



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



**RENATA NATÁLIA CÂNDIDO DE SOUZA GAMA**

**MARCADORES MICROSSATÉLITES LIGADOS A LOCUS  
DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO E AO PADRÃO EXTERNO DE  
FRUTOS DE MELANCIA**

**RENATA NATÁLIA CÂNDIDO DE SOUZA GAMA**

**MARCADORES MICROSSATÉLITES LIGADOS A LOCUS  
DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO E AO PADRÃO EXTERNO DE  
FRUTOS DE MELANCIA**

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

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

Feira de Santana – BA

2015

### **Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado**

G178m Gama, Renata Natália Cândido de Souza  
Marcadores microssatélites ligados a locus de resistência ao  
oídio e ao padrão externo de frutos de melancia / Renata Natália  
Cândido de Souza Gama. – Feira de Santana, 2015.  
91 f. : il.

Orientador: Carlos Antonio Fernandes Santos.  
Co-orientadora: Rita de Cássia Souza Dias

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de  
Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos  
Vegetais, 2015.

1. Melancia – Melhoramento genético. I. Santos, Carlos  
Antonio Fernandes, orient. II. Dias, Rita de Cássia Souza, co-  
orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

**BANCA EXAMINADORA**

*Graziela da Silva Barbosa.*  
**Prof. Dr.<sup>a</sup>. Graziela da Silva Barbosa**  
**Universidade Estadual da Bahia**

*Flávio de França Souza*  
**Dr. Flávio de França Souza**  
**EMBRAPA/SEMIÁRIDO**

*Adriana Rodrigues Passos*  
**Prof. Dr.<sup>a</sup>. Adriana Rodrigues Passos**

**Universidade Estadual de Feira de Santana**

*Ronaldo Simão de Oliveira*  
**Prof. Dr. Ronaldo Simão de Oliveira**

**Universidade Estadual de Feira de Santana**

*Rita de Cássia Souza Dias*  
**Dr.<sup>a</sup>. Rita de Cássia Souza Dias**

**EMBRAPA/SEMIÁRIDO**

**Coorientadora e Presidente da Banca**

**Feira de Santana – BA**

**2015**

Ao meu pai Rejanildo (*in memoriam*), a minha mãe Benedita e ao meu esposo por todo apoio e companheirismo. Por compreenderem que muitas vezes para alcançarmos nossos objetivos a ausência se faz presente.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela sua infinita misericórdia, por estar sempre presente em todos os momentos de minha existência, principalmente naqueles em que mais preciso e por me conceder a graça da conclusão de mais esta etapa em minha vida.

À Embrapa Semiárido, por toda infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

À Capes, pela bolsa concedida.

À coordenadora do programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais professora Claudinéia Pelacani, ao professor José Raniere vice-coordenador, e a Alberto, secretário do Programa, pelo apoio indispensável.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelos conhecimentos transmitidos.

A toda minha família, especialmente a minha mãe Benedita e ao meu pai Rejanildo (*in memoriam*), essenciais na minha formação como pessoa e que me ensinaram a correr atrás dos meus objetivos; aos meus irmãos Renato e Robinho, que muitas vezes, me acompanharam ao campo, aos finais de semana e feriados, para me ajudarem com as polinizações; às minhas avós Raquel e Benedita (*in memoriam*), minhas guerreiras, exemplos de fé e coragem; e a todos os meus tios, tias e primos por todo apoio, incentivo e por estarem sempre presentes e dispostos a me ajudarem sempre que preciso.

Ao meu esposo, Juvêncio Neto, pelo incentivo e apoio incondicional em todas as minhas decisões, por entender quando precisei ficar longe de casa por alguns meses, os dias que precisei ficar até mais tarde no trabalho e por “segurar a barra” sempre que preciso.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos, pela orientação, por ter contribuído grandemente na minha formação profissional, orientando-me desde o mestrado até o doutorado. Pelo incentivo para que eu fizesse cursos em outras universidades para expandir meus conhecimentos, por todas as dúvidas esclarecidas e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo destes seis anos de convivência.

À minha co-orientadora, Dra. Rita de Cássia Souza Dias, a quem posso chamar de minha mãe acadêmica, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo destes oito anos de convivência. Pela co-orientação em meus trabalhos de monografia, mestrado e doutorado, pela atenção, paciência, amizade e, principalmente, por seus conselhos em todos os campos de minha vida. Seu apoio foi sempre importantíssimo.

Aos trabalhadores do Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, Manoel Cícero, Chiquinho, Sr. Antônio e Aumério, pelo apoio indispensável na condução dos experimentos de campo.

Á minha amiga Juliana, pelo apoio na condução dos experimentos e pela amizade de sempre.

Aos professores Manoel Abílio de Queiróz e Francine Hiromi Ishikawa, pela orientação no estágio em docência e pelos ensinamentos que levarei comigo para sempre.

Ao meu amigo Claudinho, por toda orientação e ajuda nos trabalhos, sempre que solicitado, e por sua amizade.

Aos bolsistas e estagiários que passaram pelo Laboratório de Genética, durante o tempo que lá estive desenvolvendo meus trabalhos: Marciene, Soniane, Hugo, Danielle, Samila, Laerte, Thaides, Robinho, Julianna, Bárbara, Danillo, Sirando e Juci pelo companheirismo e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições dadas para a melhoria deste trabalho.

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

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender”.

Clarisse Lispector.



GAMA, R. N. C. de S. **Marcadores microssatélites ligados a locus de resistência ao oídio e ao padrão externo de frutos de melancia.** 2015. 91p. Tese (doutorado) – UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana.

Orientador: Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos

Co-orientadora: Rita de Cássia Souza Dias

## RESUMO

O oídio é uma das principais doenças foliares que acomete a melancia e outras cucurbitáceas, no Brasil e no mundo. Os principais elementos de identificação de uma cultivar pelo consumidor estão relacionados com a aparência externa e qualidade do fruto. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores microssatélites ligados à resistência ao oídio e ao padrão de listras de frutos de melancia. Plantas dos parentais, de F<sub>1</sub> e de F<sub>2</sub>, resultantes do cruzamento entre as cultivares BRS Opara (resistente ao oídio e com padrão de listras claramente definidas) e Pérola (suscetível ao oídio e com padrão de listras difusas) foram fenotipadas em campo para resistência ou suscetibilidade ao oídio e, após a colheita, os frutos foram caracterizados quanto ao padrão de listras. Para essas duas características foram analisados 116 marcadores microssatélites e as análises de ligação foram realizadas no programa JoinMap 2.0. A segregação da população F<sub>2</sub> demonstrou que a resistência ao oídio e o padrão de listras de frutos de melancia são características monogênicas e dominantes. Os microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441 mostraram-se ligados ao gene que confere resistência ao oídio a 2,6 cM com LODs 'score' de 31,42 e estão localizados no cromossomo dois no genoma da melancia. Os microssatélites MCPI\_05 e o MCPI\_16 estão ligados ao padrão de listras de frutos de melancia a uma distância de 1,5 e 1,8 cM com LODs 'score' de 39,28 e 38,11, respectivamente, e estão localizados no cromossomo seis do genoma da melancia. Esses marcadores poderão ser utilizados no processo de seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento de melancia.

**Palavras-chave:** *Citrullus lanatus*, *Podosphaera xanthii*, padrão externo de frutos, seleção assistida, SSR.

## ABSTRACT

The powdery mildew is one of the most important foliar diseases that attack the watermelon and other cucurbits in Brazil and in the world. The principal identification elements by the consumer are based on the external appearance and quality of the fruit. The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to resistance to powdery mildew and to the stripe pattern of watermelon fruits with microsatellite markers. Plants of the parents, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, which are the result of a cross between the cultivars BRS Opara (powdery mildew resistant and with clearly defined stripes fruit) and Pérola (powdery mildew susceptible and with diffuse stripes fruit), were phenotyped in the field for resistance or susceptibility to powdery mildew and, after of the harvest, the fruits was morphologically characterized. For these characteristics, 116 microsatellite markers were analyzed and the linkage analysis done in JoinMap 2.0. Segregation in the F<sub>2</sub> population demonstrated that resistance powdery mildew and the stripe pattern are controlled by a single dominant gene. The microsatellite loci MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441 showed linked to the powdery mildew resistance gene at 2.6 cM with LODs 'score' of 31.42 and are located in chromosome two of the watermelon genome. The microsatellite loci MCPI\_05 and MCPI\_16 showed a linkage to the stripe patterns of watermelon fruits at a distance of 1.5 and 1.8 cM with a LODs 'scores' of 39.28 and 38.11 respectively, and are located in the chromosome six of the watermelon genome. These markers can be used in the marker assisted selection process in watermelon improvement programs.

**Keywords:** *Citrullus lanatus*, *Podosphaera xanthii*, fruit external pattern, assisted selection, SSR.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	11
1.1 A cultura da melancia e sua importância socioeconômica	11
1.2 Oídio	12
1.3 Importância da aparência do fruto	14
1.4 Melhoramento genético da melancia para o Semiárido brasileiro	15
1.5 Seleção assistida por marcadores (SAM)	18
1.6 REFERÊNCIAS	20
<b>2. CAPÍTULO 1- Marcadores microssatélites ligados a locus de resistência ao oídio em melancia</b>	29
2.1 Introdução	32
2.2 Material e Métodos	34
2.3 Resultados	39
2.4 Discussão	40
2.5 Conclusões	43
2.6 REFERÊNCIAS	44
<b>3. CAPÍTULO 2 – Marcadores microssatélites ligados ao locus do padrão de listras de frutos de melancia</b>	53
3.1 Introdução	56
3.2 Material e Métodos	57
3.3 Resultados	62
3.4 Discussão	63
3.5 REFERÊNCIAS	66
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS</b>	72
<b>5. ANEXO</b>	73
ANEXO A – Lista dos 116 pares de primers microssatélites analisados nos dois capítulos	74
<b>6. APÊNDICES</b>	77
Apêndice A – Artigo publicado no Australian Journal and Crop Science	78
Apêndice B – Artigo publicado na revista Genetics and Molecular Research	84

## 1. Introdução Geral

### 1.1 A cultura da melancia e sua importância socioeconômica

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] pertence ao gênero *Citrullus* e à família Cucurbitaceae. Este gênero é constituído de cinco espécies diploides ( $2n = 22$ ): *C. ecirrhosus* Cogn., *C. colocynthis* (L.) Schrad., *C. rehmii* de Winter, *C. naudinianus* (Sond.) Hook.f. e *C. lanatus* (Thunb) Matsum & 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 utilizada, principalmente, para a alimentação animal (Whitaker & Davis, 1962; Mohr, 1986).

A melancia é considerada uma das principais cucurbitáceas cultivadas no Brasil, quarto país dentre os maiores produtores mundiais de melancia, ficando atrás apenas da China, do Irã e da Turquia (FAO, 2013). A produção em 2013 foi de 2.163.501 toneladas, destacando-se as regiões Nordeste e Sul, responsáveis por 27,8% e 26,2%, respectivamente, desta produção (IBGE, 2013).

Esta espécie é originária das regiões quentes da África tropical, sendo difundida mundialmente. É uma planta anual, herbácea, de hábito rasteiro com ramificações sarmentosas e pubescentes, as folhas, geralmente, apresentam limbo em contorno triangular, recortado em lóbulos. É monóica, ou seja, possui flores masculinas e femininas na mesma planta. Contudo, algumas populações podem ser andromonóicas, com flores masculinas e hermafroditas na mesma planta ou ginandromonóicas, com flores masculinas, femininas e hermafroditas na mesma planta. As flores femininas e hermafroditas apresentam ovário súpero em formato similar à forma final do fruto. Este varia quanto ao formato, tamanho, cor externa, padrão de listras, espessura da casca, cor da polpa e cor de sementes (Whitaker & Davis, 1962; Mohr, 1986; Dias & Resende, 2010). 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. É uma espécie alógama e os principais agentes polinizadores são as abelhas, sendo necessário que pelo menos 1.000 grãos de pólen sejam depositados sobre o estigma para que se desenvolva um fruto perfeito (Dias & Resende, 2010).

A melancia é fonte de pró-vitamina A e das vitaminas C e do complexo B, além de sais minerais como cálcio, fósforo e ferro. Levando-se em consideração que 90% de seu volume é água, é considerada hidratante e diurética, elimina resíduos do aparelho digestivo e funciona como laxante (Dias & Resende, 2010). Os frutos são normalmente consumidos *in*

*natura*, como sobremesa refrescante. Entretanto, em diversas regiões da Ásia as sementes, ricas em lipídios, são muito utilizadas na alimentação: na Índia, faz-se pão de farinha de semente de melancia; no Oriente Médio, comem-se as sementes assadas. O fruto possui quantidades abundantes de antioxidante licopeno (confere a cor vermelha), bem como é uma fonte excelente do aminoácido citrulina. O corpo humano usa a citrulina para produzir outro aminoácido importante, arginina, que tem um papel importante na divisão das células, para cicatrizar ferimentos e na eliminação de amônia do corpo. Nas cultivares de polpa amarela, a cor é conferida por  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A) e por xantofilas (Almeida, 2003; Dias & Resende, 2010).

A maioria das cultivares utilizadas atualmente no Brasil não foram desenvolvidas para as condições climáticas aqui existentes. Somando-se a isso, grande parte 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 suscetibilidade a doenças (Levi et al., 2000, 2001), tais como, o oídio, míldio, murcha de fusário, alternária, viroses e a antracnose (Terao et al., 2010).

## 1.2 Oídio

O oídio é uma das principais doenças foliares da melancia e de outras cucurbitáceas, cultivadas ou silvestres, no Brasil e no mundo. Nos Estados Unidos e em Israel, o oídio passou a ser um fator limitante para o cultivo da melancia apenas por volta do ano 2000 (Davis et al., 2001; Cohen et al., 2000). Entretanto, no Nordeste brasileiro, desde o final da década de 1980, o oídio já era citado como uma das principais doenças que atingiam a cultura da melancia (Souza et al., 1988; Queiróz et al., 1999).

O fungo causador do oídio em melancia é o *Podospaera xanthii* (Castagne) Braun & Shishkoff [syn. *Sphaerotheca fuliginea* auct. p.p.] (Jahn et al., 2002), que é um parasita obrigatório e apresenta especialização fisiológica. Os sintomas aparecem em toda a parte aérea da planta, mas as folhas são as mais afetadas. Inicialmente, tem crescimento branco pulverulento, que pode ser visualizado sobre a superfície abaxial e adaxial das folhas. Normalmente, começa nas folhas mais velhas em plantas no estágio de frutificação, contribuindo para a formação de frutos com baixo teor de sólidos solúveis e de qualidade inferior. Além disso, as folhas muito atacadas secam e a planta entra em senescência mais precocemente, encurtando o seu período produtivo. Ocorre praticamente em todos os locais onde a melancia é cultivada (Terao et al., 2010).

A importância dos oídios de cucurbitáceas em diferentes regiões depende da precipitação que nelas ocorre. Chuvas intensas são prejudiciais ao fungo, porque além de carregarem os conídios para o solo, danificam fisicamente os conidióforos e micélio. Por isso, a severidade do oídio aumenta quando a precipitação diminui (Sitterly, 1978; Coelho et al., 2000).

Os conídios germinam de 22 a 31 °C, com um ótimo em 28 °C (Sitterly, 1978) e são facilmente disseminados pelo vento e, mesmo em condições de umidade relativa abaixo de 20%, podem germinar e infectar as plantas. A germinação ocorre na ausência de água, pois os conídios têm um sistema extremamente eficiente de conservação do seu alto conteúdo de água. Condições de alta umidade favorecem a infecção e a sobrevivência do conídio, enquanto que umidade relativa baixa favorece o processo de colonização, esporulação e disseminação. Porém, todos estes processos ocorrem em uma ampla faixa de condições (Reuveni & Rotem, 1974).

O oídio das cucurbitáceas é capaz de se desenvolver com sucesso em climas quentes porque folhas superiores sombreiam as inferiores e as colônias se desenvolvem também sobre o lado inferior das folhas. Como o oídio se desenvolve melhor na sombra, plantios adensados favorecem o aparecimento da doença (Sitterly, 1978).

No Brasil, até o momento foi reportada a ocorrência de uma raça de oídio específica, que infecta a melancia. Trabalhos realizados por Reis & Buso (2004) e Reis et al. (2005) afirmam que nenhum isolado de melão, abóbora ou pepino foi capaz de infectar melancia, e os isolados obtidos de melancia só foram capazes de colonizar esta espécie. O mesmo foi observado por Cohen et al. (2000) em Israel. Entretanto, nos Estados Unidos, foram identificadas duas raças distintas de oídio, denominadas 1W e 2W (Davis et al., 2007; Tetteh et al., 2010). O número de raças que infectam uma cultura pode variar em função das condições ambientais e dos genótipos utilizados. Por exemplo, na literatura é possível encontrar trabalhos que reportam a existência de várias raças de oídio que infectam o melão (Pitrat et al., 1998; Coffey et al., 2006; McCreight, 2006; Reis, 2007; Pitrat & Besombes, 2008), entretanto, na China, é reportada a existência de uma única raça de *P. xanthii* que infecta o melão (Liu et al., 2010).

Estudos realizados no Brasil revelaram uma fonte de resistência ao oídio em melancia de herança monogênica dominante, com segregação de três resistentes para um suscetível (Borges, 1996). Já nos Estados Unidos, as raças 1W e 2W possuem herança de resistência multigênica e monogênica, respectivamente (Davis et al., 2002; Tetteh et al., 2013). Não é possível afirmar se são raças diferentes, se está havendo alguma especiação dessa raça

dependendo do local, ou, se por serem fontes de resistência diferentes, se comportam de forma diferente quanto ao tipo de herança da resistência ao patógeno. Apesar de limitados, os dados disponíveis sugerem que a distribuição geográfica de raças é complexa e mutável com o passar do tempo (Mohamed et al., 1995; Sowell, 1982). Portanto, os melhores locais para se avaliar fontes de resistência a alguma doença de planta e desenvolver programas de melhoramento genético com o objetivo de transferir a resistência para cultivares de interesse, são aquelas regiões onde o hospedeiro cresce naturalmente ou é cultivado por muitos anos, permitindo somente a sobrevivência de hospedeiros resistentes ao patógeno.

### **1.3 Importância da aparência do fruto**

De acordo com a lista de descritores morfológicos para melancia disponível no site do Ministério da Agricultura, o padrão externo de frutos de melancia pode ser caracterizado quanto ao formato do fruto, cor de fundo da casca, presença de sulcos e de listras - estas são classificadas em claramente definidas e difusas, intensidade de coloração das listras e largura das listras; o padrão interno do fruto pode ser caracterizado quanto à espessura do pericarpo, coloração e firmeza da polpa (BRASIL, 2009).

Durante o processo de desenvolvimento de uma nova cultivar é preciso considerar os possíveis clientes: produtor, indústria e o consumidor (Borém & Miranda, 2013). De acordo com Dias et al. (2010), no Brasil, a cultivar Crimson Sweet e tipos semelhantes, que é de origem americana e possui o padrão de listras claramente definidas, é a mais plantada, respondendo praticamente por mais de 90% do fornecimento ao mercado consumidor. Na escolha da cultivar para o plantio, deve-se considerar o tipo de fruto preferido pelo mercado consumidor, sua resistência ao transporte, a adaptação da cultivar à região, à tolerância a doenças e a distúrbios fisiológicos. Dessa forma, um programa de melhoramento genético deve seguir várias vertentes: desde resistência a doenças e pragas, maior produtividade até características externas e internas do fruto, uma vez que a aparência é o elemento de identificação da cultivar pelo consumidor.

O processo de seleção para o padrão dos frutos de melancia pelas técnicas do melhoramento clássico só pode ser feito na fase de frutificação ou durante a colheita, o que levaria em torno de 40 ou 80 dias após o semeio, respectivamente. A identificação de marcadores moleculares ligados às características do fruto permitirá selecionar o padrão do fruto ainda nos estádios iniciais das plantas, além de permitir melhor conhecimento dos

caracteres herdados entre as progênes e redução do número de indivíduos a serem avaliados, posteriormente, em campo (Bhering et al., 2009).

#### **1.4 Melhoramento genético da melancia para o Semiárido brasileiro**

Um ponto importante para se começar um programa de melhoramento genético é ter fontes de variabilidade genética. O Nordeste brasileiro possui grande variabilidade para diversos caracteres de planta, frutos e resistência a doenças (Queiróz, 1993; Dias et al., 1996; Romão, 2000; Dias et. al., 2010). 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, que começou a ser formado na década de 80 e está localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina – PE (Queiróz et al., 1999; Silva et al., 2010). Este banco engloba o Banco de Germoplasma de Melancia (BG CIA), o Banco de Germoplasma de Melão (BGMEL) e o Banco de Germoplasma de Cucurbita (BGC), e foi criado visando à conservação dos recursos genéticos de Cucurbitáceas. 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*).

Além de fontes de variabilidade, uma condição básica para que o melhorista realize com êxito suas atividades é o conhecimento da espécie com a qual trabalha, principalmente, o manejo e a forma de reprodução desta. Pois existem métodos de melhoramento específicos para espécies de plantas que se reproduzem sexualmente (alógamas ou autógamas) e métodos para plantas que se reproduzem assexuadamente. Bem como, é importante conhecer a herança do caráter que está sendo selecionado e a influência do ambiente sobre esse caráter (Borém & Miranda, 2013).

As principais cultivares existentes no Brasil são de origem americana e japonesa, destacando-se, ‘Crimson Sweet’, ‘Nova Crimson’, ‘Crimson Select’, ‘Charleston Gray’, ‘Sugar Baby’, ‘Jubilee’, ‘Fairfax’, ‘Flórida Gigante’, ‘Omaru Yamato’, ‘Mickylee PVP’ e ‘Preciosa’; alguns híbridos que estão no mercado como ‘Top Gun’, ‘Crimson Glory’, ‘Emperor’, ‘Eureka’, ‘Rubi AG-8’, ‘Safira AG-124’, ‘Electra’, ‘Georgia’, ‘Manchester’, ‘Karistan’, ‘Phedra’, ‘Olímpia’, ‘Denver F<sub>1</sub>’, ‘Ferrari F<sub>1</sub>’. Além destas, existem ainda os híbridos de melancia triploide (Queiróz et al., 1999; Souza, 2008, Nascimento et al., 2011). Apesar da disponibilidade de vários genótipos, a cultivar Crimson Sweet é utilizada



praticamente em todas as áreas de cultivo de melancia em todo o país (Queiróz et al., 1999; Dias et al., 2010).

Vale salientar, que as cultivares existentes no Brasil, apesar de apresentarem boas características de frutos e atenderem atualmente às demandas do mercado brasileiro, não foram desenvolvidas para as condições ambientais do Nordeste brasileiro, especialmente do semiárido e, por conseguinte, apresentam muitas limitações para os produtores. Estes precisam de custos adicionais com os tratamentos fitossanitários para controle do oídio (*Podosphaera xanthii*), do cancro das hastes (*Didymella bryoniae*) e doenças causadas pelos vírus PRSV (*Papaya ringspot virus* – type watermelon), WMV (Watermelon mosaic virus) e ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*). Pois quase todas as cultivares cultivadas comercialmente, são suscetíveis a estas doenças. Além dos custos, outros fatores complicadores na utilização de genótipos suscetíveis são: exigência de maior trabalho e habilidade dos produtores no manejo fitossanitário da cultura, para uso de dosagem, forma de aplicação e época corretas; maiores riscos de intoxicação no campo com as pulverizações e no público consumidor com os resíduos de agrotóxicos nos frutos (Queiróz et al., 1999; Terao et al., 2010).

Um programa de melhoramento deve levar em consideração as características que sejam relevantes para os agricultores e para os consumidores. Para os primeiros, a resistência às principais doenças, a produtividade e qualidade do produto se revestem da maior importância (Queiróz et al., 1999). Assim, a resistência ao oídio, ao cancro das hastes, à murcha de fusário, nematóides e aos vírus PRSV-W, WMV e ZYMV constituem os objetivos primordiais para o programa de melhoramento da melancia, desenvolvido na Embrapa Semiárido. Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar e avaliar o germoplasma disponível no BGCIA, para posterior utilização dos acessos deste banco em programas de melhoramento. Foram realizados estudos de acessos de melancia para a análise de diversidade genética (Romão, 2000; Silva et al., 2006; Silva, 2010; Gama et al., 2013a); para resistência à *D. bryoniae* (Dias et al., 1996; 1999); para à resistência ao *P. xanthii* (Souza et al., 1988; Dias et al., 1999; Borges, 1996); para resistência aos vírus do gênero Potyvirus: PRSV-W, WMV e ZYMV (Silveira et al., 2005); desenvolvimento de híbridos de melancia triploide (Souza et al., 2001; Souza et al., 2005); para resistência ao *M. enterolobii* (Damaceno, 2012); capacidade de combinação de linhagens avançadas e cultivares comerciais de melancia (Souza et al., 2013), além de estudos de seleção e análises de compatibilidade e manejo de portaenxertos de melancia (Santos et al., 2014) dentre vários outros, que podem ser encontrados na literatura.

Os estudos realizados com o germoplasma do BGCIA permitiram avanços no programa de melhoramento de melancia e em 2007 a Embrapa Semiárido lançou a primeira cultivar de melancia, brasileira, resistente ao oídio, a cv. BRS Opara, desenvolvida para as condições irrigadas do Semiárido brasileiro. Esta cultivar foi obtida a partir de cruzamentos de uma linha oriunda do acesso CPATSA-2 do BAG de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro e a cultivar Crimson Sweet – a mais cultivada no Brasil. O primeiro genitor possui frutos sem qualidade comercial, mas apresenta resistência ao oídio, enquanto que a cultivar Crimson Sweet apesar de possuir frutos com excelentes características comerciais é suscetível a essa doença. O esforço de combinar geneticamente as qualidades desejadas desses dois materiais na BRS Opara foi bem recompensado. Os frutos são de grande aceitação comercial e com boa resistência ao transporte. A resistência ao oídio, além da economia de insumos e mão de obra, torna viável uma segunda colheita de frutos de qualidade já que a planta não sofre os danos causados pela doença. As recomendações para cultivo da ‘BRS Opara’, de modo geral, são as mesmas adotadas para as demais cultivares de melancia (Dias et al., 2007).

