**CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA E VARIABILIDADE
GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE MELANCIA
(*Citrullus lanatus*) DO NORDESTE BRASILEIRO.**

JOSÉ GERALDO DE AQUINO ASSIS

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **GERHARD BANDEL**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1999

ERRATA

Pág	Parág	ONDE LÊ-SE	LEIA-SE								
vii	1º	... small farmers	... small farms								
Vii, viii		horse watermelon	fodder watermelon								
viii	4º	... relation ...	... relationship...								
16	1º	... homodímeros aa e bb são recomendados...	... homodímeros aa e bb que são recomendados...								
18	1º	cucurbitáceas	cucurbitáceas								
20	Tab. 03	PGI ... glicose	PGI ... glicólise								
23	4º	Foram avaliados, em cada sistema enzimático... indivíduos de cada acesso...	Foram avaliados, em cada sistema enzimático... indivíduos ao acaso								
24	Tab. 04	<i>Citrullus lanatus</i>	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i>								
26	1º	com boa resolução.	com boa resolução. Foram avaliados 10 a 20 indivíduos de cada acesso.								
27	Tab. 07	30 40 Ma	30-40 mA								
29		$F = (H_o - H_e)$	$f = H_e - H_o / H_e$								
31	3º	... 5 a 8 dias	... 6 a 10 dias								
32	1º	De fato, o uso...	De fato, é o uso...								
36	1º	Observou-se três locos... ...um intermediário, monomórfico... ...e um terceiro, com três bandas no gel anódico e uma no gel catódico...	Observou-se quatro locos... ...um intermediário, com alelos raros... ... um terceiro com três alelos no gel catódico e um quarto monomórfico no gel catódico...								
40	3º	MADH Apresentou	MADH Apresentou-se								
	4º	... apresentaram perfil eletroforético apresentado	... apresentam perfil eletroforético								
44	Tab. 10	<table><tr><td></td><td>Cat-3</td></tr><tr><td>Crimson Sweet</td><td>0,110 0,000 0,000 0,000</td></tr></table>		Cat-3	Crimson Sweet	0,110 0,000 0,000 0,000	<table><tr><td></td><td>Cat-3</td></tr><tr><td>Crimson Sweet</td><td>0,200 0,300 0,400 0,100</td></tr></table>		Cat-3	Crimson Sweet	0,200 0,300 0,400 0,100
	Cat-3										
Crimson Sweet	0,110 0,000 0,000 0,000										
	Cat-3										
Crimson Sweet	0,200 0,300 0,400 0,100										
45	Tab. 11	<table><tr><td></td><td><i>C. col.</i>³</td></tr><tr><td>% locos polimórficos</td><td>0,37/0,10/0,05</td></tr></table>		<i>C. col.</i> ³	% locos polimórficos	0,37/0,10/0,05	<table><tr><td></td><td><i>C. col.</i>³</td></tr><tr><td>% locos polimórficos</td><td>37/ 10/ 5</td></tr></table>		<i>C. col.</i> ³	% locos polimórficos	37/ 10/ 5
	<i>C. col.</i> ³										
% locos polimórficos	0,37/0,10/0,05										
	<i>C. col.</i> ³										
% locos polimórficos	37/ 10/ 5										
45	5º	0,05; 0,10; 0,37	5, 10 e 37%								
49	2º	... melancias do Nordeste foi a fatores...	... melancias do Nordeste a fatores...								
51	1º	... enquanto o alelo 2 é o mais comum não cultivadas .	... enquanto o alelo 1 é o mais comum nas não cultivadas								
51	2º	... Per-2	... Per-1								
52	Tab.14	Comprimento	Comprimento médio dos frutos								
52	Tab.14	Peso	Peso médio dos frutos								
52	rodapé	Unieversidade	Universidade								
53	3º	... cores verde e vermelho	... sementes de cores verde ou vermelho								
57	2º	... 10 das cinco...	... dez das quinze ...								
Tab. 7, Tab.9, p.25		EM melancia de cavalo	ME melancia forrageira								

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Assis, José Geraldo de Aquino

Caracterização Isoenzimática e variabilidade genética de populações de melancia
(*Citrullus lanatus*) do nordeste brasileiro / José Geraldo de Aquino Assis. - Piracicaba,
1999.

76 p. : Il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Divergência genética 2. Genética de população 3. Germoplasma 4. Isoenzima
vegetal 5. Melancia 6. Variabilidade genética I. Título

CDD 635.615

Dedico a

Manoel Abílio de Queiroz

e

Paulo Soderó Martins

Pelos exemplos de competência, seriedade e dignidade.

Ofereço

à minha família,

Meu eterno porto-seguro

Vou mostrando como sou

E vou sendo como posso

Jogando meu corpo no mundo

LUIZ GALVÃO

Agradeço,

Aos mestres: Manoel Abílio de Queiroz, Paulo Soderó Martins, Gerhard Bandel, Akihiko Ando, Samira Miguel Araújo. Com cada um deles busco aprender as muitas qualidades necessárias para um bom desempenho profissional.

Aos amigos colegas e de laboratório: Elisabeth Veasey, Elias Chaibub, Fábio Freitas, Gilda Mulhen, Inês Faraldo, Juliano Sambatti, Nivaldo Peroni, Rainério Santos, e aos amigos e colaboradores da Genética, Alexandre Sebben, Maria Aldete Ferreira, Luciana Carlini.

A Roberto Romão, por ceder dados originais de sua dissertação de mestrado;

Aos amigos de Piracicaba: Afrânio Vieira, Daniela Caldeira, Denise Pinho, Flóridalma Morales, Rose Cipriani.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos botânicos	4
2.2. Aspectos taxonômicos do gênero <i>Citrullus</i>	5
2.3. O germoplasma de melancia no Nordeste brasileiro	8
2.4. Variabilidade morfológica em melancia	10
2.5. Variabilidade isoenzimática em <i>Citrullus</i>	13
2.6. Função e localização de enzimas em Cucurbitaceae	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Material	21
3.2. Métodos	23
3.2.1. Análises eletroforéticas	23
3.2.2. Análises genético-biométricas	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Metodologia para análises isoenzimáticas em melancia	31
4.2. Padrões isoenzimáticos	32
4.3. Análise da variabilidade genética	43
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

**CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA E VARIABILIDADE GENÉTICA
DE POPULAÇÕES DE MELANCIA (*Citrullus lanatus*) DO NORDESTE
BRASILEIRO.**

Autor: JOSÉ GERALDO DE AQUINO ASSIS

Orientador: GERHARD BANDEL

RESUMO

A melancia (*Citrullus lanatus*), originária da África, foi introduzida no Brasil pelos escravos durante a colonização, sendo ainda cultivada como variedades locais (etnovariedades) na agricultura de sequeiro do Nordeste do Brasil em pequenos estabelecimentos agrícolas, constituindo um germoplasma ameaçado, principalmente, pela substituição destas variedades pelas variedades comerciais. A EMBRAPA-Semi-Árido realizou coletas desse germoplasma que apresentou ampla variabilidade em caracterização morfológica realizada previamente onde avaliou-se 39 populações (acessos) de três distintas regiões do Nordeste do Brasil: Médio Sertão Maranhense (MA), Depressão Sertaneja (DS) e Região Central da Bahia (BA).

Neste trabalho, realizaram-se análises isoenzimáticas em gel de amido das mesmas populações utilizadas na caracterização morfológica, um grupo de melancias não cultivadas (melancia de cavalo) e um cultivar (Crimson Sweet), com o objetivo de quantificar a variabilidade genética existente, determinar a estrutura das populações, comparar os dois métodos de caracterização, estimar a divergência genética do germoplasma entre as três regiões e avaliar a viabilidade da técnica de eletroforese de isoenzimas na formação de coleção nuclear do banco de germoplasma de melancia.

Dezoito sistemas enzimáticos foram testados sendo que apenas seis apresentaram claro polimorfismo e boa resolução (ACP, EST, CAT, PER, PGI, ME). Utilizando-se

esses seis sistemas detectou-se treze locos entre os quais dez foram polimórficos. Determinou-se valores de heterozigosidade média observada, número médio de alelos por loco e porcentagem de locos polimórficos sugerindo que as populações de melancia coletadas no Nordeste apresentam mais variabilidade que o cultivar Crimson Sweet, aproximando-se mais dos valores da melancia de cavalo que são altos por se tratar de variedade não cultivada.

Os índices de fixação encontrados diferiram pouco de zero, indicando que as populações estão próximas do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A estatística F para locos individuais mostra excesso de heterozigotos (F_{is}) para alguns locos e deficiência de heterozigotos para outros, indicando presença de deriva genética.

Cinco dos dez locos polimórficos apresentaram padrões bem diferenciados entre os acessos das etnovarietades de melancia e os acessos de melancia de cavalo, sugerindo a existência de dois *gene pools* distintos, havendo acessos das três regiões, principalmente BA e MA, com introgressão de alelos do outro “gene pool”. Assim, o fluxo gênico, evidenciado pela introgressão de alelos isoenzimáticos, decorrente da alogamia da espécie e da compatibilidade de cruzamento dos dois “gene pools”, seria a principal causa da variabilidade isoenzimática. A região DS apresentou menor variabilidade, com maior proporção de alelos comuns em relação às demais regiões, que é uma tendência dos cultivares melhorados, provavelmente, porque as coletas aí realizadas foram mais seletivas. No entanto, esta região foi apontada, a partir das análises morfológicas como a de maior variabilidade, não havendo assim relação entre variabilidade isoenzimática e morfológica.

Na análise de agrupamento, as populações formadas pelos acessos das três regiões mostraram considerável identidade, divergindo do grupo das melancias de cavalo e em nível maior do cultivar Crimson Sweet. Devido ao alto nível de identidade entre os acessos das três regiões considerou-se que as análises isoenzimáticas não seriam indicadas para formação de coleção nuclear.

