/462	742/742	665/665	683/683	469/742	480/480	577/577	870/870	942/942
Crimson Sweet	736/774	462/462	742/742	831/831	683/683	469/742	480/480	640/640	856/856	942/942
Crimson select	736/774	462/462	742/742	831/831	638/701	469/742	480/480	640/640	856/856	942/942
Nova Crimson	736/774	462/462	742/742	831/831	683/683	469/742	480/480	640/640	856/856	942/942
Top Gun	774/799	462/462	742/742	738/738	683/683	469/742	480/480	640/640	856/856	965/965
Omaru Yamato	736/774	556/556	623/623	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	856/856	965/965
Sugar Baby	736/774	556/556	623/623	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	856/856	965/965
Fairfax	736/774	462/462	742/742	728/728	683/683	469/742	475/475	640/640	856/856	942/942
Emperor	736/774	556/507	742/742	738/738	683/683	810/835	475/475	640/640	856/870	942/965
Charleston Gray	774/799	507/507	742/742	738/738	683/683	835/835	475/475	640/640	856/856	942/942
Peacock	736/774	556/556	742/742	738/738	683/683	810/810	480/480	577/577	856/856	942/965
Sunshade	774/799	507/507	742/742	738/738	683/683	835/835	475/475	640/640	856/856	942/942
<i>C. colocynthis</i>	671/703	579/579	722/742	738/738	683/683	787/787	475/475	640/640	856/856	965/1064

Tabela 3. Parâmetros genéticos estimados para 10 microssatélites em 18 genótipos de melancia. Petrolina-PE, 2011.

SSR	Maior frequência alélica	Nº. de genótipos	Nº de indivíduos	Número de alelos	Diversidade gênica	Hererozigosidade	PIC
MCPI_04	0,472	4,000	18,000	6,000	0,654	1,000	0,597
MCPI_05	0,444	5,000	18,000	4,000	0,650	0,056	0,583
MCPI_07	0,694	3,000	18,000	3,000	0,440	0,056	0,365
MCPI_11	0,722	4,000	18,000	4,000	0,444	0,000	0,409
MCPI_14	0,944	2,000	18,000	3,000	0,106	0,056	0,104
MCPI_16	0,361	5,000	18,000	5,000	0,748	0,500	0,707
MCPI_21	0,611	2,000	18,000	2,000	0,475	0,000	0,362
MCPI_26	0,889	2,000	18,000	2,000	0,198	0,000	0,178
MCPI_33	0,750	3,000	18,000	2,000	0,375	0,056	0,305
MCPI_39	0,528	4,000	18,000	3,000	0,523	0,167	0,412
Média	0,642	3,400	18,000	3,400	0,461	0,189	0,402

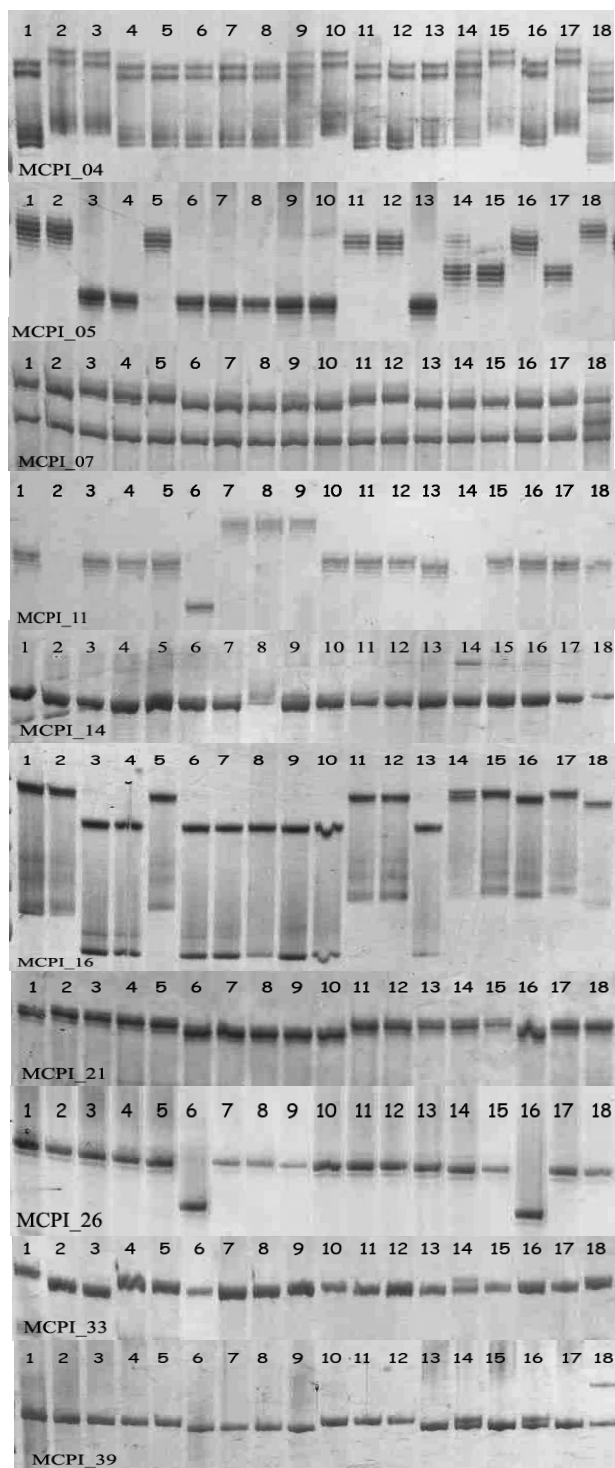


Figura 1. Padrão de bandas para 10 locos microssatélites avaliados em 17 cultivares de melancia e um acesso de *C. colocynthis*. Genótipos: 1 = Minipool, 2 = Pérola, 3 = Smile, 4 = BRS Soleil, 5 = BRS Kuarah, 6 = BRS Opara, 7 = Crimson Sweet, 8 = Crimson Select, 9 = Nova Crimson, 10 = Top Gun, 11 = Omaru Yamato, 12 = Sugar Baby, 13 = Fairfax, 14 = Emperor Charleston Bonanza, 15 = Charleston Gray, 16 = Peacock, 17 = Sunshade, 18 = *C. colocynthis*. Petrolina-PE, 2011.

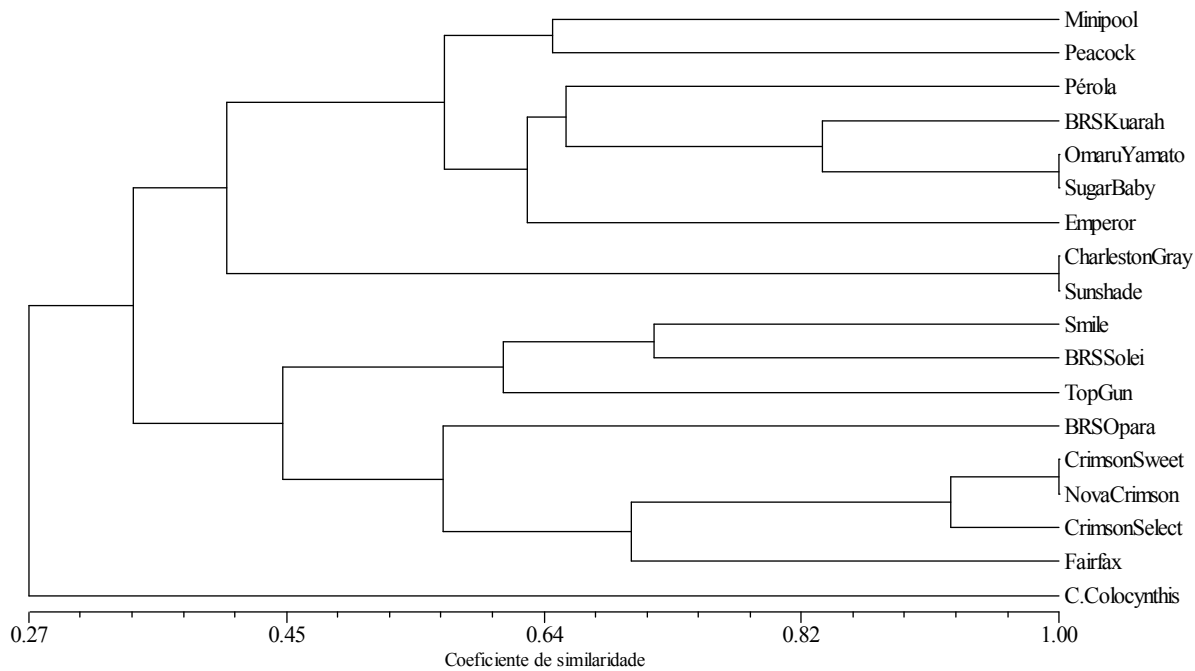


Figura 2. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard de 17 cultivares de melancia e um acesso *C. colocynthis* genotipados para 32 alelos de dez locos microssatélites. Correlação cofenética = 0,86. Petrolina-PE, 2011.

