

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO  
VEGETAL**



**DIVERSIDADE DE GENÓTIPOS DE MELÃO POR MEIO  
DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADOR  
RGA**

**CAROLINE CERQUEIRA MACIEL**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**JULHO de 2014**

**CAROLINE CERQUEIRA MACIEL**

**DIVERSIDADE DE GENÓTIPOS DE MELÃO POR MEIO  
DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADOR  
RGA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

**Área de concentração:** Melhoramento Genético Vegetal

**Orientador:** Ronan Xavier Corrêa

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**JULHO de 2014**

CAROLINE CERQUEIRA MACIEL

**DIVERSIDADE DE GENÓTIPOS DE MELÃO POR MEIO  
DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADOR  
RGA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

**Área de concentração:** Melhoramento Genético Vegetal

Ilhéus, 25 de Julho de 2014

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Norma Eliane Pereira  
(UESC)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Gualberto Santos  
(UNIME)

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa  
(UESC – Orientador)

## DEDICATÓRIA

*A minha mãe, Roseane Cerqueira e ao meu esposo Vanei Lobo pelo carinho, amor, compreensão e por estarem sempre presente em minha vida me apoiando em todos os momentos. E em especial ao meu filho, meu pequenino Elias,  
Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo seu amor incondicional e pela sua misericórdia renovada todos os dias em minha vida.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela oportunidade de ensino para que eu pudesse realizar esse curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento do projeto.

Ao meu Orientador Ronan Xavier Corrêa, por todos os ensinamentos, incentivo e força em todos os momentos.

À pós graduação em Produção Vegetal, em especial a todos os que compõem o corpo docente, pelos ensinamentos transmitidos durante o mestrado.

Aos mestrandos em Produção Vegetal, pela convivência e troca de ensinamentos, em especial a Lorena, pelo convívio e amizade.

Ao Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), pelo espaço cedido para realização das análises moleculares.

À equipe do laboratório de Genética e Biologia Molecular, pela ajuda durante a obtenção dos dados moleculares.

A Andressa, Carina e Cláudio, pela colaboração e ajuda imprescindíveis durante o andamento do curso.

Aos meus familiares, pela compreensão e apoio constante e por todos os ensinamentos da minha vida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
3.1 A Cultura do melão .....	5
3.2 Importância socioeconômica.....	6
3.3 A Diversidade do meloeiro .....	8
3.4 Melhoramento Genético do Melão .....	10
3.4.1 Análise morfoagronômica .....	10
3.4.2 Caracterização Molecular .....	11
3.4.3 Método Ward-MLM .....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4.1 Material Biológico .....	14
4.2 Mensuração de Variáveis Biológicas .....	14
4.3 Análise de dados.....	16
4.4 Caracterização Molecular .....	17
4.4.1 Extração de DNA .....	17
4.4.2 Amplificação de RGAs por PCR .....	18
4.4.3 Análise dos dados moleculares.....	18
5 RESULTADOS .....	20
5.1 Biologia Floral .....	20
5.2 Método multivariado <i>Ward-MLM</i> .....	21
5.3 Amplificação do DNA.....	30

<b>5.4</b>	<b>Marcadores RGAs .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6.1</b>	<b>Biologia Floral .....</b>	<b>34</b>
<b>6.2</b>	<b>Método multivariado Ward-MLM .....</b>	<b>35</b>
<b>6.3</b>	<b>Marcadores RGAs .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>Anexos</b>		

## DIVERSIDADE DE GENÓTIPOS DE MELÃO POR MEIO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADOR RGA

### RESUMO

O melão é uma das espécies de maior importância econômica da família Cucurbitaceae e possui grande variabilidade genética em relação a diversos caracteres como cor, forma e tamanho dos frutos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética de genótipos de melão por meio de descritores morfológicos e marcador RGA sob condição de casa de vegetação. Foram avaliadas 58 genótipos de melão para a análise morfológica, composto por 38 acessos do banco de germoplasma da Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA), 5 cultivares comerciais, 5 cultivares novas e 10 seleções do programa de melhoramento da UFERSA e 54 desses mesmos genótipos para análise molecular. Para analisar o vigor vegetativo foi realizado a mensuração das variáveis biológicas; comprimento do ramo principal (CRP) e número de folhas (NF) a cada 7 dias durante o desenvolvimento em casa de vegetação. Adicionalmente, o número de dias para o aparecimento das primeiras flores masculina (NDM) e feminina (NDF) foram avaliados e transformados em variáveis qualitativas (florescimento precoce, mediano e tardio). Os dados foram avaliados através da estratégia *Ward-MLM*, visando identificar genótipos promissores e adequados para a utilização em programa de melhoramento para citada cultura. O método de *Ward-MLM* para as variáveis quantitativas dividiu os genótipos avaliados em 13 grupos. Os grupos mais similares foram os grupos 1 e 3 com distâncias de 4,059 e o mais divergentes foram os grupos 12 e 13. Para análise molecular foram obtidos marcadores RGA (*Resistance Genes Analogs*). O polimorfismo RGA observado na



população foi convertido em uma matriz de dados binários (presença e ausência), a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes genótipos visando à análise de agrupamento pelo método UPGMA. Em relação à análise molecular foi gerado o dendrograma com base no coeficiente de similaridade de Jaccard. Foi observada a similaridade em locos RGA variando de 35% a 100% com formação total de 7 grupos. Com isso, os genótipos avaliados possuem uma elevada variabilidade genética.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*, análise multivariada Ward-MLM, marcadores moleculares, RGA.

## **DIVERSITY GENOTYPES MELON THROUGH WORDS AND MORPHOLOGICAL RGA MARKER**

### **ABSTRACT**

The melon is one of the most economically important species from Cucurbitaceae family it has great genetic variability for various characters such as color, shape and size of the fruit. This study aims to evaluate the genetic diversity of melon genotypes using morphological descriptors and RGA marker under greenhouse condition. 58 melon genotypes for morphological analysis, comprising 38 accessions of germplasm bank of the Federal Rural University of Semi-Arid (UFERSA), five commercial cultivars, five new cultivars and 10 selections from the breeding program of UFERSA were evaluated and 54 of those genotypes for molecular analysis. To analyze the vigor the measurement of biological variables was performed; main branch length (CRP) and number of leaves (NL) every 7 days during development in the greenhouse. Additionally, the number of days to the appearance of the first male flowers (NDM) and female (NDF) were evaluated and transformed into qualitative variables (early, middle and late flowering stage). The data were evaluated by the Ward-MLM strategy, to identify promising and suitable for use in breeding programs for crop genotypes quoted. The Ward-MLM method for quantitative variables divided the genotypes into 13 groups. The most groups were similar in groups 1 and 3 to 4.059 and the distances of the most divergent groups 12 and 13. RGA markers for molecular analysis (Resistance Genes Analogs) were obtained. The RGA polymorphism in the population has been converted to a binary data (presence or absence), from which to estimate genetic distances between the

different genotypes aiming to cluster analysis by UPGMA. Regarding the molecular analysis was generated dendrogram based on Jaccard similarity coefficient. Similarity was observed in RGA loci ranging from 35% to 100% with a total of 7 training groups. Thus, the genotypes have a high genetic variability.

**Key-words:** *Cucumis melo*, Ward-MLM multivariate analysis, molecular markers, RGA.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as famílias de plantas utilizadas para a produção de alimentos, as cucurbitáceas ocupam lugar de destaque em importância econômica e social. No Nordeste brasileiro, o melão do tipo amarelo destaca-se numa produção concentrada principalmente nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (SILVEIRA et al., 2009).

A espécie *Cucumis melo L.* é o táxon mais polimórfico dentro do gênero *Cucumis*, com variações em diferentes características da planta, principalmente na cor, forma e tamanho dos frutos, sendo tal polimorfismo maior em relação aos frutos, os quais apresentam diferentes cores de polpa, casca, bem como variado flavor (sabor e aroma) (STAUB et al., 2002).

Os estudos de diversidade genética de melão são importantes para o melhoramento dessa espécie. A avaliação da diversidade genética molecular auxilia na escolha de genótipos para cruzamentos (CERQUEIRA et al., 2004). E, esses estudos podem ser inferidos por meio do uso de diversos tipos de descritores, entre os quais, destacam-se os morfoagronômicos, citológicos, bioquímicos, fisiológicos e moleculares (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

A caracterização morfológica da cultura do melão tem por base a lista de descritores morfológicos e agronômicos, proposta pelo IPGRI - *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, 2003). As fases de caracterização e avaliação, quando bem conduzidas, além de proporcionar melhor conhecimento do germoplasma disponível, permitem a detecção de acessos duplicados, proporciona o estabelecimento de coleções nucleares e possibilita a identificação dos modos de reprodução predominantes nos

acessos, bem como da ocorrência ou não de variabilidade intrínseca em acessos individuais (VALLS, 2007).

Várias são as metodologias utilizadas para estimar a distância genética. A escolha do método depende dos objetivos propostos na pesquisa, das características das variáveis e das propriedades inerentes às distâncias e coeficientes (CRUZ E CARNEIRO, 2006). Dentre os métodos multivariados, o procedimento *Ward Modified Location Model* (MLM), proposto por Franco et al., (1998), consiste em uma excelente estratégia para a quantificação da variabilidade utilizando tanto as variáveis quantitativas, qualitativas e binárias simultaneamente.

A estratégia Ward-MLM tem sido realizada em diversas culturas, possibilitando a análise da diversidade genética, a indicação dos descritores que mais contribuem a formação de grupos e a recomendação de germoplasma com potencial para o melhoramento genético (CAMPOS et al., 2013; SANTOS, 2013).

Uma das ferramentas para obter também o conhecimento da diversidade genética é a caracterização molecular, os quais utilizam marcadores moleculares constituindo uma das ferramentas interessante para se caracterizar acessos de um banco de germoplasma podendo ser usado também na seleção assistida (DANTAS et al., 2012).

O marcador utilizado neste estudo foi o RGA (Resistance Genes Analogs) que são *primers* degenerados que tem o objetivo de amplificar regiões análogas a genes de resistência usando técnica simplificada de PCR (*polymerase chain reaction*) (LEISTER et al., 1996; KANAZIN et al., 1996; YU et al., 1996). O RGA pode constituir uma ferramenta muito útil na para a construção de mapas genéticos e em seleção assistida dentro de programas de melhoramento genético vegetal. A possibilidade de gerar um grande número de polimorfismos entre diferentes acessos de uma mesma espécie ou gênero também pode permitir o uso dos marcadores RGA em sistemas de caracterização genética de acessos e cultivares (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997).

No presente estudo foi avaliado o vigor vegetativo das plantas e os estádios reprodutivos de melão em casa de vegetação pela estratégia Ward-MLM e utilizando marcadores moleculares RGAs, os quais são importante

ferramenta de seleção que tem por finalidade conhecer a variabilidade genética dos acessos de melão que será de grande utilidade em programa de melhoramento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética de genótipos de melão por meio do uso de descritores morfológicos e marcador RGA sob condições de casa de vegetação.

### 2.2 Objetivos Específicos

Determinar os estádios vegetativo e reprodutivo dos diferentes acessos de melão.

Estimar a divergência genética entre os acessos de melão através do uso da análise conjunta de variáveis quantitativas e qualitativas por meio do procedimento multivariado *Ward-MLM*.

Genotipar acessos de melão pela obtenção de marcadores análogos de genes de resistência (RGA);

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A Cultura do melão

O melão (*Cucumis melo* L.: Cucurbitaceae) é uma hortaliça muito apreciada e de grande aceitação no mundo. É originário da África Central, com centros de diversidade em outras regiões. A partir do seu centro de origem, o melão se distribuiu pelo Oriente Médio e Ásia Central. O registro mais antigo de sua domesticação é no Egito, entre 2.000 a 2.700 a.C. (ALMEIDA, 2006)

São plantas anuais que apresentam caule herbáceo e prostrado, com número de hastes ou ramificações variável. As folhas são alternadas simples com 1 a 5 lobos, angulosas quando jovens e subcordiformes quando completamente desenvolvidas. Possuem gavinhas, órgãos de sustentação da planta. O sistema radicular é ramificado com pouca capacidade de regeneração. Os frutos são bagas grandes, polimorfas, de cores variadas (amarelos, amarelados ou verdes). A polpa é doce e as sementes são de tamanho regular, ovaladas e compridas (KIRKBRIDE, 1993; GOMES, 1998).