**ISOZYMATIC CHARACTERIZATION AND GENETIC VARIABILITY
OF WATERMELON POPULATIONS (*Citrullus lanatus*) OF NORTHEAST BRAZIL.**

Author: JOSÉ GERALDO AQUINO ASSIS

Adviser: GERHARD BANDEL

SUMMARY

The watermelon (*Citrullus lanatus*), originated from Africa, was introduced in Brazil by the African slaves during colonization, and it is still cultivated as landraces (etnovarieties) in the traditional agriculture in Northeast Brazil in small farmers, constituting a threatened germplasm, mainly by the substitution of these landraces by commercial varieties. Embrapa Semi-Árido (Agricultural Research Brazilian Enterprise, Semi-Arid) has been collecting this germplasm, which showed wide variability on previous morphological characterization of 39 populations (accessions) of three distinct regions from Northeast Brazil: Médio Sertão Maranhense (MA), Depressão Sertaneja (DS) and Região Central da Bahia (BA).

This work relates isozymatic analysis in starch gel electrophoresis of practically the same populations used in previous morphological characterization and a group of non-cultivated watermelon (horse watermelon) and a cultivar (Crimson Sweet), aiming at quantifying the genetic variability, determining the genetic structure of populations, comparing both methods of characterization, estimating germplasm genetic divergence

among three regions and evaluating the isozyme electrophoresis viability to create a watermelon germplasm bank core collection.

Eighteen enzymatic systems were tested and six showed clear polymorphism and good resolution (ACP, EST, CAT, PER, PGI, ME). Using these six enzymatic systems, thirteen loci were scored, ten of them being polymorphic. Mean heterozygosity, mean number of alleles per locus and percentage of polymorphic loci suggested that watermelon populations collected in Northeast Brazil showed higher variability than Crimson Sweet cultivar, being closer to the high values of non-cultivated horse watermelon.

Fixation indexes were close to zero, showing that populations are near Hardy-Weinberg equilibrium. F statistics for individual loci showed excess of heterozygotes (F_{is}) for some loci and deficiency of heterozygotes for others, indicating the occurrence of genetic drift.

Five among the ten polymorphic loci showed divergent patterns between watermelon landrace accessions and horse watermelon, suggesting the existence of two gene pools. Accessions from the three regions, mainly BA and MA, showed introgression from the other gene pool. Therefore, the gene flow, evidenced by the introgression of isozymatic alleles, as a result of allogamy and cross-compatibility between both gene pools, might be the main cause of isozymatic variability. The region DS showed less variability, with greater proportion of common alleles than the other regions, which is a tendency of improved cultivars, probably because the collections made in this region were more selective. However, this region was pointed in the morphological analysis as the most variable one. So, there was no relation between isozymatic and morphological variabilities.

In the cluster analysis, populations formed by accessions from the three regions showed reasonable identity, diverging from the horse watermelon group and, in a greatest level, from the cultivar Crimson Sweet. Due to the high level of identity between accessions of the three regions, isozymatic analysis was not considered suitable for forming a core collection.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Citrullus*, da família *Cucurbitaceae* e ao qual pertence a melancia, compreende quatro espécies (Navot & Zamir, 1987; Winter, 1990), todas originárias da África (Mohr, 1986; Maheshwari, 1978, Winter, 1990). *Citrullus lanatus*, a espécie cultivada, é distribuída em todas as áreas tropicais do mundo apresentando grande variabilidade de caráter morfológico, biológico e agrônômico.

Segundo Mohr (1986), a melancia foi trazida para os Estados Unidos pelos colonizadores europeus em 1629, onde adquiriu um grande desenvolvimento como cultura comercial e no Brasil, o início do plantio racional e em grande escala deu-se com a chegada dos imigrantes norte-americanos no estado de São Paulo, na década de 50 (Costa & Pinto, 1977), embora fosse cultivada desde o período da colonização em vários pontos do território, tendo sido trazida pelos escravos africanos (Romão, 1995).

A produtividade média de melancia no Brasil é de 30t/ha e, em 1990; a produção foi de 794.580 t., segundo Makishima (1991). A área colhida em 1996, segundo dados do IBGE (1998) foi de 88.047,310 ha, estando 51% desta área na região NE e cerca de 40% nos estados da Bahia, do Maranhão e Pernambuco.

Esta produção é resultado de dois sistemas agrícolas distintos. O primeiro deles se refere ao cultivo efetuado sob irrigação utilizando, de um modo geral, cultivares americanos

e japoneses, de base genética estreita e bastante suscetíveis às doenças (Queiroz, 1993). O segundo sistema é realizado em pequenas propriedades, sendo dependente de chuva e utilizando variedades locais (etnovariedades). Estas variedades são resultantes do germoplasma introduzido pelos africanos. Segundo Queiroz (1993) a melancia introduzida no Brasil vem sendo cultivada até hoje na agricultura de sequeiro no Nordeste do Brasil, em pequenos estabelecimentos agrícolas. O cultivo utilizando variedades locais, a larga diversidade edafoclimática, cultural e sócio-econômica e as formas de utilização do espaço rural praticada pelos pequenos e médios produtores rurais do Nordeste, vêm permitindo que um número expressivo de espécies cultivadas, inclusive melancia, seja exposta ao processo de seleção natural ao longo dos anos.

No entanto, observa-se um grande risco de substituição destas variedades locais pelas variedades comerciais devido ao mercado remunerar melhor as últimas. Além disso, as secas freqüentes, as inundações por barragens, e o êxodo rural, dentre outros fatores, vêm aumentando o risco de extinção das variedades locais (Queiroz, 1993).

Constatada a importância desta variabilidade e o risco eminente de perda, o Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido (EMBRAPA Semi-Árido) iniciou um programa de coleta sistematizada de germoplasma de cucurbitáceas no Nordeste do Brasil (Queiroz, 1993). O germoplasma de melancia coletado apresenta ampla variabilidade morfológica, como demonstrado por Romão (1995), tendo sido encontrado também genes de resistência às principais doenças que atacam os cultivos da área irrigada como, virose, oídio e micosferela (Araújo et al., 1987; Araújo & Souza 1988; Souza et al., 1988; Dias et al., 1989).

A utilização de qualquer germoplasma depende do conhecimento da base genética desses materiais, da quantidade de variabilidade existente e do modo como essa variabilidade está estruturada nas populações.

A quantificação da variabilidade das populações de melancia do Nordeste deve auxiliar no entendimento da estrutura genética dessas populações e possibilitar um manejo e uso mais racional desses recursos genéticos.

Dentro desse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a variabilidade isoenzimática existente dentro e entre trinta e nove acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas do Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido (EMBRAPA Semi-Árido), coletados em três regiões do Nordeste brasileiro, avaliados morfológicamente por Romão (1995) a fim de:

- comparar os métodos de caracterização isoenzimática e morfológica na quantificação de variabilidade genética;
- discutir a estrutura genética destas populações;
- estimar a divergência genética entre o germoplasma das três regiões,
- avaliar a viabilidade do uso da técnica de eletroforese de isoenzimas na formação de coleção nuclear (“core collection”) do banco de germoplasma de melancia, que consiste na estruturação do germoplasma de modo que o máximo de variabilidade esteja representado num número reduzido de acessos (10-15%)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos botânicos

A melancia é uma planta anual, de hábito rasteiro, com ramificações sarmentosas. Os ramos podem atingir até 5 m de comprimento. Plantas de crescimento anão, com internós curtos foram encontradas (Mohr, 1986). O sistema radicular é extenso e superficial, concentrando-se as raízes até 25-30 cm de profundidade, sendo mais desenvolvido no sentido vertical (Filgueira, 1981). Segundo Araújo (1989), as raízes podem atingir 1,20 m de profundidade em solos profundos e em solos arenosos ou com camadas endurecidas no subsolo, as raízes não crescem normalmente. As folhas são divididas em 3 ou 4 pares de lóbulos, havendo um mutante de folha não lobulada que pode ser utilizada como marcador genético (Mohr, 1986).

A melancia é uma planta monóica, com flores masculinas e femininas na mesma planta, ocorrendo, também, algumas populações de plantas andromonóicas, com flores perfeitas (bissexuais) ao lado de flores masculinas. Partenocarpia e autoesterilidade provavelmente não ocorrem. A flor feminina se distingue facilmente da masculina por apresentar na base das sépalas o ovário já com uma forma que lembra bastante a forma final do fruto (ovário súpero). As flores femininas ocorrem em quantidades bem menores do que

as masculinas. Usualmente, a proporção é de 1 flor feminina para 7 masculinas (Carvalho et al., 1988).

Os frutos variam em formato, podendo ser cilíndricos, ovais ou intermediários. A cor da casca varia de branco a várias tonalidades de verde, algumas com listras finas ou grossas ou rendilhadas. A casca pode apresentar-se muito fina a bastante espessa e de muito mole a muito dura. A cor da polpa pode ser branca, amarela, laranja, rosa ou vermelha, pouco a muito fibrosa (Mohr, 1986).

As sementes são muito variáveis em cor podendo ser branca, preta, marrom ou mesclada, e ainda, verde e vermelha. Variam também em tamanho podendo ser pequenas ou grandes.

2.2. Aspectos taxonômicos do gênero *Citrullus*

A melancia é atualmente classificada do seguinte modo (Carvalho et al., 1988):

Divisão: Magnoliophyta (=Spermatophyta),

Classe: Magnoliopsida (=Angiospermae),

Subclasse Dilleniidae (=Dicotyledoneae),

Ordem: Violales (=Campanulales),

Família: Cucurbitaceae;

Gênero: *Citrullus*;

Espécie: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai.

Uma classificação anterior denominava a espécie como *Citrullus vulgaris* (Scharad). A nomenclatura atual foi indicada em 1969 (Hara, 1969) porém, a nomenclatura anterior ainda é bastante encontrada. Outras sinonímias são: *Colocynthis citrullus* (Linn.), *Cucurbita citrullus* (Linn.), *Momordica lanata* (Thunb.) (Hara, 1969; Maheshwari, 1978).

O gênero *Citrullus* inclui quatro espécies diplóides ($2n = 22$): *C. lanatus*, *C. colocynthis*, *C. ecirrhosus* e *C. rehmanii*.