Também em 2007, foram lançadas pela Embrapa Rondônia em parceria com a Embrapa Semiárido, duas cultivares de melancia de polpa amarela, a ‘BRS Soleil’ e a ‘BRS Kuarah’. Estas cultivares foram obtidas a partir de sucessivos ciclos de seleção em populações originadas das variedades ‘Kodama’, polpa amarela e ‘Sugar Baby’, polpa vermelha. Os frutos da ‘BRS Soleil’ e da ‘BRS Kuarah’ possuem propriedades organolépticas e nutricionais, bem como possuem frutos menores do que a cultivar Crimson Sweet, com peso variando entre 4 e 6 kg, o que implica em praticidade no transporte e no acondicionamento no refrigerador (Souza & Dias, 2007).

A busca pelo desenvolvimento de cultivares resistentes às principais doenças e pragas é constante em programas de melhoramento genético de melancia, bem como desenvolvimento de híbridos sem sementes e cultivares com frutos menores, que também é uma tendência do mercado atual, principalmente para a exportação (Queiróz et al., 1999; Dias & Resende, 2010). Entretanto, é evidente o quão laborioso e demorado é um programa de melhoramento, principalmente de espécies alógamas que demandam polinização manual controlada. São necessários vários anos de empenho e dedicação do melhorista para conseguir lançar uma nova cultivar, como o exemplo citado acima da cultivar BRS Opara, que levou cerca de dezessete anos para ser desenvolvida. Por outro lado, técnicas biotecnológicas, tais como, marcadores moleculares, podem agilizar os programas de melhoramento, uma vez que permitem a seleção de indivíduos com base no seu genótipo, independentemente de fatores bióticos ou abióticos e em qualquer fase de desenvolvimento da planta (Bhering et al., 2009).

### 1.5 Seleção assistida por marcadores (SAM)

A seleção assistida por marcadores utiliza marcadores moleculares para selecionar genótipos com características de interesse em programas de melhoramento genético. É rápida e segura, sendo na atualidade, de fundamental importância para o desenvolvimento de novas cultivares. Para isto, faz-se necessário o conhecimento prévio da herança do caráter e a associação de marcadores moleculares com a característica de interesse, o qual pode ser realizado, por exemplo, por meio de fenotipagem e genotipagem de populações segregantes oriundas de genitores contrastantes para a característica que se deseja selecionar (Demore, 2008).

Atualmente, existem vários tipos de marcadores moleculares e estes diferem entre si quanto à metodologia, ao custo empregado na tecnologia para utilização, a reprodutibilidade, ao tempo gasto para se obter algum resultado, ao grau de informação polimórfica, bem como a qualidade dos resultados obtidos. Os marcadores microssatélites, também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”), consistem em unidades de cerca de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, ou seja, um após o outro (Oliveira et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Têm sido desenvolvidos para várias espécies de plantas cultivadas e estão substituindo rapidamente outros tipos de marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente, devido à sua reprodutibilidade e simplicidade da técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (Caixeta et al., 2009).

Com a publicação do mapa genético da melancia, com grupos de ligações genéticas altamente saturados com marcadores SSRs por Ren et al. (2012) e a disponibilização do genoma da melancia por Guo et al. (2013) ficou mais fácil o desenvolvimento de trabalhos de seleção assistida por marcadores e de identificação de genes responsáveis por características agronomicamente desejáveis em melancia. Para tal, será preciso o desenvolvimento de populações segregantes resultantes de parentais contrastantes para as características de interesse, com uma boa fenotipagem, seguida da sua ‘alocação’ para determinados grupos de ligações genéticas e com a associação de marcadores SSR a uma distância inferior a 3 cM. A base genética de mapas de ligação é a recombinação genética resultante do “crossing over” entre cromossomos homólogos durante a meiose. E, quanto mais perto estão dois locus em um cromossomo, menor será a chance de recombinação entre eles; quanto mais afastados, maior será o número de recombinantes (Liu, 1997). Então, quanto mais próximo do locus que

é responsável por determinada característica fenotípica estiver o marcador molecular, mais precisa será a seleção assistida por marcadores (SAM).

A utilização de marcadores moleculares associados a características de interesse nos programas de melhoramento genético de plantas por meio da SAM permite selecionar indivíduos com base no seu genótipo sem a interferência ambiental. Desse modo, a transferência e a manutenção de características entre as diferentes gerações da população a ser melhorada, poderá ser realizada sem a intervenção de estresses bióticos ou abióticos, em qualquer fase de desenvolvimento da planta e em qualquer ambiente de cultivo. Todos esses fatores contribuem para uma redução no tempo gasto para o desenvolvimento de uma nova cultivar. Alpuerto et al. (2009) estimaram que, com a utilização da seleção assistida por marcadores no programa de melhoramento de arroz para tolerância a salinidade e deficiência de fósforo, houve uma redução de três a seis anos para o desenvolvimento de uma nova cultivar, em relação ao melhoramento convencional. Vale salientar que os marcadores moleculares não vão substituir todas as avaliações fenotípicas do melhoramento clássico, mas sim auxiliá-las.

Poucos trabalhos têm sido encontrados na literatura reportando marcadores associados a características fenotípicas em melancia. Lin et al. (2009) analisaram mais de 300 “primers” RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) quanto à capacidade de identificar genótipos resistentes e suscetíveis à doença vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (fusário) em populações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, oriundas do cruzamento da cultivar Sugar Baby (suscetível) e uma linha melhorada de Sugar Baby, denominada JSB (resistente). O “primer” OP-G05 revelou um fragmento presente em todas as populações resistentes, denominado JSB-OP05898, que foi clonado, sequenciado e utilizado para desenhar “primers” SCARs (“Sequence Characterised Amplified Region”). Os autores afirmaram que o SCAR desenvolvido nesse estudo é capaz de diferenciar de forma rápida e segura genótipos de melancia resistentes e suscetíveis ao fusário e que isso pode acelerar os programas de melhoramento. Futuramente, esses autores pretendem encontrar mais marcadores ligados à resistência à murcha de fusário e utilizá-los para isolar o gene de resistência.

Prothro et al. (2012) identificaram um QTL, denominado M-QTL, no LG 2 como candidato para a seleção assistida por marcadores para tamanho de sementes de melancia. Kim et al. (2013) analisaram 5.493 “primers” RAPDs e identificaram um marcador (OP-R483) ligado à resistência ao oídio raça 1W a uma distância de 3,6 cM. Em seguida esses autores clonaram a marca encontrada com esse marcador e converteram em SCAR1-F e SCAR1-R, correspondente ao locus OP-S483. O alinhamento das sequências obtidas com OP-

S483 e OP-R483, revelou cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que foram utilizados para desenvolvimento de marcador CAPs (“cleaved amplified polymorphic sequence”). Entretanto, ainda não existem relatos da utilização desses marcadores em programas de melhoramento para o desenvolvimento de novas cultivares, assim como não há informações sobre qual seria a redução do tempo gasto até o lançamento de uma nova cultivar.

No Brasil, os trabalhos publicados envolvendo melancia e marcadores moleculares eram restritos a trabalhos de caracterização molecular de germoplasma (Capeloto et al., 2004; Silva et al., 2006; Silva, 2010; Gama et al., 2013a; Gama et al., 2013b). Porém, apesar de tímidos, estudos buscando associar marcadores moleculares a características agronomicamente desejáveis em melancia estão começando a serem realizados no Brasil e no mundo. Deve-se, portanto, enfatizar a importância dos mesmos para o avanço dos programas de melhoramento desta espécie. São evidentes os benefícios da seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas, uma vez que estes vêm somar às avaliações do melhoramento clássico e acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares. Pois a avaliação pode ser feita em qualquer fase de desenvolvimento da planta sem que haja interferência ambiental e, além disso, é possível avaliar um grande número de genótipos por vez.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar marcadores microsatélites ligados ao locus de resistência ao oídio e ao padrão de listras de frutos de melancia em uma população F<sub>2</sub> de ‘BRS Opara’ x ‘Pérola’ para auxiliar em programas de melhoramento de melancia.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. P. F. **Cultura da melancia**. Porto: Universidade do Porto, 2003. 16 p. Disponível em: <<http://dalmeida.com/hortnet/Melancia.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2014.

ALPUERTO, V.-L. E. B; NORTON, G. W.; ALWANG, J.; ISMAIL, A. M. Economic Impact Analysis of Marker-Assisted Breeding for Tolerance to Salinity and Phosphorous Deficiency in Rice. **Review of Agricultural Economics**, San Diego, v. 31, n. 4 p. 779-792. 2009.

BHERING, L. L.; PINTO, C. A. B. P.; BENITES, F. R. G.; LEITE, M. E.; SILVA, F. L. Seleção assistida por marcadores para teor de matéria seca e açúcares redutores em tubérculos de batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 38-44. 2009.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa, MG: UFV, 2013. 523 p.

BORGES, R. M. E. **Estudo da herança da resistência ao oídio *Sphaerotheca fuliginea* (Schelecht. ex Fr.) Poll em melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.** 1996. 46f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

BRASIL. Ato n. 5, 2 de junho de 2009. Dispõe sobre instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 jun. 2009. Seção 1.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BRITO, G. G. de; SAKUYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E. T. (ed) **Marcadores moleculares**. UFV, Viçosa, 2009. p. 11-94.

CAPELATO, 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: 27 ago. 2014.

COELHO, M. V. S.; CAFÉ-FILHO, A. C.; LOPES, C. A.; MAROUELLI, W. A. Severidade de oídio em abóbora híbrida sob diferentes lâminas de irrigação e níveis de nitrogênio. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 2, p. 157-160. 2000.

COFFEY, M. D.; MCCREIGHT, J. D.; MILLER, T. New races of the cucurbit powdery mildew *Podosphaera xanthii* present in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. S25, 2006.

COHEN, Y.; BAIDER, A.; PETROV, L.; SHECK, L.; VOLOISKY, V. Cross-infectivity of *Sphaerotheca fuliginea* to watermelon, melon, and cucumber. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 510, p. 85-88, 2000.

DAMACENO, L. S. **Reação de genótipos de melancia a *Meloidogyne enterolobii***. 2012. 64 f. Dissertação, (Mestrado em Horticultura Irrigada) – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro.

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.

DAVIS, A. R. et al. Powdery mildew: an emerging disease of watermelon in the United States. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Madison, v. 24, p. 42-48, 2001.

DAVIS, A. R.; LEVI, A.; TETTEH, A.; WEHNER, T.; PITRAT, P. Evaluation of watermelon and related species for resistance to race 1W powdery mildew. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 132, p. 790-795, 2007.

DAVIS, A. R.; THOMAS, C. E.; LEVI, A.; BRUTON, B. D.; PAIR, S. Watermelon resistance to powdery mildew race 1. In: MAYNARD, D. N. (Ed.). **Cucurbitaceae '02**. Alexandria: ASHS, 2002. p. 192-198.

DEMORE P. dos S. **Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites para resistência ao oídio em soja**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

DIAS, R. de C. S. R. de C. S.; BARBOSA, G. S.; SOUZA, F. de F.; QUEIROZ, 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: 2 ago. 2014.

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.; QUEIROZ, 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.

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

DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. Socioeconomia. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. (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/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

GAMA, R. N. de S.; SANTOS, C. A. F.; DIAS, R. de C. Genetic variability of watermelon accessions based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 747-754, 2013a.

GAMA, R. N. C. S.; SANTOS C. A. F.; DIAS, R. de C. S.; SOUZA, F. de F. Molecular characterization of watermelon cultivars using microsatellite markers. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 522-527, 2013b.

GUO, S. et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. **Nature Genetics**, New York, v. 45, p. 51-60, 2013.

FAO. **Production quantities by country**. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 15 jul. 2015.



IBGE. **Culturas temporárias e permanentes**. 2013. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Agricola/Producao\_Agricola\_Municipal\_[anual]/2013/tabelas\_pdf/tabela02.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2015.

JAHN, M.; MUNGER, H. M.; McCREIGHT J. D. Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In: BELANGER, R. R.; BUSHNELL, W. R.; DIK, A. J.; CARVER, L. W. (Ed). **The powdery mildews: A comprehensive treatise**. St. Paul: APS, 2002. p. 239-248.

KIM, K.-H.; AHN, S.-G.; HWAN, J.-H.; CHOI, Y.-M.; MOON, H.-S.; PARK, Y.-H. Inheritance of resistance to powdery mildew in the watermelon and development of a molecular marker for selecting resistant plants. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Seoul, v. 54, p. 134-140, 2013.

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.

LIN, Y.-H.; CHEN, K.-S.; LIOU, T.-D.; HUANG, J.-W.; CHANG, P.-F. L. Development of a molecular method for rapid differentiation of watermelon lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*. **Botanical Studies**, Heidelberg, v. 50, p. 273-280, 2009.

LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. New York: CRC Press, 1997. 611 p.

LIU, L.; CHEN, Y.; SU, Z.; ZHANG, H.; ZHU, W. A sequence-amplified characterized region marker for a single, dominant gene in melon PI 134198 that confers resistance to a unique race of *Podosphaera xanthii* in China. **Hortscience**, Alexandria, v. 45, n. 9, p. 1407-1410, 2010.

McCREIGHT, J. D. Melon-powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* races 1 and 2. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, p. 59-65. 2006.

MOHAMED, Y. F.; BARDIN, M.; NICOT, P. C. Causal agents of powdery mildew of cucurbits in Sudan. **Plant Disease**, St. Paul. v. 79, p. 634-635. 1995.

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

NASCIMENTO, I. R.; SANTOS, G. R.; MALUF, W. R. Melhoramento genético e cultivares de melancia. In: SANTOS, G. R.; ZAMBOLIN, L. **Tecnologias para produção sustentável da melancia no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 2011. p. 171-183.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R., VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307. 2006.

PITRAT, M.; BESOMBES, D. Inheritance of *Podosphaera xanthii* resistance in melon line '90625'. In: EUCARPIA MEETING ON GENETICS AND BREEDING OF CUCURBITACEAE, 9., 2008. Avignon. **Proceedings...** Avignon: INRA, 2008. p. 135-142.

PITRAT, M.; DOGIMONT, C.; BARDIN, M. Resistance to fungal diseases of foliage in melon. In: McCREIGHT, J. D. (Ed.). **Cucurbitaceae '98**: Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm. Alexandria: ASHS, 1998. p. 167-173.

PROTHRO, J.; SANDILIN, K.; ABDEL-HALEEM, H.; BACHLAVA, E.; WHITE, V.; KNAPP, S.; MCGREGOR, C. Main and epistatic quantitative trait loci associated with seed size in watermelon. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 137, p. 452-457, 2012.

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; DIAS, R. de C. S.; SOUZA, F. de F.; FERREIRA, M. A. J. da F.; ASSIS, J. G. A.; BORGES, R. M. E.; ROMÃO, R. L.; RAMOS, S. R. R.; COSTA, M. S. V. CRUZ, M. da; MOURA, C. L. Recursos genéticos e melhoramento de melancia no Nordeste brasileiro. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Embrapa Semiárido/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. Embrapa Semiárido, Disponível em: <http://www.cpatosa.embrapa.br/catalogo/livroorg/melancia.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2014.

REIS, A. **Oídio das Cucurbitáceas**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007. 5p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 42).

REIS, A.; BUSO, J. A. Levantamento preliminar de raças de *Sphaerotheca fuliginea* no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF: v. 22, p. 628-631, 2004.

REIS, A.; DIAS, R. de C. S.; ARAGÃO, F. A. S.; BOITEUX, L. S. Caracterização do perfil patogênico de isolados de *Podosphaera xanthii* obtidos em cucurbitáceas na região Nordeste do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 362-362, 2005.

REN, Y.; ZHAO, H.; KOU, Q.; JIANG, J.; GUO, S.; ZHANG, H.; HOU, W.; ZOU, X.; SUN, H.; GONG, G.; LEVI, A.; XU, Y. High resolution genetic map anchoring scaffolds of the sequenced watermelon genome. **Plos One**, San Francisco, v. 7, p. 1-10, 2012.

REUVENI, M.; ROTEM, J. Effect of humidity on epidemiological patterns of the powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on squash. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 2, n. 1, p. 25-33, 1974.

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.

SANTOS, J. S. dos; DIAS, R. C. S.; GRANGEIRO, L. C. ; LIMA, M. A. C. ; ANDRADE, K. M. N. S. S. Compatibilidade com porta-enxertos, rendimento e qualidade de futos em cultivares de melancia triplóide. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, p. 141-147, 2014.

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.; QUEIROZ, 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. de A.; NEGRUEIROS, M. Z. de; RAMOS, N. F.; NASCIMENTO, A. K. Q. do; Seleção de acessos e progêncies de *Citrullus* spp. Para resistência a três potyvírus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n.4, p. 394-399, 2005.

SITTERLY, W. R. The powdery mildews of cucurbits. In: SPENCER, D. (Ed.). **The powdery mildews**. London: Academic Press, 1978. p. 359-379.

SOUZA, F. de F. Cultivares. In: SOUZA, F. de F. (Ed.). **Cultivo da melancia em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008. p. 34-44.

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.; DIAS, R. C. de; QUEIRÓZ, M. A. Capacidade de combinação de linhagens avançadas e cultivares comerciais de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, p. 595, 2013.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A.; DIAS, R. de C. S. Desenvolvimento de híbridos triplóides experimentais de melancia. *Sitientibus. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana*, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2001.

SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. de; DIAS, R. de C. S. Heterotic Effects in triploid watermelon hybrids. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, MG, v. 5, p. 279-285, 2005.

SOUZA, R. de C. S.; ARAÚJO, J. P. de; QUEIRÓZ, M. A. de. Avaliação da resistência de acessos de melancia ao oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 6, n. 1, p. 82, 1988.

SOWELL, G. Population shift of *sphaerotheca fuliginea* on muskmelon from race 2 to race 1 in the southeastern United States. *Plant Disease*, St. Paul, v. 66, p. 130-131, 1982.

TERAO, D.; CASTRO, J. M. da C.; LIMA, M. F.; BATISTA, D. da C.; BARBOSA, M. A. G.; REIS, A.; DIAS, R. de C. S. Doenças. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. (Ed). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/doencas.htm>>. Acesso em: 6 fev. 2014.

TETTEH, A. Y.; WEHNER, T. C.; DAVIS, A. R. Identifying Resistance to Powdery Mildew Race 2W in the USDA-ARS Watermelon Germplasm Collection. *Crop Science*, Madison, v. 50, p. 933-939, 2010.

TETTEH, A. Y.; WEHNER, T. C.; DAVIS, A. R. Inheritance of Resistance to the New Race of Powdery Mildew in Watermelon. *Crop Science*, Madison, v. 53, p. 880-887. 2013.

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

## **2. CAPÍTULO I – MARCADORES MICROSSATÉLITES LIGADOS A LOCUS DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM MELANCIA<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Apêndice A - Artigo Microsatellite markers linked to powdery mildew resistance locus in watermelon publicado no Australian Journal and Crop Science, disponível em: [http://www.croj.com/natalia\\_9\\_1\\_2015\\_92\\_97.pdf](http://www.croj.com/natalia_9_1_2015_92_97.pdf)

## RESUMO

O oídio é uma das principais doenças foliares que ataca a melancia e outras cucurbitáceas no mundo. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores microssatélites ligados à resistência ao oídio em uma população F<sub>2</sub> resultante do cruzamento de ‘BRS Opara’ (resistente) × ‘Pérola’ (suscetível). Plantas dos parentais, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> foram fenotipadas em campo para resistência ou suscetibilidade ao oídio e 116 marcadores microssatélites foram analisados. Dados da segregação da população F<sub>2</sub> demonstraram que a resistência ao oídio é condicionada por um único gene de característica dominante. Os microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441 mostraram-se ligados ao gene que confere resistência ao oídio a uma distância de 2,6 cM e estão localizados no cromossomo dois no genoma da melancia. Esses marcadores poderão ser utilizados no processo de seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento de melancia e a identificação da região cromossômica em que esses marcadores se encontram facilitará estudos futuros na identificação do gene que confere resistência ao oídio em melancia.

**Palavras-chave:** *Citrullus lanatus*, *Podosphaera xanthii*, seleção assistida, SSR.

## ABSTRACT

Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) is one of the main foliar diseases that attack the watermelon (*Citrullus lanatus*) and other cucurbits species, cultivated in Brazil and around the world. The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to the resistance locus to powdery mildew in a F<sub>2</sub> population of ‘BRS Opara’ (resistant) × ‘Pérola’ (susceptible). Plants of the parents, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, were phenotyped for resistance or susceptibility to powdery mildew and 116 microsatellite markers were analyzed. Segregation data in the F<sub>2</sub> population demonstrated that resistance powdery mildew is controlled by a single dominant gene. The microsatellites MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441 showed linkage to the powdery mildew resistance gene at same 2.6 cM distance, and were located on chromosome two of the watermelon genome. These markers can be used in the marker assisted selection in watermelon breeding programs and the identification of the chromosome region in which these markers are found will facilitate future studies to identify the gene that confers resistance to powdery mildew in watermelon.

**Keywords:** *Citrullus lanatus*, *Podosphaera xanthii*, assisted selection, SSR.



## 2.1 INTRODUÇÃO

A melancia, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai, pertence ao gênero *Citrullus*, à família Cucurbitaceae e tem como centro de origem a África (Mohr, 1986). Atualmente, é cultivada em todo o mundo e é uma das principais cucurbitáceas cultivadas no Brasil. De acordo com dados da Agrianual (2014), o Brasil é o quarto país maior produtor de melancia, com uma produção em 2011 de 2.198.620 toneladas/ano.

A maioria das cultivares utilizadas no Brasil são suscetíveis a doenças e pragas, tais como o oídio, a alternária, viroses e a antracnose. O oídio é uma das principais doenças foliares da melancia e de outras cucurbitáceas, cultivadas no Brasil e no mundo. Nos Estados Unidos e em Israel o oídio passou a ser um problema limitante para o cultivo da melancia apenas por volta do ano 2000 (Davis et al., 2001; Cohen et al., 2000). Entretanto, no Nordeste brasileiro, desde o final da década de 80, o oídio já era citado como uma das principais doenças que atingiam a cultura da melancia (Souza et al., 1988; Queiróz et al., 1999).

O fungo causador do oídio em melancia é o *Podosphaera xanthii* (Castagne) Braun & Shishkoff [syn. *Sphaerotheca fuliginea* auct. p.p.] (Jahn et al., 2002), que é um parasita obrigatório e apresenta especialização fisiológica. Os sintomas aparecem em toda a parte aérea da planta, mas as folhas são as mais afetadas. Inicialmente, tem crescimento branco pulverulento, que pode ser visualizado sobre a parte superior e inferior das folhas. Normalmente, começa nas folhas mais antigas e plantas mais velhas, no estágio de frutificação, contribuindo para a formação de frutos com baixo teor de sólidos solúveis e de qualidade inferior. Além disso, as folhas muito infestadas secam e a planta entra em senescência mais precocemente, encurtando o seu período produtivo. Esse fungo, ocorre praticamente em todos os locais onde a melancia é cultivada (Terao et al., 2010).

No Brasil, até o momento, foi reportada ocorrência de uma raça de oídio específica, que infecta a melancia. Trabalhos realizados por Reis & Buso (2004) e Reis et al. (2005) afirmam que nenhum isolado de melão, abóbora ou pepino foi capaz de infectar melancia, e os isolados obtidos de melancia só foram capazes de colonizar esta espécie. O mesmo foi observado por Cohen et al. (2000) em Israel. Entretanto, nos Estados Unidos, foram identificadas duas raças distintas de oídio, 1W e 2W (Davis et al., 2007; Tetteh et al., 2010), sendo a herança da resistência das mesmas multigênica e monogênica, respectivamente (Davis et al., 2002; Tetteh et al., 2013).

Os programas de melhoramento genético em geral visam à incorporação de alelos para características relativas à melhor qualidade de fruto, aumento de produtividade e resistência a

pragas e doenças. A resistência ao oídio, além da diminuição do uso de fungicidas, torna viável uma segunda colheita de frutos de qualidade já que a planta não sofre os danos causados pela doença (Dias et al., 2007).

O desenvolvimento de novas cultivares de melancia com características agronomicamente desejáveis e a resistência ao oídio pelas técnicas de melhoramento clássico é bastante demorado e laborioso, além de ser dificultado pela influência ambiental. Técnicas biotecnológicas, tais como marcadores moleculares, permitem a seleção de indivíduos com base no seu genótipo, independentemente de fatores bióticos ou abióticos e em qualquer fase de desenvolvimento da planta. A identificação de marcadores moleculares ligados a características fenotípicas, como a resistência ao oídio, permite aumentar a eficiência da seleção dos caracteres herdados entre as progênes e redução do número de indivíduos a serem avaliados posteriormente em campo (Bhering et al., 2009). Dessa forma, a seleção assistida por marcadores (SAM) tende a agilizar os programas de melhoramento, uma vez que a seleção pode ser feita ainda nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, sendo na atualidade, uma ferramenta de fundamental importância para o processo de desenvolvimento de novas cultivares (Demore, 2008).

Os marcadores microssatélites também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”) consistem em unidades de cerca de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem (Oliveira et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Têm sido desenvolvidos para várias espécies de plantas cultivadas e estão substituindo rapidamente outros tipos de marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente, devido à sua reprodutibilidade e simplicidade da técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (Caixeta et al., 2009).

Ren et al. (2012) publicaram um mapa genético da melancia, com grupos de ligações genéticas altamente saturados com marcadores SSRs. Guo et al. (2013) publicaram o genoma da melancia, que em conjunto com o trabalho de Ren et al. (2012) facilitará os trabalhos de seleção assistida por marcadores e de identificação de genes responsáveis por características agronomicamente desejáveis.

O objetivo desse trabalho foi identificar marcadores microssatélites ligados ao locus de resistência ao oídio em melancia em uma população  $F_2$  de ‘BRS Opara’ × ‘Pérola’ para auxiliar programas de melhoramento de melancia de várias instituições de pesquisa.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetativo – Obtenção de população F<sub>1</sub>

Foram realizados cruzamentos, por meio de polinização manual controlada (PMC) conforme metodologia descrita por Dias et al. (2001), entre duas cultivares de melancia, contrastantes para a resistência ao oídio: ‘BRS Opara’ (resistente) e ‘Pérola’ (suscetível), para obtenção da população F<sub>1</sub>. Inicialmente, as sementes dessas cultivares foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato comercial para hortaliças Plantmax<sup>®</sup> e foram mantidas em casa de vegetação, até o aparecimento das primeiras folhas definitivas, aproximadamente 12 dias. Em seguida, essas mudas foram transplantadas para o Campo Experimental de Bebedouro, da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Na fase de floração foram realizados os cruzamentos. As flores masculinas de ‘Pérola’ e femininas de ‘BRS Opara’ foram isoladas 24 horas antes da antese, utilizando um copo plástico descartável (250 ml) grampeado em uma miniestaca de madeira branda, a fim de mantê-lo fixado ao solo. No dia seguinte, quando as flores já estavam abertas, no período entre 8 e 10 h, foram efetuadas as polinizações. A flor masculina foi destacada da planta, a corola pressionada e retida pelos dedos polegar e indicador na região do pedúnculo e com movimentos leves e giratórios, o pólen foi depositado sobre o estigma do genitor feminino. Após a polinização, as flores femininas foram identificadas com uma etiqueta de papel guache contendo as informações do cruzamento: parentais, planta e a data da PMC e foram novamente isoladas durante mais 72 h.