O melão pode apresentar quatro tipos de expressão sexual: andromonoica, ginomonoica, monóica e hermafrodita (MONTEIRO et al., 2006). As flores masculinas são axilares, enquanto as hermafroditas são solitárias. O surgimento das flores masculinas acontece entre 18 e 25 dias após o plantio dando início ao período de floração e, após três a cinco dias, inicia-se o aparecimento simultâneo de flores masculinas e femininas, uma



vez que as flores masculinas surgem na haste principal e as femininas nas secundárias. A abertura dessas flores ocorre entre uma a duas horas após o aparecimento do sol, e o fechamento, à tarde, permanecendo assim apenas por um dia (CRISÓSTOMO et al., 2002).

O melão é especialmente rico em elementos minerais, particularmente potássio, sódio e fósforo. O fruto é consumido “in natura”, como ingrediente de saladas com frutas ou outras hortaliças e na forma de suco. O fruto maduro tem suas propriedades medicinais, é tido como calmante, refrescante, alcalinizante e também, recomendado para reumatismo, obesidade, prisão de ventre, afecções renais (BALBACH; BOARIM, 1992).

### **3.2 Importância socioeconômica**

Atualmente, encontramos cultivares de melão em diversas regiões do mundo, desde os países mediterrâneos, centro e leste da Ásia, sul e centro da América e também o centro e sul da África. No Brasil, o cultivo do melão em escala comercial teve início nos primeiros anos na década de 1960. A cultura foi estabelecida pelos imigrantes europeus e o Estado do Rio Grande do Sul foi, possivelmente, o seu primeiro centro de cultivo no país (COSTA, 2005). Devido à melhor adaptação climática fisiológica o cultivo do melão foi transferido para a região Nordeste, no início dos anos de 1980 (DELLA VECCHIA, 2010).

Além de sua importância na pauta de exportações, o cultivo do melão sob o ponto de vista socioeconômico representa uma importante atividade geradora de empregos, sobretudo por ser desenvolvida quase que exclusivamente por pequenos produtores em áreas tipicamente de agricultura familiar (TEIXEIRA, 2004), principalmente parte da região Nordeste e Sul de Brasil.

As diferentes condições climáticas existentes no Nordeste brasileiro favorecem o desenvolvimento e a produção da cultura do melão com possibilidade de plantios e colheitas durante o ano todo, com limitações apenas nas localidades onde há elevada precipitação pluviométrica em determinados períodos do ano (COSTA; LEITE, 2005)

No Brasil, em 2012, o melão teve uma área plantada de 22.810 hectares, uma área colhida de 22.789 hectares e uma produção de 575.386 toneladas de frutos (IBGE, 2012). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de melão da América do Sul com fortes tendências de crescimento para os próximos anos em função do aumento do consumo interno e das exportações. A evolução da cultura do meloeiro no Brasil, no período de 2003 a 2009, mostra que a área cultivada passou de 16.266 hectares para 17.544 hectares e a produção de 349.498 toneladas para 402.959 toneladas (AGRIANUAL, 2012).

No Rio Grande do Norte, a cultura do melão se destaca devido às condições de novas tecnologias, principalmente relacionados a equipamentos de irrigação, a formação e a capacitação de mão de obra, além das condições edafoclimáticas e emprego de alta tecnologia do setor produtivo (SILVA et al., 2002).

As principais áreas produtoras e exportadoras localizam-se na região semi-árida e se concentram nos Agropólos Mossoró/Assu (RN) e Baixo Jaguaribe (CE). Mossoró teve uma área colhida de 8.330 hectares e uma produção de 238.487 toneladas de melão, enquanto que no Baixo Jaguaribe sua área colhida foi de 7.790 hectares e uma produção de 219.280 toneladas (IBGE, 2012).

Devido, o surgimento de novas tecnologias o agronegócio do melão brasileiro tem se expandido. Além, de resultar em relevante inserção internacional. As exportações brasileiras de melão destinam-se basicamente a União Europeia e em segundo lugar a América do Norte. Em relação a exportação mundial de melões a Espanha, com produção de 869,4 mil toneladas é a líder absoluta em exportações do produto. Os países baixos (Holanda) é considerado o segundo no *ranking*. Enquanto que, o Brasil foi o quinto maior exportador de melão em 2011, com uma participação de 8,3% do total mundial, enquanto sua produção representava apenas 1,83% Em 2012, o país permaneceu na mesma posição com uma ligeira queda no seu *market share* (APEXBRASIL, 2014).

Em termos de importação, novamente a União Europeia é a região mais relevante, com 57,7% do valor comercializado em 2011. A segunda é a América do Norte, com um pouco menos de um terço das importações

mundiais. A terceira região importadora é a Ásia e Oceania, com 6,1%. A Espanha também destaca-se como um importante importador em termos mundiais aparecendo em sétimo lugar do *ranking* em 2011. Assim, considerando o potencial produtivo pode-se afirmar que há um amplo mercado a ser explorado em relação a essa fruta tanto em nível nacional como internacional (APEXBRASIL 2014).

### 3.3 A Diversidade do meloeiro

A região Nordeste dispõe de várias espécies de Cucurbitáceas introduzidas há muitos anos, onde as condições de solo e clima favorecem o crescimento e desenvolvimento adequado dessas plantas. Muitas dessas espécies ainda são cultivadas na agricultura de sequeiro e subsistência, principalmente em pequenos estabelecimentos agrícolas originando diversas cultivares tradicionais ou cultivares criolas ou *landraces* (QUEROL, 1993).

No Sul do Brasil e na região Nordeste parte dos produtores utiliza variedades criolas em seus plantios. No entanto, esses agricultores fazem seleção dos frutos que consideram de qualidade superior e produzem a sua própria semente. Esta seleção, realizada por várias gerações, combinada com a seleção natural, resultou em diversos tipos de melão e em elevada rusticidade e adaptação às condições locais onde foram selecionadas. Atualmente, muitas dessas variedades criolas já foram perdidas pela alteração da matriz produtiva e pela substituição por cultivares comerciais, contudo é importante que sejam realizadas ações de coleta, conservação e caracterização destas variedades com intuito de conservar fonte de genes para o melhoramento genético (NEITZKE et al., 2009).

A espécie *Cucumis melo* L. é diplóide ( $2n=2x=24$  cromossomos) (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991) e tamanho do genoma estimado 454 Mb (GARCIA et al., 2012). Compreende duas subespécies de acordo com a pilosidade do ovário: *C. melo* ssp *melo*, com ovário piloso, e *C. melo* ssp *agrestis*, com ovário ceroso (JEFREY, 1980). O meloeiro é a espécie que possui a maior variabilidade fenotípica no gênero *Cucumis* sendo a maior

parte da variação observada em seus frutos com formas que variam de esféricos a extremamente alongado, com peso de pouca grama a vários quilogramas, sabor da polpa de amargo a doce e diferentes colorações de polpa e casca (STEPANSKY et al., 1999).

A grande variação fenotípica observada no meloeiro levou os botânicos a proporem uma classificação intraespecífica de interesse para a agricultura. O trabalho pioneiro foi realizado pelo botânico francês Charles Naudin em 1859, o qual serviu de base para todas as outras classificações subsequentes. O referido estudioso dividiu a espécie *Cucumis melo* em dez variedades a partir das observações de uma coleção composta de 2.000 espécimes (PITRAT et al., 2000). Munger e Robinson (1991) propuseram uma versão simplificada da classificação de Naudin. Estes autores dividiram a espécie *Cucumis melo* em uma variedade selvagem denominada de *Agrestis* e seis variedades: *Cantaloupensis*, *Inodorus*, *Conomon*, *Dudaim*, *Flexuosus* e *Momordica*. No entanto, a classificação proposta por Robinson e Dereck-Walters (1997) é a mais utilizada na literatura atual e divide a espécie *Cucumis melo* em apenas seis variedades conforme citado acima.

Dentre os inúmeros grupos de melão existentes, os mais comercializados no Brasil são: Amarelo, Honey Dew, Pele de Sapo, Cantaloupe, Gália e Charentais. Os três primeiros tipos de melão pertencem a variedade botânica *Inodorus* e se caracterizam por serem frutos sem aroma, não climatéricos, resistentes ao transporte e elevada vida pós colheita. Os melões do tipo Cantaloupe (americano) e Charentais (europeu) são aromáticos, climatéricos, têm elevado teor de sólidos solúveis e baixa conservação pós colheita. O melão Gália foi desenvolvido pelos israelenses em meados da década de 1960. Foi o primeiro híbrido simples desenvolvido por um programa de melhoramento realizado em Israel. É resultante do cruzamento de uma linhagem de melão Ogen e outra de melão Honey Dew (ODET, 1985). Os frutos de melão Gália são esféricos, aromáticos, têm peso entre 1.000 a 1.500 g, polpa esverdeada e teor de sólidos solúveis entre 13 e 15 % (KARCHI, 2000). Os melões tipo Charentais são de origem francesa, pertencente ao grupo dos *Cantaloupensis* destacam-se pelo forte e agradável aroma e caracterizam-se por desprenderem da planta quando maduros (CRISÓSTOMO et al., 2004).

Estes grupos podem ser cruzados entre si e suas diferentes características fenotípicas podem ser combinadas e exploradas em programas de melhoramento genético dessa cultura, cujo principal objetivo é o desenvolvimento de híbridos adaptados às diversas condições de cultivo, visando contornar dificuldades relacionadas às principais doenças, produtividade e qualidade de frutos proporcionando a produção de genótipos superiores (NUNES et al., 2006).

### **3.4 Melhoramento Genético do Melão**

#### **3.4.1 Análise morfoagronômica**

A caracterização de genótipos permite identificar acessos duplicados, estabelecer coleções nucleares, identificar os modos de reprodução predominantes nos acessos, bem como inferir a ocorrência ou não de variabilidade genética entre os acessos (VALLS, 2007). É feita com base em lista de descritores por meio de observações ou mensurações dos caracteres analisados (BURLE; OLIVEIRA, 2010.)

A avaliação dos genótipos tem como objetivo agregar valor ao banco de germoplasma, uma vez que os caracteres avaliados estão relacionados ao melhoramento de plantas, tais como adaptabilidade de acessos a regiões climáticas e forma de cultivo, composição química, reações estresses bióticos e abióticos, entre outros (TEIXEIRA, 2010). Na maioria dos acessos estudados as obtenções de dados morfológicos e agronômicos podem ser realizadas concomitantemente.

O uso de listas de descritores para a caracterização morfológica distingue informações sobre o germoplasma conservado, tornando assim a utilização do mesmo mais efetivo (RAMOS; QUEIROZ, 1999), sendo normalmente a forma mais acessível e mais utilizada para quantificar a diversidade genética de um banco de germoplasma (RABBANI et al., 1998).

A morfometria, atividade de medir estruturas anatômicas, pode ser efetuada utilizando-se desde técnicas mais simples, p.ex., o paquímetro, a fita métrica, até aquelas mais sofisticadas, como a morfometria

computadorizada. Entretanto, deve-se salientar que o emprego da morfometria evidentemente não invalida as consagradas técnicas de morfologia clássica, ou mesmo da análise qualitativa e semi quantitativa empregada pelos morfologistas (BELTRÃO et al., 2006).

Caracterizações agrônômicas e morfológicas foram realizadas em seleções do banco de germoplasma de melão para identificar cruzamentos com características comerciais desejável e disponibilizar sementes selecionadas para os produtores. No Brasil, a conservação de germoplasma de melão é realizada pela Embrapa Clima Temperada, Embrapa Hortaliças e a Embrapa Semi Árido e por algumas universidades públicas.

Nunes et al. (2004) avaliaram o desempenho produtivo e qualitativo de híbridos de melão no agropolo Mossoró-Assu com base nas seguintes características: produtividade, peso médio do fruto, cavidade interna, espessura da polpa, aparências externa e interna, perda de peso, teor de sólidos solúveis e firmeza da polpa. Considerando as variáveis utilizadas na avaliação, constatou-se variação entre os híbridos nos experimentos. No estudo realizado por Dantas et al. (2011), 9 híbridos de melão Cantaloupe foram avaliados quanto as mesmas características do trabalho citado por Nunes et al (2004), no qual foi observado diferença significativa entre híbridos para todas as características avaliadas, com exceção da espessura da polpa e do teor de sólidos solúveis totais.