C. lanatus (Thunb.) Matsum. & Nakai, inclui a melancia cultivada, de larga distribuição mundial e *C. lanatus* var. *citroides*, uma forma selvagem encontrada no sul da África e que é cultivada em outras partes do mundo principalmente para alimentação animal.

C. colocynthis (L.) Schrad, é encontrada no Norte e no Sudoeste da África e na Ásia, e dividida em duas raças distintas, uma encontrada na costa do Mediterrâneo e em Israel e outra nos desertos de Negev e Sinai e *C. ecirrhosus*, endêmica do deserto da Namíbia (Jeffrey, 1975 e Zamir et al., 1984).

As principais diferenças entre *C. lanatus* e *C. colocynthis*, segundo a publicação Flora do Irak (1980) e Mohr (1986) são as seguintes:

C. colocynthis é perene, com folhas com margens crespas, pilosas e cinzentas na cor e lóbulos estreitos; frutos pequenos, não ultrapassando 20 cm de diâmetro, com casca fina, de cor verde, verde claro ou amarelo claro quando maduros e polpa branca esponjosa e compacta, com sabor amargo; *C. lanatus* é anual, com planta suavemente pilosa, com folhas com margens não crespas, fruto acima de 10 cm de diâmetro, algumas vezes muito grandes.

C. ecirrhosus e *C. colocynthis* são morfologicamente similares mas facilmente distintas no tamanho e mosqueado dos frutos, presença e distribuição disjunta (Winter, 1990). As folhas de *C. ecirrhosus* são mais divididas e cobertas com finos pêlos densos e tem margens fortemente recurvadas; não possui gavinhas e tem polpa branca e amarga; as flores são formadas no segundo ano (Mohr, 1986).

C. rehmi é uma nova espécie, também do deserto da Namíbia, relatada por Winter (1990), como planta monóica, rasteira, anual. As partes vegetativas são asperamente espinhosas, com pelos eriçados; as folhas com pecíolos espinhosos, com 3 a 5 lóbulos profundos; as flores solitárias, axilares, amarelas pediceladas. *C. rehmi* aparentemente habita principalmente superfícies pedregosas a areno-pedregosas. É provavelmente muito similar a *C. ecirrhosus*. Os frutos de todas as espécies de *Citrullus* contêm cucurbitacina E, um triterpeno tetracíclico oxigenado; *C. rehmi* contém cucurbitacina E e traços de

cucurbitacinas B e I. *C. rehmii* difere de todas as outras espécies pela característica do mosqueado rosa-salmão em um fundo verde-escuro da casca do fruto.

Duas outras espécies foram anteriormente classificadas como pertencendo ao gênero: *Praecitrullus fistulosus* (Stocks) Pangalo é cultivada na Índia e Paquistão e é semelhante em morfologia à melancia, mas difere de *Citrullus* no complemento haplóide ($n=12$), morfologia da semente e ausência de urease na semente; *Acanthosicyos naudinianus* (Song.) C. Jeffrey é uma espécie selvagem nativa do Sul da África que foi, em 1975, classificada em gênero diferente (Navot & Zamir, 1987).

A. naudinianus (Sond) Hook. assim como *C. ecirrhosus* Cogn., é uma espécie perene do Sudoeste da África. Os caracteres vegetativos de *A. naudinianus* diferem das outras espécies. As folhas são cobertas por pêlos finos e densos; as gavinhas são simples, retas, longas ou ligeiramente recurvadas; as flores são dióicas e só são formadas após o segundo ano de desenvolvimento; os frutos são elipsóides de tamanho médio a grande, de casca fina e polpa macia (Mohr, 1986).

P. fistulosus é originária da Índia (Anghel, 1969) é mais semelhante às espécies de *Cucumis*, tendo número cromossômico $2n = 24$ (Mohr, 1986). Possui folhas grossas e lobuladas, não abundantes, frutos esféricos pequenos e sementes com bordos proeminentes (Trivedi & Roy, 1970).

As espécies selvagens apresentam sabor amargo dos frutos, caráter dominante sobre o não-amargo (Robbinson et al., 1976) e que está presente, também, nas espécies selvagens e cultivadas de outras cucurbitáceas. Segundo Joubert (1980), espécimes amargos foram encontrados nas seguintes cucurbitáceas do sul da África: *Cucurbita pepo* L., *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai, *Cucumis sativus* L., *Cucumis metuliferus* E. Mey, *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl., *Luffa acutangula* Roxb., não havendo relato de amargor em frutos de melão (*Cucumis melo*). Apesar desta característica estar associada à cor branca da polpa em melancias selvagens, conforme Navot et al. (1990), há relatos de raças em que estas características são encontradas dissociadas em *Citrullus colocynthis*, que é considerada ancestral da espécie cultivada, *C. lanatus* (Shimotsuma, 1960; Shimotsuma, 1963 e

Maheshwari, 1978). As duas espécies apresentam intercrossamentos (Shimotsuma, 1963; Singh, 1978; Maheshwari, 1978; Fulks et al., 1979; Sukhankuliev, 1989) e consequente introgressão de caracteres. Navot & Zamir (1986) adotaram a classificação de *C. lanatus* var. *citroides* para plantas que apresentam características intermediárias entre as duas espécies. Essa classificação foi utilizada por Assis (1994) para a melancia de cavalo.

2.3. O germoplasma de melancia do Nordeste brasileiro

A melancia cultivada tem como centro de origem a África, havendo alguns relatos de ser originária do Nordeste Africano e outros da África Central (Romão, 1995). Nas Américas, foi inicialmente introduzida nos Estados Unidos trazida pelos colonizadores europeus em 1629, onde adquiriu um grande desenvolvimento como cultura comercial (Mohr, 1986) tendo sido os imigrantes norte-americanos que iniciaram o plantio racional e em grande escala no Brasil, na década de 50 (Costa & Pinto, 1977). Porém, a melancia já era cultivada em vários pontos do território, desde o período da colonização tendo sido introduzida pelos escravos africanos (Romão, 1995) e constitui, ainda nos dias de hoje, um germoplasma de ampla variabilidade, cultivado no Nordeste brasileiro por pequenos agricultores.

Para permitir o desenvolvimento de cultivares de melancia mais adaptadas às condições de cultivo das áreas irrigadas do Nordeste, a EMBRAPA Semi-Árido criou um banco de germoplasma, realizando coletas de variedades locais, em propriedades de agricultores em diferentes localidades do Nordeste brasileiro, incluindo a região do município de Pastos Bons, no Maranhão; a microrregião de Irecê, na Bahia; região de Teresina, Piauí; a Chapada Diamantina, na Bahia, com base no município de Jacobina, e Tacaimbó-PE (Ramos & Queiroz, 1992 e Queiroz, 1993).

Os acessos coletados apresentaram variação na cor da casca, cor da polpa, cor da semente, tamanho e forma do fruto e brix (Queiroz, 1993) e foram caracterizados morfologicamente (Romão, 1995); alguns passaram por avaliações preliminares (Araújo et

al., 1987; Araújo & Souza, 1988; Dias et al., 1989 e Souza et al., 1988) e avaliação aprofundada (Dias, 1993; Lima et al., 1998).

Dentre o germoplasma coletado no Nordeste brasileiro, um acesso não cultivado, conhecido como melancia de cavalo, originário de Ouricuri, estado de Pernambuco, merece destaque por ter sido identificado como uma fonte de resistência ao oídio (Araújo et al., 1987) e tolerância ao vírus WMV-1 (ou vírus do mosaico do mamoeiro, estirpe melancia, na classificação mais recente) (Araújo & Souza, 1988), doença para a qual não havia qualquer fonte de resistência, segundo relatos de Sitterly (1972) e Ávila (1982) e que tem causado grandes perdas de produção, pois todos os cultivares utilizados para plantio são suscetíveis a estas e a outras doenças, já que nenhum deles foi desenvolvido no Brasil, em decorrência da grande aceitação apresentada pelos tipos americanos, o que desestimulou o interesse no melhoramento dessa hortaliça, segundo relato de Araújo (1989).

Aspectos filogenéticos da melancia de cavalo foram estudados por Assis (1994) revelando grande proximidade em relação à melancia cultivada considerando, principalmente, a compatibilidade de cruzamentos e viabilidade dos híbridos. A compatibilidade de cruzamento foi determinada com base em cruzamentos entre melancia de cavalo e dez cultivares, onde analisou-se: porcentagem de pegamento de frutos nos cruzamentos e quantidade de sementes produzidas; germinação e vigor das sementes produzidas; índice meiótico e viabilidade do pólen dos híbridos. Foram polinizados em média 40 frutos por cultivar e de todos os cruzamentos foram produzidos frutos com sementes viáveis com as menores taxas de polinizações bem sucedidas entre 10% e 18% e as maiores entre 31,4% e 37%, valores altos se comparados com o resultado obtido por Porter (1933) onde a porcentagem de pegamento de frutos autopolinizados do cultivar Klondike variou entre 13,1 a 53,7%. Dois dos cruzamentos efetuados se destacaram quanto a quantidade de sementes por fruto, produzindo cerca da metade produzida pelos cultivares utilizados no cruzamento. Os demais cruzamentos raramente produziram mais que 25% das sementes produzidas pelos respectivos cultivares usados nos cruzamentos. Em relação ao peso das sementes, quando comparando-se com o cultivar envolvido no cruzamento, o

menor valor encontrado foi 28,7%, porém, valores altos, entre 82,9% a 106,6% também foram encontrados. As maiores porcentagens de germinação verificadas foram 74% e 44%, respectivamente não diferindo estatisticamente dos progenitores e apenas dois cruzamentos apresentaram germinação muito baixa (3% e 5%). Todos os híbridos apresentaram altura média da plântula após o 5º dia de germinação estatisticamente semelhante aos progenitores. A velocidade média de germinação dos híbridos, em geral também não apresentou diferenças estatísticas. A análise da viabilidade do grão de pólen dos híbridos F1 foi alta, com valores entre 50 e 60% de grãos viáveis, caracterizando uma meiose praticamente regular, segundo os critérios de Nijs & Visser (1985).