**CAPÍTULO II – VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE MELANCIA
POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de 40 acessos de melancia oriundos de oito regiões e preservados no Banco de Germoplasma de Cucurbitáceas, com base em marcadores moleculares SSR. O DNA total foi extraído pelo método CTAB 2x e os produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida desnaturante 6% e corados com nitrato de prata. Para visualização da similaridade genética, utilizou-se o dendrograma UPGMA gerado da matriz de similaridade do coeficiente de Jaccard, com base em 41 alelos de treze locos microssatélites. O número de pares de bases foi estimado pelo método da mobilidade inversa, com base em regressão de produtos de tamanho conhecido. A análise molecular de variância foi realizada pela decomposição total entre e dentro das regiões. Dos 36 pares de 'primers' microssatélites utilizados apenas treze apresentaram ampliações polimórficas de fácil interpretação. Os acessos apresentaram coeficiente de similaridade entre 37 e 96%, com dendrograma apresentando valor cofenético de 0,80. A variabilidade genética entre populações foi considerada alta ($\hat{\phi}_{ST}=0,319$). Agrupamentos específicos foram observados em três regiões. Esses resultados indicam que a variabilidade genética da melancia não está uniformemente distribuída nas regiões analisadas. Sugere-se a prospecção de um maior número de populações por região, para se ter maior visibilidade da diversidade da espécie.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*. SSR. AMOVA. Dendrograma.

ABSTRAT

The objective of this work was to analyze the genetic variability of 40 accessions from eight regions of watermelon preserved in the Watermelon Active Germplasm Bank based on SSR markers. The total DNA was extracted by the CTAB 2x method, and PCR products were analyzed in denaturing polyacrylamide 6% gels, stained with silver nitrate. For visualization of the genetic similarity, the dendrogram UPGMA generated by the matrix of similarity of the coefficient of Jacquard was used, based on 41 alleles of thirteen microsatellite loci. The number of base pairs was estimated by the method of inverse mobility, based on known size products regression. Analysis of molecular variance was accomplished by total decomposition among and within regions. Among the 36 tested microsatellites primers only thirteen presented polymorphic amplification of easy interpretation. The accessions presented a similarity coefficient between 37 and 96%, the dendrogram presented co-phenetic value of 0.80. The genetic variability among population was high ($\hat{\phi}_{ST}=0,319$). Specific clusters were observed in three regions. These results indicate that the genetic variability of watermelon is not uniformly distributed in the analyzed regions. It is suggested the prospecting of a greater number of populations by region in order to have greater visibility of the diversity of species.

Keywords: *Citrullus lanatus*. SSR. AMOVA. Dendrogram.

INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus*) pertence ao gênero *Citrullus*, a família *Cucurbitaceae* e é originária da África (Witaker & Davis, 1962). É uma espécie alógama, cujos principais agentes polinizadores são as abelhas. Entretanto, há relatos de altas taxas de autofecundações naturais em populações andromonóicas, cultivadas em casa-de-vegetação (Ferreira *et al.*, 2000; 2002). Sua introdução no Brasil ocorreu em duas fases, a primeira durante o tráfico de escravos e, na segunda, foram introduzidas cultivares melhoradas oriundas dos programas de melhoramento dos Estados Unidos e Japão (Romão, 2008).

Atualmente o Brasil é o quarto país maior produtor de melancia, com uma produção em 2008 de 1.950.000 toneladas/ano, o que contribui para o agronegócio do país com mais de R\$ 600 milhões de reais por ano (Agriannual, 2011). O Nordeste tem expressiva participação no agronegócio da melancia, onde seu cultivo é realizado principalmente por pequenos agricultores, sob condições irrigadas ou não, devido ao seu fácil manejo e baixo custo de produção (Dias *et al.*, 2001).

No Brasil a maioria das cultivares comerciais é de origem americana e japonesa (Capeloto *et al.*, 2004), não tendo sido, portanto, desenvolvidas para as condições climáticas do país, principalmente as existentes no Semiárido nordestino. Somando-se a isso, a maioria das cultivares de melancia desenvolvidas na América do Norte durante os últimos dois séculos, apesar da grande variabilidade de caracteres morfológicos, possui base genética estreita, o que pode ter contribuído para sua elevada susceptibilidade a doenças e pragas (Levi *et al.*, 2000, 2001).

Uma etapa importante no desenvolvimento de cultivares é o estudo da variabilidade genética encontrada nos recursos genéticos. O uso dos recursos genéticos, como fonte de criação de novas variedades, é fator de fundamental importância para a obtenção de produtividades mais elevadas e para as transformações tecnológicas verificadas no processo de modernização do agronegócio. Trata-se de um processo dinâmico, que necessita de contínuo enriquecimento e caracterização dos materiais mantidos nas coleções de germoplasma (Valls, 2007).

O Nordeste brasileiro é considerado centro de diversidade secundário para a melancia e têm apresentado grande variabilidade para diversos caracteres de planta, frutos e resistência a doenças (Queiróz, 1993; Dias *et al.*, 1996). A variabilidade encontrada na referida região serviu de base para a formação de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG)

de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, na década de 80, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina – PE (Queiróz, 1993). O Banco de Germoplasma de Melancia (BGCIA), componente deste BAG, possui atualmente cerca de 870 acessos conservados (Silva *et al.*, 2010), incluindo cultivares comerciais, amostras da agricultura tradicional, e alguns parentes silvestres da melancia. Romão (1995) estudou a dinâmica e variabilidade de populações do BGCIA em três regiões do Nordeste brasileiro utilizando 39 populações, 13 populações por região, coletadas no médio sertão maranhense, na depressão sertaneja e na região central da Bahia, concluindo que o Nordeste brasileiro é um centro de diversidade secundário para a melancia.

Muitos estudos referentes ao uso dos recursos genéticos da melancia têm sido realizados, com acessos conservados no BGCIA, com base em descritores morfológicos, o que têm permitido grandes avanços na descrição da divergência genética entre acessos (Queiróz *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2005). Quando avaliado para a susceptibilidade aos principais patógenos que atingem a cultura foi observado a presença de genes de resistência ao oídio, viroses e à micosferela (Queiróz *et al.*, 1993, Dias *et al.*, 1996, Silveira, *et al.*, 2009). Os estudos realizados no BGCIA permitiram o desenvolvimento da cultivar resistente ao oídio, BRS Opara, (Dias *et al.*, 2007), e de cultivares com diferentes padrões de fruto, como as cultivares de polpa amarela BRS Soleil e BRS Kuarah (Souza *et al.*, 2007).

As informações moleculares podem complementar as informações ecológicas, morfológicas e agronômicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta, direcionar o enriquecimento da base genética, formar e validar coleções nucleares e de trabalho, analisar a diversidade e a pureza genética, identificar acessos duplicados e redundantes, auxiliar trabalhos de classificação botânica e filogenia, subsidiar seleção de genitores, planejamento de cruzamentos e seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento (Faleiro, 2007).

A escolha inadequada dos locais de coleta pode fazer com que não haja uma representatividade da variabilidade genética que precisa ser conservada e utilizada. Estudos de diversidade molecular de acessos ou populações em diferentes regiões podem fornecer informações importantes sobre estratégias de amostragem para realização de eficientes trabalhos de coleta, tais como o número de acessos, tamanho de cada população, análise quantitativa e qualitativa das regiões onde serão feitas as coletas (Nebauer *et al.*, 1999; Faleiro, 2007).

Capeloto *et al.* (2004), realizaram estudo de divergência genética entre e dentro de 18 acessos de melancia coletados no estado do Maranhão com 59 primers RAPD ('Random Amplified Polymorphic DNA'), concluindo, com base em análises de agrupamento, da existência de considerável divergência genética entre e dentro acessos. Silva *et al.* (2006), realizaram caracterização morfológica e com marcador RAPD molecular de 43 acessos do BGCIA, oriundos de diferentes regiões do Estado da Bahia, concluindo com base nos agrupamentos formados a existência de variabilidade genética ente os acessos e a inexistência de agrupamentos específicos por região de origem dos acessos. Silva (2010) identificou, com base em análises de agrupamentos e de análises de variância molecular de dados de marcadores DAF ('DNA Amplification Fingerprinting') e ISSR ('Inter-Simple Sequence Repeat'), ampla variabilidade genética em 291 acessos do BGCIA.