Neitzke et al. (2009) verificaram a divergência genética através de dados morfológicos entre 14 variedades crioulas de melão do Sul do Brasil conservadas no Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, com base em 26 descritores indicando variabilidade genética entre os descritores utilizados neste estudo.

### 3.4.2 Caracterização Molecular

Os marcadores moleculares representam polimorfismo na sequência nucleotídica do DNA existentes entre indivíduos. Vários tipos de marcadores de DNA estão disponíveis, diferenciando-se entre si quanto aos custos de aplicação, facilidade de uso e consistência de resultados (BORÉM; CAIXETA,

2006). Entre eles os baseados em PCR (Poymerase Chain Reactions) como AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism), RGA (Resistance Genes Analogs), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats) e LM-PCR (Ligation Mediated PCR) são os mais utilizados.

Esses marcadores permitem gerar grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos de determinado germoplasma. As informações moleculares podem complementar as informações ecológicas, morfológicas e agronômicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta, direcionar o enriquecimento da base genética, formar e validar coleções nucleares, identificar acessos duplicados e redundantes, auxiliar trabalhos de classificação botânica e filogenia, subsidiar seleção de genitores, o planejamento de cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento (FALEIRO, 2007).

Os marcadores moleculares, em especial os baseados em PCR tem sido utilizados em vários estudos envolvendo o gênero *Cucumis*. Zhuang et al. (2004) utilizaram em seus estudos os marcadores SSR e RAPD para analisarem a diversidade entre o gênero *Cucumis*. Cerqueira et al. (2004) também analisou a divergência genética entre linhagens de melão utilizando marcadores RAPD.

Os RGA são genes de resistência que possuem regiões filogeneticamente conservadas, denominadas motivos, os quais podem incluir proteínas ricas em Leucina (LRR), sítios de ligação a nucleotídeos (NBS), estruturas complexas de NBS-LRR e proteínas quinases (STASKAWICZ et al., 1995; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). Devido a essas regiões conservadas podem representar sítios de relevância biológica na expressão fenotípica dos genes de resistência (BENT, 1996). Desta forma, foram desenvolvidos diversos *primers* degenerados como o objetivo de amplificar regiões análogas a genes de resistência (RGA) em várias espécies vegetais usando técnicas simplificadas de PCR (*polymerase chain reaction*) (LEISTER et al., 1996; KANAZIN et al., 1996; YU et al., 1996).

Diversos trabalhos utilizam-se os RGA como fontes ligadas a genes de resistência ou podendo representar segmentos de genes de resistência funcionais (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997; COLLINS et al., 2001). Além de constituir uma ferramenta muito útil para a construção de mapas genéticos e em seleção assistida dentro de programas de melhoramento genético vegetal. A possibilidade de gerar um grande número de polimorfismos entre diferentes acessos de uma mesma espécie ou gênero também pode permitir o uso dos marcadores RGA em sistemas de caracterização genética de acessos e cultivares (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997).

#### 3.4.3 Método Ward-MLM

O método Ward-MLM (Modified Location Model) é uma das técnicas que possibilita a análise de caracteres quantitativos, qualitativos e binários simultaneamente a fim de caracterizar o germoplasma (FRANCO et al., 1998), o qual é composto por duas etapas: a primeira é o agrupamento Ward (WARD JUNIOR, 1963) aplicado sobre a matriz de dissimilaridade de Gower (GOWER, 1971); e a segunda fase, é a utilização do procedimento MLM em cada subpopulação, visando estimar o vetor das médias das variáveis quantitativas.

Este procedimento ainda permite a definição do número ótimo de grupos, com o cálculo da melhor subdivisão com alta precisão. Assim, essa abordagem identifica a melhor probabilidade de cada acesso se alocar em grupos específicos (GONÇALVES et al., 2009).

A aplicação do procedimento Ward-MLM tem sido realizada em diversas culturas como, por exemplos em banana (PEREIRA, 2011), maracujá (SANTOS et al., 2012) e goiaba (CAMPOS et al., 2013). No entanto, não há relatos de estudos que avaliaram a diversidade genética no gênero *Cucumis* utilizando este procedimento estatístico.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material Biológico**

O material biológico constituiu-se de 58 genótipos de melão para a análise morfológica, os quais foram utilizados 38 acessos do banco de germoplasma da UFERSA, 5 cultivares comerciais, 5 cultivares novos em teste na UFERSA e 10 seleções do programa de melhoramento da UFERSA. Para análise molecular foram utilizados 54 desses mesmos genótipos com exceção dos acessos do banco de germoplasma da UFERSA A24, A13, A11 e A17. (Tabela 01).

### **4.2 Mensuração de Variáveis Biológicas**

Para a análise quantitativa foi realizada a mensuração com acompanhamento do vigor das plantas através da medição da altura (comprimento do ramo principal- CRP) a cada 7 dias durante o desenvolvimento em casa de vegetação utilizando-se uma fita métrica, com análise do número de folhas (NF) a cada medição do ramo principal.

Em relação às características qualitativas foi avaliado o número de dias para o aparecimento das primeiras flores masculinas (NDM) e femininas (NDF), respectivamente.

Tabela 01. Identificação, origem e variedade dos 58 genótipos de melão.

	Identificação	Origem	Variedade
1	A1	Mossoró, RN <sup>1</sup>	cantaloupensis
2	A2	Mossoró, RN <sup>1</sup>	cantaloupensis
3	A3	Baraúna, RN <sup>1</sup>	cantaloupensis
4	A4	Baraúna, RN <sup>1</sup>	cantaloupensis
5	A5	Baraúna, RN <sup>1</sup>	nd
6	A6	Assú, RN <sup>1</sup>	cantaloupensis
7	A7	Quixeré, CE <sup>1</sup>	cantaloupensis
8	A8	Aracati, CE <sup>1</sup>	nd
9	A9	Quixeré, CE <sup>1</sup>	conomon
10	A11	Petrolina, PE <sup>1</sup>	conomon
11	A12	Petrolina, PE <sup>1</sup>	nd
12	A13	Patos, PB <sup>1</sup>	cantaloupensis
13	A14	Souza, PB <sup>1</sup>	cantaloupensis
14	A15	Arapiraca, AL <sup>1</sup>	momordica
15	A17	Barra do Mendes, BA <sup>1</sup>	conomon
16	A18	Picos, PI <sup>1</sup>	cantaloupensis
17	A22	São Luis, MA <sup>1</sup>	cantaloupensis
18	A23	Ipanguassu, RN <sup>1</sup>	momordica
19	A24	Arapiraca, AL <sup>1</sup>	cantaloupensis
20	A25	Cururipe, AL <sup>1</sup>	cantaloupensis
21	A26	Lagarto, SE <sup>1</sup>	nd
22	A27	São Luis, MA <sup>1</sup>	nd
23	A28	São João dos Patos, MA <sup>1</sup>	cantaloupensis
24	A29	Paraibano, MA <sup>1</sup>	cantaloupensis
25	A30	São José do Mipibu, RN	momordica
26	A31	Areia, PB <sup>1</sup>	cantaloupensis
27	A32	Itabuna, BA <sup>1</sup>	momordica
28	A33	São Luis, MA <sup>1</sup>	nd
29	A34	Jazeiro, BA <sup>1</sup>	cantaloupensis

	Identificação	Origem	Variedade
30	A35	Muribeca, SE <sup>1</sup>	nd
31	A36	Jaboatão, PE <sup>1</sup>	cantaloupensis
32	A37	Areia Branca, RN <sup>1</sup>	momordica
33	A39	Irecê, BA <sup>1</sup>	cantaloupensis
34	A41	Paulistana, PI <sup>1</sup>	cantaloupensis
35	A42	Brumado, BA <sup>1</sup>	momordica
36	A43	Itapecurú, MA <sup>1</sup>	inodorus
37	A44	Serra Talhada, PE <sup>1</sup>	inodorus
38	A45	Messejana, CE <sup>1</sup>	inodorus
39	Cv. Amaral	Comercial	-
40	Cv. Amarelo Iracema	Comercial	-
41	Cv. Mabel	Comercial	-
42	Cv. Olympic	Comercial	-
43	Cv. Vereda	Comercial	inodorus
44	D1	Comercial	-
45	D2	Comercial	-
46	D3	Comercial	-
47	D4	Comercial	-
48	D5	Comercial	-
49	D6	Comercial	-
50	D7	Comercial	-
51	D8	Comercial	-
52	D9	Comercial	-
53	D10	Comercial	-
54	Rey saboroso	Comercial	Inodorus
55	Imperial 45	ILSLA, PAK LOTE 32483-51 Porto Alegre, RS	Reticulatus
56	Gaucho (caipira)	ILSLA, PAK LOTE 32483-52 Porto Alegre, RS	Inodorus
57	Poty	-	-
58	Amarelo doce Famosa	Agrícola Famosa	Inodorus

Fonte: <sup>1</sup>Dantas, 2011

### 4.3 Análise de dados

A caracterização das variáveis quantitativas foi realizada a partir de sete medições, sendo posteriormente utilizados valores médios para a análise multivariada. Por outro lado, para as variáveis qualitativas, foram estimados tipos de comportamentos, no qual os dias de aparecimento das flores foram convertidos em agrupamento como precoce (1), mediano (2) e tardio (3), sendo posteriormente indicados como dado qualitativo no programa SAS.

A análise de divergência genética foi realizada utilizando-se simultaneamente as variáveis qualitativas e quantitativas, através do procedimento multivariado Ward-MLM com a utilização do software SAS (SAS Institute, 2000). A matriz de distância foi obtida pela função logarítmica de Gower (GOWER, 1971), sendo a definição do número ideal de grupos realizada com base nos critérios pseudo-F e pseudo- $t^2$  combinados com o perfil da verossimilhança associado com o teste da razão da verossimilhança (SAS Institute, 2000). O uso de dados quantitativos e qualitativos pelo índice de Gower para a obtenção do índice de dissimilaridade variante de 0 a 1 foi dada pelo:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$$

Onde  $i$  e  $j$  representam os indivíduos em comparação e  $k$  as características;  $p$  = número total de características, e  $S_{ij}$  = contribuição da característica  $k$  para a distância total. Caso a variável seja qualitativa,  $S_{ijk}$  assume o valor 1, quando a concordância é positiva ou negativa para a característica  $k$  entre os indivíduos  $i$  e  $j$ . No caso de característica quantitativa:

$$S_{ij} = \frac{|Y_{ik} - Y_{jk}|}{R_k}$$

Onde  $R_k$  = amplitude de variação da variável K, tendo valores 0 e 1. O valor de  $W_{ijk}$  foi utilizado para definir as contribuições dos indivíduos  $S_{ijk}$ . Assim, quando o valor da variável k está ausente em um ou ambos os indivíduos  $W_{ijk} = 0$  ou no caso de presença o valor é igual a 1.

#### **4.4 Caracterização Molecular**

##### **4.4.1 Extração de DNA**

Para a análise molecular o número de plantas foi diferente da análise agronômica. As extrações de DNA dos 54 genótipos de melão foram realizadas por meio de folhas jovens e sadias. O protocolo de extração utilizado foi o de Doyle e Doyle (1990), considerando-se as modificações previamente estabelecidas para outras plantas e que vêm sendo utilizadas com sucesso na extração de DNA de espécies como o cacau, jacarandá, pau-brasil e melão (CORRÊA et al., 1999; ALMEIDA, 2001; FALEIRO et al., 2001). Amostras de aproximadamente 300 mg de tecido de folha de cada indivíduo foram maceradas em presença de nitrogênio líquido, sendo posteriormente transferidas para tubos Ependorff® de 2 mL, adicionando-se aos mesmos 650 µL de tampão [tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0; EDTA 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0; NaCl 1,4 mol.L<sup>-1</sup>; 0,2% (v/v) β- mercaptoetanol, 2 % CTAB, 1 % polivinilpirrolidona e 0,1 mg de proteinase K]. Após 60 min em banho-maria a 65 °C, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 min e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Aos sobrenadantes foram adicionados 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1, agitando por cinco min, seguindo de centrifugação a 10.000 g por 5 min. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Os sobrenadantes transferidos para novos tubos receberam isopropanol gelado, na proporção de uma parte de isopropanol: para uma de sobrenadante, e centrifugados a 10.000 g por cinco min. Foram descartados os sobrenadantes e os precipitados foram lavados com 1 mL de solução 70% de etanol por 2 vezes. Após as lavagens, os precipitados foram secos ao ar

por 2 h e ressuspensos em solução de TE (10 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0) contendo RNase na concentração final de 40 µg e incubados em banho-maria a 37<sup>0</sup> C por 60 min.

Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 3 µL de cada amostra, foram adicionada de 3 µL do corante tipo IV (Bromofenol Blue a 0,25 %, sacarose 40 %) aplicada em gel de agarose a 0,8 %, utilizando como tampão de corrida o TBE 1X (EDTA 2 mol.L<sup>-1</sup>; Tris-borato 9 mol.L<sup>-1</sup>).

A corrida eletroforética foi realizada com 80 V, durante 1 hora. Os géis foram corados com corante SYBR Green (INVITROGEN) diluído. A concentração do DNA de cada amostra foi estimada pelo espectrofotômetro a 260 nm Cary Winv 50, utilizando-se o software RNA&DNA (SAMBROOK et al., 1989) e, em seguida diluída para 10ng/µL.

#### 4.4.2 Amplificação de RGAs por PCR

Marcadores RGA (Tabela 02) foram amplificados via PCR. A reação de PCR foi realizada contendo 10 ng de DNA, 0,5 uM dos iniciadores e 0,5 U de Taq DNA Polimerase, 0,02 mM de dNTP e 1,5 mM de cloreto de magnésio e tampão de PCR (1X), sendo adicionado água ultrapura para completar o volume final da reação de 18 µl por amostra. A temperatura ideal para cada iniciador foi testada, detectando a melhor temperatura de amplificação, em torno de 37°C.

As condições de amplificação consistiram de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 37°C por 1 minuto e 72°C por 1minuto e 20 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR dos marcadores RGA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. Como padrão de referência ao tamanho dos produtos dos marcadores foi usado o marcador de peso molecular 50 pb. As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

Tabela 02: Combinações de *primers* RGAs utilizados para amplificar o DNA de acessos de melão e suas sequências.

<b>Primers</b>	Sequências 5' → 3'	
S1+AS1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	CAA GGC TAG TGG CAA TCC
S1+AS2	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	IAA IGC IAG IGG IAA ICC
S1+AS3	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	IAG IGC IAG IGG IAG ICC
AS1+AS2	CAA GGC TAG TGG CAA TCC	IAA IGC IAG IGG IAA ICC
AS1+AS3	CAA GGC TAG TGG CAA TCC	IAG IGC IAG IGG IAG ICC
S1+LM637	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	ARI GCT ARI GGI ARI CC
AS1+LM637	CAA GGC TAG TGG CAA TCC	ARI GCT ARI GGI ARI CC
NBSF1+AS1	GGA ATG GGN GGN GTN GGN AAR AC	CAA CGC TAG TGG CAA TCC
NBSF1+AS2	GGA ATG GGN GGN GTN GGN AAR AC	IAA IGC IAG IGG IAA ICC
NBSF1+AS3	GGA ATG GGN GGN GTN GGN AAR AC	IAG IGC IAG IGG IAG ICC
NBSF1+LM637	GGA ATG GGN GGN GTN GGN AAR AC	ARI GCT ARI GGI ARI CC
S1+NBSR1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	YCT AGT TGT RAY DAT DAY YYT RC
1F+8R	AGT TTA TAA TTY SAT TGCT	AGC CAC TTT TGA CAA CTG
NBSF1+NBSR1	GGA ATG GGN GGN GTN GGN AAR AC	YCT AGT TGT RAY DAT DAY YYTRC
8F+8R	AGC GAG AGT TGT ATT TAAG	AGC CAC TTT TGA CAA CTG

#### 4.4.3 Análise dos dados moleculares

Os polimorfismos observados para marcadores do tipo RGA foram convertidos em matriz de dados binários (presença e ausência de cada banda/amplicon), a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas

entre os diferentes acessos (Cruz, 1997), com base no coeficiente de similaridade de Jaccard como descrito no Programa Genes

A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithemetical Average). Com base na análise de agrupamento, diferentes grupos de similaridade foram definidos de acordo com os resultados do perfil de amplicon obtidos com DNA extraído de 60 variedades de melão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Biologia Floral

O conhecimento da biologia floral é importante tanto para o melhoramento genético, quanto para o cultivo de uma espécie. No meloeiro, a fase mais importante é o surgimento das primeiras flores até os primeiros frutos. Normalmente, a floração do meloeiro tem início com o surgimento da flor masculina, os quais se localizam no ramo principal, enquanto que as flores femininas nos ramos secundários (Figura 1).



Figura 1: Visualização da flor masculina (A) e da flor feminina (B) em melão.

Fonte: Arquivo pessoal.

Neste estudo, o início do florescimento foi caracterizado quando ocorreu o aparecimento da primeira flor masculina aberta na haste principal (caule), no qual foi possível observar que o surgimento das primeiras flores



masculinas foram em média aos 44 dias após a semeadura enquanto que as flores femininas surgiram em média há 51,0 dias após semeadura (Figura 2).

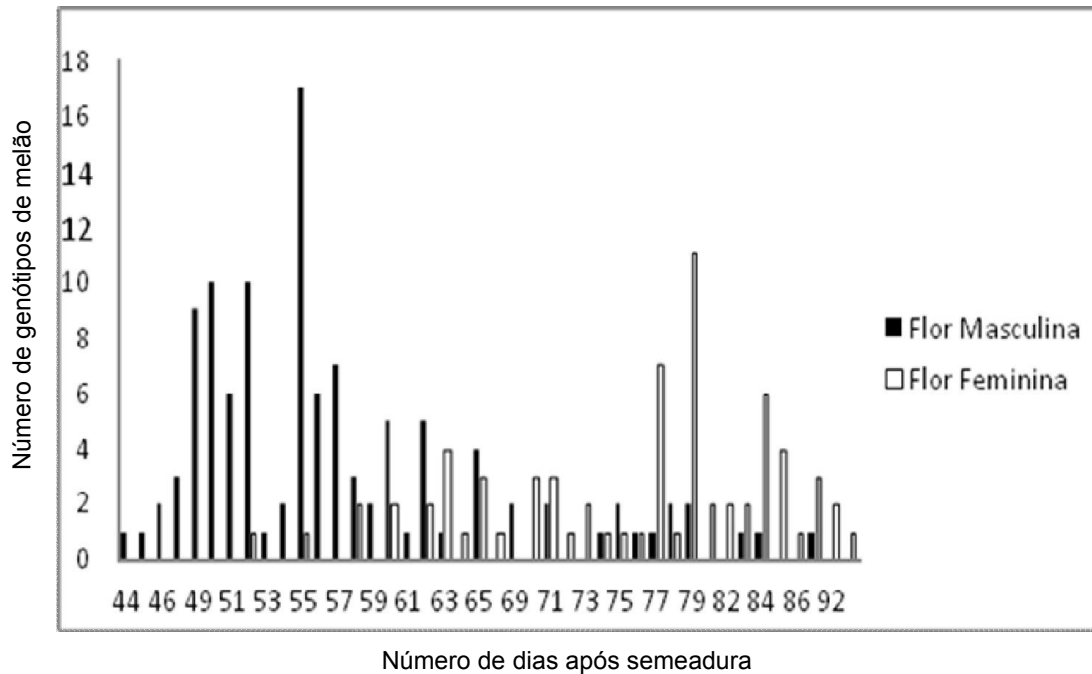


Figura 2: Período de floração em dias após a semeadura das flores masculina e femininas dos genótipos de melão.

### 5.2 Método multivariado *Ward-MLM*

O presente trabalho propõe a caracterização do desenvolvimento até a fase adulta de variedades e cultivares comerciais de melão (Tabela 3) para a inferência da diversidade genética utilizando a estratégia *Ward-MLM*. Neste sentido, a definição do número ideal de grupos foi realizada através da função logarítmica da probabilidade *Log-Likelihood* de acordo com os critérios testes do pseudo-F e pseudo-T<sup>2</sup>, combinados com o perfil da verossimilhança e associado ao teste da razão da verossimilhança (Figura 3; tabela 4) (SAS, 2000).

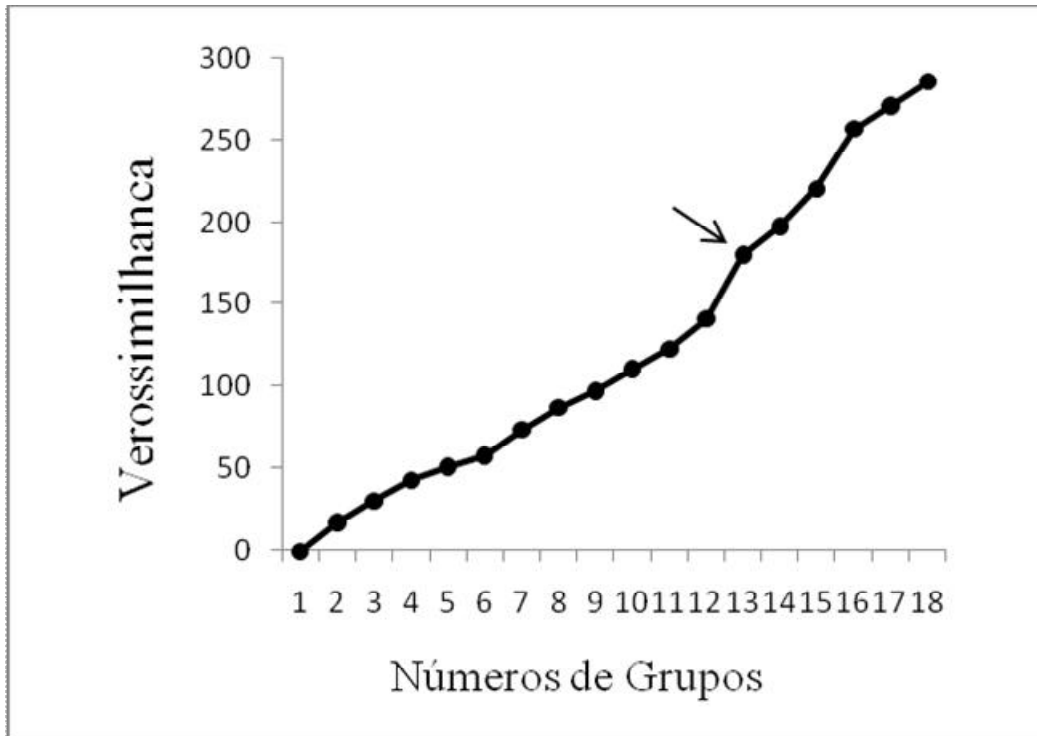


Figura 3. Função logarítmica de probabilidade (*Log-Likelihood*) com a formação de 13 grupos na população.

Tabela 3. Características quantitativas e qualitativas avaliadas durante o desenvolvimento dos genótipos de melão.