Foram coletadas amostras foliares jovens de cada parental e conservadas em freezer a -80 °C para posterior extração de DNA. Após a colheita dos frutos oriundos desse cruzamento, as sementes foram lavadas e postas para secar. Em seguida, sementes (F<sub>1</sub>) de um desses frutos foram semeadas em bandejas de poliestireno e mantidas em casa de vegetação até o aparecimento das primeiras folhas definitivas, aproximadamente 12 dias. No início do desenvolvimento destas mudas, foram coletadas e armazenadas, em freezer -80°C, amostras foliares da F<sub>1</sub> para extração de DNA e confirmação da hibridação via PCR, utilizando marcadores microssatélites.

### Extração de DNA e análises com microssatélites da população F<sub>1</sub>

Foram realizadas extrações de DNA das folhas dos parentais (BRS Opara e Pérola) e do F<sub>1</sub>, usando o protocolo CTAB 2x (Doyle & Doyle, 1990), com algumas modificações: 1)

maceração mecânica da folha, realizada na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó muito fino; 2) o macerado vegetal de cada amostra foi transferido para microtubos de 2 mL, contendo 950  $\mu$ L de tampão CTAB 2x; 3) as amostras foram levadas ao banho-maria a 60 °C por 30 min, com inversão destas a cada 10 min; 4) adicionou-se 950  $\mu$ L de clorofórmio: álcool isoamilílico (24:1) em cada tubo; 5) em seguida, foi feita uma centrifugação a 7.500 rpm, por 10 min; 6) após a centrifugação observou-se a formação de duas fases: na fase inferior (mais escura) ficaram depositados os resíduos orgânicos e na fase superior (aquosa) ficaram os ácidos nucleicos. Retirou-se 700  $\mu$ L da fase aquosa e transferiu-se para um novo microtubo de 1,5 mL; 7) adicionou-se 467  $\mu$ L de álcool isopropílico (gelado) em cada tubo, seguido de suaves inversões dos mesmos. Estes foram mantidos em gelo por 20 min; 8) após esse período a solução foi centrifugada a 12.000 rpm para deposição do “pellet” no fundo do tubo; 9) descartou-se o sobrenadante em um béquer, em capela de exaustão de gases; 10) foi observado se houve formação do “pellet”, este foi posto para secar em temperatura ambiente, e posteriormente ressuspendido em 30  $\mu$ L de tampão Tris-EDTA. Esta solução foi armazenada a 6 °C por 24 horas em geladeira para completa dissolução do “pellet” e em seguida, essas amostras de DNA foram tratadas 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 ‘rastro’ de DNA. As amostras de DNA foram diluídas para 50 ng/ $\mu$ L e armazenadas em freezer a -20 °C.

Cinco marcadores microssatélites (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 e MCPI\_26), desenvolvidos para melancia, por Joobeur et al. (2006) foram utilizados para inclusão da paternidade e confirmação dos híbridos. Esses SSRs foram previamente selecionados do trabalho de Gama et al. (2013), por apresentarem produtos de PCR de diferentes tamanhos, para essas cultivares. A reação de PCR foi realizada seguindo o protocolo de Joobeur et al. (2004), com algumas modificações, para um volume final de 12  $\mu$ L, contendo 50 ng de DNA, 5  $\mu$ M de cada “primer”, 0,1 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 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 de 30 ciclos a 94 °C durante 15 s, a 56 °C durante 30 s e a 72 °C durante 2 min e um ciclo final a 72 °C por 30 min.

À solução da reação de PCR foram adicionados seis microlitros de tampão desnaturante 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. 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 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 lenço de papel, o excesso foi retirado com um lenço de papel 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 45 W foi realizada antes da aplicação das amostras de PCR. Foram aplicados 2,5µL da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 6%, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente duas horas e meia, com potência constante de 45 W. O marcador de peso molecular “Ladder” 50 pb (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): 1) a placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo 10% de etanol absoluto e 1% de ácido acético por 20 min sob leve agitação; 2) lavagem com água destilada sob agitação por 1 min; 3) pré-tratamento realizado em solução de ácido nítrico 0,2 mol.L<sup>-1</sup> 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.

Para confirmação de que o resultado obtido no cruzamento entre as cultivares, tratava-se realmente de um  $F_1$ , livre de contaminação, foi observado se os híbridos apresentavam apenas o padrão alélico dos dois parentais.

### **Material vegetativo – Obtenção de população $F_2$**

Após a confirmação da hibridação usando marcadores microssatélites as mudas da população  $F_1$  foram transplantadas para o Campo Experimental de Bebedouro, Petrolina-PE, e na fase de floração foram realizadas autofecundações dessas plantas, por meio de PMC, para obtenção de população  $F_2$ . Essas plantas foram avaliadas quanto à resistência ao oídio, como descrito no item fenotipagem para resistência ao oídio. Após a colheita dos frutos, as sementes foram lavadas e postas para secar à sombra.

### **Fenotipagem para resistência ao oídio das populações $F_1$ , $F_2$ e dos parentais**

Foi realizado um último experimento de campo para avaliar a resistência/suscetibilidade ao oídio. Foram avaliadas 10 plantas de cada parental, 100 plantas da população  $F_1$  e 200 plantas da população  $F_2$  (as sementes utilizadas foram oriundas de um único fruto). Na fase inicial de desenvolvimento das mudas foram coletadas amostras foliares jovens e sadias da população  $F_2$  e foram conservadas em freezer a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para posterior extração de DNA.

Após o período de floração, foi realizada inoculação do oídio, utilizando uma suspensão de água estéril, o oídio de melancia, na concentração de  $10^6$  conídios/ml e um espalhante adesivo (“Tween 80”). A solução foi pulverizada sobre as populações  $F_1$ ,  $F_2$  e os parentais utilizando um pulverizador costal. No final do ciclo as plantas foram avaliadas utilizando-se uma escala de cinco notas, desde ausência de oídio à infecção severa (**0** = 0 colônias; **1** = 1-30 colônias; **2** = 31-60 colônias; **3** = 61-90 colônias; **4** = >90 colônias (Dias et al., 1999). As plantas que apresentaram 0-30 colônias foram consideradas resistentes e, as que apresentaram mais de 31 colônias foram consideradas suscetíveis.

### **Genotipagem de população $F_2$ para resistência ao oídio usando marcadores microssatélites**

Inicialmente foi realizado um “screening”, com 116 marcadores microssatélites desenvolvidos para melancia (Jarret et al., 1996; Guerra-Sánz, 2002; Joobeur et al., 2006; Ren et al., 2012). A fim de selecionar aqueles “primers” que apresentassem produto de PCR de tamanhos diferentes entre os parentais. Esses foram utilizados para analisar cinco indivíduos resistentes e cinco suscetíveis da população  $F_2$ , para identificar alelos que estivessem presentes nos indivíduos resistentes e ausentes nos indivíduos suscetíveis ou vice-versa. Em seguida, aqueles “primers” em que foi possível verificar essa característica foram utilizados para genotipar os 200 indivíduos da população  $F_2$ . A metodologia utilizada para extração de DNA, reação de PCR, usando marcadores microssatélites e revelação dos géis de poliacrilamida foi a mesma descrita anteriormente no tópico extração de DNA e análises com microssatélites da população  $F_1$ .

### **Análises estatísticas e identificação da região cromossômica da resistência ao oídio**

Os dados foram anotados ‘b’ para os genótipos dominantes (‘AA’) e heterozigotos (Aa) e ‘d’ para os recessivos (‘aa’). Os dados obtidos pelos marcadores microssatélites e pela avaliação visual de resistência/ suscetibilidade ao oídio, foram submetidos ao teste de qui-quadrado a 0,05 para verificação do padrão mendeliano de segregação esperado na população  $F_2$  de 3:1. As análises de ligação foram realizadas utilizando o programa JoinMap versão 2.0 (Stam & Van Ooijen, 1995) e os valores obtidos pelas frequências de recombinação foram convertidos em mapas de distância genética (centiMorgan) usando a função Kosambi (Kosambi, 1944).

Foi realizado um “blast” da sequência dos “primers” e de seus produtos de PCR, ligados à resistência ao oídio, no genoma da melancia disponível em: <http://www.icugi.org> (Guo et al. 2013), para localizar em que cromossomo esses “primers” se encontram.

### **Validação de marcadores microssatélites ligados à resistência ao oídio**

Os três marcadores microssatélites ligados à resistência ao oídio, identificados no presente trabalho, foram analisados em 17 cultivares comerciais de melancia ‘Minipool’, ‘Pérola’, ‘Smile’, ‘BRS Soleil’, ‘BRS Kuarah’, ‘BRS Opara’, ‘Crimson Sweet’, ‘Crimson Select’, ‘Nova Crimson’, ‘Top gun’, ‘Omaru Yamato’, ‘Sugar Baby’, ‘Fairfax’, ‘Emperor Charleston Bonanza’, ‘Charleston Gray’, ‘Peacock’ e ‘Sunshade’, todas estas cultivares, exceto a cultivar BRS Opara, têm em comum o fato de serem suscetíveis ao oídio.

## 2.3 RESULTADOS

### **Verdadeiros F<sub>1</sub>s identificados por marcadores microssatélites**

O método de Polinização Manual Controlada utilizado foi eficaz para a obtenção das populações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, oriundas do cruzamento das cultivares BRS Opara x Pérola, livre de contaminação. Os cinco marcadores microssatélites (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 e MCPI\_26) utilizados para confirmação da hibridação, foram capazes de discriminar a população F<sub>1</sub> de seus parentais. Os indivíduos da população F<sub>1</sub> apresentaram apenas os alelos do genitor feminino (BRS Opara) e do genitor masculino (Pérola).

### **A resistência ao oídio é condicionada por um alelo dominante**

Na fenotipagem das populações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e dos parentais para resistência ao oídio, observou-se que: os parentais estavam em homozigose para a resistência e suscetibilidade ao oídio, uma vez que, 100% das plantas avaliadas da ‘BRS Opara’ mostraram-se resistentes e 100% das plantas da ‘Pérola’ mostraram-se suscetíveis; na população F<sub>1</sub> 100% das plantas foram resistentes e na população F<sub>2</sub> 158 (79%) das plantas foram resistentes e 42 (21%) foram suscetíveis. Os valores observados em campo, para a resistência ao oídio, na população F<sub>2</sub>, não diferiram estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade dos valores esperados (Tabela 1). O estudo realizado na população F<sub>2</sub> para segregação da resistência ao oídio indica que a resistência à doença é condicionada por um gene dominante, segregando na proporção 3:1.

### **Três marcadores microssatélites ligados ao oídio em melancia**

O “screening” realizado com os 116 marcadores microssatélites desenvolvidos para melancia, revelou apenas doze pares de “primers” com polimorfismo entre os parentais (Tabela 2). Destes, apenas três apresentaram o padrão alélico esperado, com presença de alelo nos indivíduos resistentes e ausência nos suscetíveis (Figura 1). Os três marcadores foram: MCPI\_11, o CYSTSIN, e o BVWS02441 desenvolvidos por Joobeur et al. (2006), Guerra-Sánz (2002) e Ren et al. (2012), respectivamente. Estes três marcadores foram utilizados para genotipar a população F<sub>2</sub> de 200 indivíduos (Figuras 1, 2 e 3), sendo observada a presença de apenas nove indivíduos recombinantes para os marcadores citados. As análises de ligação



mostraram que os microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441 estão ligados ao gene de resistência ao oídio em melancia, a uma distância de 2,6 cM com LODs 'score' de 31,42.

O "blast" das sequências dos três pares de "primers", ligados à resistência ao oídio, e de seus produtos de PCR, feito no genoma da melancia disponível em: <http://www.icugi.org>, mostraram que o gene relacionado com a resistência ao oídio está no cromossomo dois e que os três marcadores em questão, estão muito próximos um do outro, com uma distância aproximada de: 1) MCPI\_11 ao BVWS02441 57,44 kb 2) BVWS02441 ao CYSTSIN 33,82 kb, e 3) MCPI\_11 ao CYSTSIN 91,26 kb.

A análise dos marcadores microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441 em 17 cultivares comerciais de melancia, revelou que a cultivar BRS Opara (resistente ao oídio) tem um alelo diferente de todas as demais cultivares analisadas (suscetíveis ao oídio) para os três marcadores analisados (Figura 4).

## 2.4 DISCUSSÃO

Os marcadores microssatélites MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 e MCPI\_26, utilizados, para confirmar a hibridação entre as cultivares utilizadas: 'BRS Opara' e 'Pérola' podem ser usados como ferramenta na identificação e em análises de parentesco de híbridos de melancia envolvendo essas cultivares. Em muitos casos, quando não é possível confirmar a hibridação, diferenciar um híbrido de seus parentais, ou mesmo confirmar sua paternidade, com base apenas em descritores morfológicos, marcadores moleculares, tais como os marcadores microssatélites, são uma alternativa. A ampla utilização desse marcador em estudos genéticos, inclusive em testes de paternidade, deve-se ao fato de serem co-dominantes, multialélicos, altamente reprodutíveis e de ampla resolução (Varshney, 2005; Oliveira et al., 2006).

Os resultados obtidos na fenotipagem das populações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e de seus parentais para resistência ao oídio em melancia, se ajustam a segregação mendeliana de 3:1 (resistentes: suscetível) com dominância do gene que confere resistência a doença. Com isso, pode-se verificar que a herança da resistência, na fonte utilizada, é monogênica e dominante. Esses resultados corroboram com Borges (1996), que também realizou estudo de herança em linhagens do programa de melhoramento de melancia que deram origem a cultivar BRS Opara. Esse padrão tem sido observado há cerca de 20 anos e se mantém até os dias atuais. Na Coreia do Sul, Kim et al. (2013) relataram que a resistência ao oídio, raça 1W, é monogênica e parcialmente dominante. Já nos Estados Unidos, Davis et al. (2002) afirmaram que a

resistência à raça 1W é multigênica. Não é possível afirmar se são raças diferentes, se está havendo alguma especiação dessa raça dependendo do local, ou, se por serem fontes de resistência diferentes, se comportam de forma diferente quanto ao tipo de herança da resistência ao patógeno. Apesar de limitados, os dados disponíveis sugerem que a distribuição geográfica de raças é complexa e mutável com o passar do tempo (Mohamed et al., 1995; Sowell, 1982). Portanto, o melhor local para se avaliar fontes de resistência a alguma doença de planta e desenvolver programas de melhoramento genético com o objetivo de transferir a resistência para cultivares de interesse, são aquelas regiões onde o hospedeiro cresce naturalmente ou é cultivado por muitos anos, permitindo somente a sobrevivência de hospedeiros resistentes ao patógeno.

Na genotipagem da população  $F_2$  para resistência ao oídio, usando marcadores microssatélites, os resultados mostraram três marcadores SSRs (MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441) que são capazes de identificar alelos presentes em plantas resistentes e ausentes em plantas suscetíveis. Estes marcadores microssatélites identificaram apenas nove indivíduos recombinantes em uma população de 200 indivíduos. A base genética de mapas de ligação é a recombinação genética resultante do “crossing over” entre cromossomos homólogos durante a meiose. A recombinação genética é medida pela fração de recombinação, que é a razão entre gametas recombinantes e o total de gametas. Quanto mais perto estão dois locus em um cromossomo, menor será a chance de recombinação entre eles; quanto mais afastados, maior será o número de recombinantes (Liu, 1997). As análises feitas no JoinMap 2.0 mostraram que os microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441 estão ligados ao gene que confere resistência ao oídio a uma distância de 2,6 cM com LODs ‘score’ de 31,42. Isso significa que esses marcadores estão muito próximos do alelo que confere a resistência a este patógeno em melancia e são aptos para serem utilizados na seleção assistida por marcadores para esta característica, acelerando bastante os programas de melhoramento de melancia, visando resistência ao oídio.

Marcadores moleculares, quando associados a características fenotípicas, tais como a resistência ao oídio, podem agilizar os programas de melhoramento. Alpuerto et al. (2009) estimaram que, com a utilização da seleção assistida por marcadores no programa de melhoramento de arroz para tolerância a salinidade e deficiência de fósforo, houve uma redução de 3 a 6 anos para o desenvolvimento de uma nova cultivar, em relação ao melhoramento convencional, esse tempo pode variar em função da cultura. Os marcadores identificados no presente trabalho, como ligados à resistência ao oídio, permitem selecionar plantas resistentes homocigotas ou heterocigotas para a resistência a esta doença, bem como

plantas suscetíveis ainda no estágio de plântula, o que gera economia de tempo, espaço e dinheiro, uma vez que, permite ao melhorista levar adiante no programa de melhoramento apenas as plantas que apresentem a característica de interesse. A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é rápida e segura, sendo na atualidade, de fundamental importância para o processo de desenvolvimento de novas cultivares (Demore, 2008). Vale salientar que os marcadores moleculares não vão substituir todas as avaliações fenotípicas, mas sim auxiliá-las.

Os resultados da validação dos marcadores microssatélites MCPI\_11 e CYSTSIN e BVWS02441 reforçam a utilização desses marcadores na seleção assistida visando resistência ao oídio. Uma vez que, esses marcadores foram analisados em 17 cultivares comerciais de melancia, e, como pode ser observado na Figura 4, a cultivar BRS Opara (resistente ao oídio) apresentou um padrão alélico único, distinto de todas as demais cultivares analisadas, que são suscetíveis ao oídio.

Poucos estudos têm sido encontrados na literatura reportando a associação de marcadores moleculares a características fenotípicas em melancia. Kim et al. (2013) analisaram 5493 “primers” RAPDs (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) e identificaram um marcador (OP-R483) ligado a resistência ao oídio raça 1W a uma distância de 3,6 cM. Em seguida esses autores clonaram a marca encontrada com esse marcador e converteram em SCAR1-F e SCAR1-R, correspondente ao locus OP-S483. O alinhamento das sequências obtidas com OP-S483 e OP-R483 revelou cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que foram utilizados para desenvolvimento de marcador CAPs (“cleaved amplified polymorphic sequence”).

A comparação entre os dados deste trabalho e os dados do trabalho de Kim et al. (2013) é difícil, uma vez que são fontes de resistência diferentes e os autores deste último não disponibilizaram a sequência do primer (OP-R483). Dessa forma não é possível verificar, se este e os marcadores microssatélites revelados neste trabalho, estão na mesma região cromossômica.

Lin et al. (2009) analisaram mais de 300 “primers” RAPD quanto à capacidade de identificar genótipos resistentes e suscetíveis à doença vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (fusário) em populações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, oriundas do cruzamento da cultivar Sugar Baby (suscetível) e uma linha melhorada de Sugar Baby, denominada JSB (resistente). O primer OP-G05 revelou um fragmento presente em todas as populações resistentes, denominado JSB-OP05898, que foi clonado, sequenciado e utilizado para desenhar “primers” SCARs (“Sequence Characterized Amplified Region”). Os autores afirmaram que o SCAR

desenvolvido nesse estudo é capaz de diferenciar de forma rápida e segura genótipos de melancia resistentes e suscetíveis ao fusário e que isso pode acelerar os programas de melhoramento. Futuramente, esses autores pretendem encontrar mais marcadores ligados à resistência à murcha de fusário e utilizá-los para isolar o gene de resistência. Prothro et al. (2012) identificaram um QTL, denominado M-QTL no LG 2 como candidato para a seleção assistida por marcadores para tamanho de sementes de melancia.

Considerando outras culturas de importância econômica, a seleção assistida por marcadores moleculares tem sido bem utilizada em programas de melhoramento. Como por exemplo no milho: Gupta et al. (2013) introgridiram, com sucesso, o alelo *opaque 2* (*O2*) para as linhas parentais de um milho híbrido por meio de retrocruzamento assistido por marcadores genéticos seguido por reconstituição do híbrido original, com teores de lisina e triptofano melhorados. Os autores conseguiram aumentar o teor de lisina em 30 % e o de triptofano em 41%. Em todas as etapas do programa de melhoramento foram utilizados marcadores microssatélites para selecionar, ainda na fase de plântula, os materiais que apresentavam a marca do alelo *O2*.

Apesar de tímidos, estudos buscando associar marcadores moleculares a características agronomicamente desejáveis em melancia, estão sendo realizados e, deve-se enfatizar a importância dos mesmos para o avanço dos programas de melhoramento desta espécie. São evidentes os benefícios da seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas, uma vez que estes vêm somar às avaliações do melhoramento clássico e acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares. Pois a avaliação pode ser feita em qualquer fase de desenvolvimento da planta sem que haja interferência ambiental e, além disso, é possível avaliar um grande número de genótipos por vez.

Grandes avanços foram obtidos nos estudos moleculares em melancia, principalmente com a disponibilização do genoma desta cultura por Guo et al. (2013). O estudo feito por estes autores possibilitou identificar em que cromossomo estão os marcadores microssatélites, MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441, ligados à resistência ao oídio e quais os genes estão nessa região.

## 2.5 CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441, localizados no cromossomo dois, estão intimamente ligados com a resistência ao oídio e podem oferecer suporte para programas de melhoramento de melancia que visem resistência a esta doença e

outras características agronômicas desejáveis. Bem como, a identificação da região cromossômica, em que se encontram estes marcadores, facilitará estudos futuros para identificar o gene que confere resistência ao oídio em melancia.

## 2.6 REFERÊNCIAS

- Agriannual: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, 2014. p. 341-344.
- Alpuerto Vida-Lina EB, Norton GW, Alwang J, Ismail AM (2009) Economic Impact Analysis of Marker-Assisted Breeding for Tolerance to Salinity and Phosphorous Deficiency in Rice. *Appl Econ Perspect Polp.* 31(4): 779–792.
- Bhering LL, Pinto CABP, Benites, FRG, Leite ME, Silva FL (2009) Seleção assistida por marcadores para teor de matéria seca e açúcares redutores em tubérculos de batata. *Cienc Rural* 39: 8-44.
- Borges RME, (1996) Estudo da herança da resistência ao oídio *Sphaerotheca fuliginea* (Schelecht. ex Fr.) Poll em melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco.
- Caixeta ET, Oliveira ACB de, Brito GG de, Sakuyama NS (2009) Tipos de marcadores moleculares. In: Borém A e Caixeta ET (ed) *Marcadores moleculares*, 2ª Ed. UFV, Viçosa.
- Cohen Y, Baider A, Petrov L, Sheck L, Voloisky V (2000) Cross-infectivity of *Sphaerotheca fuliginea* to watermelon, melon, and Cucumber. *Acta Hortic.* 510:85-88.
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Bio Rep.* 19: 299-306.
- Davis AR, Bruton BD, Pair SD, Thomas CE (2001) Powdery Mildew: An Emerging Disease of Watermelon in the United States. *Cucurbit Genet Coop Rep.* 24:42-48.
- Davis AR, Levi A, Tetteh A, Wehner, T, Pitrat P (2007) Evaluation of Watermelon and Related Species for Resistance to Race 1W Powdery Mildew. *J Amer Soc Hort Sci.* 132(6):790-795.
- Davis AR, Thomas CE, Levi A, Bruton BD, Pair SD (2002) Watermelon resistance to powdery mildew race 1. In: Maynard DN (ed) *Cucurbitaceae*, ASHS Press, Alexandria.

- Demore P dos S (2008) Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites para resistência ao oídio em soja. Dissertação, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Dias R de CS, Costa ND, Queiróz, MA de, Faria CMB de (2001) Cultura da melancia. Embrapa Semiárido, Petrolina.
- Dias R de CS, Queiróz MA de, Costa ND, Souza F de F, Almeida MCB, Araújo HM, Liberalino Filho F, Pereira AB, Bahia J, Lima RNS, Anjos JB dos, Pereira FA, Alves DC, Araujo JP (2007) BRS Opara: melancia resistente ao oídio. Embrapa Semiárido, Petrolina, Folder.
- Dias R de CS, Queiróz MA de; Menezes M, Borges RME (1999) Avaliação de resistência a *Sphaerotheca fuliginea* e a *Didymella bryoniae* em melancia. Horti Bras. 17: 13- 19.
- Doyle JJ e Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.
- Gama RNCS; Santos CAF, Dias R de CS, Souza F de F (2013) Molecular characterization of watermelon cultivars using microsatellite markers. Horti Bras. 31: 522-527.
- Guerra-Sanz JM (2002) Citrullus simple sequence repeats markers from sequence databases. Mol Ecol Notes. 2: 223-225.
- Guo S. Zhang J, Sun H et al (2013) The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. Nat Genet. 45: 51-60.
- Gupta, H.S.; Babu, R.; Agarwal, P.K.; Mahajan, V.; Hossain F, Thirunavukkarasu, N (2013) Accelerated development of quality protein maize hybrid through marker-assisted introgression of *opaque-2* allele. Plant Breeding 132:77-82.
- Jahn M, Munger HM, McCreight JD (2002) Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver LW (ed) The powdery mildews: A comprehensive treatise. APS Press, St. Paul.
- Jarret RL, Merrick LC, Holms T, Evans J, Aradhya MK (1996) Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai). Genome. 40: 433-441.