Os marcadores RAPD, ISSR e DAF têm a principal desvantagem de serem dominantes (Esselink *et al.*, 2003). Em contraste a estes, os marcadores microssatélites, também denominados SSR ("Simple Sequence Repeats"), têm sido o melhor marcador para estudos de "fingerprinting" devido ao seu alto polimorfismo, co-dominância, confiabilidade e reprodutibilidade (Varshney, 2005). Apesar da sua vantagem e superioridade, marcadores SSR não haviam sido aplicados para a análise da variabilidade genética de acessos do BGCIA até o presente trabalho.

Mujaju *et al.* (2010) concluíram com base em análise molecular de variância (AMOVA) e de agrupamentos de dados de RAPD e SSR, maior existência da variabilidade dentro de acessos de melancia selvagem do Zimbábue. Trabalhos de Jarret *et al.* (1996), Guerra-Sanz (2002) e Joobeur *et al.* (2006) reportaram a existência de variabilidade genética em acessos de melancia pela formação de agrupamento com dados moleculares de SSR. Deve ser destacado, que análises de agrupamento são apenas indicativos da existência de diversidade entre populações e de que o parâmetro $\hat{\phi}_{ST}$, similar ao coeficiente F e obtido em AMOVA, pode ser usado como medida de diferenciação entre populações (Excoffier *et al.*, 1992).

O objetivo do presente trabalho foi analisar a variabilidade genética de 40 acessos, oriundos de oito regiões do Nordeste brasileiro e preservados no BGCIA da Embrapa Semiárido, por intermédio de marcadores moleculares SSR, a fim de subsidiar estratégias de preservação e utilização da variabilidade genética da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética da Embrapa Semiárido.

Material Vegetal: foram selecionados acessos de melancia oriundos de oito regiões do Nordeste brasileiro, sendo cinco acessos por região (Tabela 1). As sementes, oriundas do Banco ativo de germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro, foram semeadas em bandejas de poliestireno, contendo substrato comercial para hortaliças, a base de vermiculita e cinzas vegetais e mantidas em casa de vegetação. Para extração do DNA total, foram coletadas, após o aparecimento da terceira folha definitiva, amostras foliares de cinco plantas para representar cada acesso. Essas foram armazenadas em freezer a -80°C, até o momento da extração.

Extração e Quantificação do DNA: O DNA foi extraído pelo método CTAB 2x (Doyle & Doyle, 1990), com algumas modificações: 1) a maceração mecânica foi realizada na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó muito fino; 2) O macerado vegetal de cada amostra foi transferido para tubos duplicados de eppendorf (2 mL), contendo cada um 950 µL de tampão CTAB 2x; 3) As amostras foram colocadas em banho Maria a 60°C por 30 min, com inversão destes a cada 10 min; 4) Adicionou-se 950 µL de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) em cada tubo, seguida de centrifugação 7.500 rpm, por 10 min; 5) 700 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf (1,5 mL), sendo adicionado 467 µL de álcool isopropílico ‘gelado’, seguido de suaves inversões dos tubos, estes foram mantidos em gelo por 20 min; 6) Após esse período a solução foi centrifugada a 10000 rpm para deposição do ‘pellet’ no fundo do tubo, descartando-se o sobrenadante em béquer em capela de exaustão de gases; 7) o ‘pellet’ foi ressuspensionado em 30 µL Tris-Edta, permanecendo a 6°C por 24h em geladeira para completa dissolução do ‘pellet’; 8) a solução foi tratada com RNase durante 45 min em banho maria a 37°C para remoção dos RNAs co-extraídos.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, pela comparação visual da intensidade das bandas do DNA extraído com bandas do DNA do fago Lambda, de concentrações conhecidas e carregadas no mesmo gel das amostras. A integridade das amostras de DNA foi avaliada pela presença ou ausência de ‘rastros’ de DNA. As amostras de DNA foram diluídas para 50 ng/µL e armazenadas a -20°C.

Reação, amplificação do DNA e resolução em géis de poliacrilamida: foram utilizados 36 pares de ‘primers’ microssatélites (Joobeur *et al.*, 2006). Inicialmente foi feita uma

avaliação dos pares de 'primers' utilizando quatro acessos para seleção daqueles de melhor resolução polimórfica em géis de poliacrilamida. As reações de amplificação de PCR ('Polymerase chain reaction')

foram realizadas conforme metodologia de Joobeur (2004), com algumas modificações, para um volume final de 12 μL , contendo 50 ng de DNA, 5 μM de cada 'primer', 0,1 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 , 1x tampão de PCR e 0,75 unidades da enzima Taq DNA polimerase. A programação do termociclador para as amplificações consistiu de: um ciclo inicial de 94°C durante 2 min, seguido 30 ciclos a 94°C durante 15s, a 56°C durante 30s e a 72°C durante 2 min. e um ciclo final a 72°C por 30 min.

À solução da reação de PCR foi adicionado metade do volume do tampão desnaturante de formamida 98% (EDTA pH 8,0 10 mM, 1 mg/mL de Xilene Cyanol e 1 mg/mL de Bromofhenol blue), seguido da completa desnaturação a 94°C por 5 min em termociclador e logo após colocadas imediatamente no gelo até a aplicação no gel de poliacrilamida.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6% [acrilamida/bisacrilamida (19:1), 7,5 M de uréia e tampão TBE 5x], preparado em placa de vidro tipo sanduíche com capacidade para 60 poços. As placas de vidro foram limpas com o auxílio de um lenço de papel embebido com etanol. A placa grande (de adesão do gel) foi tratada com 1,1 mL de uma solução contendo 95% de Etanol + 0,5% de Ácido Acético e 1 μL de Bind silane (Bioscience). Essa solução foi espalhada em toda a superfície da placa com um auxílio de um lenço de papel, o excesso foi retirado com um lenço umedecido com álcool etílico. A placa pequena (repulsão do gel) foi tratada de acordo como descrito anteriormente, porém, substituindo-se a solução contendo Bind silane por um produto usado para a limpeza de vidros de automóveis com nome comercial de Waterlux (Luxcar).

Uma pré-corrida de 30 minutos a 40 W foi realizada antes da aplicação das amostras de PCR. Foi aplicado 2,5 μL da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 6%, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente 3h, com potência constante de 40 W. O Marcador de peso molecular Ladder 50pb (Fermentas) foi carregado na extremidade lateral de cada gel.

Os géis foram corados com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Creste *et al.* (2001), com algumas modificações: 1) a placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo etanol absoluto 10% e ácido acético 1% por 20 min sob leve agitação; 2) lavagem com água destilada sob agitação por 1 min, 3) pré-tratamento foi realizado em solução de ácido nítrico 0,2 mol.L⁻¹ por 3 min, seguida de nova lavagem do

gel com água destilada por 1 min, sob lenta agitação, 4) A impregnação do gel foi realizada com solução de nitrato de prata 0,2% por 20 min, seguida de duas lavagens de 30 s com água destilada sob leve agitação, 5) o gel foi imerso em solução de revelação contendo carbonato de sódio 2,4% e formaldeído 37%, sendo utilizado metade da solução reveladora na primeira lavagem, até o início do aparecimento das bandas, 6) a placa com gel foi transferida para uma segunda bandeja contendo o restante da solução e corado até o aparecimento do padrão das bandas desejado, 7) uma nova lavagem do gel foi realizada com ácido acético 5% por 3 min. seguida de uma lavagem final com água por 1 min, sob agitação lenta. A placa com o gel corado foi colocada em posição vertical até a secagem em temperatura ambiente para posterior análise dos fragmentos e digitalização em scanner Epson GT-15000.

Anotação e análise dos dados de microssatélites: os locos que apresentaram polimorfismo de fácil interpretação foram selecionados para genotipagem dos 40 acessos de melancia. A estimativa do tamanho em pares de base (pb) para cada alelo, para a construção do padrão alélico de cada germoplasma, foi obtida pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50bp da Fermentas (EUA).

Os microssatélites foram anotados para a presença (1) versus ausência (0) de alelos, para construir uma matriz de similaridade do índice de Jaccard. O dendrograma com as distâncias dos acessos foi gerado pelo método de agrupamento UPGMA (Método de Agrupamento não Ponderado com base na Média Aritmética). A avaliação do ajuste do fenograma foi realizada pela correlação co-fenética, ou seja, a correlação entre as distâncias reais e as representadas graficamente. Para estas análises utilizou-se o aplicativo computacional NTSYSpc versão: 2.1 (Rophlf, 2000).

Estimativas para frequência dos principais alelos, número de genótipos, diversidade do gene, heterozigosidade e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os microssatélites utilizados, foram realizados com auxílio do programa PowerMarker (Liu & Muse, 2005).