Genótipo	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	CR6	CR7	NF1	NF2	NF3	NF4	NF5	NF6	NF7	FM*	FF*
A1	21,5	41,5	71,5	107,5	130	158	167	4,5	6	10	12,5	15,5	18,5	19,5	1	2
A2	52	68	120	134,5	149	154	161,5	6	7,5	13,5	16	17	18	17	1	3
A3	34	60,5	91,5	135,5	160,5	177	184,5	5,5	8	12	14	17,5	22,5	21,5	1	3
A4	36,5	37	51,5	74	91,5	114,5	143,5	5,5	7	8,5	11	12	15,5	16,5	3	3
A5	34	54,5	104	170,5	196	233,5	269,5	5,5	6,5	11,5	17	20	27	27,5	1	2
A6	51	63	99,5	135	142	156	165	6,5	7,5	12	15	17,5	21	21,5	2	3
A7	61,5	76,5	122	177	212,5	230	260,5	6	8,5	13	17,5	22,5	27,5	30	1	3
A8	38,5	62	111	181	226,5	275	300	5,5	9	15,5	21	26,5	33,5	33,5	1	3
A9	26,5	46	77,5	100	117	146	155,5	5	6	10	11,5	17	25	26	1	1
A11	11	12	13	40	115	150	177	1	2	4	7	13	21	24	2	3
A12	21	34,5	56,5	95,5	146,5	184	213	4,5	6	9	14,5	20	24,5	28	1	2
A13	55,5	89,5	142	201	230,5	267	308,5	7	9	14,5	18	23	29,5	31,5	1	3
A14	58	75,5	112	161,5	181,5	219,5	250	7	8,5	12,5	15	18,5	23	23,5	3	3
A15	31,5	50	85,5	133	160,5	177	206	6	6,5	10,5	13	16,5	22	24	1	2
A17	71,5	87	127	166	168,5	197,5	212,5	7,5	9	14,5	18,5	19	24	26	1	3
A18	23,5	41	72	113,5	147,5	182	215,5	4	6	8,5	11,5	15	21	23	1	2
A22	21	43	86	153	183,5	215,5	227,5	3,5	7	11,5	15	19,5	24,5	26	1	3
A23	28	47	77	118	149	163	166	4	7	10	16	18	26	24	1	1
A24	38	77	132,5	162	186	238	279	6,5	9,5	15,5	20	21,5	28,5	29,5	1	2
A25	18,5	28	50,5	101,5	146	168	200,5	3,5	5,5	8,5	13,5	17	23	29,5	2	3
A26	24	40	67	128	167	196	226	4	8	12	19	21	30	30	2	3
A27	36,5	47,5	79,5	122	140	155	164,5	4	6	9,5	12,5	11,5	16	15,5	2	3
A28	47,5	66,5	97,5	136,5	176	214,5	236	6,5	11	13,5	20	24	31	32,5	1	2
A29	27,5	57	118	175	202,5	246,5	268	4,5	9,5	16	24	24,5	33,5	35	1	3
A30	13,5	21,5	30	59,5	120,5	187,5	248	4	4,5	5,5	8	12,5	18	20,5	3	3
A31	26,5	47	94	145,5	182,5	231	254	5	8,5	14	19	22,5	31	28,5	1	2
A32	30,5	54,5	105,5	142,5	188	214	214	6	9	11,5	15,5	20	26	18,5	1	2
A33	44	63	117	176	233	255	273	5,5	8,5	12	19,5	24	28	29	1	2
A34	68,5	109	181,5	234	260	272,5	266	7	11,5	16	22,5	22,5	25	14	1	3
A35	32	44	61	89	138,5	154	168,5	5	9	10,5	13,5	21,5	25	27	2	3

(Cr) Comprimento do ramo; (NF) número de folhas; (1-7) semanas de desenvolvimento da primeira a última coleta de dado; (FM) flores masculinas; (FF) flores femininas. \*Precoce (1); Mediano( 2); Tardio (3).

Tabela 3. Continuação

Genótipo	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	CR6	CR7	NF1	NF2	NF3	NF4	NF5	NF6	NF7	FM	FF
A36	71	102	175	204,5	232,5	274	288,5	7	12	16,5	20,5	24	30,5	31	1	3
A37	49,5	76,5	133,5	184,5	216,5	256,5	128,5	6,5	10	14	20,5	24,5	31,5	32	2	3
A39	40	62	115,5	160	187	197,5	206,5	6	8	11,5	15,5	19	23	24	1	3
A41	47,5	67,5	107,5	174,5	231	252	260,5	5	8,5	13	19	22,5	29	31,5	1	2
A42	24	43,5	87,5	138	158	203	211	4	6,5	10,5	14	17,5	23,5	26	1	2
A43	11,5	17	65,5	107,5	128	163,5	178	4,5	7,5	10	14	17,5	23	22,5	2	3
A44	26,5	42	92	148	176	210	231	5	7,5	12,5	19,5	22	25,5	25	1	3
A45	54,5	76	148,5	197,5	139,5	155	156,5	6	9	14	19	13,5	17,5	18,5	1	2
D1	32,5	46,5	78,5	124,5	153,5	179,5	190	4	7	11	15	19	22,5	25	1	2
D2	29	51,5	98	140,5	169	178	184	5,5	8	12	16	18	19,5	19	1	3
D3	30,5	38,5	59	104,5	138,5	163	171,5	6	6,5	8,5	13	16	22	18	1	2
D4	35	45,5	78	115	139	149	150,5	5,5	8	12	17	19,5	23	16,5	1	2
D5	25,5	26,5	37,5	63	101,5	143	157	4,5	4	4,5	9,5	13,5	18	20	1	2
D6	37,5	66,5	121,5	181,5	220	237,5	242,5	5	7,5	11,5	17	19,5	22	22,5	1	2
D7	28	33	51,5	79	103	117	119,5	4	5,5	7,5	10,5	11,5	15,5	15,5	1	3
D8	32,5	50,5	86,5	128,5	156,5	211	224	5,5	8,5	11,5	16,5	21,5	23,5	21	1	2
D9	33,5	59,5	98,5	124	135	146	144,5	5	8,5	12	13,5	15	19	18	1	3
D10	31,5	46,5	75,5	99,5	114	121	122	4,5	7	10	14	15	17	18,5	1	3
CultivarAmaral	27,5	59	100,5	155,5	188,5	210,5	225	3	6,5	10,5	16	18	23	25,5	1	2
CultivarAmarelo	50,5	66,5	101	140	169	203	234	5,5	7	10	13,5	16	20	23	2	2
CultivarMabel	44	60	101	148,5	177,5	191	196	4,5	6,5	10,5	15,5	18	22	21,5	1	3
CultivarOlimpic	36,5	51,5	87,5	132	154,5	174,5	182,5	6,5	9	13	18,5	21	25	26,5	1	3
CultivarVereda	55,5	67	103,5	152	193,5	197	229	5,5	7	11	15	18,5	20	23,5	2	3
ReySaboroso	50	70,5	112,5	148,5	165	193,5	203	4,5	7	11,5	15,5	17,5	21	21	1	3
Imperial45	15	19,5	39,5	71,5	89,5	118	127,5	3	4	6	9,5	10,5	15,5	16	2	3
GaúchoCaipira	36,5	51	86,5	132	160,5	98	213,5	4,5	6,5	8,5	12,5	15,5	22,5	24	2	3
Poty	53	56	79,5	111,5	127	129,5	140	5	6	7	11	14	16	17,5	2	3
Famosa	28	43	62	89	104	112	123	3	6	9	13	10,5	11,5	13,5	2	3

(Cr) Comprimento do ramos; (NF) número de folhas; (1-7) semanas de desenvolvimento da primeira a última coleta de dado. (FM) flores masculinas; (FF) flores femininas.\*Precoce (1); Mediano( 2); Tardio (3)

Tabela 4. Número de grupos formados com base na função logarítmica da probabilidade (*Log-Likelihood*) e seu incremento para variáveis quantitativas.

Número de grupos	<i>Log-Likelihood</i>	Incremento
1	-2332,58	0
2	-2314,91	17,66
3	-2301,73	30,84
4	-2289,42	43,15
5	-2281,09	51,48
6	-2274,67	57,91
7	-2258,92	73,66
8	-2245,47	87,1
9	-2235,01	97,57
10	-2221,47	111,1
11	-2209,45	123,12
12	-2191,38	141,2
<b>13</b>	<b>-2156,49</b>	<b>180,08*</b>
14	-2142,98	197,6
15	-2109,19	220,38
16	-2068,75	256,83
17	-2057,76	270,82
18	-2038,19	285,39

\*Maior incremento para a formação de treze grupos pela função logarítmica.

O grupo 1 conteve o total de 9 genótipos, dentre eles duas cultivares em teste na UFERSA (Cultivar Mabel e Cultivar Olímpic), uma cultivar comercial (Rey Saboroso), cinco acessos do banco de Germoplasma da UFERSA (A2, A3, A22, A39, A44) e uma seleção do programa de melhoramento da UFERSA (D2). Os outros grupos 6, 7, 8, 11 e 12 e 13 foram compostos somente por acessos do banco de germoplasma da UFERSA (acessos A). Por outro lado, grupo 13 obteve apenas um genótipo (A45) (Tabela 5). O grupo 8 conteve genótipos com as maiores médias para comprimento do ramo em todas as fases de desenvolvimento analisadas. Por outro lado, os menores valores médios tanto para comprimento do ramo principal (CRP) como para o número de folhas (NF) foi observado nos genótipos do grupo 12 (Tabela 6). Neste caso, observa-se a formação de grupos exclusivos em função as características quantitativas avaliadas.

Tabela 5. Grupos formados pelos métodos Ward-MLM.

Grupos Ward-MLM	Genótipos
1	A2, A3, A22, A39, A44, D2, Cultivar Mabel, Cultivar Olympic, Rey Saboroso
2	A5, A24, A28, A31, A33, A41, D6
3	A15, A32, A42, D1, D8, D4, Cultivar Amaral
4	A1, A9, A12, A18, A23, D3, D5
5	A27, D9, D10, Gaucho Caipira, Poty
6	A8, A29, A37
7	A25, A26, A35, A43
8	A13, A34, A36
9	A6, Cultivar Amarelo, Cultivar Vereda
10	A4, D7, Imperial45, Famosa
11	A7, A14, A17
12	A11, A30
13	A45

Foi verificada maior distância entre o grupo 13, e os demais grupos formados pelo procedimento Ward-MLM para as variáveis avaliadas (Tabela 7). Por outro lado, os genótipos disposto nos grupos 4, 5 e 7 apresentaram valores médios próximos principalmente para o número de folhas. A maior distância, ou seja, a maior dissimilaridade foi observada entre os grupos 12 e 13 com valor estimado de 505,510, enquanto que menor distância foi verificada entre os grupos 1 e 3 com valor estimado de 4,059 mostrando alta similaridade entre as espécies (Tabela 7).

Tabela 6: Médias das variáveis quantitativas para cada um dos 13 grupos formados pelo método *Ward-MLM*.

Variável	Grupo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CN1	37,00	39,29	30,50	25,21	38,20	38,50	21,50	65,00	52,33	26,88	63,67	12,25	54,50
CN2	56,56	63,14	49,93	39,29	52,10	65,17	32,25	100,17	65,50	33,13	79,67	16,75	76,00
CN3	100,44	110,57	88,86	64,43	83,90	120,83	61,00	166,17	101,33	51,13	120,33	21,50	148,50
CN4	144,50	163,79	133,86	100,29	117,80	180,17	106,50	213,17	142,33	78,38	168,17	49,75	197,50
CN5	169,11	203,50	163,43	132,86	135,30	215,17	144,88	241,00	168,17	97,00	187,50	117,75	139,50
CN6	187,89	237,36	192,00	162,71	129,90	259,33	170,38	271,17	185,33	115,38	215,67	168,75	155,00
CN7	197,39	259,21	202,93	177,93	156,90	232,17	193,25	287,67	209,33	128,38	241,00	212,50	156,50
NF1	5,22	5,57	4,86	4,64	4,60	5,50	4,25	7,00	5,83	3,88	6,83	2,50	6,00
NF2	7,61	8,57	7,43	5,93	6,80	9,50	7,50	10,83	7,17	5,63	8,67	3,25	9,00
NF3	12,00	13,00	11,07	8,64	9,40	15,17	10,25	15,67	11,00	7,75	13,33	4,75	14,00
NF4	16,17	18,79	15,29	12,64	12,70	21,83	15,00	20,33	14,50	11,00	17,00	7,50	19,00
NF5	18,83	22,00	18,86	16,43	14,20	25,17	19,25	23,17	17,33	11,13	20,00	12,75	13,50
NF6	22,33	28,07	23,36	22,14	18,10	32,83	25,25	28,33	20,33	14,50	24,83	19,50	17,50
NF7	22,39	28,71	22,36	22,64	18,70	33,50	27,25	25,50	22,67	15,38	26,50	22,25	18,50

\*Comprimento do ramo principal (CN); número de folhas (NF).