2.4. Variabilidade morfológica em melancia

São conhecidos diversos genes, com alelos alternativos, que explicam parte da variabilidade genética observada em melancia (Tabela 1). Em 1976 foram listados por Robinson et al. (1976) vinte e cinco genes, a maioria relacionada a caracteres de sementes e frutos. Em 1995 a lista publicada por Rhodes e Zhang (1995) ampliava este número para 147 genes, tendo sido adicionados novos genes relacionados a caracteres morfológicos, como os três genes de segregação independente que afetam cor da folhagem descritos por Rhodes (1986) e o gene *gms* relacionado a macho esterilidade e comportamento desinápico dos cromossomos (Ray & Sheman, 1988), além de muitos outros relacionados a locos enzimáticos.

Inúmeros relatos se referem à variabilidade morfológica em melancia.

Vashistha et al. (1984), avaliaram 14 diferentes variedades e observaram diferenças altamente significativas para os caracteres: dias para o florescimento, nó da primeira flor feminina, número de ramos/planta, comprimento do ramo principal, peso de fruto, número de frutos/planta e produção por planta. Foram calculados os coeficientes de variação genotípico e fenotípico e a herdabilidade no sentido amplo. A amplitude de variação maior

Tabela 1. Genes conhecidos em melancia relacionados a caracteres morfológicos, reprodutivos e agrônômicos

Símbolo	Caráter
Sistema reprodutivo	
<i>a</i>	<u>andromonóico</u> . Recessivo ao monóico.
<i>gms</i>	<u>macho-esterelidade glabroso</u> . Folhagem sem tricomas, macho esterilidade.
<i>ms</i>	<u>macho-estéril</u>
Resistência a doenças e pragas	
<i>Ar-1</i>	<u>Resistência a antracnose raça 1.</u>
<i>Ar-2</i>	<u>Resistência a antracnose raça 2.</u>
<i>pm</i>	<u>Suscetibilidade a oídio</u> . (<i>Sphaeroteca fuliginea</i>).
<i>db</i>	<u>Resistência a micosferela causada por <i>Didymella bryoniae</i></u>
<i>Fo-1</i>	<u>Resistência à raça 1 de <i>Fusarium oxysporum</i></u>
<i>Fwr</i>	<u>Resistência à mosca da fruta <i>Dacus cucurbitae</i></u>
<i>Af</i>	<u>Resistência ao besouro <i>Aulacophora foveicollis</i></u>
Caracteres vegetativos	
<i>nl</i>	<u>folhas não lobuladas</u> . Dominância incompleta
<i>go</i>	<u>'golden'</u> . Cor amarela das folhas mais velhas e frutos quando maduros.
<i>Sp</i>	<u>Manchas nas folhas e frutos</u> . Causado por deficiência de cloroplasto, controlado por um fator citoplasmático.
<i>dg</i>	<u>Verde tardio</u> . Os cotilédones das plântulas e todas as folhas jovens da planta são descoradas.
<i>slv</i>	<u>variegação nas folhas da plântula</u>
<i>Yl</i>	<u>folha amarela</u> . Dominância incompleta em relação à folha verde
<i>I-dg</i>	<u>Inibidor da expressão de <i>dg</i></u> .
<i>Dg 1^s</i>	<u>ramo curto</u> . Intermediário entre normal e anão
<i>dw-1</i>	<u>anão -1</u> . Internós curtos com menos células e mais curtas que o normal.
<i>dw-2</i>	<u>anão -2</u> . Internós curtos devido a menos células
<i>bl</i>	<u>sem ramificação</u> . Apenas metade dos muitos ramos originam dos 1 ^{os} nós.
Caracteres dos frutos	
<i>O</i>	<u>fruto oval</u> . Dominância incompleta em relação ao esférico
<i>f</i>	<u>casca rugosa</u> . Recessivo ao liso
<i>g</i>	<u>casca verde clara</u> . Recessivo do verde escuro
<i>g^s</i>	<u>casca verde listrada</u> . Recessivo ao verde escuro mas dominante sobre o verde claro.
<i>m</i>	<u>frutos mosqueados</u> .
<i>p</i>	<u>linhas desenhadas na casca</u> . Faixas irregulares. Recessivo a fruto rendilhado
<i>e</i>	<u>casca explosiva.Fina</u> , explode quando cortada
<i>d</i>	<u>polpa amarelo canário</u> . Dominante ao rosa
<i>y</i>	<u>polpa amarela</u> . Recessiva ao vermelho
<i>wf</i>	<u>polpa branca</u> . Dominante ao vermelho
<i>C</i>	<u>polpa amarelo canário</u> . Dominante sobre rosa
<i>y^o</i>	<u>polpa laranja</u> . Recessivo ao vermelho. Domoniante ao amarelo
<i>su</i>	<u>supressor do sabor amargo</u> .
Caracteres das sementes	
<i>l</i>	<u>sementes longa</u> . Recessivo ao comprimento médio da semente; interage com <i>s</i>
<i>s</i>	<u>sementes curtas</u> . Epistático a <i>l</i>
<i>r</i>	<u>semente vermelha</u> . Interage com <i>w</i> e <i>t</i> .
<i>t</i>	<u>semente marrom</u> . Interage com <i>r</i> e <i>w</i>
<i>w</i>	<u>semente branca</u> . Interage com <i>r</i> e <i>t</i>
<i>d</i>	<u>semente mesclada</u> . Pontos pretos quando dominante sobre <i>r</i> , <i>t</i> e <i>w</i>

Fonte : Robinson et al. (1976) e Rhodes e Zhang (1995)

foi encontrada no comprimento da rama principal, dias para o florescimento, nó da primeira flor feminina, brix, e número de ramos por planta.

Nove populações de melancia (*Citrullus lanatus*) foram avaliadas por Lalta Prasad et al. (1988) para 14 características sendo estimados os coeficientes de variação genotípica e fenotípica. Os coeficientes foram altos para número de frutos/planta, peso médio de frutos, número de sementes/fruto, peso de 100 sementes e produção/planta. Produção foi correlacionada com comprimento do ramo ($r = 0.47$), número de ramos/planta (0.75), peso de fruto (0.88), comprimento (0.63) e circunferência (0.61). Estas características mostraram alta herdabilidade e alto ganho genético e são recomendadas como critério de seleção.

Ferreira et al. (1998) estimaram a divergência genética entre sete populações de melancia, com base em caracteres morfológicos e determinaram que diâmetro transversal do fruto e peso de cem sementes seriam os principais responsáveis pela divergência entre elas.

Romão (1995) estudou a variabilidade genética existente entre e dentro de 39 populações de três regiões do Nordeste brasileiro (Região Central da Bahia, Depressão Sertaneja e Médio Sertão Maranhense) através de caracterização morfométrica, tendo concluído que há diferenças significativas para todas as variáveis quantitativas analisadas entre as populações dentro de cada região e que o inter cruzamento entre populações semeadas e subespontâneas aumenta a variabilidade nos cultivos de melancia. Foi constatada grande variabilidade para diversas características como cor da polpa, tamanho e forma de fruto, brix, padrão de casca, espessura de casca, cor externa predominante, espessura da polpa; cor, tamanho e número de sementes. Foi sugerido que a variabilidade observada é resultado da variabilidade introduzida, do efeito fundador, da biologia das populações e da seleção do agricultor. Dentre estes, a ação dos agricultores parece ser fundamental na medida que altera processos da biologia das populações que ocorrem ao nível da roça.

Pouco se sabe sobre a variabilidade existente entre populações de melancia de cavalo. Entretanto, foi mostrado por Assis (1994) que apresenta divergências morfológica e

eletroforética (para proteínas totais e isoesterases e isoperoxidasas) em relação às formas cultivadas (Assis, 1994). Os estudos evidenciaram que na origem da melancia de cavalo houve participação de *C. colocynthis*, embora não haja relatos da existência desta espécie no Brasil. Tal introgressão de caracteres poderia, então, ter ocorrido nos locais onde hoje é encontrada a melancia de cavalo, com a participação de um *C. colocynthis* posteriormente eliminado por seleção humana ou, mais provavelmente, teria sido introduzida numa forma próxima da que se apresenta hoje, tendo sido mantida durante estes anos para utilização na alimentação animal.

2.5. Variabilidade isoenzimática em *Citrullus*

As isoenzimas são marcadores genéticos/bioquímicos definidas como diferentes formas moleculares variantes de uma mesma enzima, apresentando função idêntica ou similar, presente num mesmo indivíduo. Muitas enzimas existem em múltiplas formas moleculares que apresentam diferentes propriedades de mobilidade eletroforética. A análise genética pode indicar que algumas destas formas variantes são codificadas por alelos alternativos em um único loco, cujos produtos alélicos são denominados aloenzimas. O estudo das isoenzimas tem sido extremamente importante para as investigações sobre variação intra-específica, genética de populações, evolução e mapeamento genético e tem sido aplicado também em identificação varietal e proteção dos direitos dos melhoristas, identificação de locos que afetam caracteres quantitativos importantes, e melhoramento genético incluindo "screening" e avaliação de germoplasma, introgressão, melhoramento de híbridos comerciais e seleção (Wendel & Weeden, 1990).

De acordo com Moore & Collins (1983), destacam-se as seguintes vantagens do uso das isoenzimas: são marcadores codominantes para a maioria dos locos, permitindo a distinção entre homozigotos e heterozigotos; isoenzimas raramente apresentam interações epistáticas; os equipamentos e materiais necessários são relativamente baratos e permitem que várias plantas sejam examinadas rapidamente; o processo é, na maior parte dos casos,

não destrutivo, uma vez que pequenas porções de um determinado tecido são utilizadas; métodos de análise de plântulas permitem a seleção de genótipos desejáveis na fase juvenil.