A análise da variância de dados moleculares (AMOVA) foi realizada pela decomposição total nas suas componentes, entre e dentro de populações (regiões), por meio das distâncias ao quadrado, conforme Excoffier *et al.* (1992), com o auxílio do macro do excel GenAlex 6.2 (Peakall, & Smouse, 2006). A significância dessas estimativas foi obtida pelo método de randomização com 1.000 permutações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 36 pares de primers utilizados, apenas 13 apresentaram ampliações polimórficas de fácil interpretação: MCPI_04, MCPI_05, MCPI_07, MCPI_09, MCPI_11, MCPI_12, MCPI_14, MCPI_16, MCPI_21, MCPI_26, MCPI_29, MCPI_33 e MCPI_39 (Figura 1). Joobeur *et al.* (2006), ao avaliarem a capacidade de detectar polimorfismo, desses 36 primers, reportaram que todos eles foram polimórficos em oito acessos de melancia, incluindo cinco acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* e três de *C. lanatus* var. *citroides*. Essa diminuição no número de SSR em detectar polimorfismo, pode ser devido ao fato de que, no presente trabalho esses microsatélites foram avaliados quanto à capacidade de detectar polimorfismo em acessos de melancia, todos pertencentes à subespécie *C. lanatus* var. *lanatus*.

Foram detectados 41 alelos nos 13 microsatélites analisados, onde o número de alelos por loco variou de dois a seis, com média de 3,15 alelos por microsatélite, nos 40 acessos de melancia genotipados. A média descrita é comparável com resultados reportados por Guerra-Sanz (2002), Joobeur *et al.* (2006) e Kwon *et al.* (2010).

O tamanho dos alelos variou de 359 pb no MCPI-09 a 965 pb no MCPI-39 (Tabela 2), diferente dos tamanhos reportados por Kwon *et al.* (2010), que utilizaram os mesmos marcadores microsatélites, que variaram de 135 pb no MCPI-42 a 298 pb no MCPI-39.

Os valores de PIC, que refletem a diversidade alélica e taxa de frequência entre as variedades, não foram uniformes para todos os locos microsatélites testados. A média do PIC foi de 0,391, com o maior e menor valor observados nos locos MCPI_12 (0,683) e MCPI_14 (0,186), respectivamente (Tabela 3). Kwon *et al.* (2010), na caracterização de 49 cultivares de melancia coreanas e norte-americanas, também reportaram o MCPI_12 como o loco com maior valor de PIC, ainda segundo os mesmos autores, o MCPI_14 foi reportado como um dos mais polimórficos, o que não foi observado neste trabalho.

A média da heterozigidade foi de 0,409, com o maior valor observado no MCPI_04 (1,00) e o menor valor observado no MCPI_14 (0,200) (Tabela 3), indicando que os microsatélites apresentaram grande poder de detecção de variabilidade. O PIC e a heterozigidade representam a existência de variabilidade, pois cada indivíduo diplóide pode ter até dois alelos por loco (Weir, 1996), em que a variabilidade é maior com a maior frequência de heterozigotos e PIC, sendo os microsatélites que se enquadrem nessa situação considerados como os mais indicados para estudos de diversidade (Ribeiro, 2011).

A correlação entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz das distâncias de similaridade foi 0,80, o que indica que o dendrograma (Figura 2) apresentou um bom ajuste nos agrupamentos dos acessos de melancia com os 41 alelos dos 13 locos microssatélites analisados. A similaridade entre os acessos variou entre 37 e 96%, refletindo a alta variabilidade genética das populações estudadas.

Os 41 alelos dos 13 locos microssatélites foram suficientes para separar todos os 40 acessos de melancia analisados. Os acessos BGCIA 297 e o BGCIA 299, coletados em Jacobina, BA, foram os que apresentaram maior similaridade (96%). Silva (2010) diferenciou todos 187 acessos de melancia do BGCIA com 11 locos ISSR e 16 locos DAF, enquanto Santos *et al.* (2010a) também diferenciaram todos 44 acessos de cebola com 13 locos de microssatélites. O mesmo foi reportado por Priolli *et al.* (2002) para 184 cultivares de soja com a aplicação de apenas 12 marcadores SSR.

Foram observados agrupamentos específicos para as três regiões do Maranhão (São Luís, Codó e Colinas), com os acessos destas regiões posicionando-se de forma contínua no dendrograma e similaridade entre 61% e 94%. Nas demais regiões, apesar de se ter observado grande similaridade para alguns pares de indivíduos, não foram constatados agrupamentos específicos por local de amostragem (Figura 2). Segundo Silva *et al.* (2006) a seleção praticada pelos agricultores tende a fixar tipos distintos em determinadas regiões, como foi observado nos acessos do Maranhão, com o aparecimento de grupos específicos.

A estimativa da variação entre ecorregiões foi de 0,319 ($\hat{\phi}_{ST}$), considerada alta, sugerindo que a melancia possui fluxo restrito, menos que um migrante por geração ($Nm = 0,533$) (Tabela 3). Silva (2010) analisou a variabilidade genética do BGCIA, por meio de marcadores DAF, e encontrou $\hat{\phi}_{ST} = 0,263$, corroborando os resultados obtidos com SSRs no presente estudo. Resultados elevados para $\hat{\phi}_{ST}$ também foram reportados por Santos *et al.* (2008), para umbuzeiro, e por Santos *et al.* (2010b), para pinhão-manso. Djè *et al.* (2010) analisaram a variabilidade genética entre 80 indivíduos de quatro acessos de melancia africana, por meio de marcadores ISSR, utilizando a AMOVA, encontraram baixa variação entre acessos ($\hat{\phi}_{ST} = 0,09$), e alta dentre acessos ($\hat{\phi}_{ST} = 0,91$). Essa baixa variabilidade entre acessos encontrada por Djè *et al.* (2010) pode ser devido ao baixo número de acessos analisados pelos autores.

Apesar de ser uma espécie alógama, o fluxo gênico entre as populações foi pequeno e considerado restrito, provavelmente em consequência da antropização das áreas estudadas. O cultivo da melancia, de modo tradicional, ocorre geralmente em áreas

pequenas, onde o processo de endogamia é favorecido e com isso a deriva genética pode levar a maior divergência entre roças de uma mesma região (Queiróz, 1993; Romão, 1995). Dentro de uma mesma região a seleção artificial realizada pelos agricultores também contribui para maior variação. Esses selecionam as próprias sementes para plantios futuros, de acordo com critérios particulares (Silva, 2010; Queiróz, 2004). Para Romão (2000) a forte troca de sementes entre os agricultores, com as roças situando-se em muitos casos bem próximas uma das outras, aliado ao fato de que a melancia é uma planta alógama, aumenta a possibilidade de recombinação gênica entre seleções de diferentes agricultores, o que contribui para ampliar a variabilidade genética existente e poderia explicar a grande variabilidade mesmo em amostras coletadas no mesmo local (Romão, 2000; Capeloto, 2004).

O conjunto dos resultados do dendrograma (Figura 2) e da AMOVA (Tabela 4) indica que a variabilidade genética da melancia não está uniformemente dispersa nas regiões analisadas, indicando que as barreiras geográficas ou as condições edafoclimáticas têm limitado o acasalamento. Resultados semelhantes foram reportados por Santos *et al.* (2010b) para o pinhão manso.

Como destacado por Reis & Grattapaglia (2004), em espécies de comportamento alógamo, como a melancia, é esperado que maior variabilidade seja encontrada dentro de áreas do que entre áreas, o que pode ser comprovado com agrupamentos específicos de indivíduos amostrados numa mesma região e pelo alto valor do ($\hat{\phi}_{ST}$) observado neste trabalho.

Os resultados indicam que os acessos apresentam diferenças em razão da região de amostragem, que os indivíduos de uma dada região apresentam maior similaridade e que a variabilidade genética da melancia não está uniformemente distribuída por todas as regiões estudadas. Nesse cenário, sugere-se a amostragem de um número suficiente de germoplasma-semente em maior número de indivíduos por região para a preservação *ex situ* da variabilidade genética da espécie. Esses dados estão de acordo com a análise de variância molecular, que mostrou grande variação entre populações de melancia ($\hat{\phi}_{ST} = 0,319$), o que indica que se deve coletar maior número de populações, para se ter maior representatividade da diversidade da espécie.

CONCLUSÕES

1. Foram estabelecidos padrões alélicos e similaridade genética baseados em marcadores microssatélites para 40 acessos de melancia, com a similaridade variando de 37 a 96%.
2. Os locos que apresentaram maior conteúdo de informação polimórfica (PIC) e heterozigosidade foram MCPI_04, MCPI_05, MCPI_11, MCPI_12 e MCPI_21, sendo indicados para estudos de diversidade.
3. Os 41 alelos dos 13 locos microssatélites analisados foram suficientes para separar todos os 40 acessos de melancia.
4. A variabilidade genética da melancia não está uniformemente distribuída nas regiões analisadas.
5. A variabilidade genética da melancia entre regiões é alta, devendo-se amostrar um maior número de populações por região para conservação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2011: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, 2011. p. 351-354.