Tabela 7. Distância entre os grupos formados pelo método Ward-MLM para variáveis quantitativas avaliadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0	15,099	4,054	26,68	28,052	44,317	23,109	67,253	8,343	70,857	31,848	152,079	153,552
2	15,099	0	19,192	49,629	71,309	16,118	46,243	36,723	21,908	126,142	26,122	178,958	191,153
3	4,054	19,192	0	13,6	25,407	53,832	14,08	83,08	16,371	58,302	47,304	119,179	181,727
4	26,68	49,629	13,6	0	25,204	100,038	13,594	147,163	39,049	33,21	92,128	63,792	244,935
5	28,052	71,309	25,407	25,204	0	130,308	22,682	148,201	31,026	20,091	81,713	119,083	156,112
6	44,317	16,118	53,832	100,038	130,308	0	86,889	41,53	59,441	200,496	44,177	265,048	205,509
7	23,109	46,243	14,08	13,594	22,682	86,889	0	145,242	38,895	35,107	86,587	90,857	214,981
8	67,253	36,723	83,08	147,163	148,201	41,53	145,242	0	61,054	246,469	26,96	333,959	175,88
9	8,343	21,908	16,371	39,049	31,026	59,441	38,895	61,054	0	76,359	16,721	160,72	146,84
10	70,857	126,142	58,302	33,21	20,091	200,496	35,107	246,469	76,359	0	153,649	71,293	240,686
11	31,848	26,122	47,304	92,128	81,713	44,177	86,587	26,96	16,721	153,649	0	256,018	130,065
12	152,08	178,958	119,18	63,792	119,083	265,048	90,858	333,959	160,72	71,293	256,019	0	505,513
13	153,552	191,154	181,728	244,935	156,112	205,51	214,982	175,881	146,841	240,686	130,065	505,513	0



As duas primeiras variáveis canônicas obtidas através do procedimento *Ward-MLM* foram suficientes para explicar 85,57% do total de variação (Tabela 8). Neste sentido pode-se obter uma interpretação satisfatória da variabilidade entre os acessos, tal como ocorreu neste estudo, sendo possível a representação gráfica bidimensional (Figura 4).

Tabela 8. Valores das variáveis canônicas.

Variável	CAN 1	CAN 2
CN1	0,7299	-0,331
CN2	0,8714	-0,187
<b>CN3*</b>	0,9293	-0,179
<b>CN4*</b>	0,961	-0,093
CN5	0,8745	0,2982
CN6	0,82	0,4847
CN7	0,6518	0,4444
NF1	0,7266	-0,139
NF2	0,8173	-0,065
<b>NF3*</b>	0,9049	-0,029
NF4	0,8744	0,0785
NF5	0,7921	0,4494
NF6	0,6706	0,5465
NF7	0,5182	0,4974

\* Variáveis que mais contribuíram para a variação.

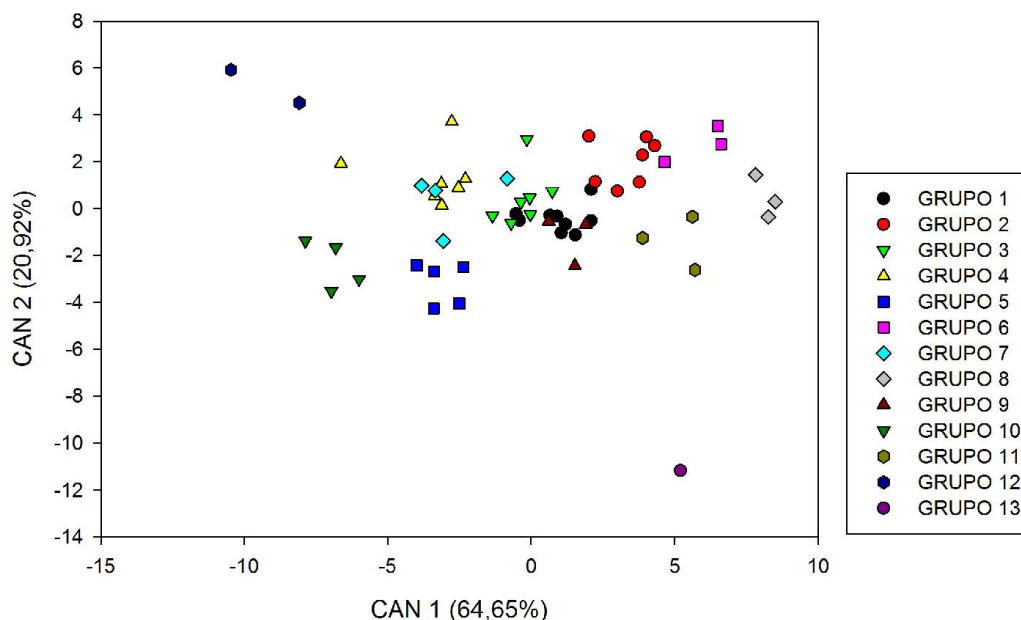


Figura 4. Dispersão gráfica das duas primeiras variáveis canônicas representando a formação de 13 grupos na população de melão.

De acordo com a visualização gráfica foi possível observar os grupos de genótipos mais similares e os mais divergentes. O grupo 1 esteve mais distante, geneticamente, do grupo 10, 12 e 13 e mais próximo do grupo 2, 3 e 9. O grupo 2 é mais divergente em relação ao grupo 10 e mais similar ao grupo 6. O grupo 3 se encontra mais distante, geneticamente, do grupo 8 e 12 e apresenta mais similaridade em relação ao grupo 7. O grupo 4 é mais divergente do que o grupo 6 e mais semelhante ao grupo 7. O grupo 5, também, é mais similar ao grupo 7, no entanto, mais divergente ao grupo 6, 8 e 13. O grupo 6 se apresenta mais próximo, geneticamente, do grupo 2 e 8 e mais distante do grupo 10 e 13. Em resumo, o que apresenta mais divergência entre todos os grupos é o grupo 13.

### 5.3 Amplificação do DNA

O protocolo de extração de DNA desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) e modificado neste trabalho atendeu às necessidades requeridas para os experimentos, uma vez que indicou através da eletroforese amostras de DNA rica em DNA não fragmentados (Figura 5). A relação de absorbância a 260nm ( $A_{260}$ ) e a 280 ( $A_{280}$ ) variou entre 1,7 a 2,0 indicando não haver contaminação por proteínas. Em relação ao método de extração adotado foi possível obter amostras de DNA de boa qualidade e de quantidade satisfatória adequada para as análises moleculares.

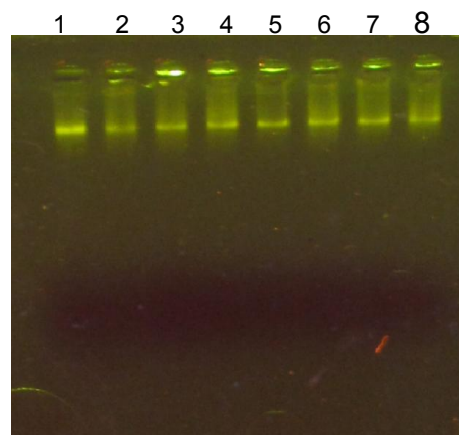


Figura 5: Quantificação de DNA em gel de agarose. As canaletas 1 a 8 representam amostras de diferentes acessos de melão.

## 5.4 Marcadores RGAs

Os 54 acessos de melão foram testados com 15 marcadores RGAs, visando à detecção de polimorfismo na população. Os pares de *primers* utilizados revelaram amplificar 22 bandas, das quais 16 foram polimórficas e 6 monomórficas (Tabela 9).

O menor número de alelos foi gerado pela combinação de *primers* NBSF1+AS2 e 1F+8R, com a amplificação de dois alelos. Apenas as amplificações com polimorfismos na população com reprodutibilidade foram levadas em consideração para a análise de similaridade genética. Os fragmentos polimórficos RGAs foram selecionados para a análise considerando-se a intensidade da banda no gel de agarose 2% e a ausência e presença das mesmas. Um exemplo da eletroforese das amplificações RGAs pode ser observado na Figura 6.

Tabela 9. Par de *primers* do tipo RGAs (análogo a genes de resistência) utilizado em sistema de PCR. A tabela lista o código e seus respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas obtidas na análise utilizando DNA dos genótipos de melão.

Combinação de <i>primers</i>	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
NBSF1+AS2	2	1
NBSF1+LM637	4	1
1F+8R	2	2
S1+AS3	4	1
S1+LM637	4	1
Total	16	6

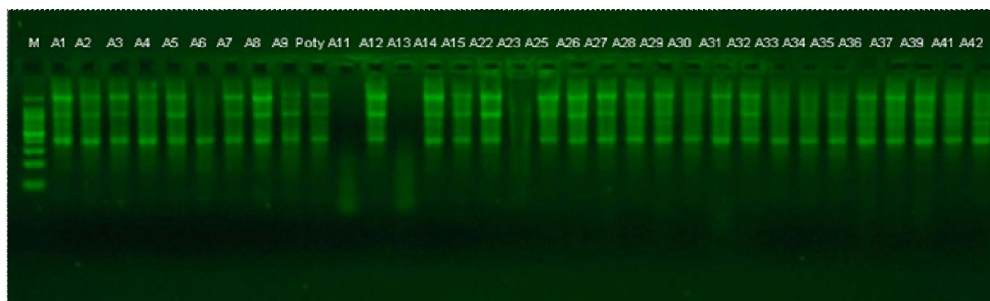


Figura 6: Gel de agarose a 2% contendo fragmentos de DNA amplificados com o marcador RGA (NBSF1+LM637), a partir do DNA de alguns genótipos de meloeiro.

Das 15 combinações *primers* utilizadas, apenas 5 amplificaram fragmentos de RGA (NBSF1+AS2; NBSF1+LM637; 1F+8R; S1+AS3; S1+LM637). Os outros geraram bandas inespecíficas sem reprodutibilidade ou não resultaram em amplificação. Neste caso, foram realizados vários testes com alterações no programa de amplificação, principalmente na temperatura de anelamento. No entanto, não foram obtidas amplificações satisfatórias para algumas combinações de *primers* RGAs (dados não apresentados).

O dendrograma gerado com base no coeficiente de similaridade de Jaccard está ilustrado na figura 7. Os valores de similaridade variaram de 35% a 100% com a formação de sete grupos e vários subgrupos, indicando grande variabilidade em regiões RGAs para a população analisada.

Em relação aos sete grupos gerados neste estudo: o grupo 1 foi formado pelos acessos A1, Cultivar Amarel, A18, A2, A14, A28, A29, A32, A36, A37, A39, A41, Rey Saboroso, Famosa, A12, A44, D5 e D9; o grupo 2 A3, A4, A8, A25, A26, A27, A31, A5, A30, A33, A34, D6, A35, D10, A23, A7, A9, Poty e A15; o grupo 3 pelos acessos A42, D1 e A43; o grupo 4 por A45 e gaúcho caipira; o grupo 5 D7, Cultivar Amarelo e D4; o grupo 6 foi formado por Cultivar Olímpic, Cultivar Mabel, D2, D3 e Imperial 45 e o grupo sete é formado por D7 e Cultivar Vereda.

Os acessos pertencentes aos grupos 1, A1, A18 e a cultivar Amarel, apresentaram 100% de similaridade. Tal fato sugere que todas as sequências RGAs analisadas foram similares entre esses genótipos. Por outro lado, a menor similaridade foi verificada entre a cultivar vereda com os genótipos do grupo 1 com apenas 35% de similaridade (Anexo 1).