- Joobeur T, Gusmini, G, Zhang A, Levi A, Xu Y, Wehner TC, Oliver M, Dean RA (2006) Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or Arabidopsis genomes. *Theor and Appl Genet.* 112: 1553-1562.
- Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, Thomas CE, Dean RA (2004) The fusarium resistance locus From-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J.* 39: 283-297.
- Kim K-H, Ahn S-G, Hwan J-H, Choi Y-M, Moon H-S, Park Y-H (2013) Inheritance of resistance to powdery mildew in the watermelon and development of a molecular marker for selecting resistant plants. *Hortic Environ Biotechnol.* 54: 134-140.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugenetic.* 12: 172-175.
- Lin Y-H, Chen K-S, Liou T-D, Huang J-W, Chang P-F L (2009) Development of a molecular method for rapid differentiation of watermelon lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*. *Bot Stud.* 50: 273-280.
- Liu, BH (1997) *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*, 1st edn. CRC Press, New York.
- Mohamed YF, Bardin M, Nicot PC (1995) Causal agents of powdery mildew of cucurbits in Sudan. *Plant Dis.* 79: 634-635.
- Mohr HC (1986) Watermelon breeding. In: Basset MJ (ed) *Breeding vegetables crops*. Westport: Avi, pp 33-66.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Bio.* 29:294-307.
- Prothro J, Sandlin K, Abdel-Haleem H, Bachlava E, White V, Knapp S, McGregor C (2012) Main and Epistatic Quantitative Trait Loci Associated with Seed Size in Watermelon. *JASHS* 137: 452-457.
- Queiróz MA de, Dias R de CS, Souza F de F, Ferreira MAJ da F, Assis JGA, Borges, RM E, Romão RL, Ramos SRR, Costa MSV, Cruz M da, Moura CL (1999) Recursos genéticos e melhoramento de melancia no Nordeste brasileiro. In: Queiróz MA de, Goedert CO, Ramos SRR. *Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro*.

- Embrapa Semiárido/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. Embrapa Semiárido, Disponível em: <http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livroorg/melancia.pdf>. Acessado em 20 de agosto de 2014.
- Reis A e Buso JA (2004) Levantamento preliminar de raças de *Sphaerotheca fuliginea* no Brasil. Horticult Bras. 22: 628-631.
- Reis A, Dias R de CS, Aragão FAS, Boiteux LS (2005) Caracterização do perfil patogênico de isolados de *Podosphaera xanthii* obtidos em cucurbitáceas na região Nordeste do Brasil. Horticult Bras. 23: 362-362.
- Ren Y, Zhao H, Kou Q, Jiang J, Guo S, Zhang H, Hou W, Zou X, Sun H, Gong G, Levi A, Xu Y (2012) A High Resolution Genetic Map Anchoring Scaffolds of the Sequenced Watermelon Genome. Plos One 7: 1-10.
- Sowell G (1982) Population shift of *Sphaerotheca fuliginea* on muskmelon from race 2 to race 1 in the southeastern United States. Plant Dis. 66: 130-131.
- Souza RC, Araújo JP, Queiróz MA (1988) Avaliação da resistência de acessos de melancia ao oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). Horticult Bras. 6(1) p. 82.
- Stam P, Van Ooijen JW (1995) *JOINMAP TM version 2.0*: software for the calculation of genetic maps. Wageningen, The Netherlands: CPRO-DLO.
- Terao D, Castro JM da C, Lima MF, Batista D da C, Barbosa MAG, Reis A, Dias R de CS Doenças (2010) In: Dias R de CS, Resende GM, Costa ND (ed) Sistema de produção de melancia. Publicado por Embrapa Semiárido. <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/doencas.htm>>. Acesso em: 06 de fevereiro de 2014.
- Tetteh AY, Wehner TC, Davis AR (2010) Identifying Resistance to Powdery Mildew Race 2W in the USDA-ARS Watermelon Germplasm Collection. Crop Sci. 50:933–939.
- Tetteh AY, Wehner TC, Davis AR (2013) Inheritance of Resistance to the New Race of Powdery Mildew in Watermelon. Crop Sci. 53: 880-887.
- Varshney RK, Garner A, Sorells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotechnol. 23: 48–63.



**Tabela 1.** Número de plantas analisadas para resistência ou suscetibilidade ao oídio nas cultivares de melancia ‘BRS Opara’ e ‘Pérola’ e nas populações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>.

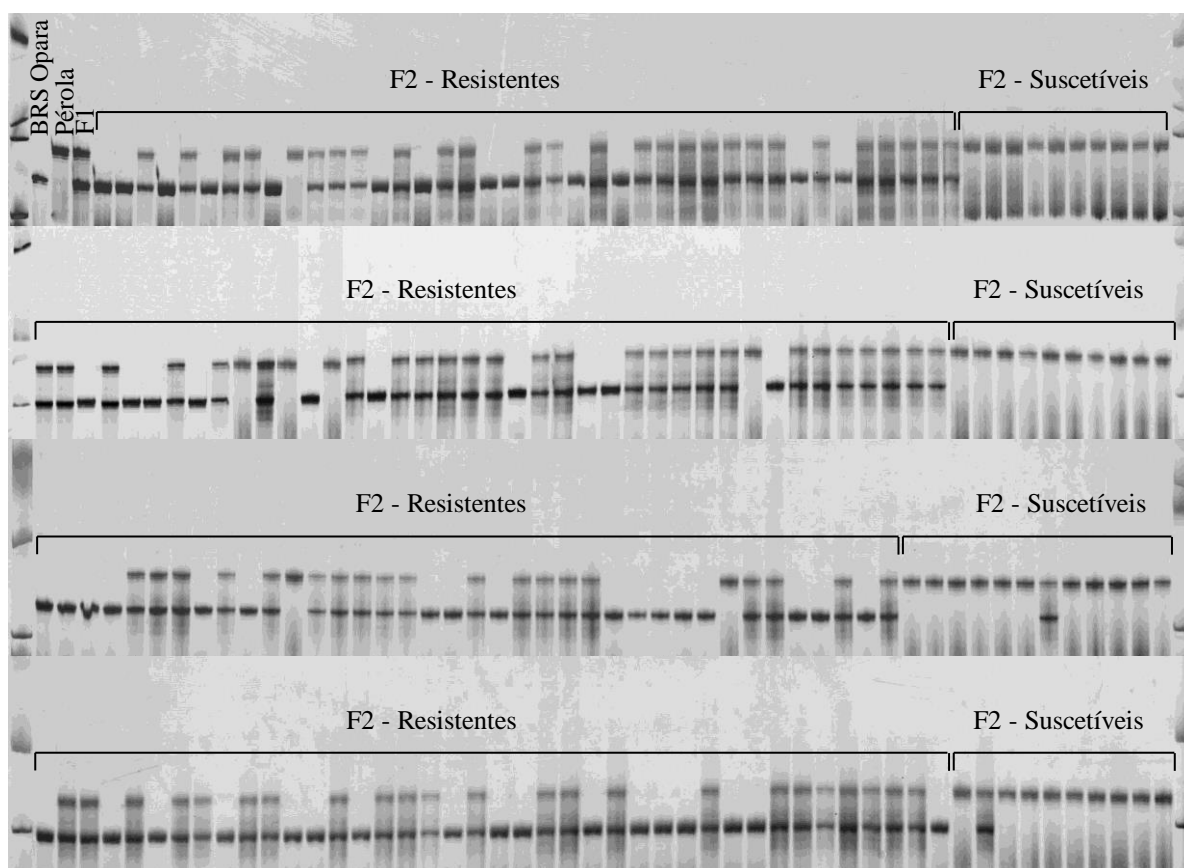
<b>Resistência ou suscetibilidade ao oídio</b>			
	Número de Plantas avaliadas	Plantas resistentes	Plantas suscetíveis
BRS Opara	30	30 (100%)	0
Pérola	30	0	30 (100%)
População F <sub>1</sub>	40	40 (100%)	0
População F <sub>2</sub>	200	158(79%) <sup>NS</sup>	42(21%) <sup>NS</sup>

<sup>NS</sup> Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste Qui-quadrado.

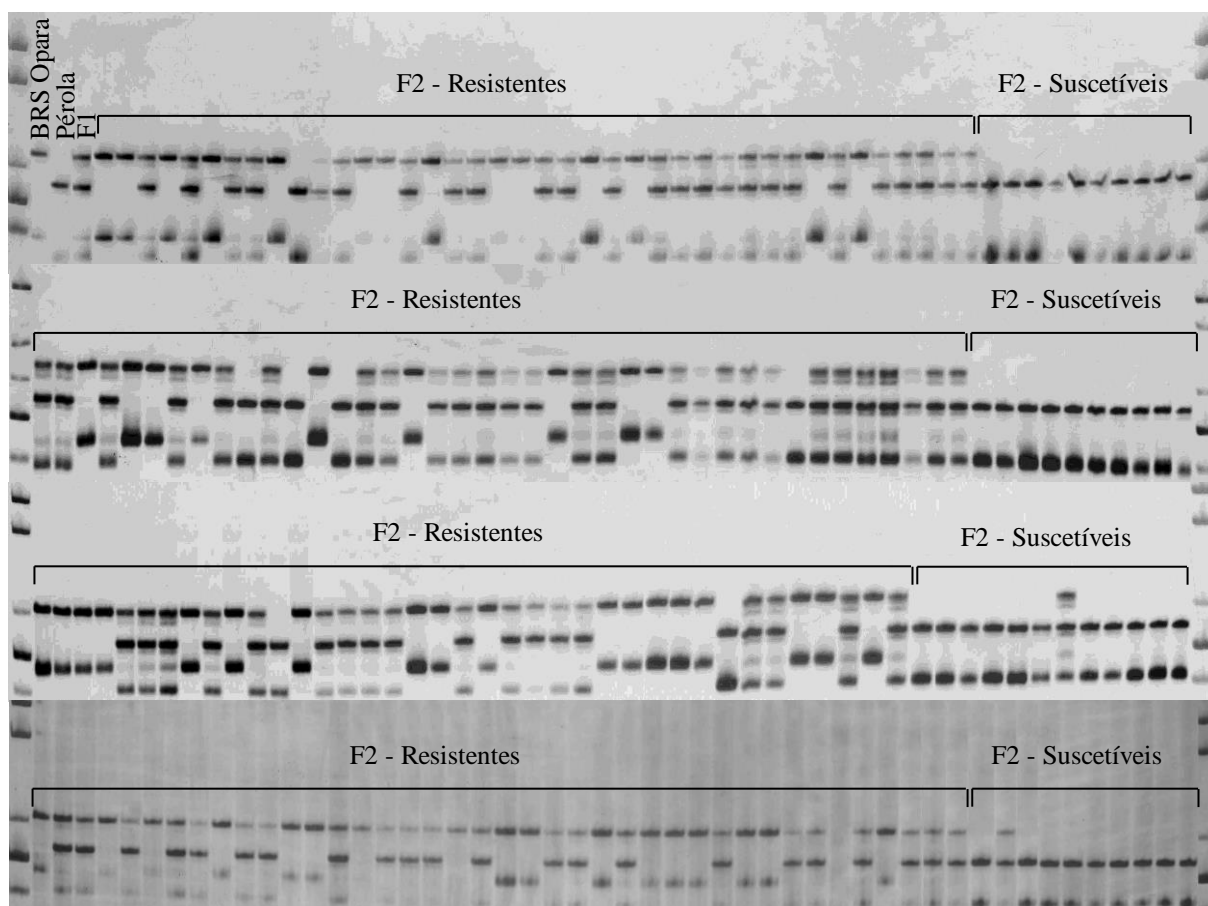
**Tabela 2.** Nome e sequência dos “primers” que foram polimórficos entre as cultivares ‘BRS Opara’ e ‘Pérola’, dentre os 116 microssatélites analisados.

<b>Nome do primer</b>	<b>Sequencia do primer</b>
MCPI_04 <sup>a</sup>	AGCAAATGCATGGGGAAAAC/TGTTGAATGGAGGCTTTGAG
MCPI_05 <sup>a</sup>	ATTTCTGGCCCCAGTGTAAG/GAACAACGCAACCACGTATG
MCPI_11 <sup>a</sup>	GAGCAGGGGAGAAGGAAAAC/CCAGTAGCTTTTTCCGATGC
MCPI_16 <sup>a</sup>	TGCTCAATCCACCCTTTCTC/AAAAACAGCAACTCTCCCATC
MCPI_26 <sup>a</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAACC
CYSTSIN <sup>b</sup>	ATTTTCTTGCTTCAAATGGA/ATAAGCAAAGCATCGAAAG
EST00680 <sup>b</sup>	CCTTATCTCAACTCTTTTCGGA/AGGATTGGGCTTGATTGTTG
BVWS00241 <sup>c</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAACC
BVWS2447 <sup>c</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAACC
BVWS01050 <sup>c</sup>	GAATTTGCTTCAGCCTTTGG/TTCATTTCTAGGTTGGTTTTAAGATTT
BVWS02384 <sup>c</sup>	TCCAAGTGGCTTGCTCTTTT/TCTCAACCTCAAATTCCGAGA
BVWS01358 <sup>c</sup>	CCCTATTGCCTATTTTTCTCAA/AAATTTGTGCTCTTCGTGGG

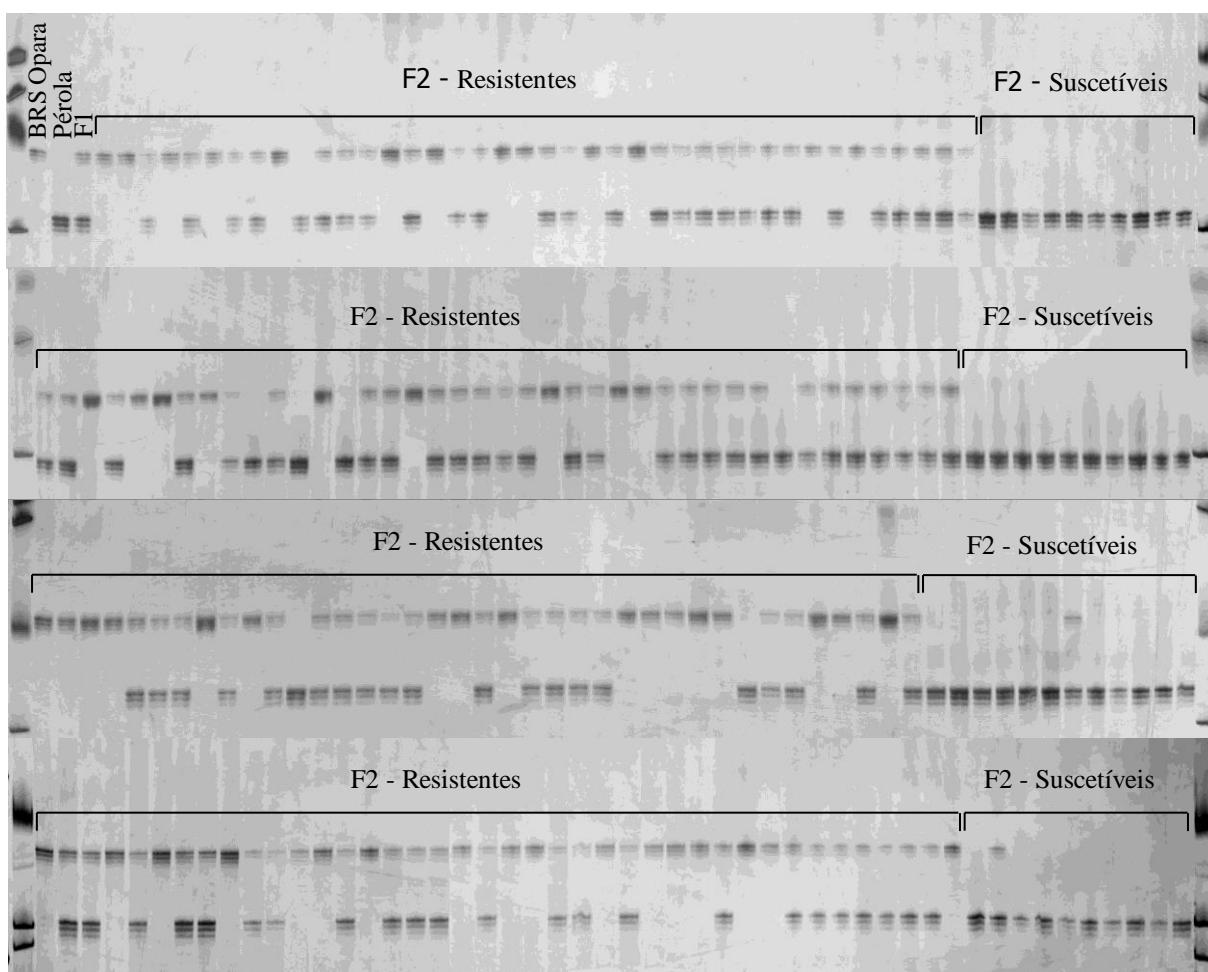
<sup>a</sup>“Primers” desenvolvidos por Joobeur et al. (2006); <sup>b</sup>“Primers” desenvolvidos por Guerra-Sánz (2002); <sup>c</sup>“Primers” desenvolvidos por Ren et al. (2012).



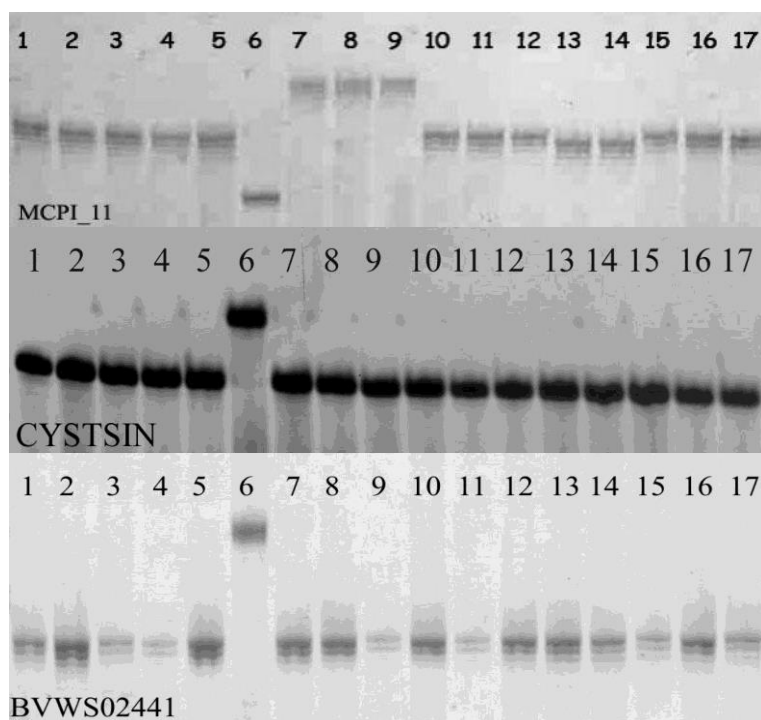
**Figura 1.** Padrão alélico da cultivar BRS Opara (resistente), da cv. Pérola (suscetível), da F<sub>1</sub> e de 200 indivíduos da população F<sub>2</sub> utilizando o marcador microssatélite MCPI-11 associado à resistência ao oídio em melancia.



**Figura 2.** Padrão alélico da cultivar BRS Opara (resistente), da cv. Pérola (suscetível), da F<sub>1</sub> e de 200 indivíduos da população F<sub>2</sub> utilizando o marcador microssatélite CYSTSIN associado à resistência ao oídio em melancia.



**Figura 3.** Padrão alélico da cultivar BRS Opara (resistente), da cv. Pérola (suscetível), da F1 e de 200 indivíduos da população F<sub>2</sub> utilizando o marcador microssatélite BVWS02441 associado à resistência ao oídio em melancia.



**Figura 4.** Padrão alélico para dois locos microssatélites, ligados à resistência ao oídio, avaliados em 17 cultivares de melancia. Cultivares: 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.

### **3. CAPÍTULO II – MARCADORES MICROSSATÉLITES LIGADOS AO LOCUS DO PADRÃO DE LISTRAS DE FRUTOS DE MELANCIA<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Apêndice B - Artigo Microsatellite markers linked to the locus of the watermelon fruit stripe pattern, publicado na Genetics and Molecular Research, disponível em: <http://www.geneticsmr.com//year2015/vol14-1/pdf/gmr5172.pdf>

## RESUMO

O desempenho agronômico, a aparência externa e interna de frutos de melancia são características importantes que devem ser levadas em consideração durante o desenvolvimento de uma nova cultivar, bem como os principais elementos de identificação da mesma pelo consumidor ocorrem pela aparência externa e qualidade do fruto. Externamente, o fruto pode ser caracterizado quanto ao formato, cor de fundo da casca, presença de sulcos e presença de listras, sendo que estas podem ser claramente definidas ou difusas. O objetivo desse trabalho foi identificar marcadores microssatélites ligados ao padrão de listras de frutos de melancia, para auxiliar em programas de melhoramento de melancia na seleção dessa característica ainda na fase de plântula. Plantas dos parentais, de F<sub>1</sub>S e F<sub>2</sub> resultantes do cruzamento entre as cultivares ‘BRS Opara’ (listras claramente definidas) e ‘Pérola’ (listras difusas) foram fenotipadas quanto ao padrão de listras de frutos de melancia. O protocolo CTAB 2X foi utilizado para extração do DNA e foram analisados 116 marcadores microssatélites em um grupo de plantas F<sub>2</sub> que possuíam frutos com padrão de listras claramente definidas e um grupo de plantas que possuíam frutos com listras difusas. Os locus microssatélites MCPI\_05 e MCPI\_16 apresentaram ligação ao padrão de listras de frutos de melancia a uma distância de 1,5 e 1,8 cM, respectivamente com LODs ‘score’ de 39,28 e 38,11, respectivamente, e estão localizados no cromossomo seis no genoma da melancia. Esses marcadores poderão ser utilizados no processo de seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento de melancia de várias instituições de pesquisa.

**Palavras-chave:** *Citrullus lanatus*; padrão externo de frutos; seleção assistida; SSR

## ABSTRACT

Agronomic performance and external and internal appearance of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit are important traits that should be taken into consideration during the development of a new cultivar, as well as being the principal identification elements used by the consumer, which are based on the external appearance and quality of the fruit. Externally, the fruit can be characterized in terms of the shape, the color of the lower rind, and the presence of grooves and stripes, the stripes can be classified as clearly defined or diffuse. The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to the stripe pattern of watermelon fruit to support watermelon improvement programs, with the selection of this characteristic in the plantlet stage. F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> populations, result of a cross between the cultivars BRS Opara (clearly defined stripes) and Pérola (diffuse stripes), were phenotyped for their fruit stripe pattern. The CTAB 2X protocol was used for DNA extraction and 116 microsatellite markers were examined in a group of F<sub>2</sub> plants that had fruit with well-defined stripes and fruit with diffuse stripes. The microsatellite loci MCPI\_05 and MCPI\_16 exhibited a linkage to the stripe pattern at a distance of 1.5 and 1.8 cM, respectively, with LOD scores of 39.28 and 38.11, respectively, which were located on chromosome six of the watermelon genome. These markers can be used in marker-assisted selection in watermelon improvement programs, by various research institutions.

**Keywords:** *Citrullus lanatus*; fruit external pattern; assisted selection; SSR



### 3.1 INTRODUÇÃO

A melancia é uma Cucurbitaceae cultivada em todo o mundo. Atualmente, há várias cultivares desta espécie, que diferem entre si quanto ao padrão externo dos frutos, cor da polpa, teor de sólidos solúveis, produtividade, resistência a pragas e doenças, precocidade, dentre outras características agronomicamente desejáveis. Um resumo das características morfológicas das principais cultivares de melancia é apresentado por Dias et al. (2010) e Gama et al. (2013).

Durante o processo de desenvolvimento de uma nova cultivar é preciso considerar os possíveis clientes: produtor, indústria e o consumidor (Borém e Miranda, 2013). De acordo com Dias et al. (2010), no Brasil, a cultivar Crimson Sweet e tipos semelhantes, que é de origem americana e possui o padrão de listras claramente definidas, é a mais plantada, respondendo praticamente por mais de 90% do fornecimento ao mercado consumidor. Na escolha da cultivar para o plantio, deve-se considerar o tipo de fruto preferido pelo mercado consumidor, sua resistência ao transporte, a adaptação da cultivar a região, a tolerância a doenças e a distúrbios fisiológicos. Dessa forma, um programa de melhoramento genético deve seguir várias vertentes, desde resistência a doenças e pragas, maior produtividade até a aparência externa e interna do fruto, uma vez que a aparência é o elemento de identificação da cultivar pelo consumidor.

De acordo com a lista de descritores morfológicos para melancia disponível no site do Ministério da Agricultura, o padrão externo de frutos de melancia pode ser caracterizado quanto ao formato do fruto, cor de fundo da casca, presença de sulcos, presença de listras - estas são classificadas em claramente definidas e difusas, intensidade de coloração e largura das listras; o padrão interno do fruto pode ser caracterizado quanto à espessura do pericarpo, coloração e firmeza da polpa (BRASIL, 2009).

O processo de seleção para o padrão dos frutos de melancia pelas técnicas do melhoramento clássico, só pode ser feito na fase de frutificação ou durante a colheita, o que levaria em torno de 40 ou 80 dias após o semeio, respectivamente. Técnicas biotecnológicas, tais como marcadores moleculares, permitem a seleção de indivíduos com base no seu genótipo, independentemente de fatores bióticos ou abióticos e em qualquer fase de desenvolvimento da planta. Dessa forma, a identificação de marcadores moleculares ligados a características fenotípicas, tais como o padrão de listras de frutos de melancia, permite selecionar o tipo de padrão externo do fruto, desejado, ainda na fase de muda, além de

permitir melhor conhecimento dos caracteres herdados entre as progênies e redução do número de indivíduos a serem avaliados posteriormente em campo (Bhering et al., 2009).

A seleção assistida por marcadores (SAM) tende a agilizar os programas de melhoramento, uma vez que a seleção pode ser feita ainda nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, sendo na atualidade, de fundamental importância para o processo de desenvolvimento de novas cultivares (Demore, 2008). Vários marcadores moleculares associados a diferentes características fenotípicas permitirão fazer a seleção assistida por marcadores, agregando várias características de interesse em uma nova cultivar.

Os marcadores microssatélites também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”) consistem em unidades de cerca de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, ou seja, uma após a outra (Oliveira et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Têm sido desenvolvidos para várias espécies de plantas cultivadas e estão substituindo rapidamente outros tipos de marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente, devido à sua reprodutibilidade e simplicidade da técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (Caixeta et al., 2009).

Gama et al. (2013) utilizaram 36 marcadores moleculares microssatélites para caracterizar 17 cultivares de melancia, observando a formação de dois grupos entre essas cultivares e que todas as cultivares que apresentam o padrão de listras difusas ficaram agrupadas no grupo I e as que possuem o padrão de listras claramente definidas no grupo II. Ainda nesse trabalho, observou-se que, para os marcadores MCPI-05 e MCPI-16, todas as cultivares que possuem padrão de listras claramente definidas, apresentaram o mesmo padrão alélico.