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: 5 ago. 2010.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, p. 299-306, 2001.

DIAS, R. de C. S.; COSTA, N. D.; QUEIRÓZ, M. A. de; FARIA, C. M. B. de. **Cultura da melancia**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2001. 20 p. il. (Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica, 63).

DIAS, R. de C. S.; QUEIRÓZ, M. A.; COSTA, N. D.; SOUZA, F. F.; ALMEIDA, M. C. B.; ARAUJO, H. M.; LIBERALINO FILHO, F.; PEREIRA, A. B.; BAHIA, J.; LIMA, R.

N. S. ; ANJOS, J. B. dos; PEREIRA, F. A.; ALVES, D. C.; ARAUJO, J. P. **BRS Opara**: melancia resistente ao oídio. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 1 folder.

DIAS, R. de C. S.; QUEIRÓZ, M. A. de; MENEZES, M. Fontes de resistência em melancia a *Didymella bryoniae*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 14, n. 1, p. 15-18, 1996.

DJÈ Y, TAHI CG, ZORO BI AI, BAUDOIN JP, BERTIN P. Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded *Citrullus lanatus* landraces. **Scientia Horticulturae**, v. 124 p. 159–164, 2010.

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

ESSELINK, G. D.; SMULDERS, M. J. M.; VOSMAN, B. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 277-286, 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSES, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p. il.

FERREIRA, M. A. J. da F.; QUEIROZ, M. A. de; VENCOVSKY, R.; BRAZ, L. T.; VIEIRA, M. L. C.; BORGES, R. M. E. Sexual expression and mating system in watermelon: implications for breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, n. 1, p. 39-48, 2002.

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

GUERRA-SANZ J. M. *Citrullus* simple sequence repeats markers from sequence databases. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 223–225, 2002.

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.

JOOBEUR, T.; GUSMINI, G.; ZHANG, A.; LEVI, A.; XU, Y.; WEHNER, T. C.; OLIVER, M.; DEAN, R. A. Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or Arabidopsis genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 8, p. 1553-562, 2006.

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

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; KEINATH, A. P.; WEHNER, T. C. Estimation of genetic diversity among *Citrullus* accessions using RAPD markers. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 510, p. 385-390, 2000.

LEVI, A; THOMAS, C. E.; WEHNER, T. C.; ZHANG, X. Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. **Horscience**, Alexandria, v. 36, n. 6, p. 1096-1101, 2001.

LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 2128-2129, 2005.

MUJAJU, C.; SEHIC, J.; WERLEMARK, G.; GARKAVA-GUSTAVSSON, L.; FATIH, M.; NYBOM, H. Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from

Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. **Hereditas**, Lund, v. 147, n. 4, p. 142-53, 2010.

NEBAUER, S. G.; CASTILLO-AGUDO, L. del; SEGURA, J. RAPD variation within and among natural populations outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 985-994, 1999.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 288-295, 2006.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 185-193, 2002.

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

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

QUEIRÓZ, M. A.; RAMOS, S. R. R.; DIAS, R. C. S. Divergência genética entre linhagens de melancia parcialmente endogâmicas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v 19, n. 2, jul. 2001. Suplemento.

REIS, A. M. M.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD variation germplasm collection of *Myracrodruonurundeuva* (Anacardiaceae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 51, p. 529-538, 2004.

RIBEIRO, I. C. N. dos S. **Análise da divergência genética em acessos de *Mangifera indica* com base em descritores agro-morfológicos e marcadores microssatélites**. 2001. 114 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

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

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

ROMÃO, R. L.; ASSIS, J. G. A.; QUEIRÓZ, M. A de. 2008. Melancia. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. p. 555-573.

ROPHLF, F. J. **NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 2.10m. Setauket: Exeter Software, 2000.

SANTOS, C. A. F. ; DRUMOND, M. A.; RODRIGUES, M. A.; EVANGELISTA, M. R. V. Genetic similarity of physic nut procedences based on AFLP markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 10, p. 364-369, 2010b.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. de; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, p. 49-55, 2010a.

SANTOS, C. A. F.; RODRIGUES, M. A.; ZUCCHI, M. I. Variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro por meio de marcadores AFLP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 8, p. 1037-1043, 2008.

SILVA, A. F.; SANTOS, C. A. F.; ARAUJO, F. P. de; LIMA NETO, F. P.; MOREIRA, J. N.; FERREIRA, M. A. J. F.; LEAO, P. C. de S.; DIAS, R. de C. S.; ALBUQUERQUE, S. G. de. Recursos genéticos vegetais conservados na Embrapa Semiárido. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação.** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. cap. 8, p. 274-315.

SILVA, M. L. **Avaliação molecular da variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de melancia do Nordeste brasileiro**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

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

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

SOUZA, F. F.; DIAS, R. de C. S. **BRS soleil e BRS Kuarah**: melancias de polpa amarela. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 1 folder.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. de; DIAS, R. de C. S. Divergência genética em linhagens de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 2, p. 179-183, 2005.

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

VARSHNEY, R. K.; GARNER, A.; SORELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 48-63, 2005.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**: methods for discrete population genetic data. 2. ed. Rev. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

WHITAKER, T. W.; DAVIS, G. N. **Cucurbits**: botany, cultivation, and utilization. London: L. Hill, 1962. 250 p.

Tabela 1. Região de coleta dos acessos do BAG de Cucurbitáceas do Nordeste genotipados com 13 locos SSR. Petrolina-PE, 2011.

Código do BAG	Local de coleta	Código do BAG	Local de coleta
BGCIA 30	Xique-Xique –BA	BGCIA 357	Lagoa Grande – PE
BGCIA 31	Xique-Xique –BA	BGCIA 358	Lagoa Grande – PE
BGCIA 32	Xique-Xique –BA	BGCIA 359	Lagoa Grande – PE
BGCIA 33	Xique-Xique –BA	BGCIA 376	Lagoa Grande – PE
BGCIA 37	Xique-Xique –BA	BGCIA 375	Lagoa Grande – PE
BGCIA 51	Itaguaçu – BA	BGCIA 416	São Luís – MA
BGCIA 52	Itaguaçu – BA	BGCIA 417	São Luís – MA
BGCIA 53	Itaguaçu – BA	BGCIA 419	São Luís – MA
BGCIA 54	Itaguaçu – BA	BGCIA 422	São Luís – MA
BGCIA 55	Itaguaçu – BA	BGCIA 424	São Luís – MA
BGCIA 127	Juazeiro – BA	BGCIA 469	Colinas – MA
BGCIA 129	Juazeiro – BA	BGCIA 470	Colinas – MA
BGCIA 130	Juazeiro – BA	BGCIA 471	Colinas – MA
BGCIA 131	Juazeiro – BA	BGCIA 472	Colinas – MA
BGCIA 134	Juazeiro – BA	BGCIA 484	Colinas – MA
BGCIA 295	Jacobina – BA	BGCIA 511	Codó – MA
BGCIA 296	Jacobina – BA	BGCIA 525	Codó – MA
BGCIA 297	Jacobina – BA	BGCIA 552	Codó – MA
BGCIA 298	Jacobina – BA	BGCIA 554	Codó – MA
BGCIA 299	Jacobina – BA	BGCIA 559	Codó – MA

Tabela 2. Padrão alélico, em pares de bases, estimado para 40 acessos do BAG de melancia, genotipados com treze marcadores microssatélites. Petrolina-PE, 2011.