No que diz respeito à variabilidade isoenzimática em melancia existem poucos relatos. Zamir et al. (1984) estudaram a variação eletroforética em 13 cultivares de *C. lanatus* e 31 acessos de *C. colocynthis* de Israel, utilizando 12 sistemas enzimáticos, representando 19 locos. Doze cultivares de *C. lanatus* mostraram-se monomórficos em todos os locos, em contraste com a riqueza de variabilidade morfológica que apresentam, e um único acesso de *C. lanatus* de Israel foi altamente polimórfico, carregando alelos de *C. colocynthis*; esse acesso é uma raça local cultivada por beduínos para alimentação animal.

Wang & Zhang (1988b) observaram a existência de diferenças na composição de esterases de sementes, entre melancias cultivadas e variedades africanas não cultivadas. Cao & Zhao (1994) encontraram diferenças claras entre seis cultivares e uma melancia africana para esterases e peroxidases. Entre os cultivares houve diferenças em peroxidases mas não em esterases.

Romão et al. (1992) estudaram o polimorfismo isoenzimático em tecidos de cinco variedades de melancia com o objetivo de estabelecer a metodologia adequada. Foram utilizados tecidos da radícula, hipocótilo e cotilédones para os sistemas PGI, PGM, MDH, 6PGD, HK, SKDH, IDH e LAP em gel de amido e PER e EST em poliacrilamida. Os zimogramas de EST e PER apresentaram variação em diferentes estágios e em diferentes tecidos. Todos os tecidos apresentaram atividade enzimática. Apresentaram-se como polimórficos os sistemas PGI, PGM, 6PGD, EST, POD e LAP. Cao & Zhao (1994) também verificaram diferenças em esterases e peroxidases para diferentes estágios de crescimento.

Assis (1994) comparou perfis eletroforéticos de proteínas totais em gel de poliacrilamida e de esterases e peroxidases em gel de amido, de cultivares de *Citrullus lanatus*, *C. colocynthis* de três regiões diferentes (Namíbia, Nigéria e Irã), de melancia de cavalo, e ainda alguns híbridos entre esta e cultivares de *C. lanatus*. Os perfis de proteínas totais dos genótipos estudados foram de modo geral muito semelhantes, apresentando, principalmente, diferenças em intensidade de bandas, e em alguns casos, em presença de

bandas, tendo sido possível diferenciar genótipos tanto entre como dentro de espécies. O perfil de peroxidases apresentou 3 a 4 bandas, com uma grande divergência entre um acesso de *C. colocynthis* do Irã com todos os outros oito genótipos e a quarta banda foi observada na melancia de cavalo e no cultivar Jubilee. O *C. colocynthis* do Irã também divergiu em relação aos perfis de esterases, não tendo apresentado uma banda anódica comum aos demais oito genótipos e com uma banda catódica extra; outras bandas diferentes foram observadas em *C. colocynthis* da Nigéria e em um híbrido entre melancia de cavalo e o cultivar Jubilee.

Biles et al. (1989) analisaram através de eletroforese em gel de amido e em SDS e IEF-PAGE, diferentes tecidos (fluido do xilema, cotilédone, caule e folha) de oito cultivares de melancia e fizeram algumas comparações entre cultivares suscetíveis e resistentes a fusariose. Em gel de amido, todos os locos foram monomórficos nos seis sistemas de enzima utilizados (MDH, PGI, IDH, PGM, PER). Entretanto, diferenças foram observadas entre os diferentes tecidos. O tecido do cotilédone mostrou uma isoenzima peroxidase ausente no tecido do caule. Em IEF-PAGE, diferenças de proteínas totais foram detectadas entre os cultivares no fluido do xilema mas não nos tecidos do caule e do cotilédone. As variantes mais notáveis ocorreram nos cultivares suscetíveis a fusariose Black-Seeded Chilean, Black Diamond e Dixie Queen. As duas primeiras apresentaram uma banda diferente e Black Diamond não apresentou diversas bandas presentes nos outros cultivares. O cultivar Dixilee apresentou uma banda diferencial de outros cultivares. O fluido do xilema foi corrido também em SDS-PAGE e observou-se que Black Diamond deixou de apresentar duas bandas presentes nos outros cultivares. Os cultivares Dixilee e Calhoun Gray, altamente resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, tiveram uma banda mais intensa que os outros cultivares. O vasto número de bandas de proteínas no fluido do xilema causaram dificuldades de interpretação, entretanto, a técnica mostrou-se útil para diferenciar cultivares e auxiliar na identificação de germoplasma.

Biles & Martyn (1993) sugeriram que isoenzimas PER adicionais ocorrem devido a patógeno avirulento e também com a maturação.

Marcador isoenzimático foi determinado para resistência ao ZYMV (vírus do mosaico amarelo do pepino) e tolerância ao frio por Provvidenti (1991) que encontrou quatro raças locais de melancia com alto nível de resistência a uma estirpe de ZYMV, que ocorre nos EUA. Uma planta de um destes acessos foi cruzada, em ambas as direções, com o cultivar suscetível New Hampshire Midget. As populações F_2 segregaram na proporção 1 resistente : 3 suscetíveis. As plantas do retrocruzamento com o progenitor suscetível, foram todas suscetíveis, enquanto que aquelas do cruzamento com o progenitor resistente, segregaram na proporção 1 resistente : 1 suscetível, mostrando que a resistência é condicionada por um gene recessivo (*zym*). Investigando padrões eletroforéticos da isoenzima fosfoglucoisomerase (PGI), foram identificados dois locos Pgi-1 e Pgi-2 em 11 cultivares comerciais e nas seleções resistentes ao ZYMV. Todas as linhas foram monomórficas para Pgi-1, mas três padrões de bandas diferentes foram encontrados para Pgi-2. A banda homodímera rápida (aa) foi observada em diversas plantas de um acesso resistente PI 482308; o homodímero intermediário (bb), em plantas das quatro PI resistentes, e o homodímero lento (cc), em todas as variedades cultivadas testadas. Foi, então, realizado um 'test cross' para observar a possível ligação entre *zym* e a uma das três bandas homodímeras da isoenzima fosfoglucoisomerase (*Pgi-2b*), mas observou-se que os dois genes segregavam independentemente. Os resultados indicam o potencial para o uso dos homodímeros aa e bb são recomendados como marcadores para resistência a ZYMV e tolerância ao frio.

Geric et al. (1989) não conseguiram nenhum marcador para monitorar a pureza varietal de um híbrido de melancia utilizando os sistemas IDH, MDH, PGD, PGM e PHI (fosfo-hexose isomerase), embora tenham conseguido para híbridos de pepino, tomate e cenoura.

Na lista de genes de *Citrullus* elaborada por Rhodes & Zhang (1995) foram relacionados os genes isoenzimáticos indicados por Zamir et al.(1984), Navot & Zamir (1986), e apresentados na tabela a seguir (Tabela 2). Alguns alelos característicos de outras espécies ou da variedade *citroides* são apresentados em colunas específicas.

Alguns destes genes enzimáticos foram colocados em grupos de ligação determinados por Navot & Zamir (1986) e Navot et al. (1990) que identificaram 7 grupos de ligação de 22 genes isozímicos, usando-se de cruzamentos entre *C. lanatus* e *C. colocynthis*. O grupo 1 inclui os genes *Est-1*, *Skdh-2*, *Tpi-1*, *Fdp-1*, *Sod-1*, *Prx-1*, *Prx-1* e *Prx-3*, o grupo 2 *Got-1* e *Got-2*; o grupo 3 *red*, *Gdh-2*, *Pgm-1* e *Bi*; o grupo 4, *Pgi-1*, *Got-4* e *Pgi-2*; o grupo 5, *Pgdh-1* e *Aps-2*; o grupo 6 *Dia-1* e *For-1* e o grupo 7, *Est-1* e *Adh-1*. Foi demonstrado que a cor vermelha da polpa do fruto da melancia é determinado por um gene recessivo (*red*) e está ligado ao marcador *Gdh-2* e que o sabor amargo do fruto (*Bi*) é governado por um gene dominante e ligado ao marcador *Pgm-1*. Os dois caracteres são característicos da espécie selvagem *Citrullus colocynthis* e o estudo foi realizado a partir de híbridos desta espécie com a melancia cultivada, *C. lanatus*. Hashizume et al. (1996) elaboraram amplo mapa de ligação para melancia com base em marcadores de RAPD, RFLP, morfológicos e de isoenzimas, no qual analisaram padrões de isoenzimas MDH, 6GPH, ACP e GOT, sendo que apenas os dois últimos foram polimórficos mas apenas GOT apresentou bandas nítidas.

2.6. Função e localização de enzimas em Cucurbitaceae

Sabe-se que as variedades múltiplas de uma enzima são necessárias para catalizar a mesma reação, mas sob diferentes condições metabólicas, ou em diferentes lugares na mesma célula, ou em células diferentes, ou na mesma célula em sucessivos estágios na diferenciação (Market citado por Marcon, 1988). As isoenzimas propiciam um material rico para investigar a estrutura e função de enzimas e para analisar seu papel no metabolismo celular. Mas elas também facilitam o estudo na diferenciação celular e na genética de populações e evolução, porque apresentam excelentes marcadores de função gênica (Marcon, 1988)