O objetivo desse trabalho foi identificar marcadores microssatélites ligados ao padrão de listras de frutos de melancia, para auxiliar em programas de melhoramento de melancia na seleção desta característica ainda na fase de plântula.

### **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Material vegetal – Obtenção de população F<sub>1</sub>**

Foram realizados cruzamentos, por meio de polinização manual controlada (PMC) conforme metodologia descrita por Dias et al. (2001), entre duas cultivares de melancia, contrastantes para o padrão de listras de frutos de melancia (Figura 1): a cv. BRS Opara

(listras bem definidas) e a cv. Pérola (listras difusas), para obtenção da população F<sub>1</sub>. Inicialmente, as sementes destas cultivares foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato comercial para hortaliças Plantmax<sup>®</sup> e foram mantidas em casa de vegetação até o aparecimento das primeiras folhas definitivas, 12 dias após o semeio. Em seguida, essas mudas foram transplantadas para o Campo Experimental de Bebedouro, da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Na fase de floração foram realizados os cruzamentos, as flores masculinas de 'Pérola' e femininas de 'BRS Opara' foram isoladas 24 horas antes da antese, utilizando um copo plástico descartável (250 ml) grampeado em uma miniestaca de madeira branda, a fim de mantê-lo fixado ao solo. No dia seguinte, quando as flores já estavam abertas, no período entre 8 e 10 h, foram efetuadas as polinizações. A flor masculina foi destacada da planta, a corola pressionada e retida pelos dedos polegar e indicador na região do pedúnculo e com movimentos leves e giratórios, o pólen foi depositado sobre o estigma do genitor feminino. Após a polinização, as flores femininas foram identificadas com uma etiqueta de papel guache contendo as informações do cruzamento: parentais, planta e a data da PMC e foram novamente isoladas durante mais 72 h.

Foram coletadas amostras foliares jovens de cada parental e conservadas em freezer a -80 °C para posterior extração de DNA. Após a colheita dos frutos oriundos desse cruzamento, as sementes foram lavadas e postas para secar. Em seguida, sementes (F<sub>1</sub>) de um desses frutos foram semeadas em bandejas de poliestireno e mantidas em casa de vegetação até o aparecimento das primeiras folhas definitivas, 12 dias após o semeio. No início do desenvolvimento destas mudas, foram coletadas e armazenadas, em freezer -80°C, amostras foliares do F<sub>1</sub> para extração de DNA e confirmação da hibridação via PCR, utilizando marcadores microssatélites.

### **Confirmação de hibridação utilizando marcadores microssatélites**

#### Extração de DNA

Foram realizadas extrações de DNA das folhas dos parentais (BRS Opara e Pérola) e do F<sub>1</sub>, usando o protocolo CTAB 2x de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações: 1) maceração mecânica, da folha, realizada na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó muito fino; 2) o macerado vegetal de cada amostra foi transferido para microtubos de 2 mL, contendo 950 µL de tampão CTAB 2x; 3) as amostras foram levadas ao banho-maria a 60 °C por 30 min, com inversão destes a cada 10 min; 4) adicionou-se 950 µL de clorofórmio:

álcool isoamílico (24:1) em cada tubo; 5) em seguida, foi feita uma centrifugação a 7.500 rpm, por 10 min; 6) após a centrifugação observou-se a formação de duas fases: na fase inferior (mais escura) ficaram depositados os resíduos orgânicos e na fase superior (aquosa) ficaram os ácidos nucleicos. Retirou-se 700 µL da fase aquosa e transferiu-se para um novo microtubo de 1,5 mL; 7) adicionou-se 467 µL de álcool isopropílico ‘gelado’ em cada tubo, seguido de suaves inversões dos mesmos. Estes foram mantidos em gelo por 20 min; 8) após esse período a solução foi centrifugada a 12.000 rpm para deposição do “pellet” no fundo do tubo; 9) descartou-se o sobrenadante em um béquer, em capela de exaustão de gases; 10) foi observado se houve formação do “pellet”, este foi posto para secar em temperatura ambiente, e posteriormente ressuspendido em 30 µL de tampão Tris-EDTA. Esta solução foi armazenada a 6 °C por 24 horas em geladeira para completa dissolução do “pellet” e em seguida, essas amostras de DNA foram tratadas 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 ‘rastro’ de DNA. As amostras de DNA foram diluídas para 100 ng/µL e armazenadas em freezer a -20 °C.

#### Reação de amplificação do DNA e resolução em géis de poliacrilamida

Foram utilizados cinco marcadores microssatélites (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 e MCPI\_26), desenvolvidos para melancia, por Joobeur et al. (2006) para inclusão da paternidade e confirmação dos híbridos. Esses SSRs foram previamente selecionados do trabalho de Gama et al. (2013), por apresentarem produtos de PCR de diferentes tamanhos, para essas cultivares. A reação de PCR foi realizada seguindo o protocolo de Joobeur et al. (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<sub>2</sub>, 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 de 30 ciclos a 94 °C durante 15 s, a 56 °C durante 30 s 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 da reação, de tampão desnaturante 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. 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 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 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 45 W foi realizada antes da aplicação das amostras de PCR. Foram aplicados 2,5µL da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 6%, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente duas horas e meia, com potência constante de 45 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): 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 realizado em solução de ácido nítrico 0,2 mol.L<sup>-1</sup> 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.

Para confirmação de que o resultado obtido no cruzamento entre as cultivares, tratava-se realmente de um  $F_1$ , livre de contaminação, foi observado se os híbridos apresentavam apenas o padrão alélico dos dois parentais.

### **Obtenção de população $F_2$**

Após a confirmação da hibridação usando marcadores microssatélites as mudas da população  $F_1$  foram transplantadas para o Campo Experimental de Bebedouro, e na fase de floração foram realizadas autofecundações dessas plantas, por meio de PMC, para obtenção de população  $F_2$ . Após a colheita dos frutos, as sementes foram lavadas e postas para secar à sombra.

### **Fenotipagem para o padrão de listras de frutos de melancia em populações $F_1$ , $F_2$ e parentais**

Foi realizado um último experimento de campo para avaliar o padrão de listras dos frutos. Foram avaliadas 10 plantas de cada parental, 100 plantas da população  $F_1$  e 200 plantas da população  $F_2$  (as sementes utilizadas foram oriundas de um único fruto). Na fase inicial de desenvolvimento das mudas foram coletadas amostras foliares jovens e sadias da população  $F_2$  e foram conservadas em freezer a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , para posterior extração de DNA.

A colheita foi realizada manualmente, 75 dias após o semeio. Os frutos foram identificados com a numeração da planta e levados a um galpão, onde foram caracterizados de acordo com os descritores morfológicos para melancia para o padrão de listras (Figura 2). Foi contabilizado o número de frutos com padrão de listras claramente definidas e listras difusas.

### **Genotipagem da população $F_2$ para o padrão de listras de frutos de melancia, usando marcadores microssatélites**

Foram analisados um total de 116 marcadores microssatélites desenvolvidos para melancia, sete desenvolvidos por Jarret et al. (1996), dezoito por Guerra-Sanz (2002), 36 por Joobeur et al. (2006) e 55 por Ren et al. (2012). A fim de selecionar aqueles “primers” que apresentassem produto de PCR de diferentes tamanhos entre os parentais. Em seguida, estes foram utilizados para analisar cinco indivíduos de frutos com padrão de listras bem definidas e cinco com padrão de listras difusas, da população  $F_2$ , para identificar alelos que estivessem

presentes nos indivíduos com padrão de listras claramente definidas e ausentes nos indivíduos com padrão de listras difusas ou vice-versa. Após verificar esta característica com esses 10 indivíduos, os “primers” selecionados foram utilizados para genotipar os 200 indivíduos da população F<sub>2</sub>. A metodologia utilizada para extração de DNA, reação de PCR, usando marcadores microssatélites e revelação dos géis de poliacrilamida foi a mesma descrita anteriormente no tópico confirmação de hibridação utilizando marcadores microssatélites.

### **Análises estatísticas e identificação da região cromossômica do padrão de listras de frutos de melancia**

Os dados foram anotados para a presença (1) *versus* ausência (0) de alelos. Os dados obtidos pelos marcadores microssatélites e pela avaliação visual de frutos com padrão de listras claramente definidas/ listras difusas, foram submetidos ao teste de qui-quadrado a 0,05 para verificação do padrão mendeliano de segregação esperado na população F<sub>2</sub> de 3:1. As análises de ligação foram realizadas utilizando o programa JoinMap versão 2.0 (Stam e Van Ooijen, 1995) e os valores obtidos pelas frequências de recombinação foram convertidos em mapas de distância genética (centiMorgan) usando a função Kosambi (Kosambi, 1944), para ilustração em diagrama.

Foi realizado um “blast” da sequência dos “primers” e de seus produtos de PCR, ligados ao padrão de listras de frutos de melancia, no genoma desta espécie disponível em: <http://www.icugi.org> (Guo et al., 2013), para localizar em que cromossomo esses “primers” se encontram.

### **3.3 RESULTADOS**

Os cinco marcadores microssatélites (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 e MCPI\_26) utilizados, para confirmação da hibridação, foram capazes de discriminar a população F<sub>1</sub> de seus parentais: os indivíduos da população F<sub>1</sub> apresentaram apenas os alelos do genitor feminino (BRS Opara) e do genitor masculino (Pérola).

Na fenotipagem das populações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e dos parentais para o padrão externo de listras do fruto, observou-se que: os parentais estavam em homozigose para esta característica, uma vez que, 100% dos frutos avaliados da cv. BRS Opara apresentaram padrão de listras claramente definidas e 100% dos frutos da cv. Pérola exibiram padrão de listras difusas; na população F<sub>1</sub>, 100% dos frutos apresentaram padrão de listras claramente definidas e na

população F<sub>2</sub>, 150 (75%) dos frutos apresentaram padrão de listras claramente definidas e 50 (25%) de padrão difusas (Figura 2). Os valores observados na avaliação dos frutos na população F<sub>2</sub> são exatamente iguais aos valores esperados para uma característica monogênica e dominante. O estudo da hereditariedade genética realizado na população F<sub>2</sub> para padrão de listras em frutos de melancia indicou que a presença de listras claramente definidas é condicionada por um gene dominante, segregando na proporção 3:1.

Dos 116 marcadores microssatélites analisados, apenas 12 foram polimórficos entre os parentais da população em estudo. Na análise dos 10 indivíduos da população F<sub>2</sub>, apenas dois pares de “primers” apresentaram o padrão alélico esperado com presença de alelo nos indivíduos de frutos com padrão de listras bem definidas e ausência nos de frutos com padrão de listras difusas. Os pares de “primers” foram: MCPI\_05 (ATTTCTGGCCCCAGTGTAAG/GAACAACGCAACCACGTATG) e MCPI\_16 (TGCTCAATCCACCCTTTCTC/AAAAACAGCAACTCTCCCATC), desenvolvidos por Joobeur et al. (2006). Na genotipagem dos 200 indivíduos da população F<sub>2</sub> utilizando estes marcadores, observou-se presença de alelo nos indivíduos de frutos com padrão de listras definido e ausência desse alelo nos indivíduos com padrão de listras difusas (Figuras 3 e 4).

As análises feitas no JoinMap 2.0, mostraram que os microssatélites MCPI\_05 e o MCPI\_16 estão ligados ao gene responsável pelo padrão de listras de frutos de melancia a uma distância de 1,5 e 1,8 cM com LODs ‘score’ de 39,28 e 38,11, respectivamente.

O “blast” das sequências dos dois pares de “primers”, ligados ao padrão de listras de frutos de melancia, e de seus produtos de PCR, feito no genoma da melancia disponível em: <http://www.icugi.org>, mostraram que o gene relacionado com o padrão de listras em frutos de melancia está no cromossomo seis e que os dois marcadores em questão, estão muito próximos um do outro e de alguns genes preditos no trabalho de Guo et al. (2013)

### 3.4 DISCUSSÃO

Os resultados da obtenção de população F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> indicam que o método de PMC, descrito por Dias et al. (2001) é eficaz para a realização de cruzamentos de melancia, em que os genitores devem ser controlados e livres de contaminação por pólen de outros genótipos.

Os marcadores microssatélites MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 e MCPI\_26, utilizados, para confirmar a hibridação entre as cultivares BRS Opara e Pérola podem ser usados como ferramenta na identificação e em análises de parentesco de híbridos de melancia envolvendo essas cultivares. Além disso, tais marcadores, também podem ser utilizados para



distinguir a ‘BRS Opara’ do híbrido obtido neste trabalho, uma vez que ambos possuem resistência ao oídio e frutos com padrão de listras claramente definidos. Vale ressaltar que apesar do híbrido apresentar uma tonalidade no verde da casca um pouco diferente, não é possível distingui-los, com absoluta certeza, utilizando apenas descritores morfológicos, uma vez que a intensidade de coloração da casca pode ser influenciada por fatores ambientais. Desse modo, se um fruto ficar muito exposto ao sol, a intensidade de coloração da casca será diferente de um fruto que fique bem protegido, pela folhagem da planta, dos raios solares. Com a utilização de marcadores moleculares a seleção do padrão externo do fruto pode ser feita antes mesmo da fase de frutificação, ainda na fase de plântula. A ampla utilização desse marcador em estudos genéticos, inclusive em testes de paternidade, deve-se ao fato de serem co-dominantes, multialélicos, altamente reprodutíveis e de ampla resolução (Varshney et al., 2005; Oliveira et al., 2006).

Os resultados obtidos na fenotipagem das populações  $F_1$ ,  $F_2$  e de seus parentais para o padrão de listras dos frutos de melancia, se ajustam a segregação mendeliana de 3:1 (listras claramente definidas: listras difusas) com dominância do gene que confere padrão de listras claramente definidas. Com isso, pode-se verificar que a herança dessa característica é monogênica e dominante.

Na genotipagem da população  $F_2$  para padrão externo de frutos de melancia, usando os marcadores microssatélites MCPI\_05 e MCPI\_16, verificou-se que estes estão intimamente ligados ao locus que confere a característica do padrão de listras em frutos de melancia. Esses marcadores podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores para selecionar essa característica em frutos de melancia, ainda na fase de plântula, não sendo necessário esperar até a fase de frutificação para selecionar o padrão de fruto desejado e com a vantagem de poder identificar os indivíduos homocigotos e os heterocigotos para essa característica. Tal fato gera economia de tempo, espaço e dinheiro, uma vez que, permite ao melhorista levar adiante no programa de melhoramento apenas as plantas que apresentem a característica de interesse.

Existem poucos trabalhos associando marcadores moleculares a características fenotípicas em melancia. Lin et al. (2009) identificaram um marcador RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) ligado à resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* e a partir deste, desenvolveram um marcador SCAR (“sequence-amplified characterized region”), que segundo esses autores, é capaz de identificar de forma rápida e segura genótipos de melancia resistentes e suscetíveis ao fusário. Wechter et al. (2008) estudaram a expressão gênica durante o amadurecimento do fruto de melancia em três estádios: polpa verde (início

do desenvolvimento), polpa rosa (início da maturação) e polpa vermelha (fruto maduro), utilizando “microarrays” e identificaram genes possivelmente relacionados com os eventos de amadurecimento do fruto. Prothro et al. (2012) identificaram um QTL, denominado M-QTL no grupo de ligação 2 como candidato para a seleção assistida por marcadores para tamanho de sementes de melancia.

Trabalhos envolvendo marcadores moleculares associados a características fenotípicas também têm sido desenvolvidos em outras Cucurbitáceas como melão e pepino. É possível encontrar, na literatura, trabalhos associando marcadores moleculares a características fenotípicas, tanto para resistência a doenças, quanto para diversas características de frutos

Liu et al. (2010) analisaram 700 combinações de “primers” SRAP (“Sequence-related amplified polymorphism”) e identificaram uma marca ligada ao gene que confere resistência ao *Podosphaera xanthii* que acomete o melão, na China, a uma distância de 3,9 cM. Estes autores clonaram, sequenciaram e converteram esse marcador em SCAR. Os autores afirmam que esse marcador pode ser utilizado na seleção assistida por marcadores no desenvolvimento de cultivares de melão visando resistência ao *P. xanthii*.

Meng et al. (2012) analisaram 130 plantas de uma população F<sub>2</sub>, oriunda do cruzamento de dois genótipos de pepino, B-2-2 (formato do fruto longo) e Y-3 (formato do fruto redondo) e identificaram marcas de marcador SRAP ligadas ao formato do fruto em pepino. Napier et al. (2009) identificaram marcador molecular RAPD, em frutos de melão com coloração de polpa laranja, ligados a QTL (“Quantitative Trait Loci”) para alto teor de Beta-caroteno.

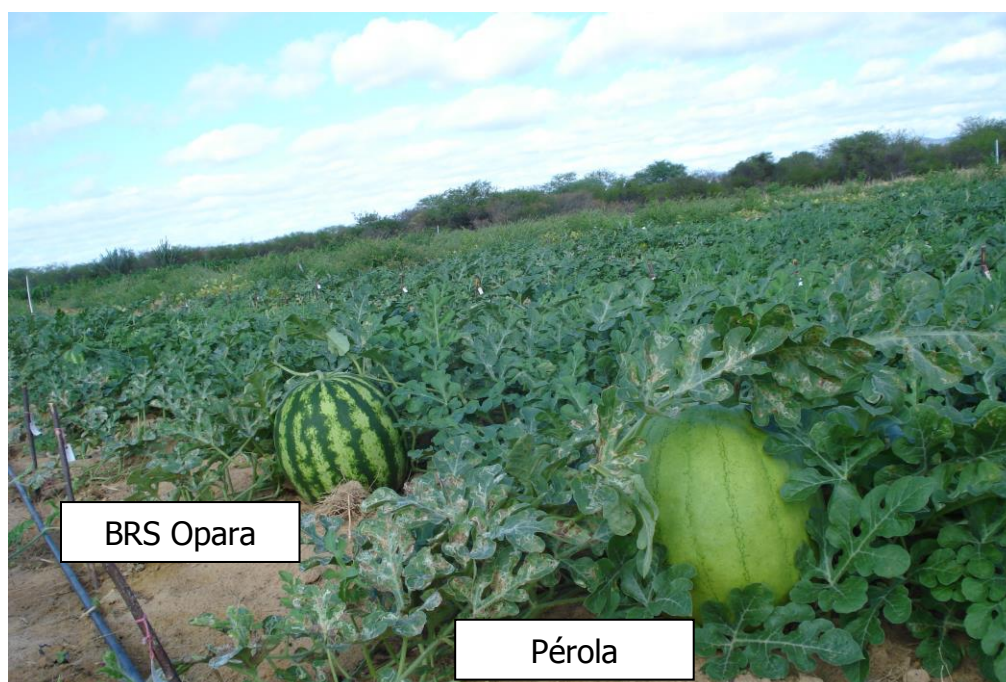
Os estudos associando características fenotípicas a marcadores moleculares em melancia estão apenas começando. Com a disponibilização do genoma desta cultura por Guo et al. (2013) várias outras características de interesse poderão ser associadas a marcadores moleculares, tais como o teor de sólidos solúveis, a coloração de casca e de polpa, a produtividade, a acidez, a precocidade, a resistência a doenças e pragas, dentre outras. Os marcadores microssatélites MCPI\_05 e MCPI\_16, identificados neste trabalho como ligados ao padrão de listras em frutos de melancia, possibilitam a utilização dos mesmos na seleção assistida por marcadores para desenvolvimento de cultivares dessa cultura. Além disso, a identificação do cromossomo em que esses marcadores se localizam permitirá um estudo mais aprofundado dos genes que se encontram próximos a esses marcadores e que, possivelmente, são relacionados com o padrão de listras em frutos de melancia.

### 3.5 REFERENCIAS

- Bhering LL, Pinto CABP, Benites, FRG, Leite ME, et al. (2009). Seleção assistida por marcadores para teor de matéria seca e açúcares redutores em tubérculos de batata. *Cienc. Rural* 39: 8-44.
- Borém A e Miranda GV (2013). *Melhoramento de Plantas*. 6th edn. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Brasil (2009). Rules to Apply Distinguishability, Homogeneity and Stability Descriptors for Watermelon Cultivars. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 Junho 2009. Section 1.
- Caixeta ET, Oliveira ACB de, Brito GG de e Sakuyama NS (2009). Tipos de Marcadores Moleculares. In: *Marcadores Moleculares* (Borém A and Caixeta ET, eds.). UFV, Viçosa, 11-94.
- Creste S, Tulmann Neto A e Figueira A (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 299-306.
- Demore P dos S (2008). Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Microsatélites para Resistência ao Oídio em Soja. Master's thesis, UNESP, São José do Rio Preto.
- Dias R de CS, Costa ND, Queiróz, MA de e Faria CMB de (2001). *Cultura da Melancia*. Embrapa Semiárido, Petrolina, 20.
- Dias R de CS, Barbosa GS, Souza FF, Queiróz MA de, et al. (2010). Cultivares. In: *Sistema de Produção de Melancia* (Dias R de CS, Resende GM de and Costa ND, eds.). Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. *Sistemas de Produção*, 6). Available at [<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/cultivares.htm>]. Accessed April 23, 2014.
- Doyle JJ e Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Gama RNCS, Santos CAF, Dias R de CS e Souza F de F (2013). Molecular characterization of watermelon cultivars using microsatellite markers. *Hort. Bras.* 31: 522-527.
- Guerra-Sanz JM (2002). *Citrullus* simple sequence repeats markers from sequence databases. *Mol. Ecol. Notes* 2: 223-225.

- Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, et al. (2013). The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat. Genet.* 45: 51-60.
- Jarret RL, Merrick LC, Holms T, Evans J, et al. (1996). Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). *Genome* 40: 433-441.
- Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, Thomas CE, et al. (2004). The *Fusarium* wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J.* 39: 283-297.
- Joobeur T, Gusmini, G, Zhang A, Levi A, et al. (2006). Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or *Arabidopsis* genomes. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1553-562.
- Kosambi DD (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- Lin Y-H, Chen K-S, Liou T-D, Huang J-W, et al. (2009). Development of a molecular method for rapid differentiation of watermelon lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Bot. Stud.* 50: 273-280.
- Liu L, Chen Y, Su Z, Zhang H, et al. (2010). A sequence-amplified characterized region marker for a single, dominant gene in melon PI 134198 that confers resistance to a unique race of *Podosphaera xanthii* in China. *HortScience* 45: 1407-1410.
- Meng H, Chen S, Cheng Z, Chai D, et al. (2012). SRAP markers for fruit shape in cucumber. *Pak. J. Bot.*, 44: 1381-1384.
- Napier AB, Park SO, Hwang HY e Crosby KM (2009). Identification and confirmation of molecular markers and orange flesh color associated with quantitative trait loci for beta-carotene in musk melon. *ISHS Acta Hort.* 841: 585-588. Available at [[http://www.actahort.org/books/841/841\\_89.htm](http://www.actahort.org/books/841/841_89.htm)]. Accessed April 23, 2014.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, et al. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 29: 294-307.
- Prothro J, Sandlin K, Abdel-Haleem H, Bachlava E, et al. (2012). Main and epistatic quantitative trait loci associated with seed size in watermelon. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 137: 452-457.

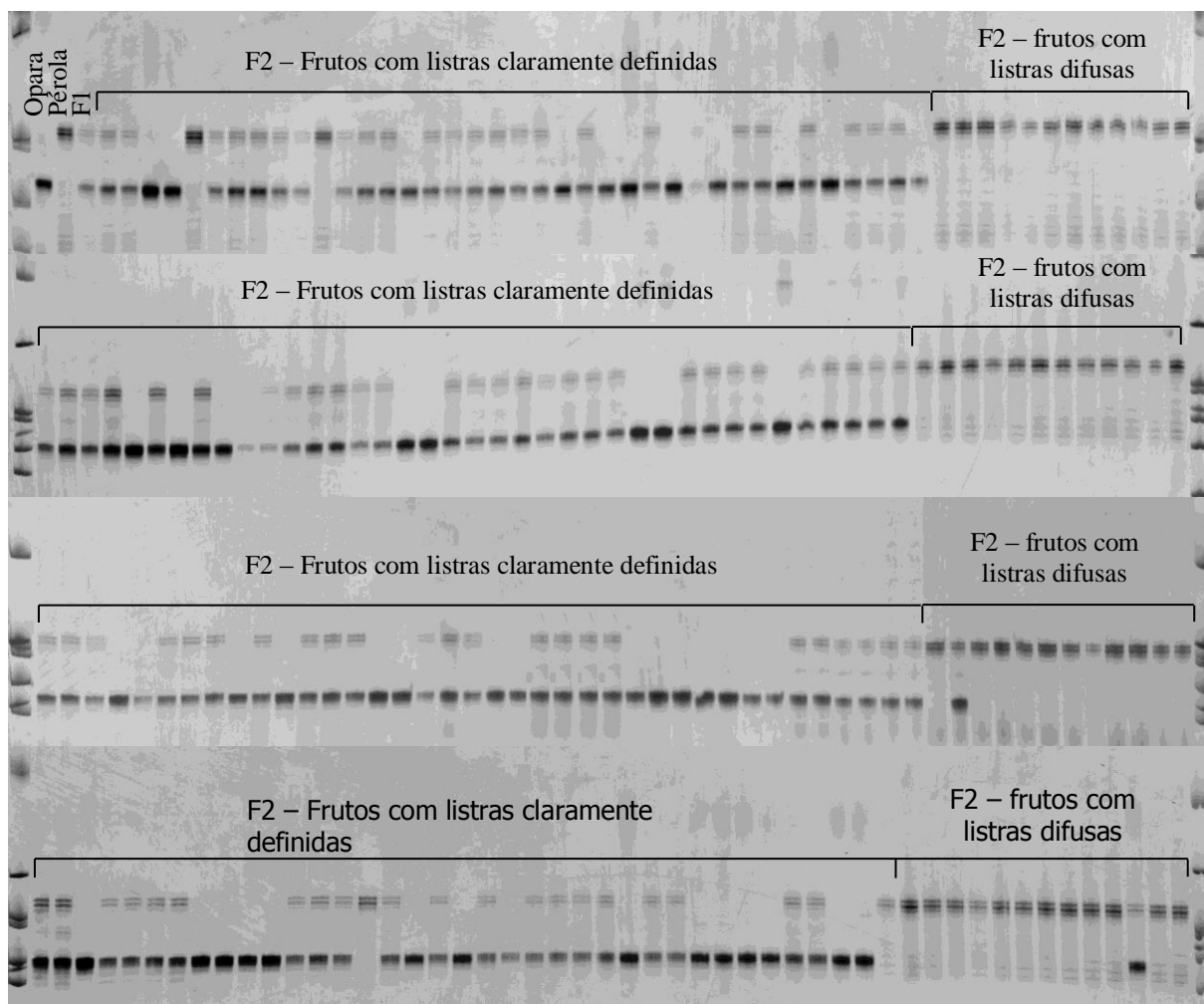
- Ren Y, Zhao H, Kou Q, Jiang J, et al. (2012). A high resolution genetic map anchoring scaffolds of the sequenced watermelon genome. *Plos One* 7: 1-10.
- Stam P and Van Ooijen JW (1995). JoinMap Version 2.0: Software for the Calculation of Genetic Maps. CPRO-DLO, Wageningen.
- Varshney RK, Garner A and Sorells ME (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23: 48-63.
- Wechter WP, Levi A, Harris KR, Davis AR, et al. (2008). Gene expression in developing watermelon fruit. *BMC Genomics* 9: 275.