Cód. do BAG	MCPI_04	MCPI_05	MCPI_07	MCPI_09	MCPI_11	MCPI_12	MCPI_14	MCPI_16	MCPI_21	MCPI_26	MCPI_29	MCPI_33	MCPI_39
BGCIA 416	736/774	556/556	742/742	374/374	738/738	519/479	683/683	810/810	475/480	640/640	681/681	870/870	942/965
BGCIA 417	736/774	556/556	742/742	374/374	738/738	519/479	683/683	810/810	475/480	640/640	681/681	870/870	942/942
BGCIA 419	736/774	556/556	742/742	374/374	738/831	519/519	701/738	810/810	475/480	640/640	670/681	856/870	942/965
BGCIA 422	736/774	556/556	742/742	374/374	738/831	519/479	683/683	810/810	475/480	640/640	681/681	870/870	942/965
BGCIA 424	736/774	556/556	742/742	374/374	738/738	519/479	683/683	810/810	480/480	640/640	681/681	870/870	942/942
BGCIA 30	736/774	556/556	742/742	359/359	738/738	629/629	683/683	810/810	480/480	577/577	681/681	856/856	942/942
BGCIA 31	736/774	556/556	742/742	374/374	738/738	571/629	683/683	810/810	480/480	577/640	670/670	856/856	942/942
BGCIA 32	703/736	556/556	623/742	374/374	665/738	.	683/683	810/810	480/480	577/640	670/681	856/856	942/942
BGCIA 33	736/774	556/556	742/742	374/374	831/831	571/571	683/683	810/810	480/480	640/640	681/681	856/856	942/942
BGCIA 37	774/799	507/507	742/742	374/374	738/738	629/629	683/683	835/835	475/475	640/640	670/670	856/856	942/942
BGCIA 357	736/774	556/556	742/742	359/374	665/665	629/629	683/683	810/810	480/480	577/640	670/681	856/856	942/942
BGCIA 358	736/774	556/556	742/742	374/404	665/738	519/629	683/683	810/810	480/480	577/640	670/681	856/870	942/965
BGCIA 359	736/774	462/462	742/742	359/374	665/738	571/629	683/683	742/810	475/480	640/640	670/681	856/870	942/942
BGICA 376	736/774	462/579	742/742	404/404	831/831	571/571	683/683	742/810	475/480	640/640	670/670	856/856	942/942
BGCIA 375	736/774	556/556	742/742	359/404	831/831	571/571	683/683	810/810	480/480	640/640	670/670	856/856	942/942
BGCIA 127	736/774	556/556	742/742	374/374	738/831	519/629	683/683	810/810	480/480	577/640	670/681	856/870	942/942
BGCIA 129	736/774	462/462	742/742	374/374	665/665	629/629	683/683	742/742	475/475	.	670/670	856/856	942/942
BGCIA 130	736/774	556/556	742/742	359/374	665/665	629/629	683/683	810/810	475/480	640/640	670/670	856/870	942/942
BGCIA 131	736/774	507/556	742/742	374/374	665/665	629/629	683/683	810/835	480/480	640/640	670/670	856/870	942/942
BGCIA 134	736/774	462/556	742/742	374/374	665/665	571/629	683/683	742/810	475/480	640/640	670/670	856/856	965/965
BGCIA 295	736/774	481/481	742/742	374/374	738/738	571/571	683/683	469/742	480/480	577/640	681/681	856/856	942/942
BGCIA 296	736/774	507/556	742/742	359/374	665/738	571/595	683/683	810/835	480/500	577/640	670/681	856/856	942/965
BGCIA 297	736/774	481/556	742/742	359/374	665/665	571/629	683/701	742/810	480/500	577/640	670/681	856/870	942/942
BGCIA 298	736/774	462/481	742/742	359/374	665/738	595/595	683/683	742/810	480/500	577/577	670/681	856/870	942/942
BGCIA 299	736/774	481/556	742/742	359/374	665/665	571/629	683/701	742/810	480/500	577/640	670/681	856/870	942/965
BGCIA 51	736/774	556/556	742/742	359/374	665/831	571/629	683/683	810/810	480/500	577/577	670/670	856/870	942/942
BGCIA 52	736/774	556/556	742/742	374/374	665/831	571/571	683/683	742/810	480/480	577/577	670/681	856/856	942/942
BGCIA 53	736/774	556/556	742/742	359/359	831/831	571/571	683/683	810/810	.	577/577	670/670	870/870	942/942
BGCIA 54	736/774	556/556	742/742	374/374	738/831	629/629	683/683	810/810	480/480	577/577	670/670	856/870	942/942
BGCIA 55	736/774	556/556	623/742	374/374	738/831	595/595	683/683	810/810	480/480	577/640	670/670	856/870	942/942

BGCIA 511	736/774	462/556	623/742	374/374	738/738	519/571	683/701	742/810	475/480	577/640	670/681	870/870	942/942
BGCIA 525	736/774	481/556	623/742	359/374	738/738	519/571	683/701	.	475/480	577/640	670/681	870/870	942/965
BGCIA 552	736/774	556/556	623/742	374/374	738/738	519/519	683/701	742/810	475/480	577/640	670/681	870/870	942/965
BGCIA 554	736/774	556/556	623/742	374/374	738/738	519/519	683/683	810/810	475/480	640/640	670/681	870/899	942/965
BGCIA 559	736/774	556/556	623/742	374/374	738/738	519/519	683/683	742/810	475/480	640/640	670/681	870/870	942/965
BGCIA 469	736/774	556/556	623/742	374/374	738/831	519/519	683/683	810/810	475/480	577/640	670/681	870/870	965/965
BGCIA 470	774/799	556/556	623/623	374/374	738/738	519/571	683/701	810/810	475/480	577/640	670/670	870/870	942/965
BGCIA 471	774/799	462/462	623/623	374/374	738/738	519/519	683/683	469/742	.	640/640	670/670	870/870	942/942
BGCIA 472	774/799	462/481	623/742	374/374	738/831	519/519	683/683	742/810	.	640/640	670/681	856/870	942/965
BGCIA 484	736/774	462/556	623/742	374/374	738/831	519/519	683/701	742/810	.	640/640	670/681	856/870	942/965

Tabela 3. Parâmetros genéticos estimados para 13 microssatélites em 40 acessos de melancia. Petrolina-PE, 2011.

SSR	Maior frequência alélica	Nº. de genótipos	Nº de indivíduos	Número de alelos	Diversidade gênica	Hererozigosidade	PIC
MCPI_04	0,488	3,000	40,000	4,000	0,557	1,000	0,459
MCPI_05	0,700	9,000	40,000	5,000	0,477	0,275	0,445
MCPI_07	0,825	3,000	40,000	2,000	0,289	0,250	0,247
MCPI_09	0,775	6,000	40,000	3,000	0,366	0,275	0,326
MCPI_11	0,513	6,000	40,000	3,000	0,618	0,375	0,548
MCPI_12	0,321	9,000	40,000	5,000	0,731	0,410	0,683
MCPI_14	0,888	3,000	40,000	3,000	0,202	0,200	0,186
MCPI_16	0,718	6,000	40,000	4,000	0,439	0,410	0,392
MCPI_21	0,667	4,000	40,000	3,000	0,481	0,556	0,414
MCPI_26	0,654	3,000	40,000	2,000	0,453	0,385	0,350
MCPI_29	0,588	3,000	40,000	2,000	0,485	0,475	0,367
MCPI_33	0,500	4,000	40,000	3,000	0,512	0,375	0,393
MCPI_39	0,788	3,000	40,000	2,000	0,335	0,325	0,279
Média	0,648	4,769	40,000	3,154	0,457	0,409	0,391

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) em 40 acessos de oito regiões do banco de germoplasma de melancia. Petrolina-PE, 2011.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Total da variação	Estatística Φ	P ¹	Nm
Entre regiões	7	99,850	14,264	32%	$\hat{\phi}_{ST} = 0,319$	< 0,001	0,534
Dentro regiões	32	136,600	4,269	68%	$1 - \hat{\phi}_{ST} = 0,681$	< 0,001	-
Total	39	236,450	-	100%	-	-	-