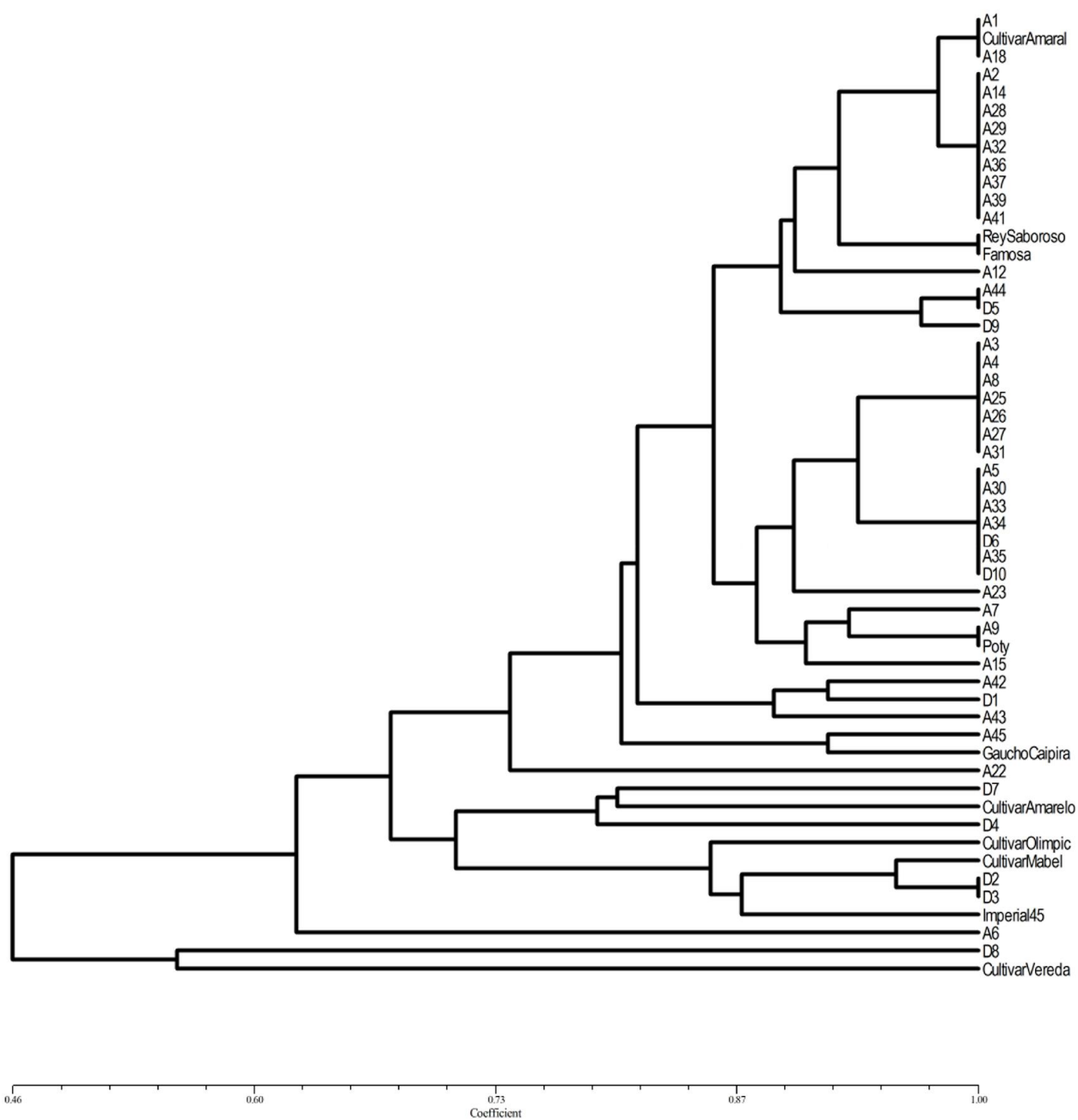


Figura 7. Análise de agrupamento de 54 genótipos de melão com base na matriz de distâncias genéticas.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Biologia Floral

O *Cucumis melo* L. é uma espécie que apresenta variação fenotípica em razão das diferentes variedades botânicas existentes. Em relação a esse fator o conhecimento do período de floração para as flores masculinas e hermafroditas é fundamental para o planejamento de cruzamentos, principalmente em programas de melhoramento genético (ABREU et al., 2008).

Em seus estudos Abreu et al. (2008) verificou que a emissão das primeiras flores masculinas ocorreu a partir do décimo quarto dia depois que foi transplantado as variedades de melão e as flores hermafroditas são produzidas a partir de vinte dias. Esse experimento foi conduzido na horta do Departamento de Ciências Vegetais da UFERSA, em Mossoró. De acordo com os estudos de Paiva et al. (2000) no Estado de Ceará, os genótipos avaliados floresceram em média, aos 35 dias após a semeadura e que algumas linhagens mostraram-se precoces, florescendo a partir de 29,3 dias e outras tiveram comportamento tardio com florescimento aos 42,0 dias.

Através desses estudos, o surgimento das flores tanto masculinas quanto femininas apresentou um comportamento tardio em relação ao florescimento neste trabalho. Uns dos fatores que pode ter ocasionado esse fenômeno é a variação de temperatura e umidade relativa do ar e outro fator pode ter sido o surgimento de pragas como mosca branca que segundo Sobrinho et al. (2003) reduz o tamanho e peso dos frutos, a produtividade, teor de açúcares além de excretar substâncias açucaradas que propiciam o surgimento de fumagina, sendo vetores do vírus causador do amarelão.

## 6.2 Método multivariado Ward-MLM

No presente trabalho 13 grupos foram formados através da análise da função da verossimilhança pelos critérios do pseudo-F e pseudo-t<sub>2</sub>. Tal estratégia *Ward-MLM* tem sido aplicada a diversas cultura vegetais, como, Goiabeira (CAMPOS et al., 2013), *Passiflora* (SANTOS, 2013), e banana (PEREIRA et al., 2012). A estratégia *Ward-MLM* foi utilizada em tomate por Gonçalves et al. (2009), os quais verificaram a formação de 5 grupos com variabilidade dentro dos grupos. Em mamoneira por Oliveira (2013) obteve a formação de 4 grupos permitindo o agrupamento adequado dos genótipos avaliados. O número ideal de grupos definidos varia em função da espécie e do grupo amostral em análise. Por outro lado, a distribuição do germoplasma é fortemente influenciada pelos tipos de descritores quantitativos e qualitativos utilizados na caracterização morfológica (GONÇALVES et al., 2009). A estratégia *Ward-MLM* tem sido ideal para a definição de grupos sem subjetividade, eliminando o estabelecimento pessoal do número de grupos formados (CAMPOS et al., 2013; SANTOS, 2013).

Neste trabalho os grupos com maior divergência foram os grupos 12 e 13 com valor de dissimilaridade em torno de 505,510. Por outro lado, os grupos 1 e 3 foram mais próximos, com valor estimado de 4,059. As distancias entre os grupos são de importância no estudo da diversidade genética e em programas de melhoramento genético, uma vez que subsidiam a escolha de genitores em potencial para a geração de populações segregantes com heterose (SANTOS, 2013; MELO, 2014).

A inclusão de variáveis qualitativas, tipo de comportamento floral, na análise multivariada pelo método *Ward-MLM* foi importante na formação e distribuição dos genótipos nos 13 grupos formados, uma vez que a exclusão dos dados qualitativos formou poucos grupos com baixo incremento na sua distinção pelo teste pseudo-F e pseudo-t<sub>2</sub> (Dado não mostrado). A inclusão de dados qualitativos são de importância na análise multivariada *Ward-MLM* e em estudos utilizando o coeficiente de Gower (1971).

A representação da distribuição dos genótipos da população em um gráfico bidimensional é a forma ideal de avaliação de germoplasma. No entanto o uso de gráficos tridimensionais pode ser realizado quando apenas

três variáveis canônicas explicam grandes percentagens da variação (CAMPOS et al., 2013). As duas primeiras variáveis canônicas foram responsáveis por apenas 61.79% da variação em 138 genótipos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), sendo neste caso necessária a inclusão da terceira variável canônica, cujo somatório foi responsável por 81.30% da variação total possibilitando a representação dos dados em um gráfico tridimensional (CAMPOS et al., 2013).

A formação de elevado número de grupos e suas divergências podem ser úteis na condução de hibridizações, possibilitando a escolha de genitores geneticamente distantes, subsidiando o pré-melhoramento (MELO, 2014). Sendo assim, as plantas mais indicada neste estudo para cruzamentos seria as plantas pertencente, aos grupos 12 e 13, uma vez que esse cruzamento pode aumentar a heterose gerando sementes híbridas que podem resultar em uma elevada diversidade da cultura em estudo, o qual foi comprovado, segundo a análise estatística utilizada neste trabalho, pois indicou realmente que o banco de Germoplasma da UFERSA apresentou uma elevada variabilidade entre os acessos.

### **6.3 Marcadores RGAs**

No presente trabalho, a obtenção de marcadores RGAs possibilitou a detecção de elevado polimorfismo para uma análise intraespecífica. Tal fato também foi relatado nos estudos realizados por Fazza (2011), com resistência a doenças a três raças de *Podosphaera xanthii* em meloeiro, o qual analisou nove combinações de RGA, apresentando 29 bandas polimórficas. Paula et al. (2009) em passiflora também detectou um alto grau de polimorfismo gerando um total de 29 bandas polimórficas. Isso sugere grande potencial do marcar RGAs em revelar polimorfismo em diversas culturas.

Barreto (2007), em seus estudos com melão utilizou 14 pares de *primers* RGA, no qual apenas quatro amplificaram fragmentos de RGA. Lana et al. (2010) conseguiu amplificar 15 *primers* dos 19 RGA analisados em



milho. Enquanto que, Zadeh et al. (2012) utilizaram apenas três *primers* RGA obtendo um alto grau de polimorfismo em estudos relacionados a resistência a doenças em trigo. Desta forma, os dados gerados a partir da utilização de marcadores do tipo RGA são importantes para estudos de caracterização genética, caracterização de cultivares, organização de bancos de germoplasma e detecção de genótipos com resistência a doenças.

O dendrograma gerado com base no coeficiente de similaridade Jaccard e agrupamento UPGMA, possibilitou a distribuição dos genótipos com similaridade que variaram de 35% a 100% formando sete grupos e vários subgrupos, indicando grande variabilidade em regiões RGA para a população analisada. Em estudos com *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera* relacionados à resistência a doenças, Palma (2011) detectou a formação de 5 grupos utilizando RGA. José et al. (2005) em seus estudos com desenvolvimento e mapeamento de marcadores RGA em espécies silvestres de *Arachis* apresentou a formação de 8 grupos. Sendo assim, um indicativo importante de que o sistema de marcadores RGA apresenta no sentido de gerar informações genéticas de interesse para uso em programas de melhoramento (PAULA et al., 2009).

Dantas (2011) utilizando praticamente os mesmos acessos do Banco de Germoplasma da UFERSA, mas com o uso de marcadores RAPD e SSR (microssatélites), observaram com RAPD o total de 144 marcadores, dos quais 139 bandas foram polimórficas e apenas 5 monomórficas. O agrupamento formou 32 grupos com coeficiente de similaridade variando de 36% a 100%. A obtenção de 15 marcadores SSR, revelou polimorfismo em 11 destes e apenas um monomórficos com o coeficiente de similaridade variando de 0% a 100% formando no total 7 grupos.

Stuab et al. (2004) analisaram 17 acessos de melão com 24 *primers* RAPD e detectaram 65 alelos polimórficos. Ritschel et al. (2004) analisou 25 marcadores SSR em estudos de diversidade de melão. No entanto, foi verificada a formação apenas de dois grandes grupos com baixa heterozigosidade devido às relações genéticas das amostras, uma vez que ao invés de selecionar um germoplasma bastante diversificado ele utilizou amostras composta principalmente pela variedade comercial Valenciano.

Com essas análises observou-se que o marcador RGA é pouco polimórfico em comparação com o RAPD e outros marcadores dominantes (multilocus).

Um fator importante a ser levado em consideração é a relação da procedência geográfica como indicador de diversidade genética. Em muitos casos, a separação geográfica geralmente não resulta em maior distância genética (CRUZ; CARNEIRO, 2006), o que foi constatado tanto neste trabalho como no trabalho de Dantas et al. (2012) pela presença de genótipos de diferentes localidades, que compuseram o mesmo grupo ou de mesmas localidades que compuseram grupos distintos.

Os grupos analisados que podem aumentar a heterose são os grupos que possuem uma maior distância, como exemplo o cruzamento dos acessos do grupo 1 com o grupo 7. Dentre os acessos estudados no dendrograma A22 e A6 são plantas isoladas, o qual pode ser atribuído ausência de bandas que levaram esses genótipos a ficarem isolados dos outros grupos. Dessa forma os dados gerados pela utilização do marcador RGA poderão ser importantes para estudos de caracterização genética em melão visando estudos adicionais relacionados principalmente a identificar associação de alguns desses marcadores com genes de resistência, uma vez que esses marcadores podem detectar loco de resistência.