Tabela 2. Genes isoenzimáticos descritos para melancia

<i>Citrullus lanatus</i>	<i>C. lanatus</i> var. <i>citroides</i>	<i>Citrullus</i> <i>colocynthis</i>	<i>Aconthosicyos</i> <i>naudinianus</i>	<i>Praecitrullus</i> <i>fistulosus</i>	<i>Citrullus</i> <i>ecirrhosus</i>
<i>Adh-1</i> ⁺	<i>Adh-1</i> ¹	<i>Adh-1</i> ²	<i>Adh-1</i> ⁴	<i>Adh-1</i> ³	<i>Est-1</i> ⁴
<i>Aps-1</i>	<i>Aps-2</i> ¹	<i>Est-1</i> ¹	<i>Adh-2</i> ²	<i>Est-1</i> ³	<i>Got-2</i> ²
<i>Adh-2</i> ¹	<i>Dia-1</i>	<i>Got-1</i> ²	<i>Aps-2</i> ²	<i>Est-2</i> ³	<i>Pgd-2</i> ¹
<i>Est-1</i> ⁺	<i>Est-2</i> ⁺	<i>Pgi-2</i> ⁴	<i>Est-1</i> ⁵	<i>Got-1</i> ¹	<i>Pgi-2</i> ²
<i>Fdp-1</i>	<i>For-1</i>	<i>Est-2</i> ¹	<i>Est-2</i> ⁴	<i>Got-2</i> ³	<i>Prx-1</i> ⁴
<i>Gdh-1</i>	<i>Gdh-2</i>	<i>Est-2</i> ²	<i>Got-1</i> ³	<i>Mdh-1</i> ¹	<i>Skdh-2</i> ⁴
<i>Got-1</i> ⁺	<i>Got-2</i> ⁺	<i>Got-1</i> ¹	<i>Got-2</i> ⁴	<i>Mdh-2</i> ²	
<i>Got-3</i>	<i>Got-4</i>	<i>Got-2</i> ¹	<i>Pgd-1</i> ²	<i>Me-1</i> ¹	
<i>Idh-1</i>	<i>Lap-1</i>	<i>Mdh-2</i> ¹	<i>Pgd-2</i> ⁴	<i>Pgd-1</i> ¹	
<i>Mdh-1</i> ⁺	<i>Mdh-2</i> ⁺	<i>Me-1</i> ²	<i>Pgi-1</i> ²	<i>Pgd-2</i> ²	
<i>Me-1</i> ⁺	<i>Me-2</i>	<i>Pgd-2</i> ³	<i>Pgi-2</i> ⁵	<i>Pgi-2</i> ³	
<i>Pgd-1</i> ⁺	<i>Pgd-2</i> ⁺	<i>Pgi-1</i> ¹	<i>Pgm-1</i> ²	<i>Pgm-1</i> ³	
<i>Pgi-1</i> ⁺	<i>Pgi-2</i> ⁺	<i>Pgi-2</i> ¹	<i>Pgm-2</i> ¹	<i>Pgm-2</i> ³	
<i>Pgi-2</i> ¹	<i>Pgm-1</i> ⁺	<i>Pgm-1</i> ¹	<i>Prx-1</i> ⁶	<i>Prx-1</i> ²	
<i>Pgm-2</i> ⁺	<i>Pgm-2</i> ²	<i>Prx-1</i> ¹	<i>Skdh-2</i> ³	<i>Skdh-2</i> ⁵	
<i>Prx-1</i> ⁺	<i>Prx-1</i> ³	<i>Prx-1</i> ⁵	<i>Sod-1</i> ²	<i>Sod-3</i> ¹	
<i>Prx-1</i> ⁵	<i>Prx-2</i>	<i>Skdh-2</i> ¹	<i>Sod-2</i> ¹	<i>Tpi-1</i> ²	
<i>Prx-3</i>	<i>Skdh-1</i>	<i>Sod-1</i> ¹	<i>Tpi-1</i> ³	<i>Tpi-2</i> ²	
<i>Skdh-2</i> ⁺	<i>Sod-1</i> ⁺	<i>Tpi-1</i> ¹	<i>Tpi-2</i> ¹		
<i>Sod-2</i> ⁺	<i>Sod-3</i> ⁺				
<i>Tpi-1</i> ⁺	<i>Tpi-2</i> ⁺				
<i>Ure-1</i>					

Adaptado de Rhodes & Zhang (1995)

A localização histoquímica de enzimas oferece um procedimento para caracterização de tecidos e elucidação de enzimas no desenvolvimento primário dos tecidos. A formação de sistemas enzimáticos específicos e sua localização está relacionada, primariamente, com o processo de diferenciação segundo Onofeghara & Koroma (1974b), que estudaram a localização de fosfatases ácidas nos caules de três espécies cultivadas de cucurbitáceas: *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus* e *Citrullus lanatus*. Em três variedades de melancia observou-se atividade na maioria dos tecidos: epiderme, córtex, vasos do floema e xilema e xilema parenquimático. A localização foi feita em geral na parede celular, mas

alguma atividade citoplasmática também foi observada. De modo geral houve um decréscimo na atividade da fosfatase ácida com a idade; até a quarta semana foi muito intensa e a partir da sexta semana com intensidade fraca, em todas as espécies.

As fosfatases ácidas apresentam papel marcante na diferenciação e maturação nos estágios iniciais de desenvolvimento. Juntamente com algumas hidrolases ácidas, tais como as esterases, estão envolvidas com o transporte intracelular e formação de parede (Onofeghara & Koroma, 1974b).

Onofeghara & Koroma (1974a) estudaram a distribuição de fosfatases alcalinas e β -glucosidases nos tecidos de caules de *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus* e *Citrullus lanatus* e observaram similaridade no padrão de distribuição desses dois grupos de enzimas com as fosfatases ácidas. As atividades dessas enzimas variaram de planta para planta e também de tecido para tecido. Entretanto, ambas as enzimas mostraram aumento de atividade com a idade da planta e localização foi mais restrita.

A via xiquimato é uma importante via metabólica nas plantas que leva à síntese de aminoácidos aromáticos, ácido indolacético (auxina), ácido cinâmico (precursores de fitoalexinas fenilpropanóide, cumarinas e ligninas). Muitos desses componentes, particularmente di-hidroxifenilalanina (DOPA) estão associados com senescência ou mecanismos de resistência a doenças e sua síntese é uma função da idade da planta e localização do tecido. Diversas enzimas envolvidas na via xiquimato aumentam em atividade com hipersensibilidade ou respostas a doenças incompatíveis. Essas enzimas incluem, entre outras, fenilalanina amônia liase, calcone sintase, calcone isomerase, peroxidase, polifenoloxidase e xiquimato desidrogenase (Biles & Martyn, 1993).

As isoenzimas peroxidase têm sido estudadas extensivamente como um modelo para controle hormonal e processos fisiológicos da planta e sua atividade pode ser estimulada por muitos fatores, incluindo estresse por calor, seca, doença, fermento e etileno (Biles et al., 1993). Peroxidases, assim como esterases compreendem complexos multienzimáticos com atuação em diversas reações catalíticas e, por isso, são mais suscetíveis à variação

enzimática que outras enzimas como GOT e MDH que participam de reduzidas rotas metabólicas (Amaral Jr. et al., 1994)

A Tabela 3, extraída de Kephart (1990), resume de maneira geral as funções metabólicas das enzimas incluídas nesse estudo, apresentando também suas respectivas estruturas terciárias e a quantidade número de locos encontrados em diversas espécies .

Tabela 3. Número de locos, estrutura e funções metabólicas comumente encontrados em plantas. (Kephart, 1990)

	Enzima	Locos	estr ¹	Função
GOT	glutamato oxalatoacetato transaminase	2(4)	D	metabolismo de aminoácidos
ACO	aconitase	1-3	M	ciclo do ácido cítrico
ACP	fosfatase ácida	2-4	M,D	hidrólise de estéres fosfatados
ADH	álcool desidrogenase	1-3	D	fermentação
CAT	catalase	1	T	fotorrespiração
EST	esterase	2-10	M,D	hidrólise de ligações éster
G6PD	glucose-6-fosfato desidrogenase	2	D	ciclo de Calvin; pentose fosfato
GDH	glutamato desidrogenase	1	H	metabolismo de aminoácidos
IDH	isocitrato desidrogenase	1(2)	D	ciclo do ácido cítrico
MDH	malato desidrogenase	3	D	ciclo do ácido cítrico, fotorrespiração, fotossíntese C4
ME	enzima málica	1	T	ciclo do ácido cítrico, vias C4, CAM
PER	peroxidase	2-13	M,D	vias oxidativas
PGI	fosfoglucoisomerase	2	D	glicose, síntese de amido
PGM	fosfoglucomutase	2	M	conversão de amido em açúcar
SKD	xiquimato desidrogenase	1-2	M	síntese, componentes aromáticos

¹ Estrutura: (M) monomérica, (D) dimérica, (T)tetramérica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

As trinta e nove populações utilizadas de *Citrullus lanatus* (thumb.) Matsum e Nakai, a melancia cultivada, são uma amostra de acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas, coletados em três regiões do Nordeste do Brasil e fazem parte do programa “Recursos Genéticos e Melhoramento de Cucurbitáceas para áreas irrigadas do Nordeste Brasileiro”, que vem sendo desenvolvido desde 1990 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Semi-Árido, situada em Petrolina, PE.

As regiões onde as coletas foram realizadas são as seguintes: 1. Médio Sertão Maranhense (MA), região de clima mais úmido, 2. Depressão Sertaneja (DS) (Silva et al., 1993), região de clima semi-árido e, 3. região Central da Bahia (BA), de clima com umidade intermediária (Figura 1).

As três regiões foram escolhidas com base em três critérios : 1 - por serem regiões de referência quanto ao cultivo de Cucurbitáceas; 2 - são bastante distanciadas entre si; e 3 - são bastante distintas com relação a ecogeografia e representam áreas de ecologia semelhante a outras regiões do Nordeste.

Figura 1. Pontos de amostragem de frutos e sementes de melancia no Nordeste brasileiro (Romão, 1995)

O germoplasma estudado foi coletado na forma de sementes ou frutos entre o segundo semestre de 1992 e 1994, em roças escolhidas ao acaso, em diversas localidades das três regiões. Para a multiplicação foram utilizadas 15 plantas fazendo-se polinização manual e feito o controle gamético feminino.

As trinta e nove populações de melancia cultivada utilizadas foram as mesmas utilizadas por Romão (1995), em seu trabalho de dissertação de mestrado na ESALQ, com exceção de 91-111 (da Região 1 - MA), 85-033, 85-040 e 87-025 (da Região 2 -DS) que substituíram os acessos 91-107, 87-015, 87-025 e 87-019 que apresentaram dificuldade de germinação. Foram estudadas treze populações de cada região (Tabela 4), sorteadas ao acaso representando cerca de 10% do total dos acessos de melancia do Banco Ativo de Cucurbitáceas-CPATSA. Foram estudados também seis acessos de melancia de cavalo, cujas origens são indicadas na Tabela 5 e o cultivar Crimson Sweet que também foi incluído para fins de comparação com os acessos estudados.