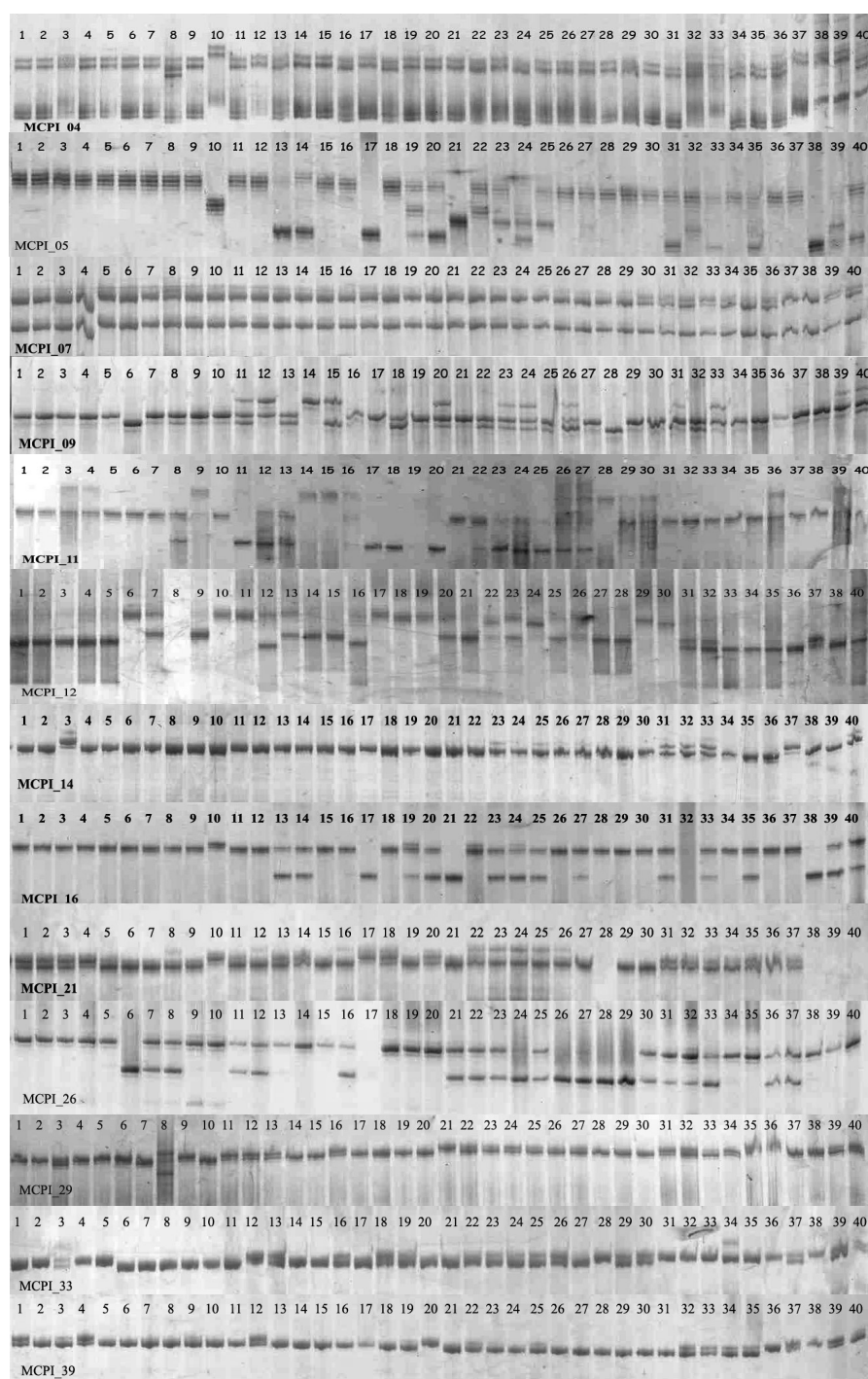


Figura 1. Padrão de bandas para 13 locos microssatélites avaliados em 40 acessos de melancia: 1 = BGCIA 416, 2 = BGCIA 417, 3 = BGCIA 419, 4 = BGCIA 422, 5 = BGCIA 424, 6 = BGCIA 30, 7 = BGCIA 31, 8 = BGCIA 32, 9 = BGCIA 33, 10 = BGCIA 37, 11 = BGCIA 357, 12 = BGCIA 358, 13 = BGCIA 359, 14 = BGCIA 376, 15 = BGCIA 375, 16 = BGCIA 127, 17 = BGCIA 129, 18 = BGCIA 130, 19 = BGCIA 131, 20 = BGCIA 134, 21 = BGCIA 295, 22 = BGCIA 296, 23 = BGCIA 297, 24 = BGCIA 298, 25 = BGCIA 299, 26 = BGCIA 51, 27=BGCIA 52, 28=BGCIA 53, 29=BGCIA 54, 30=BGCIA 55, 31=BGCIA 511, 32=BGCIA 525, 33=BGCIA 552, 34=BGCIA 554, 35=BGCIA 559, 36=BGCIA 469, 37=BGCIA 470, 38=BGCIA 471, 39=BGCIA 472, 40=BGCIA 484. Petrolina-PE, 2011.

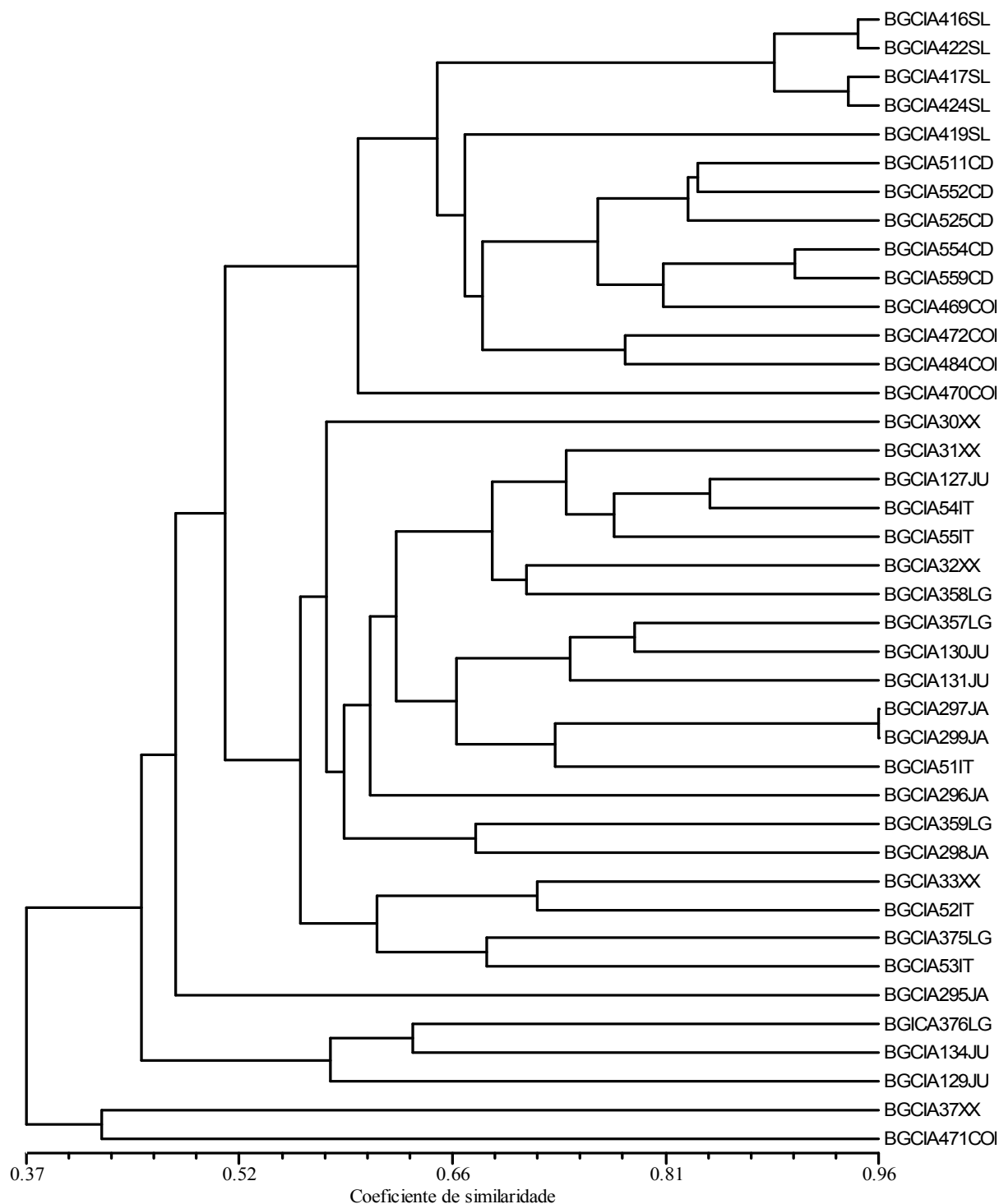


Figura 2. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard de 40 acessos de melancia genotipados para 41 alelos de 13 locos microssatélites. Correlação cofenética (r) = 0,80. Petrolina-PE, 2011. SL = São Luís, XX = Xique Xique, LG = Lagoa Grande, IT = Itaguaçu, JU = Juazeiro, JA = Jacobina, CD = Codó, COL = Colinas.

CONCLUSÕES GERAIS

O Banco de Germoplasma de Melancia (BGCIA), estabelecido desde a década de 80 com prospecção e coleta em diversos municípios do Semiárido, possui atualmente 943 acessos, incluindo algumas amostras de cultivares comerciais, amostras da agricultura tradicional e alguns parentes silvestres da melancia, como *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis*. O BGCIA tem sido estudado tanto morfológicamente, como molecularmente, com marcadores RAPD, DAF e ISSR. Todos os estudos têm demonstrado a existência de variabilidade expressas em coeficientes de similaridades. Até então amostras do BGCIA não haviam sido analisadas com marcadores microssatélites, que, devido a sua codominância e repetibilidade, são mais apropriados para estudos de variabilidade genética de espécies vegetais.