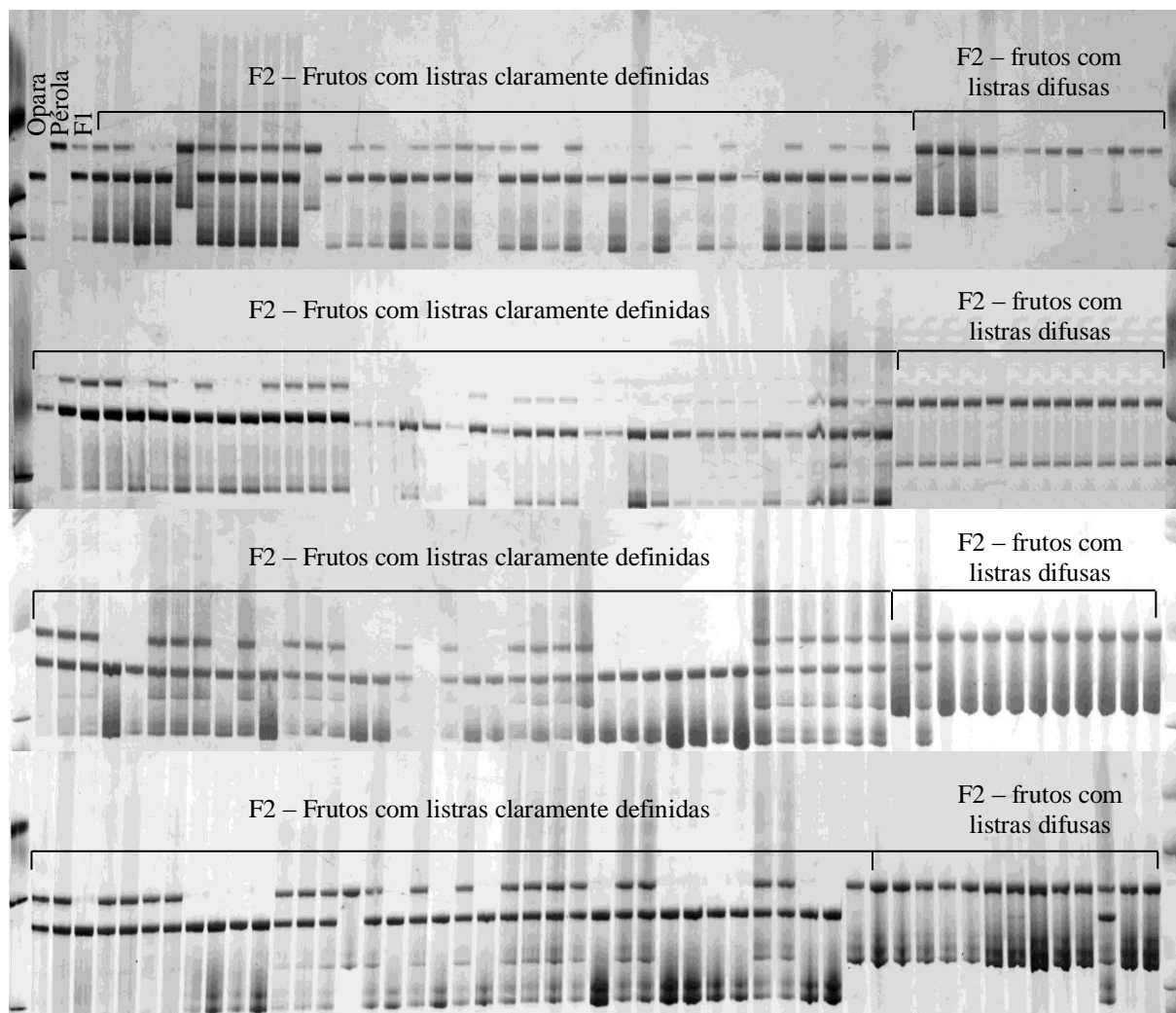
**Figura 1.** Frutos da cultivar BRS Opara (padrão de listras claramente definidas) e da cv. Pérola (padrão de listras difusas). Petrolina-PE, 2012.



**Figura 2.** Frutos de população F<sub>2</sub>, oriunda do cruzamento entre as cultivares BRS Opara e Pérola. Petrolina-PE, 2012.



**Figura 3.** Padrão alélico da cultivar BRS Opara (frutos com listras bem definidas), da cv. Pérola (frutos com listras difusas), da F<sub>1</sub> e de 200 indivíduos da população F<sub>2</sub> oriunda do cruzamento entre essas duas cultivares utilizando o marcador microsatélite MCPI\_05, associado ao padrão de listras de frutos de melancia.



**Figura 4.** Padrão alélico da cultivar BRS Opara (frutos com listras bem definidas), da cv. Pérola (frutos com listras difusas), da F<sub>1</sub> e de 200 indivíduos da população F<sub>2</sub> oriunda do cruzamento entre essas duas cultivares utilizando o marcador microsatélite MCPI<sub>16</sub>, associado ao padrão de listras de frutos de melancia.



#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

1. Os marcadores microssatélites MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 podem ser utilizados para confirmação de hibridação em cruzamentos que envolvam as cultivares Pérola e BRS Opara.
2. A resistência ao oídio em 'BRS Opara' é monogênica e dominante com segregação 3 resistentes: 1 suscetível.
3. Os marcadores microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441 estão ligados à resistência ao oídio em melancia, a uma distância de 2,6 cM com LODs 'score' de 31,42.
4. O padrão de listras em frutos de melancia é monogênica e dominante com segregação 3 frutos com listras claramente definidas: 1 fruto com listra difusa.
5. Os marcadores microssatélites MCPI\_11, CYSTSIN e BVWS02441 podem ser utilizados nos processos de registro e certificação da cultivar BRS Opara e de outras linhagens do programa de melhoramento genético de melancia da Embrapa Semiárido que tiveram os mesmos parentais que a BRS Opara.
6. Os marcadores microssatélites MCPI\_05 e MCPI\_16 estão ligados ao padrão de listras de frutos de melancia a uma distância de 1,5 e 1,81 cM com LODs 'score' de 39,28 e 38,11, respectivamente.
7. Os marcadores microssatélites ligados a resistência ao oídio e ao padrão de listras em frutos de melancia revelados neste trabalho, poderão ser utilizados em programas de melhoramento de melancia realizados por instituições de pesquisa, públicas e privadas. Dessa forma, espera-se acelerar o processo de desenvolvimento de novas cultivares, uma vez que a seleção poderá ser feita ainda nas fases iniciais de desenvolvimento da planta.

## **5. ANEXO**

**Anexo A.** Lista dos 116 marcadores microssatélites que foram analisados nos dois capítulos desta tese.

<b>Nome</b>	<b>Sequência do primer (5'-3')</b>
MCPI-03 <sup>a</sup>	GCATAAACCCACCTGTGAGTGG/ATGGCTTTGCGTTTCATTTC
MCPI-04 <sup>a</sup>	AGCAAATGCATGGGGAAAAC/TGTTGAATGGAGGCTTTGAG
MCPI-05 <sup>a</sup>	ATTTCTGGCCCCAGTGTAAAG/GAACAACGCAACCACGTATG
MCPI-07 <sup>a</sup>	GGTTATGGCCATCTCTCTGC/GAGAGTGGGCGTAAGGTGAG
MCPI-09 <sup>a</sup>	TCAATTCCAATCATCCATCC/TAATGGCCGGACTTTATGC
MCPI-10 <sup>a</sup>	GATGATTTGTTTGTCTGATCTTTG/AAACCATCACTGAGAACAAAAGG
MCPI-11 <sup>a</sup>	GAGCAGGGGAGAAGGAAAAC/CCAGTAGCTTTTTCCGATGC
MCPI-12 <sup>a</sup>	GGAGTAGTGGTGGAGACATGG/TCCTTTCTTTTCGCAAACCTC
MCPI-13 <sup>a</sup>	TTCCTGTTTCATGATTCTCCAC/TCAGAATGGAGCCATTAACCTG
MCPI-14 <sup>a</sup>	TCAAATCCAACCAAATATTGC/GAGAAGGAAACATCACCAACG
MCPI-15 <sup>a</sup>	GCAAATGCAACTGTTTATCG/CCATTATGATTTCAATCAATCTCC
MCPI-16 <sup>a</sup>	TGCTCAATCCACCCTTTCTC/AAAAACAGCAACTCTCCATC
MCPI-17 <sup>a</sup>	CAGAAATTTTGAATAACGCCAAC/TGACTGCATTAGGGTAGAAACG
MCPI-18 <sup>a</sup>	CCGAAGCAAGATGGTTTTT/AAACCGATATGCCTGTCTGC
MCPI-20 <sup>a</sup>	GATCTCCTCAAAGCCTTACCG/CGGATCCGATAATCTGCTG
MCPI-21 <sup>a</sup>	AAAGTTTTTCATGCCAACGTATC/TCAGCCAATATGGTCAAATAGC
MCPI-23 <sup>a</sup>	CCACCGACTTGCTTTTCTTC/TGTCACCATTGAAACCAAGG
MCPI-24 <sup>a</sup>	GAACTTTCAAATTTACAACAACAAAC/CAATTTAATCCCTTCCATGC
MCPI-25 <sup>a</sup>	TACCTCAGTCGACGCTGTTG/GATTTGTGTGGAACCCAAGC
MCPI-26 <sup>a</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAAACC
MCPI-27 <sup>a</sup>	GGGAAATTAGCCCTTTTGTG/AATGGATGGGATCGTGCTAC
MCPI-28 <sup>a</sup>	AATGTTAAGCAGTAAGCACATGG/ACACCGGAGAAGGTGAATTG
MCPI-29 <sup>a</sup>	CACAATCAAGGAAGGTTTCAGC/TGAGCAAGCCAACAGAAGTG
MCPI-30 <sup>a</sup>	GCTTTGAAGTTTGTTTAATTTTAGTCC/CGCCTCACGCTCTCTAAC
MCPI-31 <sup>a</sup>	TAACCGTCACCAACCCATTC/TCCAAAATTGGTTCGGATTTG
MCPI-32 <sup>a</sup>	AAGGCTGCAGAGACCATGAC/AATGATGAAGAACGGGCAAG
MCPI-33 <sup>a</sup>	CGTCATTTGAGAGCATTGGA/TCCAATTTTGTTTAGTGACATAGAGTGC
MCPI-34 <sup>a</sup>	CCAAATTGGACCAGAACCAC/AAGCCGTCAGTCTCGGTTAG
MCPI-37 <sup>a</sup>	AATCTTCCCCATGCCAAAAC/GACTTCCAAACCCTCCCTTC
MCPI-39 <sup>a</sup>	AGGCCAAAACCTAACTTGC/CTTTTGCCCTCGCTCTTTC
MCPI-40 <sup>a</sup>	AAAAATTTGAAAATTAGGTGAGGAG/TTTTGACTAGGTGTACACTACCTTTG
MCPI-41 <sup>a</sup>	AGGTGGTATGTCGCTCATCC/GTGGGAGATGTGTGAGCTTG
MCPI-42 <sup>a</sup>	TGCTTAAACCTCCGTTCTGG/ATTTTCTTCAGCTGCGTTCC
MCPI-44 <sup>a</sup>	ATTCAAAACGCAAGGGTCAG/ATCAGGGGTACCACCTCCTC
MCPI-46 <sup>a</sup>	CAAACAAAACCTTAGGAACTAGATTG/TTAGCCATGAGGCGTGTACC
MCPI-47 <sup>a</sup>	TTGCCATTGAAATTTTGAAGAAG/TCAAATTTTGTTCCTTGAAATG
C.I. 1-06 <sup>b</sup>	CACCCTCCTCCAGTTGTCATTTCG/AAGGTCAGCAAAGCGGCATAGG
C.I. 1-12 <sup>b</sup>	GCCTTTGAAAGAGAGTTGCTCG/GCGCGTCCCTTTTTACCA
C.I. 1-20 <sup>b</sup>	CGCGCGTGAGGACCCTATA/AGCAATTGATTGAGGCGGTTCT

Continua nas próximas páginas

## Anexo A. Continuação...

<b>Nome</b>	<b>Sequência do primer (5'-3')</b>
C.I. 1-21 <sup>b</sup>	ACCCTCGCTGCTGTTATTCA/TGTCCCACCCAACATTTTCATT
C.I. 2-23 <sup>b</sup>	GAGGCGGAGGAGTTGAGAG/ACAAAACAACGAAACCCATAGC
C.I. 2-61 <sup>b</sup>	TTCTGCTCAGTTTCTTCTTAAT/CATCCTCAAAAAAAGGCTAAG
C.I. 2-40 <sup>b</sup>	CTTTTTCTTCTGATTTGACTGG/ACTGTTTATCCCGACTTCACTA
PEX5 <sup>c</sup>	GAATAATTGCATCTTTTGGC/AGAAGATTCGTACATGGAGC
ADPGPS <sup>c</sup>	ACCACAACACAACACAACAC/AAGCTTTGCATTTACTTCCA
SAT2 <sup>c</sup>	AGATTGACAACACATGCAGA/TTTTGCTCATCTACGAGAT
SAT3 <sup>c</sup>	TGAGAGGAAAGGAACCATAA/GTCTCTTGCAAAGCTCAAAC
WM403 <sup>c</sup>	AAGACGACCGTCAATACAAC/GGAGGGAGAAAGTGTCTTTT
CYSTSIN <sup>c</sup>	ATTTTCTTGCTTCAAATGGA/ATAAGCAAAAGCATCGAAAG
URF <sup>c</sup>	AGCAGCACCTTGTCTTGTAT/CACAGATCCCACTCAATCTT
MITODIXI <sup>c</sup>	ATCTGTCAAGATCACGAAGG/TGGGAAATAGGAAACGTAGA
WGA3H <sup>c</sup>	CGATAATCGACTTTCTCGAC/GCTTCTTAGCATCATCAACC
WSUS <sup>c</sup>	ATGAGTGAGAAAGCTTGAA/AATACTCCAATTGATGACGG
EST0069 <sup>c</sup>	CCAAACCCTTCTTTTCTTT/AAGGAGGTGAGTGAAGGTG
EST00680 <sup>c</sup>	CCTTATCTCAACTCTTTTCGGA/AGGATTGGGCTTGATTGTTG
EST00675 <sup>c</sup>	CTTCCTTTCTCTTCATTCCC/TGAGGGAAAACGAGTTTAGA
EST00674 <sup>c</sup>	CTGCCTCTTGAATTCTCATC/AAATCCGATTAATGCGTTA
EST00667 <sup>c</sup>	ATTGACTCTGATTCTCCCG/GGAGGAAGATCAAAAGAACC
EST00644 <sup>c</sup>	GAGAGAGAGAGAGAGAGTGTGC/GATAAGGAAGAGGGAGAGGA
EST00507 <sup>c</sup>	CTTGTTTTCTTTTTTCGATGG/ATTAGATGGATGGTGTGACG
EST00612 <sup>c</sup>	ATGGAGATCCAACTTTTGTG/ATAACCTGGAAAAAGCCGTA
BVWS01116 <sup>d</sup>	TGGCTTGAATTTTGGAAACC/GAGCTTCCACACCTGAATTTT
BVWI00072 <sup>d</sup>	CCCAATGTACTCTTGCATGG/CAAGCACTTGGGTCAAACA
BVWS00255 <sup>d</sup>	AGCATGAGAGTCCTCACCAAAGAC/TTAGAGAGGAGACCAAACCTTGCCA
BVWS02029 <sup>d</sup>	GTATGGGGGAAGAGGAGAGG/TTAGCTTCCAAACAGGCAGC
BVWI00349 <sup>d</sup>	ACACACACACACAACACTGCGA/CGACACATGCAAGCCACAATA
BVWS02248 <sup>d</sup>	GGATGGATTGAACACGATGGC/TGCGTTGGGGAACCTTGCTTG
BVWS02388 <sup>d</sup>	CGACCTTCCCCATTCTATT/CATGGAAGTCCACTGCATTAAC
BVWS01426 <sup>d</sup>	CATTTCTGCCATCAACACA/CCGACACAAAATCAACCACA
BVWS01767 <sup>d</sup>	GGAAATTTTGGGGCAATTTT/TTGCATCCCAAGACATATTCA
BVWS01965 <sup>d</sup>	AGAAGCTGAGCTGGTTTTGG/TTGCACATAAATCCACTCTATGC
BVWS02249 <sup>d</sup>	CCGAAGTGAAAGGAAAGGAT/AGTCAAAGAGGCTGAAACCC
BVWS00244 <sup>d</sup>	GCTACAAGAAAGCAGTTTGGATTTTC/GCATGGATTGTATCAAACAAATGCT
BVWS01728 <sup>d</sup>	CGCTGCTACGTCTCTTACC/TGCCCAAGAATAATGACGAA
BVWS00911 <sup>d</sup>	GCGTTACCAAATTTTCAGG/AAGAAGGAACACGTGGGTTG
BVWS02202 <sup>d</sup>	AATGAATTAAATTTCTTCGAAAATG/TGTTGATAAATTATGGACCTTTTG
BVWS02416 <sup>d</sup>	AGGGCTGCCTAGTTCACAAA/TCCATAGTTAGGCAGAAAAGCA
BVWS01450 <sup>d</sup>	TGATCTCCCTTATGCCAAC/AGAGCCTAGCACACGTCCAT
BVWS02428 <sup>d</sup>	TTGGATGGGGAACCTGAAGAG/GGCATGAACTTCTTTACCC
BVWS02366 <sup>d</sup>	TTTCTCCCACTTCTCTCTGGA/GAAAGGCATCAATGGAGGAA

Continua na próxima página

## Anexo A. Continuação...

Nome	Sequência do primer (5'-3')
BVWS00241 <sup>d</sup>	AAGAAACCTCCAGAACAGCTACCC/AGAGCAGGCACACAAACAATACAA
BVWS02335 <sup>d</sup>	ATCCAAATGCTTGTTCGTC/TAAGTAGCCGGCATCTGACC
BVWS00339 <sup>d</sup>	TTGTTTCCTGGGAATCCTTTTTCT/CTACTCTTGTCTGGCCTTTAAGAGA
BVWS01067 <sup>d</sup>	CCTGATCTATTGCCTAGTGATAGAAG/TGGAAAACGAAAGTTGTCAAAA
BVWS00658 <sup>d</sup>	TTAGCCTAAGCAAGGGTTTTT/AAGTACACATTTTAAACAATCAATCCA
BVWS02447 <sup>d</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAACC
BVWS01050 <sup>d</sup>	GAATTTGCTTCAGCCTTTGG/TTCATTTCTAGGTTGGTTTTAAGATTT
BVWS02384 <sup>d</sup>	TCCAAGTGGCTTGCTCTTTT/TCTCAACCTCAAATTCCGAGA
BVWS02424 <sup>d</sup>	ACAGCGTACTGCCGTCTCT/TCCTCCTTCGTCTTCCTTCA
BVWS01562 <sup>d</sup>	GGAGATGGTCATGGAAGCAT/TGGCCACTCAACTTCACAAG
BVWS01358 <sup>d</sup>	CCCTATTGCCTATTTTTCTCAA/AAATTTGTGCTCTTCGTGGG
BVWS00119 <sup>d</sup>	TCAATCAATGAAGAATTGGAGAGAAA/CATCCAATGACCATTTTTAAACCA
BVWS01377 <sup>d</sup>	GACAAAATGGATCTACAATAGAAACGGCTTTTTAGGCACGAAACCA
BVWS02045 <sup>d</sup>	AGGAACGAGGCGAGTAGACA/CATTCTTCCTTCTTCCCG
BVWS01724 <sup>d</sup>	AAAGGTGCGTTTGGTAGTTGA/TTGAACGGTGGAACAAAAAG
BVWS01149 <sup>d</sup>	GGAGGCAACTGTTTCTGTGC/CGATTTTAAGCTATTGGTTTGG
BVWS02332 <sup>d</sup>	AACACTTGATTGCGGACACG/AAGCCAACAAATAAATGAGC
BVWS00991 <sup>d</sup>	TACATGCAGGCATGACCCTA/TTGAAAATGGATTTGATGTTGC
BVWS02430 <sup>d</sup>	TAAAATTGTGGGACGTGCTG/TTGGAAATGCCAAACGCT
BVWS00373 <sup>d</sup>	AAGTGCCACTCGAAGCAACATAAC/CGCCATTTTTCTTTTTCTTCTCAA
BVWS02009 <sup>d</sup>	TGGAATCAGAAGATGGAGGG/GCCTTGCAGAGAGAACCAAG
BVWS00193 <sup>d</sup>	CAATGGTGCTCAATTCAACAAA/ATACAAAACGTCACTTCACCCAAA
BVWS02377 <sup>d</sup>	CTGAGGTTCAATCCCGCATA/CTCCAATCCCAAGTCCTTCA
BVWS01133 <sup>d</sup>	CATCCACCTCAAACCTTTAGAAACA/TTCTATTCCCGTCATTTTCATTG
BVWS00567 <sup>d</sup>	GCGCTTCAAAAACCCTTAGA/TGCACGTATGTACGCAAAAA
BVWS00959 <sup>d</sup>	GAGGATAAAAGCGCATTCACA/TGCATGTATGTGGGCAATTT
BVWS00030 <sup>d</sup>	ATTCGCCGAGTACACTGAAAATC/GTGAAAATCCACGAAGCTAACCAC
BVWS01136 <sup>d</sup>	TTGGTCATCAAGGGGGTTAG/AAAACCTGCATTCTCAATTTTCG
BVWS00844 <sup>d</sup>	CCCAATGTGAGAGGTGGTTT/ATGGATTGTGATGGCTGTGA
BVWS02397 <sup>d</sup>	GCTTCCGTTGCTACTTCTGG/GCACGCCACAATTACTTCT
BVWI00294 <sup>d</sup>	CAGGAATCACCTGTTACCCA/CGAGAATTATATTTACAACAACGATT
BVWS00288 <sup>d</sup>	TTGCCAATTATCATGAAACAAAA/AGAAACAATACAAAACCCAACCCA
BVWS00592 <sup>d</sup>	AGCATGGATAAAGCATGGGA/GACCGATTGATGGCTTTTTG
BVWS02443 <sup>d</sup>	AAAGTTTTTCATGCCAACGTATC/TCAGCCAATATGGTCAAATAGC
BVWS02429 <sup>d</sup>	AAGGCAAGCCAAAGTCTCAA/ACACCCTGCAATTTCTGAGC
BVWS02449 <sup>d</sup>	AATGTTAAGCAGTAAGCACATGG/ACACCGGAGAAGGTGAATTG

<sup>a</sup> Primers desenvolvidos por Joobeur et al. (2006); <sup>b</sup> Primers desenvolvidos por Jarret et al. (1996); <sup>c</sup> Primers desenvolvidos por Guerra-Sáns (2002); <sup>d</sup> Primers desenvolvidos por Ren et al. (2012).

## **6. APÊNDICES**

## Apêndice A – Artigo publicado no Australian Journal of Crop Science.

Australian Journal of  
Crop Science

AJCS

AJCS 9(1):92-97 (2015)

ISSN:1835-2707

### Microsatellite markers linked to powdery mildew resistance locus in watermelon

Renata Natália Cândido de Souza Gama<sup>1\*</sup>, Carlos Antônio Fernandes Santos<sup>2</sup>, Rita de Cássia Souza Dias<sup>2</sup>, Rejanildo Robson Cândido de Souza<sup>3</sup>, Manoel Abílio de Queiróz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Avenida Transnordestina, SN, Novo Horizonte, 44.036-900, Feira de Santana-BA, Brazil

<sup>2</sup>Embrapa Semiárido. BR 428, KM 152, zona rural, caixa postal 23, CEP: 56.302-970, Petrolina-PE, Brazil

<sup>3</sup>Universidade de Pernambuco, BR 203, KM 2, s/n, Petrolina-PE, CEP: 56328-90, Brazil

<sup>4</sup>UNEB, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, C. Postal 171, 48905-680, Juazeiro-BA, Brazil

\*Corresponding author: renata.natalia@hotmail.com

#### Abstract

Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) is one of the main foliar diseases that attack the watermelon (*Citrullus lanatus*) and other cucurbits species. The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to the resistance locus to powdery mildew in a F<sub>2</sub> population of 'BRS Opara' (resistant) × 'Pérola' (susceptible). The parental plants, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, were phenotyped for resistance or susceptibility to powdery mildew and 116 microsatellite markers were analyzed. Segregation data in the F<sub>2</sub> population demonstrated that resistance powdery mildew is controlled by a single dominant gene. The microsatellites MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441 showed linkage to the powdery mildew resistance gene at 2.6 cM distance. They were located on chromosome two of the watermelon genome. These markers can be used in the marker assisted selection in watermelon improvement programs and the identification of the chromosome region, in which these markers will facilitate future studies to identify the gene that confers resistance to powdery mildew in watermelon.

**Keywords:** Assisted selection; *Citrullus lanatus*; powdery mildew; resistance; SSR.

**Abbreviations:** MAS\_Marker Assisted Selection, SSR\_Simple Sequence Repeats, LOD\_logarithm of the odds.

#### Introduction

The watermelon [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai] is grown all over the world and one of the main cucurbits grown. Brazil is the fourth largest producer of watermelon with a production of 2,198,620 tons in year 2011 (Agriannual 2014). The majority of the cultivars used in Brazil are susceptible to diseases, such as powdery mildew, alternaria, viruses and anthracnose.

Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) is one of the main foliar diseases of the watermelon and of other cucurbits, cultivated or wild, in Brazil and in the world. In the United States and Israel, powdery mildew became a limiting problem for the cultivation of watermelon around the year 2000 (Davis et al., 2001; Cohen et al., 2000). However, in the Brazilian northeast, powdery mildew has already been cited as one of the main diseases that affected the watermelon crops since the late eighties (Souza et al., 1988). The fungus that causes powdery mildew in watermelon is *P. xanthii* (Castagne) Braun & Shishkoff [syn. *Sphaerotheca fuliginea* auct. p.p.] (Jahn et al., 2002), which is an obligatory parasite that shows physiological specialization. The symptoms appear all over the aerial part of the watermelon, but the leaves are affected the most. Initially, there is a white, dusty growth, which can be seen on the superior and inferior part of the leaves. It starts on the oldest leaves and on the oldest plants, in the fruiting stage, which contributes to the formation of fruits with a low content of soluble solids and of an inferior quality. Furthermore, the leaves that are much

attacked, dry out and the plant enters senescence earlier, reducing its productive period. It occurs in almost all areas where watermelon is cultivated (Terao et al., 2010). In Brazil, the occurrence of a specific race of powdery mildew that infects watermelon was reported. Studies carried out by Reis and Buso (2004) and Reis et al. (2005) confirmed that no fungal isolate of melon, pumpkin or cucumber powdery mildew was able to infect watermelon, and the obtained watermelon isolates were only capable of colonizing this species. The same was observed by Cohen et al. (2000) in Israel. Inheritance of resistance to powdery mildew, found in watermelon in Brazil, is of a monogenic dominant nature, with a segregation of three resistant and one susceptible gene (Borges et al., 2002). However, in the United States, two distinct powdery mildew races were identified, 1W and 2W (Davis et al., 2007; Tetteh et al., 2010), with monogenic and multigenic inheritance of resistance, respectively (Davis et al., 2002; Tetteh et al., 2013).

The genetic improvement programs generally aim to incorporate alleles for traits related to better fruit quality, yield increase or resistance to pests and diseases. Resistance to powdery mildew, apart from reducing the use of fungicides, makes a second crop of quality fruit viable because the plant does not suffer from the damage caused by the disease. The development of new watermelon cultivars with desirable agronomic traits and resistance to powdery mildew through classic improvement techniques is quite slow

and laborious, apart from undergoing environmental influence.

Biotechnological techniques, such as molecular markers permit selecting individuals based on their genotype, independently from biotic or abiotic factors at any stage of plant development. The identification of molecular markers linked to phenotypic traits, such as powdery mildew, permits a better understanding of inherited characteristics between the progenies and the reduction of the number of individuals to be examined posteriorly in the field (Bhering et al., 2009). In this way, marker assisted selection (MAS) tends to speed up improvement programs because the selection can still be done in the initial development stages of the plant, which currently, is of fundamental importance for the development process of new cultivars.

The microsatellite markers, also denominated SSR (Simple Sequence Repeats), consist of units of about one to six nucleotides repeated in tandem (Oliveira et al., 2006; Caixeta et al., 2009). They have been developed for various cultivated plant species and are rapidly substituting other types of markers in various types of genetic studies, mainly due to its reproducibility, technical simplicity, the small quantity of required DNA, the low cost, great resolving power and high levels of polymorphism (Caixeta et al., 2009).

Ren et al. (2012) published a genetic map of the watermelon, with genetic linkage groups highly saturated with SSR markers. Guo et al. (2013) published the genome of the watermelon, which together with the work of Ren et al. (2012), will facilitate marker assisted selection and identification of genes that are responsible for desirable agronomic traits.

The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to the resistance locus to powdery mildew in a  $F_2$  population of 'BRS Opara'  $\times$  'Pérola' to assist improvement programs for watermelon.

## Results

### *True $F_1$ identified by microsatellite markers*

The used method of controlled hand-pollination was efficient to obtain the  $F_1$  and  $F_2$  populations from the cross of the cultivars BRS Opara  $\times$  Pérola, free of contamination. The five microsatellite markers (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 and MCPI\_26) that used to confirm hybridization, were able of discriminating between the  $F_1$  population and parents. The individuals of the  $F_1$  population showed alleles from both the female parent (BRS Opara) and the male parent (Pérola).

### *Powdery mildew resistance is conditioned by a dominant allele*

When phenotyping the  $F_1$  and  $F_2$  populations for resistance to powdery mildew, we found that parents were pure lines for resistance to powdery mildew, as 100% of the examined plants of 'BRS Opara' were found to be resistant and 100% of the 'Pérola' plants were susceptible. In the  $F_1$  population, 100% of the plants were resistant and in the  $F_2$  population 158 (79%) of the plants were resistant and 42 (21%) were susceptible (Table 1). The values observed for resistance and segregation to powdery mildew in the  $F_2$  population for in the field indicate that the resistance to the disease is governed by a dominant segregation gene with a ratio of 3:1.

### *Three microsatellite are closely linked to powdery mildew genes*

The screening was carried out with 116 microsatellite markers developed for watermelon. Twelve primer pairs with polymorphism among the parents (Table 2) were screened. Among these, only three markers showed the expected allelic pattern, with the presence of alleles in resistant individuals and absence in susceptible individuals (Fig. 1). The three markers were: MCPI\_11 developed by Joobeur et al. (2006), the CYSTSIN developed by Guerra-Sánchez (2002) and BVWS02441 developed by Ren et al (2012). These three markers were selected to genotype the  $F_2$  populations of 200 individuals, and only nine recombinant individuals were found by the quoted markers. The analyses of linkage done in JoinMap 2.0 showed that the microsatellites MCPI\_11, CYSTSIN and the BVWS02441 are linked to powdery mildew resistance gene in watermelon at a distance of 2.6 cM with LODs 'score' of 31.42. The blast search for the sequences of the three primer pairs and its PCR products was done in the watermelon genome, available at <http://www.icugi.org>. It showed that the gene related to resistance to powdery mildew is located on chromosome two. In addition, these three markers are very close together with the following approximate distances: (1) MCPI\_11 to BVWS02441 57.44 kb (2) BVWS02441 to CYSTSIN 33.82 kb, and (3) MCPI\_11 to CYSTSIN 91.26 kb. The analysis of the microsatellite markers MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441 in 17 commercial watermelon cultivars showed that the cultivar 'BRS Opara' (resistant to powdery mildew) has an allele that is different from all the other analyzed cultivars (susceptible to powdery mildew) in relation to the three analyzed markers (Fig 2).

## Discussion

The microsatellite markers MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 and MCPI\_26, were used to confirm hybridization between the cultivars, BRS Opara and Pérola. They can be used as an identification tool in paternity analyses of watermelon hybrids for these cultivars. In many cases, when it is not possible to confirm hybridization, differentiating a hybrid from its parents, or even confirming its paternity, based only on morphological descriptors, molecular markers, such as microsatellite markers, is an alternative.

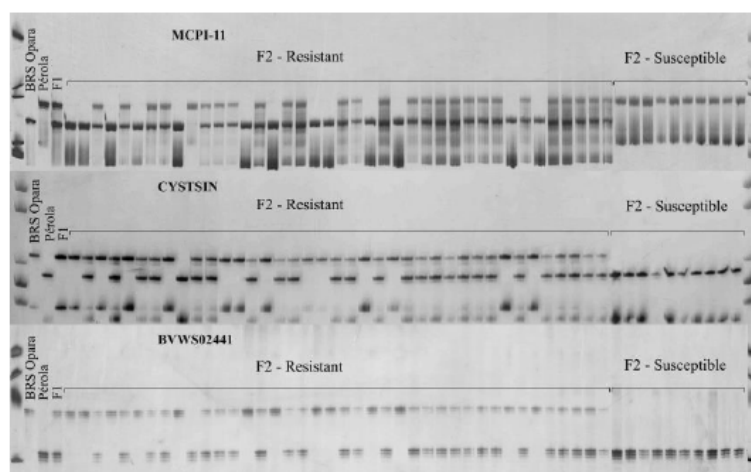
The results obtained from phenotyping the  $F_1$  and  $F_2$  populations and from its parents for resistance to powdery mildew in watermelon, validate the Mendelian segregation of 3:1 (resistant: susceptible) with dominance of a gene that confers resistance to the disease. In this way, it can be substantiated that the inheritance of resistance, in the used source, is monogenic and dominant. These results are in agreement with the results reported by Borges et al. (2002). However, in South Korea, Kim et al. (2013) reported a source of resistance to powdery mildew, race 1 W, as monogenic and partially dominant. On the other hand, in the United States, Davis et al. (2002) confirmed that resistance to race 1 W is multigenic. It is not possible to confirm whether these are different races, if there is some kind of speciation of this race that depends on the locality, or for being sources of different resistance. They behave in a different way in relation to the type of inheritance of resistance to the pathogen. Apart from being limited, the available data suggest that the geographical



**Table 1.** Number of analyzed plants for powdery mildew for resistance and susceptibility in BRS Opara, Pérola cultivars and population F<sub>1</sub> and chi-square test in F<sub>2</sub> of watermelon population.

Resistance or susceptibility to powdery mildew			
Genotypes	Number of analyzed plants	Resistant plants	Susceptible plants
BRS Opara	30	30 (100%)	0
Pérola	30	0	30 (100%)
F <sub>1</sub> (BRS Opara × Pérola)	100	100 (100%)	0
F <sub>2</sub>	200	158(79%) <sup>NS</sup>	42(21%) <sup>NS</sup>

<sup>NS</sup> Non-significant at 5% probability by the Chi-square test.



**Fig 1.** Allelic pattern of the cultivar BRS Opara (resistant), of cv. Pérola (susceptible), F<sub>1</sub> and of 50 individuals of the F<sub>2</sub> population (40 resistant × 10 susceptible) using three microsatellite markers (MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441) associated with powdery mildew in watermelon.

distribution of races is complex and mutable over time (Mohamed et al., 1995). However, the best region to select sources of resistance for some plant disease and to develop programs for genetic improvement with the objective of transferring resistance to cultivars of interest, are those regions where the host grows naturally or where it is grown for centuries, which permits only the survival of hosts that are resistant to the pathogen.

With genotyping the F<sub>2</sub> population for resistance to powdery mildew using microsatellite markers, the results showed three SSRs markers (MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441) capable of identifying the presence of alleles in resistant plants and absent in susceptible plants. These microsatellite markers identified only nine recombinant individuals in a population of 200 individuals. The genetic basis of linkage mapping is the genetic recombination, resulting from crossing over between homologous during meiosis. Genetic recombination is measured by recombination fraction, which is the ratio of recombinant gametes to total gametes. The closer together on the same chromosome are two loci, the less recombination between them; the further apart, the more recombination (Liu, 1997). The analyses of linkage done in JoinMap 2.0 showed that the microsatellites MCPI\_11, CYSTSIN and the BVWS02441 are linked to powdery mildew resistance gene in watermelon at a distance of 2.6 cM with LODs 'score' of 31.42. This means that these markers are very close to the allele that confers the resistance to powdery mildew in watermelon. Therefore, they are suitable for being used in the marker assisted selection for resistance to powdery mildew and considerably accelerate the genetic improvement programs of watermelons of various research institutions that are trying to achieve resistance to powdery mildew.

Molecular markers, when associated with phenotypic

characteristics, such as resistance to powdery mildew, can speed up the improvement programs. Alpuerto et al. (2009) estimated that, with the use of marker assisted selection in rice improvement programs for tolerance to salinity and phosphor deficiency, there was a reduction of 3 to 6 years for the development of a new cultivar in comparison to conventional improvement.

The results of the validation of the microsatellite markers MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441 reinforce the use of these markers in assisted selection aiming to achieve resistance to powdery mildew. Once these markers were analyzed in 17 commercial watermelon cultivars (Fig 2), the cultivar BRS Opara (resistant to powdery mildew) showed an allelic pattern, distinct from all the other examined cultivars, which are susceptible to powdery mildew. Few studies have been found in the literature that report markers associated with phenotypic characteristics in watermelon. Kim et al. (2013) analyzed 5493 RAPD primers and identified one marker (OP-R483) linked to resistance to powdery mildew, race 1 W, at a distance of 3.6 cM. Subsequently, these authors cloned the amplicon that was found with this marker and converted to SCAR1-F and SCAR1-R, which corresponded to the locus OP-S483. The sequences obtained with OP-S483 and OP-R483 showed five single nucleotide polymorphisms (SNP), which were used to develop the CAPs marker.

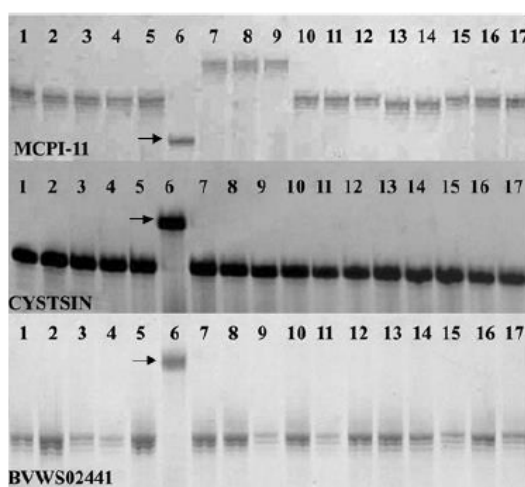
The comparison of the data from this study and the data from the study by Kim et al. (2013) is difficult because different sources of resistance are involved and the authors of the latter study did not provide the primer sequence (OP-R483). Therefore it is not possible to verify whether the microsatellite markers in their study and those that were found in this study are in the same chromosome region.

Considering other economically important crops, assisted

**Table 2.** Name and primer sequence of the polymorphic primers among the cultivars BRS Opara and Pérola.

Primer Name	Primer sequence (5'-3')
MCPI_04 <sup>a</sup>	AGCAAATGCATGGGGAAAAC/TGTTGAATGGAGGCTTTGAG
MCPI_05 <sup>a</sup>	ATTTCTGGCCCCAGTGTAAG/GAACAAACGCAACCACGTATG
MCPI_11 <sup>a</sup>	GAGCAGGGGAGAAGGAAAAC/CCAGTAGCTTTTTCCGATGC
MCPI_16 <sup>a</sup>	TGCTCAATCCACCCTTTCTC/AAAAACAGCAACTCTCCCATC
MCPI_26 <sup>a</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAACC
CYSTSIN <sup>b</sup>	ATTTTCTTGCTTCAAATGGA/ATAAGCAAAGCATCGAAAAG
EST00680 <sup>b</sup>	CCTTATCTCAACTCTTTTCGGA/AGGATTGGGCTTGATTGTTG
BVWS00241 <sup>c</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAACC
BVWS2447 <sup>c</sup>	CAGAGGAACGAGAGGGAGTG/GGGGAGCCCATATTTTAACC
BVWS01050 <sup>c</sup>	GAATTTGCTTCAGCCTTTGG/TTCATTTCTAGGTTGGTTTTAAGATTT
BVWS02384 <sup>c</sup>	TCCAAGTGGCTTGCTCTTTT/TCTCAACCTCAAATTCCGAGA
BVWS01358 <sup>c</sup>	CCCTATTGCCTATTTTCTCAA/AAATTTGTGCTCTTCGTGGG

<sup>a</sup>Primers developed by Joobeur et al. (2006); <sup>b</sup>Primers developed by Guerra-Sánchez (2002); <sup>c</sup>Primers developed by Ren et al. (2012)



**Fig 2.** Allelic pattern for three microsatellite loci CYSTSIN, MCPI\_11 E BVWS02441, linked with resistance to powdery mildew, examined in 17 watermelon cultivars. Cultivars: 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 = Oamaru Yamato, 12 = Sugar Baby, 13 = Fairfax, 14 = Emperor Charleston Bonanza, 15 = Charleston Gray, 16 = Peacock, 17 = Sunshade. Only BRS Opara cultivar is resistant to powdery mildew.

selection by molecular markers has been well used in improvement programs, such as, accelerated development of quality protein maize hybrid through marker-assisted introgression of opaque-2 allele (Gupta et al., 2013).

The great advances have been made in molecular studies in watermelon, especially by providing the genome of this crop (Guo et al., 2013). These authors made it possible to identify the chromosome that suitable microsatellite markers MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441 can be located on.

## Materials and Methods

### Plant materials

A number of crosses were carried out by means of controlled hand-pollination (CHP), as described by Dias et al. (2001), among two watermelon cultivars, contrasting for resistance to powdery mildew: 'BRS Opara' (resistant) and 'Pérola' (susceptible), to obtain population F<sub>1</sub>. Samples of young leaves were collected from each parent and stored in freezer at -80 °C for extraction of DNA. After harvesting of hybrid fruits from the cross, the seeds were washed and put to dry. Subsequently, these seeds were sown in polystyrene trays and

kept in a greenhouse for 12 days. When the seedlings started to develop, leaf samples were collected from F<sub>1</sub> individuals for extraction of DNA and for confirmation of hybridization by PCR, using microsatellite markers.

The seedlings from the F<sub>1</sub> population were transplanted to an experimental field and self-fertilization was carried out during the flowering stage by means of CHP to obtain population F<sub>2</sub>. They were examined for resistance to powdery mildew. After harvesting the fruits, the seeds were washed and put to dry. Subsequently, a final field experiment was carried out to examine the resistance to powdery mildew by using 10 plants of each parent, 100 plants of the F<sub>1</sub> population and 200 plants of the F<sub>2</sub> population. When the seedlings started to develop, samples of young leaves were collected from the F<sub>2</sub> population and conserved in a freezer at -80 °C for extraction of DNA.

### Extraction of DNA and microsatellite analysis of the F<sub>2</sub>s

DNA extraction of the leaves was done by using the 2x CTAB protocol according to Doyle and Doyle (1990), modified to: 7.500 and 10.000 rpm at the first and second centrifugation, respectively; 2-mercaptoethanol at 2% and



incubation at 60 °C for 30 min for all the samples. The DNA was resuspended in a Tris-EDTA buffer and treated with RNase to remove co-isolated RNA. Quantification and integrity analysis of the DNA was performed in agarose gel at 0.8%, followed by storage of the samples in a freezer at -20 °C.

Five microsatellite markers, developed for watermelon by Joobeur et al. (2006), were used (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16 and MCPI\_26) for inclusion of paternity and confirmation of the hybrids. These SSRs were selected from the work by Gama et al. (2013) because they showed PCR products of different sizes for these cultivars. The PCR reaction was done by following the protocol of Joobeur et al. (2004) with some modifications for a final volume of 12 µL, containing 50 ng of DNA, 5 µM of each 'primer', 0.1 mM of dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1x PCR buffer and 0.75 units of the Taq DNA polymerase enzyme. Programming of the thermal cycler for amplification consisted of: a) an initial cycle of 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 15s, at 56 °C for 30 s and at 72 °C for 2 min and a final cycle at 72 °C for 30 min.

Six µL of formamide denaturation buffer 98% (EDTA pH 8.0 10mM, 1 mg/mL of Xylene Cyanol and 1 mg/mL of Bromophenol blue) was added to the solution from the PCR reaction, followed by complete denaturation at 94 °C for 5 min in a thermal cycler and put on ice until applying in polyacrylamide gel. Two and half µL of the denatured PCR reaction was applied to the 6% polyacrylamide gel. The electrophoresis carried out for approximately 3 h with a constant power of 45 W. The gels were stained with silver nitrate according to the procedure described by Creste et al. (2001). It was observed if the hybrids exhibited alleles from both the female parent (BRS Opara) and the male parent (Pérola).

#### *Phenotyping for resistance to powdery mildew of the F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and parents*

After the flowering period, powdery mildew inoculation was carried out by using a suspension of sterile water and powdery mildew from watermelons in a concentration of 10<sup>6</sup> conidia/ml, adding a spreader sticker ("Tween 80"). The plants that showed 0-30 colonies of powdery mildew were considered resistant and those that showed more than 31 colonies were considered susceptible.

#### *Genotyping of the F<sub>2</sub> population for resistance to powdery mildew, using microsatellite markers*

Initially, a screening was done with 116 microsatellite markers developed for watermelon (Jarret et al., 1996; Guerra-Sánchez, 2002; Joobeur et al., 2006; Ren et al., 2012). In order to select the primers that show different sizes of the PCR product among the parents, they were used to analyze five resistant and five susceptible individuals from the F<sub>2</sub> population to identify alleles that were present in the resistant individuals and absent in the susceptible individuals or vice versa. Subsequently, the primers that were capable to verify this characteristic, were used to genotype the 200 individuals of the F<sub>2</sub> population. The methodology that was used for DNA extraction, PCR reaction using microsatellite markers and polyacrylamide gels was the same as was described previously for the F<sub>1</sub> topic DNA extraction and microsatellite analyses.

#### *Statistical analysis and identification of the chromosome region of resistance to powdery mildew*

The data were annotated taking 'b' for the dominant ('AA') and the heterozygote ('Aa') and 'd' for the recessive ('aa') microsatellite genotypes. The data that were obtained by the microsatellite markers and by visual examination of resistance/susceptibility to powdery mildew were submitted to the chi-square test at 0.05 for verification of the Mendelian of expected segregation for a trait monogenic and dominant in a F<sub>2</sub> population of 3:1. The linkage analyses were done by using the program JoinMap version 2.0 (Stam and Van Ooijen, 1995) and the values obtained by the recombination frequencies were converted into maps of genetic distance (centiMorgan) by using the Kosambi function (Kosambi, 1944).

A blast search was done for primer sequence and its PCR products, linked to resistance to powdery mildew, in the watermelon genome available at: <http://www.icugi.org> (Guo et al., 2013), to determine in which chromosomes these primers are located.

#### *Validation of microsatellite markers linked to resistance to powdery mildew*

In the current study, three microsatellite markers linked to resistance to powdery mildew were selected out of 116 markers. They were analyzed in 17 commercial cultivars of 'Minipool', 'Pérola', 'Smile', 'BRS Soleil', 'BRS Kuarah', 'BRS Opara', 'Crimson Sweet', 'Crimson Select', 'Nova Crimson', 'Top gun', 'Omaru Yamato', 'Sugar Baby', 'Fairfax', 'Emperor Charleston Bonanza', 'Charleston Gray', 'Peacock' and 'Sunshade' watermelons. Among these, only the cultivar 'BRS Opara' is resistant to powdery mildew and all the other analyzed cultivars were susceptible. The resistant and susceptible genotypes ['BRS Opara' (resistant) × 'Pérola' (susceptible)] then used to create the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> populations.

#### **Conclusions**

The microsatellite markers MCPI\_11, CYSTSIN and BVWS02441, are closely linked with resistance to powdery mildew genes and may offer support for watermelon improvement programs with resistance to this disease and other desirable agronomic traits. The identification of the chromosome region, in which these markers are located, will facilitate future studies to identify the gene that confers resistance to powdery mildew in watermelon.

#### **Acknowledgments**

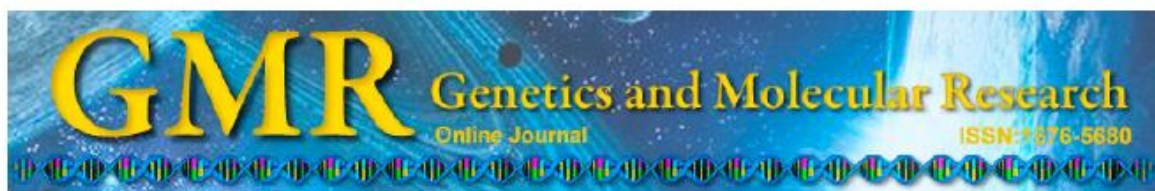
We acknowledge the CAPES for providing a scholarship for the first author and to Embrapa Semiárid for supporting the research activities.

#### **References**

- Agriannual (2014) Anuário da Agricultura Brasileira. FNP, São Paulo, Brasil.
- Alpuerto Vida-Lina EB, Norton GW, Alwang J, Ismail AM (2009) Economic impact analysis of marker-assisted breeding for tolerance to salinity and phosphorous deficiency in rice. *Appl Econ Perspect Pol.* 31(4): 779-792.