Registros das análises morfológicas dos acessos obtidos por Romão (informação pessoal) e não apresentados, referentes a tamanho e peso de frutos, cor de polpa e sementes e número de ramos, foram consultados na discussão.

3.2. Métodos

3.2.1. Análises eletroforéticas

Numa primeira etapa foi determinada a metodologia mais adequada para as análises eletroforéticas no que diz respeito a protocolo, idade do tecido e sistema-tampão. Hipocótilo, folha cotiledonar e 1ª folha verdadeira foram utilizadas nos testes tendo-se optado pela folha cotiledonar para as análises de variabilidade genética pois evidenciam as maiores diferenças com maior resolução. Nesta etapa foram utilizados os 18 sistemas enzimáticos relacionados na Tabela 6. Foram avaliados, em cada sistema enzimático, de quinze a vinte indivíduos de cada acesso.

Tabela 4. Relação das populações de melancia (*Citrullus lanatus*), com as respectivas procedências (região/local de coleta-município)

MARANHÃO		DEPRESSÃO SERTANEJA		BAHIA	
BAG*		BAG*		BAG*	
91-071	Pastos Bons	85-030	Petrolina PE (CPATSA)	91-001	São Gabriel
91-072	Pastos Bons	85-033	Petrolina PE (CPATSA)	91-002	Presidente Dutra
91-073	Pastos Bons	85-040	Petrolina PE (CPATSA)	91-008	Ibititá
91-074	Pastos Bons	85-041	Petrolina PE (CPATSA)	91-011	Ibipeba
91-078	Paraibano	87-005	Juazeiro-BA (Massaroca)	91-026	Barro Alto
91-081	Nova Iorque	87-008	Juazeiro-BA (Massaroca)	91-028	Canarana
91-083	São João dos Patos	87-010	Petrolina-PE (Lagoa dos Cavalos)	91-030	Xique-Xique
91-084	São João dos Patos	87-013	Petrolina-PE (Riacho do Sobrado)	91-031	Xique-Xique
91-087	São João dos Patos	87-017	Petrolina PE (CPATSA)	91-038	Barra
91-093	São João dos Patos	87-018	Petrolina-PE (Lagoa dos Cavalos)	91-042	Itaguaçu
91-104	São João dos Patos	87-022	Uauá-BA	91-043	Itaguaçu
91-111	Pastos Bons	87-028	sem registro	91-061	Cafarnaum
91-122	São João do Patos	87-029	Acauã-PI	91-064	América Dourada

*número no Banco Ativo de Germoplasma - BAG de cucurbitáceas da EMBRAPA Semi-Árido.

Tabela 5. Relação das populações de melancia de cavalo (*Citrullus lanatus*) com a respectiva procedência (região/município).

ACESSO	ORIGEM
1	Afrânio - BA
2	Pilão Arcado - BA
3	Tucano - BA
4	Valente - BA
5	Ouricuri - PE
6	Rio Grande do Norte

Tabela 6. Sistemas enzimáticos utilizados e respectivo tampão utilizado

ENZIMA	EC ¹	Tampão com melhor resolução
aconitase (ACO)	4.2.1.3	tris-citrato
fosfatase ácida (ACP)	3.1.3.2.	lítio-borato
álcool desidrogenase (ADH)	1.1.1.1.1.	tris-citrato
fosfatase alcalina (ALP)	3.1.3.1.	-
catalase (CAT)	1.11.1.6.	tris-citrato
α -esterase (α -EST)	3.1.1.1.	tris-citrato
glucose-6fosfato desidrogenase (G6PDH)	1.1.1.49.	tris-citrato
glutamato desidrogenase (GDH)	1.4.1.2.	tris-citrato
glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)	2.6.1.1.	lítio-borato
isocitrato desidrogenase (IDH)	1.1.1.42	tris-citrato
leucil aminopeptidase (LAP)	3.4.11.1.	-
manitol desidrogenase (MADH)	1.1.1.67	tris-citrato
malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37	tris-citrato
enzima málica (ME)	1.1.1.40.	tris-citrato
peroxidase (PER)	1.11.1.17	lítio-borato
fosfoglucoisomerase (PGI)	5.3.1.9.	lítio-borato
fosfoglucomutase (PGM)	2.7.5.1.	tris-citrato
xiquimato desidrogenase (SKDH)	1.1.1.25.	lítio-borato

¹E.C. :código de enzima.

Para os estudos de divergência genética foram selecionados os sistemas ACP, CAT, EM, EST, PER, PGI, por mostrarem-se polimórficos e com boa resolução.

Foi utilizado gel de amido de batata e amido de milho (penetrose) na proporção de 1:2, a 12%, preparado em forno de microondas, com agitação, e acondicionados em placas de vidro com espaçadores de acrílico. Após a eletroforese, cada gel foi cortado em até quatro camadas, possibilitando a investigação de até quatro enzimas distintas, a partir de um único gel.

Para a extração das proteínas foi utilizado o seguinte tampão:

Tris HCl 0.1 M pH 7,5	200 ml
sacarose 0.2 M	6,892 g
PVP 0.6%	1,20 g
EDTA 1mM	0,06724 g
albumina bovina	0,2 g

A tabela 7 apresenta os métodos de migração utilizados nas eletroforeses

Os sistemas CAT, MDH e ACO, também apresentaram boa resolução com o tampão lítio-borato, embora a Tabela 6 indique tris-citrato como o mais indicado.

Os métodos de coloração empregados estão sumarizados na tabela 8.

A nomenclatura utilizada para designação de locos e alelos foi a mesma utilizada por Navot & Zamir (1986) de acordo com o coeficiente de mobilidade R_f (distância percorrida pela banda com relação à distância percorrida pela linha frontal do azul-de-bromofenol)

3.2.2. Análises genético-biométricas

Os parâmetros de diversidade genética foram determinados para os acessos de melancia de cada região e, ainda, para o grupo de melancias de cavalo e para o cultivar (Crimson Sweet).

A partir dos perfis eletroforéticos identificou-se os locos e alelos de cada sistema enzimático, obtendo-se suas frequências alélicas para cada loco, e a partir destas, o número médio de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigiosidade média esperada (H_e) e heterozigiosidade média observada (H_o), e índice de fixação intrapopulacional, medido pelo coeficiente F de Wright (Wright, 1978). O programa

Tabela 7. Métodos de migração empregados para eletroforese em gel de amido de amostras de folha cotiledonar de melancia

Método	Tampão do gel	Migração (cm)	Voltagem	Corrente	Duração (hs)	Tampão eletrodos	Referência
1 [†]	Lítio-borato pH 8,3	5-7	200-300V	30-40 mA	5-7	Lítio-borato pH 8,3	Wendel e Weedon (1990)
2 ^{**}	Tris-citrato pH 7,5	6-7	~100V	20-40 mA	4-6	Tris-citrato 0.003%	Soltis <i>et al.</i> (1983)

[†] utilizado para ACP, PER, PGI, SKDH, GOT,

^{**} utilizado para CAT, EM, EST, G6PDH, ACO, ADH, GDH, IDH, MADH, MDH

Tabela 8. Métodos de coloração empregados na revelação de isoenzimas sobre gel de amido.

	ACP	PER	PGI	CAT*	EST	EM
Tampão	acetato 0,2M pH 4,8 50 ml	fosfato 0,1M pH 6,0 + etanol 95% 50 ml	Tris HCl 0,1 M 50 ml	água dest. 50 ml	C 20 ml + D 25 ml + H ₂ O 5 ml	Tris HCl 0,1M pH 8,5 - 50ml
Substrato	α -naftil fosfato 0,05 g	H ₂ O ₂ 0,5% - 1 ml	Frutose-6-fosfato 0,04 g	iodeto de potássio 0,5 g	α -naftil acetato 1,0 ml	
Catalizador	1 ml		1 ml	ác. acético 0,5 ml		1 ml
MgCl ₂ 0,1M						
Cofatores			NADP-1ml			NADP - 1 ml
			10 μ l G6PDH			
	Fast Blue BB 0,05 g	o-dianizidina 0,05 g	MTT - 1 ml		Fast Garnet GBC 0,04 g	MTT - 1 ml
			PMS - 1 ml			PMS - 1 ml
Referência	Alfenas <i>et al.</i> (1991)	Scandalios (1974)	Alfenas <i>et al.</i> (1991)	Scandalios, (1974)	Alfenas <i>et al.</i> (1991)	Alfenas <i>et al.</i> (1991)

* O gel é lavado por 1 min. com 50 ml de água com 1 ml de H₂O₂ a 0,5%

BIOSYS (Swofford & Selander, 1989) foi utilizado como auxílio no cálculo das frequências alélicas.

A proporção de locos polimórficos foi calculada dividindo-se o número de locos polimórficos pelo número total de locos analisados, sendo que o termo polimorfismo expressa a presença ou não de variação alélica no loco.

O número médio de alelos por loco foi calculado somando-se todos os alelos observados em todos os locos e dividindo-se esta soma pelo número total de locos.

As heterozigosidades médias esperada (H_e) e observada (H_o) para cada loco foram obtidas pelas fórmulas:

$$H_o = 1 - \sum P_{ii};$$

$$H_e = 2n(1 - \sum P_i^2) / (2n - 1); \text{ (Nei, 1978)}$$

onde: P_{ii} = frequência genotípica dos genótipos homozigotos; P_i = frequência do i -ésimo alelo num dado loco; n = número de indivíduos amostrados. As heterozigosidades médias esperada (H_e) e observada (H_o) foram obtidos pelas médias aritméticas entre os locos estudados.