O agronegócio da melancia é um dos mais importantes entre as hortaliças no Brasil, sendo também uma importante atividade para o Nordeste brasileiro, principalmente para os pequenos agricultores da região. As principais cultivares comercializadas na região foram desenvolvidas fora do país e apresentam, em algumas situações, susceptibilidade à doenças, como o oídio. Recentemente, com base nas caracterizações realizadas no BGCIA, foram desenvolvidas três novas cultivares: BRS Opara, BRS Soleil e BRS Kuarah. No processo de proteção de cultivares, segundo normas internacionais, é importante que as cultivares possam ser distinguidas de outras existentes. A proteção de cultivares de melancia toma como referência a aplicação de descritores morfológicos, que devido à interação do ambiente podem apresentar limitações. Os marcadores moleculares podem auxiliar na proteção de cultivares, devido a sua não interação com o ambiente. Apesar dessa superioridade, até então, não haviam sido realizados estudos para o estabelecimento de perfis alélicos das cultivares estrangeiras, bem como das recentemente, desenvolvidas pela pesquisa agropecuária brasileira.

No presente trabalho foi estabelecido padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas para 17 cultivares comerciais de melancia e foi analisado a variabilidade genética de 40 acessos do BGCIA, oriundos de oito regiões do Nordeste, por intermédio de marcadores moleculares SSR, de forma a gerar um banco de dados de referência e apoio à proteção de cultivares e eventuais disputas comerciais, bem como subsidiar estratégias de preservação e utilização da variabilidade genética da espécie.

No capítulo I os principais resultados foram:

1. Estabelecimento de padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas baseados em marcador microsatélite para 17 cultivares de melancia, com a similaridade variando entre 34 e 100%.
2. Formação de três grupos no dendrograma com os genótipos analisados, no ponto de corte de 42% de similaridade, sendo um dos grupos formado predominantemente por cultivares derivadas de “Crimson Sweet” e outro grupo com cultivares de diferentes tipos, como “Sugar Baby”, “Charleston Gray” e “Pérola”.
3. Identificação de que os 32 alelos dos 10 locos analisados não foram suficientes para distinguir as cultivares “Sugar Baby” e “Omaru Yamato”, “Charleston Gray” e “Sunshade”, “Crimson Sweet” e “Nova Crimson”.
4. Indicação dos locos SSR MCPI_04, MCPI_05 e MCPI_16 para estudos de diversidade e “fingerprinting” em melancia.

O padrão alélico e as estimativas de pares de bases para os 32 alelos nos dez locos microsatélites, revelados neste capítulo, são um primeiro esforço para o emprego de marcadores microsatélites em situações de proteção de cultivares para o agronegócio da melancia no Brasil, podendo também ser utilizado em situações de disputas comerciais referentes à certificação ou não das principais cultivares de melancia usadas no país.

No capítulo II foi analisado a variabilidade genética de 40 acessos do BGCIA, coletados em oito regiões, com os principais resultados:

1. Estabelecimento dos padrões alélicos e similaridade genética baseados em marcadores microsatélites para 40 acessos de melancia, com a similaridade variando de 37 a 96%.
2. Identificação dos locos SSR MCPI_04, MCPI_05, MCPI_11, MCPI_12 e MCPI_21 como os mais indicados para estudos de diversidade, tendo sido capazes de separar todos os 40 acessos de melancia.
3. Identificação de grande variação entre populações de melancia ($\Phi_{ST} = 0,319$), o que indica que a variabilidade genética da melancia não está uniformemente distribuída nas regiões analisadas, sendo sugerido a amostragem de um número suficiente de germoplasma-semente em maior número de regiões, para a preservação *ex situ* da variabilidade genética da espécie.

Os resultados obtidos com microsatélites são mais significativos e confiáveis, pois são marcadores multialélicos, altamente reprodutíveis, com ampla resolução e não são influenciados pelo ambiente, podendo ser aplicados em qualquer fase do desenvolvimento da planta, sendo esperada maior contribuição para o melhoramento e manejo de recursos genéticos como presente estudo com microsatélites para a melancia.

Apesar da dificuldade para se encontrar polimorfismo tanto nas populações das oito regiões, como nas 17 cultivares, realçado pelo fato de que apenas 13 e 10 locos SSR entre 36 testados, respectivamente, foram polimórficos, os resultados obtidos indicam a existência de grande variabilidade nos dois estudos realizados:

1. Nas oito populações o parâmetro $\Phi_{ST} = 0,319$ indica ampla variabilidade genética da melancia e a estruturação em subpopulações. O nordeste brasileiro é considerado como centro secundário da variabilidade da melancia, devido provavelmente, as seleções praticadas pelos agricultores e a presença de barreiras, limitando o fluxo gênico entre essas subpopulações. A introdução e os sucessivos ciclos de plantio e seleção, desde o período da escravatura, pode também ter contribuído para a variabilidade identificada nesse trabalho.
2. Entre as 17 cultivares analisadas a similaridade encontrada variou de 34 a 100%, o que indica também alta variabilidade genética para as cultivares de melancia analisadas.

Outros estudos são necessários visando à aplicação de novos ‘primers’ SSR para a espécie para dar suporte às atividades de distinção de cultivares, pois algumas cultivares não puderam ser distinguidas no presente estudo. Também é imprescindível o desenvolvimento de novos ‘primers’ SSR para a melancia, uma vez que o número desse tipo de marcadores ainda é muito restrito para a espécie.

Faz-se também necessário explicar as diferenças nos tamanhos dos alelos SSRs obtidos no presente estudo, em comparação com outros.

GAMA, R. N. C. de S. **Análise molecular de germoplasma de melancia com base em marcadores microssatélites**. 2011. 61p. Dissertação (mestrado) – UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana.

Orientador: Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos

Co-orientadora: Rita de Cássia Souza Dias

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram analisar a variabilidade genética entre 40 acessos do Banco de Germoplasma de Melancia da Embrapa Semiárido, oriundos de oito regiões do Nordeste brasileiro e entre 17 cultivares comerciais de melancia, com base em marcadores microssatélites. A genotipagem foi feita com 10 e 13 locos microssatélites, nas cultivares e nos acessos, respectivamente. O DNA total foi extraído pelo método CTAB 2x e os produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida desnaturante 6% e corados com nitrato de prata. Para visualização da similaridade genética, utilizou-se o dendrograma UPGMA gerado da matriz de distâncias do coeficiente de Jaccard, com base nos dados moleculares obtidos. O número de pares de bases foi estimado pelo método da mobilidade inversa, com base em regressão de produtos de tamanho conhecido. Entre os acessos foi feita análise molecular de variância pela decomposição total entre e dentro das regiões. As cultivares apresentaram coeficiente de similaridade entre 34 e 100%, os dendrogramas apresentaram valor co-fenético de 0,86 e 0,80. Não foi possível distinguir todas as cultivares. Entretanto, foi possível distinguir todos os acessos, onde a variabilidade genética entre populações foi considerada alta ($\hat{\phi}_{ST}=0,319$). Agrupamentos específicos foram observados em três regiões. Os resultados indicam que a variabilidade genética da melancia não está uniformemente distribuída nas regiões analisadas. Os dados revelados neste trabalho, são um primeiro esforço para o emprego de marcadores microssatélites na proteção de cultivares, podendo subsidiar estratégias coleta, preservação e utilização da variabilidade genética da espécie.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*. SSR. Divergência. Dendrogramas. AMOVA

ABSTRACT

The objectives of this work were to analyze the genetic variability among 40 accessions of Watermelon Germplasm Bank of Embrapa Semiárido, from eight regions of northeast Brazil and among 17 cultivars of watermelon based on microsatellite marker. Genotyping was done with 10 and 13 microsatellite loci in cultivars and accessions, respectively. The total DNA was extracted by the CTAB 2x method, and PCR products were analyzed in denaturing polyacrylamide 6% gels, stained with silver nitrate. For visualization of the genetic similarity, the dendrogram UPGMA generated by the matrix of distances of the coefficient of Jacquard. The number of base pairs was estimated by the method of inverse mobility, based on regression of products of known size. Accessions molecular analysis was done by decomposing total variance among and within regions. The cultivars presented similarity coefficient between 34 and 100%. The dendrograms presented co-phenetic value of 0.86 and 0.80. It was not possible to distinguish all cultivars. However it was possible to distinguish all accessions, where the genetic variability among populations was high ($\hat{\phi}_{ST}=0,319$). Specific clusters were observed in three regions. These results indicate that the genetic variability of watermelon is not uniformly distributed in the analyzed regions. The data revealed in this study are a first effort for the use of microsatellite markers in the protection of plant varieties. It will serve as a basis for developing strategies collection, preservation and use of genetic variability.

Keywords: *Citrullus lanatus*, SSR. Divergence. Dendrogram. AMOVA.