- Bhering LL, Pinto CABP, Benites, FRG, Leite ME, Silva FL (2009) Seleção assistida por marcadores para teor de matéria seca e açúcares redutores em tubérculos de batata. *Cienc Rural*. 39: 8-44.
- Borges RME, Queiróz MA de, Nascimento ARP, Tavares SCC de H (2002) Herança da resistência ao oídio em cucurbitáceas. In: Tavares SCC de H (ed) *Melão: fitossanidade*, 25th edn. Embrapa Informação Tecnológica, Embrapa Semiárido, Brasil.
- Caixeta ET, Oliveira ACB de, Brito GG de, Sakuyama NS (2009) Tipos de marcadores moleculares. In: Borém A and Caixeta ET (ed) *Marcadores moleculares*, 2nd edn. UFV, Viçosa.
- Cohen Y, Baider A, Petrov L, Sheck L, Voloisky V (2000) Cross-infectivity of *Sphaerotheca fuliginea* to watermelon, melon, and Cucumber. *Acta Hort*. 510: 85-88.
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Bio Rep*. 19: 299-306.
- Davis AR, Bruton BD, Pair SD, Thomas CE (2001) Powdery mildew: an emerging disease of watermelon in the United States. *Cucurbit Genet Coop Rep*. 24: 42-48.
- Davis AR, Levi A, Tetteh A, Wehner, T, Pitrat P (2007) Evaluation of watermelon and related species for resistance to race 1W powdery mildew. *J Amer Soc Hort Sci*. 132(6): 790-795.
- Davis AR, Thomas CE, Levi A, Bruton BD, Pair SD (2002) Watermelon resistance to powdery mildew race 1. In: Maynard DN (ed) *Cucurbitaceae*, ASHS Press, Alexandria.
- Dias RCS, Costa ND, Queiróz, MA, Faria CMB (2001) *Cultura da melancia*, Embrapa Semiárido, Petrolina.
- Doyle JJ e Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Gama RNCS, Santos CAF, Dias R de CS, Souza F de F (2013) Molecular characterization of watermelon cultivars using microsatellite markers. *Hortic Bras*. 31: 522-527.
- Guerra-Sanz JM (2002) *Citrullus* simple sequence repeats markers from sequence databases. *Mol Ecol Notes*. 2: 223-225.
- Guo S, Zhang J, Sun H et al (2013) The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat Genet*. 45: 51-60.
- Gupta HS, Babu R, Agarwal PK, Mahajan V, Hossain F, Thirunavukkarasu N (2013) Accelerated development of quality protein maize hybrid through marker-assisted introgression of *opaque-2* allele. *Plant Breeding*. 132: 77-82.
- Jahn M, Munger HM, McCreight JD (2002) Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In: Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver LW (ed) *The powdery mildews: A comprehensive treatise*. APS Press, St. Paul.
- Jarret RL, Merrick LC, Holms T, Evans J, Aradhya MK (1996) Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai). *Genome*. 40: 433-441.
- Joobeur T, Gusmini, G, Zhang A, Levi A, Xu Y, Wehner TC, Oliver M, Dean RA (2006) Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or Arabidopsis genomes. *Theor Appl Genet*. 112: 1553-562.
- Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, Thomas CE, Dean RA (2004) The fusarium resistance locus From-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J*. 39: 283-297.
- Kim K-H, Ahn S-G, Hwan J-H, Choi Y-M, Moon H-S, Park Y-H (2013) Inheritance of resistance to powdery mildew in the watermelon and development of a molecular marker for selecting resistant plants. *Hortic Environ Biotechnol*. 54: 134-140.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen*. 12: 172-175.
- Liu, BH (1997) *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*, 1st edn. CRC Press, New York.
- Mohamed YF, Bardin M, Nicot PC (1995) Causal agents of powdery mildew of cucurbits in Sudan. *Plant Dis*. 79: 634-635.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol*. 29: 294-307.
- Reis A, Buso JA (2004) Levantamento preliminar de raças de *Sphaerotheca fuliginea* no Brasil. *Hortic Bras*. 22: 628-631.
- Reis A, Dias RCS, Aragão FAS, Boiteux LS (2005) Caracterização do perfil patogênico de isolados de *Podosphaera xanthii* obtidos em cucurbitáceas na região Nordeste do Brasil. *Hortic Bras*. 23:362-362.
- Ren Y, Zhao H, Kou Q, Jiang J, Guo S, Zhang H, Hou W, Zou X, Sun H, Gong G, Levi A, Xu Y (2012) A high resolution genetic map anchoring scaffolds of the sequenced watermelon genome. *Plos One*. 7: 1-10.
- Souza RC, Araújo JP, Queiróz MA (1988) Avaliação da resistência de acessos de melancia ao oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). *Hortic Bras*. 6(1): 82-1988.
- Stam P, Van Ooijen JW (1995) *JOINMAP TM version 2.0: software for the calculation of genetic maps*. Wageningen, The Netherlands: CPRO-DLO.
- Terao D, Castro JM da C, Lima MF, Batista D da C, Barbosa MAG, Reis A, Dias R de CS Doenças (2010) In: Dias R de CS, Resende GM, Costa ND (ed) *Sistema de produção de melancia*. Publishing Embrapa Semiárido <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/doencas.htm>>. Accessed em: 06 February 2014.
- Tetteh AY, Wehner TC, Davis AR (2010) Identifying resistance to powdery mildew race 2W in the USDA-ARS watermelon germplasm collection. *Crop Sci*. 50: 933-939.
- Tetteh AY, Wehner TC, Davis AR (2013) Inheritance of resistance to the new race of powdery mildew in watermelon. *Crop Sci*. 53: 880-887.





## Microsatellite markers linked to the locus of the watermelon fruit stripe pattern

R.N.C.S. Gama<sup>1</sup>, C.A.F. Santos<sup>2</sup>, R.C.S. Dias<sup>2</sup>, J.C.S.F. Alves<sup>3</sup> and T.O. Nogueira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, BA, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Petrolina, PE, Brasil

Corresponding author: R.N.C.S. Gama  
E-mail: renata.natalia@hotmail.com

Genet. Mol. Res. 14 (1): 269-276 (2015)

Received July 25, 2014

Accepted November 12, 2014

Published January 16, 2015

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.January.16.11>

**ABSTRACT.** Agronomic performance and external and internal appearance of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit are important traits that should be taken into consideration during the development of a new cultivar, as well as being the principal identification elements used by the consumer, which are based on the external appearance and quality of the fruit. Externally, the fruit can be characterized in terms of the shape, the color of the lower rind, and the presence of grooves and stripes, the stripes can be classified as clearly defined or diffuse. The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to the stripe pattern of watermelon fruit to support watermelon improvement programs, with the selection of this characteristic in the plantlet stage. F1 and F2 populations, result of a cross between the cultivars BRS Opara (clearly defined stripes) and Pérola (diffuse stripes), were phenotyped for their fruit stripe pattern. The CTAB 2X

protocol was used for DNA extraction and 116 microsatellite markers were examined in a group of F2 plants that had fruit with well-defined stripes and fruit with diffuse stripes. The microsatellite loci MCPI\_05 and MCPI\_16 exhibited a linkage to the stripe pattern at a distance of 1.5 and 1.8 cM, respectively, with LOD scores of 39.28 and 38.11, respectively, which were located on chromosome six of the watermelon genome. These markers can be used in marker-assisted selection in watermelon improvement programs, by various research institutions.

**Key words:** *Citrullus lanatus*; Fruit external pattern; SSR; Assisted selection

## INTRODUCTION

The watermelon (*Citrullus lanatus*) is a member of the Cucurbitaceae, and is cultivated all over the world. There are various cultivars of this species, which differ from one another in terms of the external pattern of the fruit, the color of the pulp, the level of soluble solids, the yield, resistance to pests and diseases, and precocity, among other desirable agronomic traits. A summary of these morphological traits is provided by Dias et al. (2010) and Gama et al. (2013).

During the development of a new cultivar, it is necessary to consider the possible clients: producers, industry, and consumers (Borém and Miranda, 2013). According to Dias et al. (2010), the cultivar Crimson Sweet (and similar types), which is American in origin and has a clearly defined stripe pattern, is the most cultivated in Brazil, and accounts for over 90% of the consumer market. When selecting a cultivar for planting, the following should be taken into consideration: the fruit that is preferred by the consumer market, its tolerance of transport, the adaptation of the cultivar to the region, and its tolerance to disease and to physiological disorders. Therefore, genetic improvement programs should have various goals, including resistance to disease and pests, increased yield, and the external and internal appearance of the fruit, since appearance is the consumer's method of identifying the cultivar.

According to morphological descriptions of watermelons (Brazilian Ministry for Agriculture), the external pattern of watermelon fruit can be characterized in terms of the shape of the fruit, the color of the lower rind, the presence of grooves, the presence of stripes (well-defined or diffuse), the intensity of the stripe coloration, and the width of the stripes. The internal pattern can be characterized in terms of the thickness of the pericarp, coloration, and the firmness of the flesh (Brasil, 2009).

Classic improvement techniques for the selection of the watermelon fruit pattern can only be conducted during the fructification stage or during harvest, 40 and 80 days after sowing, respectively. Biotechnological techniques, such as microsatellite markers, make it possible to select individuals based on their genotype, independently of biotic or abiotic factors, and at any developmental stage of the plant. In this way, the identification of molecular markers that are linked to phenotypic traits, such as the stripe pattern of watermelon fruits, enables selection of the desired external pattern of the fruit still in the seedling stage, as well as a better understanding of the inheritance of the trait between progenies and a reduction in the number of individuals that have to be examined in the field (Bhering et al., 2009). Marker-assisted selection (MAS) tends to speed up improvement programs, because selection can be conducted during the initial stages of plant development, which is of fundamental importance for the development of new



cultivars (Demore, 2008). Various molecular markers that are associated with different phenotypic traits permit MAS, and can add various traits of interest to a new cultivar.

Microsatellite markers, also known as simple sequence repeats (SSRs), consist of units of approximately one to six nucleotides repeated in tandem (Oliveira et al., 2006; Caixeta et al., 2009). They have been developed for various cultivated plant species and are quickly replacing other marker types in various types of genetic studies, because of their reproducibility and technical simplicity, the small amount of DNA that is required, their low cost, their great resolving power, and their high levels of polymorphism (Caixeta et al., 2009). Gama et al. (2013) used 36 molecular markers to characterize 17 watermelon cultivars, and observed the formation of two groups, one that contained cultivars that exhibited a diffuse stripe pattern, and one that contained cultivars that exhibited a well-defined stripe pattern.

The authors also found that for the markers MCPI-05 and MCPI-16, all the cultivars that had well-defined stripe patterns had the same allelic pattern.

The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to the stripe pattern of watermelon fruit to support watermelon improvement programs, with the selection of this characteristic in the plantlet stage.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

Crosses were made by controlled hand-pollination (CHP), as described by Dias et al. (2001), between two watermelon cultivars that had different stripe patterns on their fruit: the cv. BRS Opara (well-defined stripes) and the cv. Pérola (diffuse stripes), to obtain the F1 population. Samples of young leaves were collected from each parent and stored in a freezer at -80°C until DNA extraction. After harvesting, the fruits from this cross were characterized, and the seeds were washed and dried. Seeds (F1) of one of these fruits were sown in polystyrene trays and kept in a greenhouse for 12 days. At the beginning of seedling development, leaf samples of the F1 were collected for later DNA extraction and confirmation of hybridization by polymerase chain reaction (PCR) analysis, using microsatellite markers.

Seedlings of the F1 population were transplanted to the Experimental Field of Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brazil. During the flowering stage, the autofecundation of these plants was conducted by CHP to obtain the F2 population. After harvesting, the fruits were characterized and the seeds were washed and dried.

A final field experiment was carried out, in which fruit from the parents of the F1 and F2 populations were characterized in terms of their stripe patterns (well-defined or diffuse stripes). One-hundred plants of the F1 population and 200 plants of the F2 population (the seeds used were collected from a single fruit), as well as thirty plants of each parent, were examined. During the initial seedling development stage, young and mature leaf samples were collected from the F2 population and stored in a freezer at -80°C until DNA extraction. During this stage, no leaf samples were collected from the parents or the F1 population, because this DNA had been extracted earlier.

### DNA extraction and microsatellite analyses of the F1s

DNA extraction of the leaves was conducted using the Doyle and Doyle (1990)

CTAB 2X protocol, modified to 7500 and 10,000 rpm at the first and the second centrifugations, respectively, and 2% beta-mercaptoethanol and incubation at 60°C for 30 min, for all the samples. The DNA was resuspended in a Tris-EDTA buffer and treated with RNase to remove co-isolated RNAs. The quantification, and an integrity analysis, of the DNA were carried out on 0.8% agarose gel, and the samples were subsequently stored in a freezer at -20°C.

Five microsatellite markers were used (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16, and MCPI\_26) and were developed for the watermelon by Joobeur et al. (2006), for the inclusion of paternity and confirmation of the hybrids. These SSRs were selected based on the study by Gama et al. (2013), because they exhibited PCR products of different sizes for these cultivars. The PCR was conducted by following the protocol of Joobeur et al. (2004), with some modifications: the total volume of 12 µL contained 50 ng DNA, 5 µM of each primer, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X PCR buffer, and 0.75 U Taq polymerase DNA enzyme. The programming of the thermocycler for the amplifications was as follows: an initial cycle of 94°C for 2 min, followed by 30 cycles at 94°C for 15 s, at 56°C for 30 s, and at 72°C for 2 min, and a final cycle at 72°C for 30 min. Half of the volume from the reaction and 98% formamide denaturation buffer (10 mM EDTA, pH 8.0, 1 mg/mL xylene cyanol, and 1 mg/mL bromophenol blue) was added to the PCR solution, followed by complete denaturation at 94°C for 5 min in a thermocycler, then was immediately put on ice until use on a polyacrylamide gel. The amplification products were separated on 6% polyacrylamide gel, prepared on a glass plate of the sandwich type, with a capacity for sixty holes. A pre-run of 30 min at 35 W was conducted before adding the PCR samples. Two-and-a-half microliters of the denatured PCR on the 6% polyacrylamide gel was subjected to an electrophoresis current that was maintained for approximately 3 h, with a constant potential of 45 W. A 50-bp molecular-weight ladder (Fermentas) was charged at the lateral extremity of each gel. The gels were stained with silver nitrate, in accordance with the procedure described by Creste et al. (2001). To confirm that the obtained result of the cross between the cultivars was from F1 plants, and was free of contamination, the hybrids were examined to ascertain whether they only exhibited the allelic patterns of the parents.

### **Phenotyping for the stripe patterns of watermelon fruit in the F1 and F2 populations and the parents**

Harvesting was conducted manually, 75 days after sowing. The fruits were identified by the plant number, and taken to a barn where they were characterized in terms of morphological descriptors for the watermelon. The number of fruits with well-defined or diffuse stripe patterns was recorded.

### **Genotyping the F2 population for stripe patterns on the fruit using microsatellite markers**

A total of 116 microsatellite markers developed for the watermelon were analyzed, seven of which were developed by Jarret et al. (1996), 18 by Guerra-Sanz (2002), 36 by Joobeur et al. (2006), and 55 by Ren et al. (2012), in order to select those primers that exhibited PCR products of different sizes among the parents. These were ten used to analyze five individual fruits with well-defined stripe patterns and five with diffuse stripe patterns from the F2



population, to identify alleles that were present in the individuals with well-defined stripe patterns and absent in the individuals with diffuse stripe patterns, and vice-versa. After verifying this characteristic with these thirty individuals, the selected primers were used to genotype the 200 individuals of the F2 population. The methodology used for DNA extraction, PCR, and use of microsatellite markers and revelation of the polyacrylamide gels was the same as was previously described for the F1 DNA extraction and microsatellite analyses.

### Statistical analyses and identification of the chromosomal region of the stripe patterns of watermelon fruit

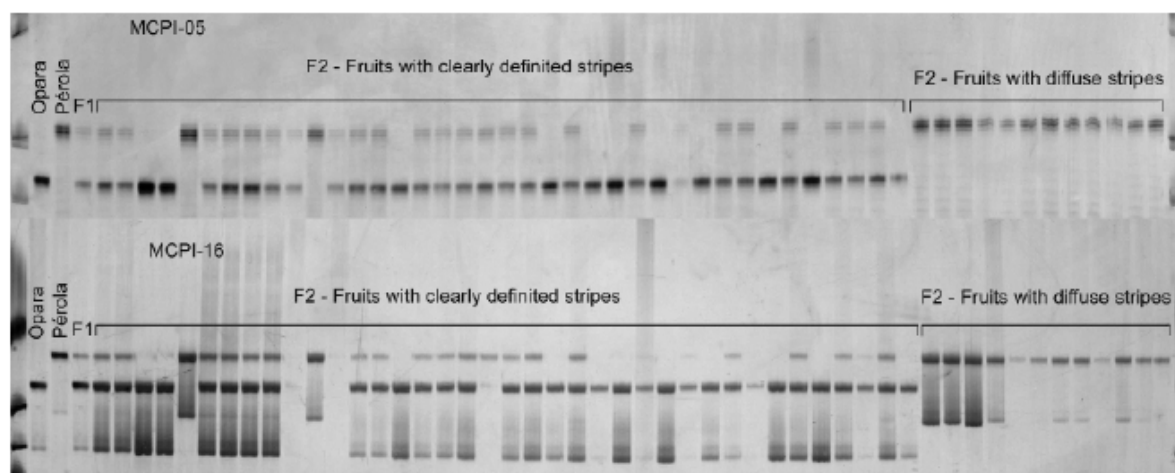
The data were annotated for the presence (1) or absence (0) of alleles. The data obtained by microsatellite markers and a visual evaluation of the fruit with well-defined or diffuse stripes were subjected to a chi-squared test with the significance set at  $P < 0.05$ , to verify the expected Mendelian segregation pattern of 3:1 in the F2 population. The linkage analyses were performed using the JoinMap (version 2.0) program (Stam and Van Ooijen, 1995), and the values obtained by the recombination frequencies were converted to maps of genetic distance (in centimorgans) using the Kosambi function (Kosambi, 1944). A BLAST of the primer sequence and its PCR products was performed on the genome of this species, in relation to the stripe patterns on its fruit.

## RESULTS

The five microsatellite markers (MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16, and MCPI\_26) used to confirm hybridization were capable of discriminating the F1 population from its parents: individuals of the F1 population only exhibited the alleles of the feminine genitor (BRS Opara) and of the masculine genitor (Pérola).

During the phenotyping of the F1 and F2 populations and the parents for the external stripe patterns on the fruit, it was found that the parents were homozygous for this characteristic, because 100% of the examined fruits of cv. BRS Opara had well-defined stripe patterns and 100% of the fruits of cv. Pérola exhibited diffuse stripe patterns. In the F1 population, 100% of the fruits had well-defined stripes; in the F2 population, 150 (75%) of the fruits had well-defined stripes and 50 (25%) had diffuse stripe patterns. The observed values of the F2 population are equal to those that were expected for a monogenic and dominant character. The study of inheritance genetics carried out on the F2 population indicated that the presence of well-defined stripes is conditioned by a dominant gene, which segregates at a ratio of 3:1.

Only 12 of the 116 microsatellite markers examined were polymorphic in the parents of the population studied. During the analysis of ten individuals from the F2 population, only two primer pairs exhibited the expected allelic pattern, with the presence of an allele in the fruits with a well-defined stripe pattern and an absence of an allele in the fruits with a diffuse stripe pattern. The primer pairs were as follows: MCPI\_05 (ATTCTGGCCCCAGTGTAAG/GAACAACGCAACCACGTATG) and MCPI\_16 (TGCTCAATCCACCCTTCTC/AAAAACA GCAACTCTCCCATC), developed by Joobeur et al. (2006). During the genotyping of the 200 individuals of the F2 population, the markers revealed the presence of an allele in the fruits with well-defined stripe patterns and the absence of an allele in the fruits with a diffuse stripe pattern (Figure 1).



**Figure 1.** Allelic patterns of the watermelon cultivars BRS Opara (fruits with well-defined stripes) and Pérola (fruits with diffuse stripes) of F1 and of 50 individuals from the F2 population (38 with well-defined stripes and 12 with diffuse stripes), using two microsatellite markers (MCPI\_05 and MCPI\_16) that are associated with the stripe pattern of watermelon fruit.

The linkage analyses performed using JoinMap 2.0 revealed that the microsatellites MCPI\_05 and MCPI\_16 are linked to the gene responsible for the stripe pattern of watermelon fruit at a distance of 1.5 and 1.81 cM, respectively, with LOD scores of 39.28 and 38.11, respectively. The BLAST search of the two primer pair sequences and their PCR products performed on the watermelon genome, revealed that the gene related to the stripe patterns on watermelon fruit is located on chromosome six, and that the two markers in question are very close to each other, and to some genes predicted by Guo et al. (2013).

## DISCUSSION

The results for obtaining the F1 and F2 populations indicate that the PMC method described by Dias et al. (2001) is effective in obtaining watermelon crosses in which the genitors have to be controlled and are free from pollen contamination by other genotypes. The microsatellite markers MCPI\_04, MCPI\_05, MCPI\_11, MCPI\_16, and MCPI\_26 could be used as identification tools in parentage analysis of watermelon hybrids, in crosses among the cultivars ‘BRS Opara’ and ‘Pérola’. Furthermore, such markers could also be used to distinguish ‘BRS Opara’ from the hybrid obtained in this study, because both are mildew resistant and have a well-defined stripe pattern. In addition to exhibiting a slightly different green skin tonality, it is also important to point out that the hybrids cannot possibly be identified with absolute certainty by using only morphological descriptors, because skin coloration can be influenced by environmental factors. Using molecular markers, the selection of the external pattern of the fruit can even be conducted before the fructification stage, at the plantlet stage. The frequent use of the marker in genetic studies, including paternity tests, is due to the fact that it is co-dominant, multiallelic, highly reproducible, and has a high resolution (Varshney et al., 2005; Oliveira et al., 2006).

The results obtained from the phenotyping of the F1 and F2 populations and the parents for the stripe pattern followed the Mendelian segregation of 3:1 (well-defined stripes:diffuse stripes), with a dominant gene that confers the well-defined stripe pattern. Therefore, it can be concluded that the heredity of this characteristic is monogenic and dominant. From the



genotyping of the F2 population using the microsatellite markers MCPI\_05 and MCPI\_16, it was revealed that these are intimately linked to the locus that confers the characteristic stripe patterns on watermelon fruit. These markers could be used in MAS to select this characteristic in watermelons still in the plantlet stage. It is not necessary to wait until the fructification stage to select the pattern of the desired fruit, and there is the advantage of being able to identify homozygous and heterozygous individuals for this characteristic. Such considerations would save time, space, and money, because they allow the breeder to include only those plants that show the desired characteristic for an improvement program.

Few studies have used molecular markers in relation to phenotypic traits in the watermelon. Lin et al. (2009) identified a random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker that is linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, and based on this, a sequenced characterized amplified region (SCAR) marker was developed, which, according to the authors, is able to quickly and accurately identify genotypes of watermelon that are resistant and susceptible to *Fusarium*. Wechter et al. (2008) studied the genetic expression of the watermelon fruit during maturation, in three stages: green pulp (start of development), pink pulp (start of maturation), and red pulp (mature fruit) using microarrays, and identified genes that are possibly related to the maturation events of the fruit. Prothro et al. (2012) identified a quantitative trait locus (QTL), named M-QTL, in the linkage group (LG 2) as a candidate for MAS for watermelon seed size.

Studies involving molecular markers associated with phenotypic traits have also been developed in other members of the Cucurbitaceae, such as melon and cucumber. Some studies have associated molecular markers with phenotypic traits, both for resistance to disease and for various fruit traits. Liu et al. (2010) analyzed 700 combinations of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) primers, and identified a marker linked to the gene that confers resistance to *Podospaera xanthii*, at a distance of 3.9 cM. Liu et al. (2010) cloned, sequenced, and converted this marker into SCAR. The authors stated that this marker can be used in MAS in the development of watermelon cultivars, in order to achieve resistance to *P. xanthii*. Meng et al. (2012) analyzed 130 plants of an F2 population from a cross of two cucumber genotypes, B-2-2 (long-fruit shape) and Y-3 (round-fruit shape), and identified SRAP markers that are linked to cucumber shape. Napier et al. (2009) identified a RAPD marker and an orange pulp-coloration marker in watermelon fruit that are linked to the QTLs for the high level of beta-carotene.

Studies that associate phenotypic traits with molecular markers in the watermelon are at an early stage. Following the characterization of the genome of this species by Guo et al. (2013), various other traits of interest could be associated with molecular markers, such as the soluble solid content, skin and pulp color, yield, acidity, precocity, and resistance to disease and pests, among others. The microsatellite markers MCPI\_05 and MCPI\_16 that were identified in this study as being linked to the stripe pattern in watermelon fruit can be used in MAS for the development of cultivars of this crop. Furthermore, the identification of the chromosome on which these markers are located will allow a closer study of the genes that are found in the proximity of these markers, which may be related to the stripe pattern of watermelon fruit.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CAPES for a scholarship for the first author and to Embrapa Semiárido for supporting the research activities.

## REFERENCES

- Bhering LL, Pinto CABP, Benites, FRG, Leite ME, et al. (2009). Seleção assistida por marcadores para teor de matéria seca e açúcares redutores em tubérculos de batata. *Cienc. Rural* 39: 8-44.
- Borém A and Miranda GV (2013). Melhoramento de Plantas. 6th edn. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Brasil (2009). Rules to Apply Distinguishability, Homogeneity and Stability Descriptors for Watermelon Cultivars. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 Junho 2009. Section 1.
- Caixeta ET, Oliveira ACB de, Brito GG de and Sakuyama NS (2009). Tipos de Marcadores Moleculares. In: Marcadores Moleculares (Borém A and Caixeta ET, eds.). UFV, Viçosa, 11-94.
- Creste S, Tullmann Neto A and Figueira A (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 299-306.
- Demore P dos S (2008). Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Microsatélites para Resistência ao Oídio em Soja. Master's thesis, UNESP, São José do Rio Preto.
- Dias R de CS, Costa ND, Queiróz, MA de and Faria CMB de (2001). Cultura da Melancia. Embrapa Semiárido, Petrolina, 20.
- Dias R de CS, Barbosa GS, Souza FF, Queiróz MA de, et al. (2010). Cultivares. In: Sistema de Produção de Melancia (Dias R de CS, Resende GM de and Costa ND, eds.). Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Available at [<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/cultivares.htm>]. Accessed April 23, 2014.
- Doyle JJ and Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Gama RNCS, Santos CAF, Dias R de CS and Souza F de F (2013). Molecular characterization of watermelon cultivars using microsatellite markers. *Hort. Bras.* 31: 522-527.
- Guerra-Sanz JM (2002). *Citrullus* simple sequence repeats markers from sequence databases. *Mol. Ecol. Notes* 2: 223-225.
- Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, et al. (2013). The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat. Genet.* 45: 51-60.
- Jarret RL, Merrick LC, Holms T, Evans J, et al. (1996). Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). *Genome* 40: 433-441.
- Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, Thomas CE, et al. (2004). The *Fusarium* wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J.* 39: 283-297.
- Joobeur T, Gusmini, G, Zhang A, Levi A, et al. (2006). Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or *Arabidopsis* genomes. *Theor. Appl. Genet.* 112: 553-562.
- Kosambi DD (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- Lin Y-H, Chen K-S, Liou T-D, Huang J-W, et al. (2009). Development of a molecular method for rapid differentiation of watermelon lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Bot. Stud.* 50: 273-280.
- Liu L, Chen Y, Su Z, Zhang H, et al. (2010). A sequence-amplified characterized region marker for a single, dominant gene in melon PI 134198 that confers resistance to a unique race of *Podosphaera xanthii* in China. *HortScience* 45: 1407-1410.
- Meng H, Chen S, Cheng Z, Chai D, et al. (2012). SRAP markers for fruit shape in cucumber. *Pak. J. Bot.*, 44: 1381-1384.
- Napier AB, Park SO, Hwang HY and Crosby KM (2009). Identification and confirmation of molecular markers and orange flesh color associated with quantitative trait loci for beta-carotene in musk melon. *ISHS Acta Hort.* 841: 585-588. Available at [[http://www.actahort.org/books/841/841\\_89.htm](http://www.actahort.org/books/841/841_89.htm)]. Accessed April 23, 2014.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, et al. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 29: 294-307.
- Prothro J, Sandlin K, Abdel-Haleem H, Bachlava E, et al. (2012). Main and epistatic quantitative trait loci associated with seed size in watermelon. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 137: 452-457.
- Ren Y, Zhao H, Kou Q, Jiang J, et al. (2012). A high resolution genetic map anchoring scaffolds of the sequenced watermelon genome. *Plos One* 7: 1-10. e29453.
- Stam P and Van Ooijen JW (1995). JoinMap Version 2.0: Software for the Calculation of Genetic Maps. CPRO-DLO, Wageningen.
- Varshney RK, Garner A and Sorells ME (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23: 48-63.
- Wechter WP, Levi A, Harris KR, Davis AR, et al. (2008). Gene expression in developing watermelon fruit. *BMC Genomics* 9: 275.