## 7 CONCLUSÕES

- Os genótipos com a mesma procedência geográfica não resultou em uma maior distância genética entre os grupos formados
- As características qualitativas e as quantitativas simultaneamente contribuíram para a formação de grupos em análises da diversidade genética utilizando a estratégia multivariada *Ward-MLM*
- A população estudada apresentou variações em locos RGAs, os quais os valores de similaridade variaram de 35% a 100%. Os genótipos do grupo 1 (A1, A2 e cultivar amarelo) apresentaram 100% de similaridade e o do grupo 7 (cultivar vereda) apresentou 35%.

## 8 REFERÊNCIAS

ABREU, B. T. et al. Fenologia floral, viabilidade do grão de pólen e receptividade do estigma do meloeiro. **Proc. Interamer. Soc Trop. Hort.** Mossoró, RN. v. 52, p. 43-46, 2008.

AGRIANUAL. Cultura do melão: Produção brasileira de melão e área colhida. In: Anuário da Agricultura Brasileira. **Anais...** Informa Economicis South América, p. 386, 2012.

ALMEIDA, M.P. **Avaliação da diversidade genética em acessos ex situ de jacarandá-da-bahia *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. por meio de marcadores moleculares RAPD, como subsídio para sua conservação e utilização.** 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus. 2001.

ALMEIDA, D. **Manual de culturas hortícolas: a cultura do melão.** Lisboa: Editorial Presença, 2006, p.325.

APEXBRASIL-Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos. **Perfil exportador de melões brasileiros.**2014 Disponível em [http://www2.apexbrasil.com.br/media/estudo/BoletimSetorialMeloFINAL\\_2014\\_0328093424.pdf](http://www2.apexbrasil.com.br/media/estudo/BoletimSetorialMeloFINAL_2014_0328093424.pdf). Acesso em\_08 de agosto de 2014.

ARUMUGANATHAN, K; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant specie. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 9. n. 4. p.208-218,1991.

BALBACH, A.; BOARIM, D. S. F. **As frutas na medicina natural.** Itaquetuba: Editora: Vida Plena.1ed, p.145-151, 1992.

BARRETO, F. A. S. **Identificação de marcador molecular ligado ao gene *Pm-1* que confere resistência a raça 1 de oídio (*Podosphaera xanthii*) em melão (*Cucumis melo* L.).** 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BELTRÃO, F.A.S. et al. Morfometria de acessos de maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoffm.) e de duas espécies afins de interesse forrageiro. **Caatinga**, v. 19, n.2, p.103-111, 2006.

BENT, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p. 1757-1771, 1996.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 374.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. S. P. **Manual de Curadores de germoplasma-Vegetal: Caracterização morfológica**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, p. 1-16 2010.

CAMPOS, B. M. et al. Quantificação da divergência genética entre acessos de goiabeira por meio da estratégia Ward-MLM. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 571-578, 2013.

CERQUEIRA, A. A. et al. **Análise de Divergência Genética entre linhagens de melão utilizando marcadores RAPD**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, p.18.

CORRÊA, R. X. et al., Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v.58, n.1, p.15-22, 1999.

COLLINS, N. et al. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance. **Gene**. Amsterdam, v.44, p. 375-381, 2001.

COSTA, N. D. O; LEITE, W. M. **Manejo e Conservação do Solo e da Água: Potencial agrícola do solo para o cultivo do melão**. Embrapa Semi-Árido. Juazeiro, BA, p. 1-20, 2005.

COSTA, N. D. **O cultivo do melão**, Edited by Foxit Reader Copyright (C) by Foxit Software Company for Evaluation Only, 2005.

CRISÓSTOMO, L. A. et al., **Adubação, irrigação, híbridos e práticas culturais para o meloeiro no Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 21 p. (Circular Técnica,14).

CRISÓSTOMO, et al. Biologia floral do meloeiro no Ceará: emissão, duração e relação flores masculinas/ hermafroditas. In Congresso Brasileiro de Olericultura, 44, Campo Grande. **Horticultura Brasileira** , v 22, n. 22, 2004.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2006. p.585.

CRUZ, C. D. Programa GENES: **Aplicativo computacional em estatística aplicada à genética** (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). *Genetics and Molecular Biology*, v.21, p.1415-4757, 1997.

DANTAS A. C. de A. et al. Caracterização Molecular de Acessos de Melão Coletados no Nordeste Brasileiro. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal** - SP, v. 34, n. 1, p. 183-189, 2012.

DANTAS, A. C. de A. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro**. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de concentração: Melhoramento genético de plantas) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2011.

DANTAS, J. D. et al. Avaliação da produção e qualidade de híbridos de melão cantaloupe **Revista Verde** Mossoró, RN v.6, n.4, p.132-136, 2011

DELLA VECCHIA, P.T. O cultivo do melão no Brasil. Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura. Disponível em <http://www.hortibrasil.org.br/classificacao/melao.html>. Acesso em agosto de 2012.

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

FALEIRO, F. G. et al. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, Bahia, v.13, n.2, p. 79-86, 2001

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**; Principais aplicações dos marcadores genético-moleculares nos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embapa Cerrado. , 2007, p.40-41.

FAZZA, A. C. Mapeamento de genes de resistência a três raças de *Podosphaera xanthii* em meleiro. 2011. 70f. Tese (Doutorado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

FRANCO, J. et al. Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. **Crop Science**, Madison, 38(6). p. 1688-1696, 1998.

GARCIA, M. J. The genome of melon (*Cucumis melo* L.) **PNAS** v.109 n. 29, 2012

GONÇALVES, L. S. A. et al. Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using Ward-modified location model. **Genet Mol Res** v.8. p. 364-374, 2009.

GOMES, P. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 1998. p. 446.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics** v.27. p.857-874, 1971.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, p. 575-607, 1997

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de recuperação Automática (SIDRA) —Melão**: Quantidade produzida, ano 2012. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl>. Acesso em: 20 janeiro. 2014.

IPGRI. International Plant Genetic Resources Institute, Descriptors for melon (*Cucumis melo* L.). Rome, Italy. p.65. 2003. Disponível em [http://www.bioversityinternational.org/publications/pubfile.asp?ID\\_PUB=906](http://www.bioversityinternational.org/publications/pubfile.asp?ID_PUB=906). Acesso em: 12 dezembro. 2013.

JEFREY, C. A review of the cucurbitaceae. **Botanic Journal Linneus Society**, v. 81, n.2., p. 233-247, 1980.

JOSÉ, A. C. F. V. et al. Desenvolvimento de marcadores moleculares para análogos a genes de resistência em *Arachis* spp. silvestres **Fitopatol. bras.** Brasília vol.30, n.6, p. 663-667, 2005.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** V. 93, p. 11746-11750, 1996.

KARCHI, Z. Development of melon culture and breeding in Israel. Proceedings of 7<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. **Acta Horticulture**, v.510, p. 13-17, 2000.

KIRKBRIDE, J. H. Jr. **Biosystematics monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons**. North Carolina:Parkway Publishers, p. 159, 1993.

LANA et al. **Desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em análogos de genes de resistência associados a QTLs de resistência à mancha-branca-do-milho** XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, , Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. 2010. CD-Rom

LEISTER, D. et al. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature genetics** .vol 14, p.421- 429, 1996.

MELO, C. A. F. **Caracterização morfológica, citogenética e confirmação molecular de híbridos interespecíficos retrocruzados de *Passiflora* L.**

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil. 2014.

MONTEIRO, R. O. C. et al. Função de resposta do meloeiro a diferentes lâminas de irrigação e doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 455-459, 2006.

MUNGER, H. M.; ROBINSON, R. W. Nomenclature of *Cucumis melo* L. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**. v.14:43-44, 1991.

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

NUNES, G. H. DE S. et al. Aspectos produtivos e de qualidade de híbridos de melão cultivados no agropolo Mossoró-Assu, **Horticultura Brasileira** 22(4):744-747, 2004.

NUNES G.H. de S et al. Estabilidade fenotípica de híbridos de melão amarelo avaliados no Pólo Agrícola Mossoró-Assu. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.41, n.9, p.1369-1376, 2006.

ODET, J. **Le melon**. Centre Technique interprofessionnel de fruits et légumes. p. 295, 1985.

OLIVEIRA, R. S. et al. Genetic divergence on castor bean using the ward-mlm strategy **Revista Ciência Agronômica**, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. v. 44, n. 3 p. 564-570, 2013.

PALMA, F. R. **Caracterização de genes análogos de resistência (RGAs) em *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera* contrastantes em resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp.*elaeidis***.2011.115 f. Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

PAULA, M. N. et al. Caracterização genética de espécies de passiflora por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal** - SP, v. 32, n. 1, p. 222-229, 2009.

PAIVA, W.O.; SABRY NETO, H.; LOPES, A.G.S. Avaliação de linhagens de melão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, n.2, p-109-113, 2000.

PEREIRA, V. M. **Variabilidade genética utilizando marcadores 'ssr' e comportamento agrônômico de diplóides melhorados de bananeira** 2011. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-Ba, 2011.

PEREIRA, V. M. et al. Genetic diversity between improved banana diploids using canonical variables and the Ward-MLM method. **Pesq Agropec Bras** v.47. p.14800-1488, 2012.



PITRAT, M.; HANELT, P.; HAMMER, K. Some comments on infraespecific classification of cultivars of melon. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 510, p. 29-36, 2000.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido**. Rio de Janeiro: ASPTA, 1993. p. 206.

RABBANI, M. A. et al. Variation and the relationship among mustard (*Brassica juncea*) germplasm from Pakistan. **Euphytica**, Dordrecht, v. 101, p. 357-366, 1998.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A. Caracterização morfológica: experiência do BAG de Cucurbitáceas da Embrapa Semi-Árido, com acessos de abóbora e moranga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 9-12, 1999.

RITSCHER, P. S. et al. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.) **Bio Med Central Plant Biology**, 4:9, 2004.

ROBISON, R. W.; DECKER-WALTERS, D. S. Cucurbits. **CAB International**, Oxon (GB), 1997. p.226.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**, 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY. Sereno, ML. 2001. Estimación de la diversidad genética de poblaciones. 1989.

SANTOS, E.A., et al. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) for ornamental use. **Euphytica**, v.184, n.3, p. 389-399, 2013.

SANTOS, E. A.; **Melhoramento do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) visando à resistência ao Cowpea aphid-borne mosaic vírus**. 2013. 143 f. Tese (Doutorado em melhoramento genético de plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro, 2013.

SAS Institute **Statistical analysis system: user's guide**. Cary: SAS. . (2000)  
SILVA, R.A. da. et al. Estimación de parâmetros genéticos e correlações em famílias de meios-irmãos de melões Orange Red Flesh HTC 01. **Caatinga**, v.15, p.43-48, 2002.

SILVEIRA, L. M. et. al. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**. v.34, n.2, p. 123-126, 2009.

SILVA, R. A. da. et al. Estimación de parâmetros genéticos e correlações em famílias de meios-irmãos de melões Orange Red Flesh HTC 01. **Caatinga**, v.15, p.43-48, 2002.

SOBRINHO R. B. et al. **Monitoramento de pragas na produção integrada do meloeiro** /Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2003.

STASKAWICHZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant Disease Resistance. **Science**. v268, p. 661-666, 1995.

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

STAUB. J. E. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. **Euphytica** 115: 225–241, 2000.

STEPANSKY, A.; KOVALSKI, I; PERL-TREVES, R. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. **Plant Systematic Evolution**, v.217, n.2, p. 313-332, 1999.

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

TEIXEIRA, F. F. **Manual de curadores de germoplasma-vegetal: Avaliação de germoplasma**, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

WARD JUNIOR, J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v.58, p.236-244, 1963.

YU, Y. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. S. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** V. 93, p. 11751-11756, 1996.

VALLS, J. F. M. Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L. (Org.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 281-305, 2007.

ZADEH, A. R. H.; KHAYAT, M.; GOHARI, M. Study of Variation of Disease Resistance Genes in Wheat using RGA Molecular Markers. **J. Basic. Appl. Sci. Res.** v.2. n.1. p. 233-236, 2012

ZHUANG. F. Y. Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR and RAPD marker analysis **Plant Breeding**123, 167—172, 2004.