Os índices de fixação intrapopulacionais foram estimados como desvios da heterozigosidade média esperada, ou seja:

$$F = (H_o - H_e)$$

Valores positivos de f indicam excesso de homozigotos, enquanto que valores negativos indicam excesso de heterozigotos. O f total é parcionado em da seguinte maneira:

$F_t = F_{is} + F_{st}$, onde F_t e F_{is} são correlações entre dois gametas unidos para produzir indivíduos, relativas à população total e às populações subdivididas, e F_{st} é a correlação entre dois gametas tomados ao acaso de cada população, servindo para medir o grau de diferenciação entre e dentro de populações subdivididas (Torggler et al., 1995).

As taxas de cruzamento aparente foram obtidas a partir das estimativas do coeficiente de endogamia (f), empregando-se a relação proposta por Wright (1921) entre a taxa de cruzamento e a endogamia, ou seja

$$f = (1 - t_a) / (1 + t_a)$$

onde $f = 1 - H_e/H_o$.

Portanto

$$t_a = (1 - f) / (1 + f)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metodologia para análises isoenzimáticas em melancia

Em relação ao tecido utilizado, a folha cotiledonar apresentou maior atividade enzimática que o hipocótilo e a folha verdadeira, embora estes também tenham revelado bandas. Observação semelhante foram obtidas por Assis et al.(1995) para os sistemas EST e PER, por Romão et al. (1992) para dez sistemas enzimáticos e por Biles et al.(1989) para proteínas totais.

A idade do tecido foi um fator importante na resolução de bandas. A tabela 9 relaciona idade da folha cotiledonar com a resolução de cada sistema enzimático. Percebe-se uma variação na expressão das enzimas com o desenvolvimento da planta também observada por Wang & Zhang (1988a), Romão et al. (1992), Biles et al.(1989) e Cao & Zhao (1994)

Constatada a variação na expressão das enzimas durante seu desenvolvimento, inclusive algumas se tornando nula a partir de certa idade, é importante determinar uma idade adequada do tecido, principalmente quando se pretende utilizar vários sistemas enzimáticos simultaneamente. Com base nas informações da Tabela 9 determinou-se que a idade de 5 a 8 dias após a germinação seria a mais adequada para a utilização simultânea

destes sistemas. De fato, é o uso de tecido jovens é costumeiro. Por exemplo, para pepino, Knerr et al. (1995) utilizaram cotilédones de plântulas com apenas 3 dias após emergência para análises eletroforéticas da isoenzima MDH.

Dos sistemas testados mostraram-se polimórficos EST, ME, PER, ACP, CAT, PGI, SKDH e G6PDH. Os sistemas enzimáticos SKDH e G6PDH, no entanto, não apresentaram boa resolução de bandas, não tendo sido, por isso, utilizado no estudo de diversidade genética.

4.2. Padrões isoenzimáticos

Aconitase (ACO) - Mostrou-se monomórfico apresentando uma única banda no perfil eletroforético de valor Rf 0,40 (Figura 2).

Álcool desidrogenase (ADH) - O sistema enzimático revelou padrão de enzima dimérica com acessos heterozigotos (inclusive em melancia de cavalo) e homozigotos para o alelo da banda mais rápida (Figura 2). Apesar do polimorfismo apresentado, este sistema não foi utilizado nos estudos de divergência genética.

Catalase (CAT) - Apresentou perfis complexos. Interpretou-se a presença de três locos, os dois primeiros com três alelos e o último com quatro, estando uma no gel catódico (Figura 3).

Enzima málica (ME) - Padrões semelhantes aos exibidos por Navot & Zamir (1986), com um único loco polimórfico, com dois alelos, sendo o mais anódico mais comum; e com baixa incidência de heterozigotos (Figura 4).

Tabela 9. Qualidade de resolução de bandas reveladas em diferentes sistemas isoenzimáticos para diferentes idades da folha cotiledonar (em dias após a germinação).

SISTEMA	IDADE DA FOLHA COTILEDONAR EM DIAS APÓS A GERMINAÇÃO												
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	+14	
ACO										NR			
ACP													
ADH												NR	
CAT											NR		
EM												NR	
EST											NR		
G6PDH											NR		
GDH												NR	
GOT													
IDH										NR			
MADH										NR			
MDH													
PER													
PGI													
PGM												NR	
SKDH

Figura 2 - Fenótipos isoenzimáticos de melancia observados em diversos sistemas enzimáticos, em gel de amido.

Figura 3. Zimograma para o sistema CAT em melancia, para a população 91-072.

Figura 4. Zimograma para o sistema ME em melancia, para as populações 91-030, 91-064 e 91-111.

Esterase (EST) - A quantidade de bandas evidenciada (até seis bandas) foi superior ao relatado por Navot & Zamir (1986) que detectaram dois locos principais, seus produtos revelando duas bandas co-segregantes (Est-1) no gel anódico e uma banda no gel catódico (Est-2). Observou-se três locos, um mais anódico com dois alelos, sendo o segundo característico de melancia de cavalo; um intermediário, monomórfico e um terceiro, com três bandas no gel anódico e uma no gel catódico (Figura 5).

Três locos também foram observados por Cao & Zhao (1994), com todas as bandas no gel anódico. No entanto, os locos indicados basearam-se em zonas de atividade de bandas, sendo que, em todos os genótipos, o primeiro loco apresentando duas bandas próximas de 0,70, o segundo loco apresentando quatro bandas entre 0,39 e 0,52 e no terceiro loco, cinco bandas entre Rfs 0,01 a 0,024. Os padrões de bandas mostrados para as duas últimas, com quatro bandas simultâneas em cada zona de atividade, não pode corresponder a locos de enzima nem monomérica, nem dimérica, devendo haver, na realidade mais locos do que os três apontados.

De qualquer maneira foi possível a observação de diferenças nos padrões entre as seis cultivares estudadas e uma melancia africana. Este sistema tem sido apontado como polimórfico também por vários pesquisadores (Romão et al., 1992).

Cao & Zhao (1994) mostraram que há diferenças nos padrões de esterases, assim como de peroxidases e proteínas totais, com diferentes estágios de crescimento e estado de nutrição durante a germinação da semente.

Fosfatase ácida (ACP) - apresentou dois locos, um monomórfico, apresentando uma banda e um polimórfico com duas bandas, indicando a natureza monomérica da enzima. Em melancia de cavalo foi observada uma banda extra, mais lenta (Figura 6). Neste loco, houve predominância de heterozigotos. Navot & Zamir (1986) detectaram diversas zonas de atividade, sendo o loco Acp-2 o único variável, sendo expresso em *C. colocynthis* e nulo em *C. lanatus*. Hashizume et al. (1996) em estudo de mapa de ligação a partir de cruzamentos

Figura 5. Zimograma para o sistema EST em melancia (amostra de Crimson Sweet é indicada com a seta; à direita, amostras de melancia de cavalo de Pilão Arcado e à esquerda, melancia de cavalo do Rio Grande do Norte)

Figura 6. Zimogramas para o sistema ACP em melancia (amostra de Crimson Sweet é indicada com a seta; à direita, amostras de melancia de cavalo de Pilão Arcado e à esquerda, melancia de cavalo do Rio Grande do Norte)

entre uma melancia cultivada e uma forma selvagem de *C. lanatus*, observaram polimorfismo para este sistema, em gel de poliacrilamida, porém as bandas não foram nítidas.

Fosfatase alcalina (ALP) - Não mostrou atividade com o método utilizado.

Fosfoglucoisomerase (PGI) - Foi detectada a existência de dois locos assim como Navot & Zamir (1986) que afirmam tratar-se de enzimas diméricas; no entanto, Pgi-1 revelou um padrão claro de enzima monomérica e apenas Pgi-2 mostrou-se dimérica (Figura 7). Essa enzima é dimérica segundo em Biles et al.(1989). No loco Pgi-2, a banda mais anódica foi característica dos acessos de melancia de cavalo. Este sistema também foi apontado como polimórfico por Romão et al.(1992) e monomórfico por Biles et al. (1989), sendo que o perfil eletroforético apresentado pelos últimos, para folha cotiledonar, com uma banda na região Rf 0,55 e duas bandas na região Rf 0,36, se assemelham aos encontrados neste trabalho, cujas bandas do loco Pgi-1, apresentam valores Rf 0,55 e 0,50, e em Pgi 2, 0,20, 0,25 e 0,30.

Provvidenti (1991) avaliou padrões eletroforéticos de PGI em 11 cultivares comerciais de melancia e acessos resistentes ao vírus ZYMV e também identificou dois locos, Pgi-1, monomórfico, e Pgi-2 com três padrões distintos de bandas, referentes a três homodímeros, sendo que os dois mais rápidos foram indicados como marcadores para resistência a ZYMV e tolerância ao frio. A banda mais lenta foi característica das variedades cultivadas, da mesma maneira como neste trabalho.

Fosfoglucomutase (PGM) - Mostrou-se monomórfico com duas bandas, a primeira na região Rf 0,28 e a segunda na região Rf 0,38 (Figura 2). Esse padrão assemelha-se ao apresentado por Biles et al.(1989) que, estudando oito variedades cultivadas, apresentou o perfil eletroforético para folha cotiledonar, mostrando uma banda na região Rf 0,47 e duas

bandas na região Rf 0,36. Romão et al. (1992), no entanto, encontraram polimorfismo neste sistema, em estudo com acessos do mesmo BAG de Cucurbitáceas. Navot & Zamir (1986) relatam a existência de dois locos: Pgm-1, de organela, segregante e Pgm-2, citosólica e mais ativa, monomórfica.

Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) - mostrou-se polimórfico mas não apresentou boa resolução de bandas, não tendo sido, por isso, utilizado no estudo de diversidade genética.

Glutamato desidrogenase (GDH) - apresentou monomorfismo, com um único loco de enzima dimérica (Figura 2). Navot & Zamir (1986) detectaram o Gdh-1 citosólico monomórfico e Gdh-2, de organela, com dois alelos, sendo o mais anódico pertencente a *C. lanatus*.

Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) - O sistema enzimático revelou três bandas, de ótima resolução, num padrão monomórfico de loco heterozigoto de enzima dimérica (Figura 2). Biles et al. (1989) apontam também este sistema enzimático como monomórfico. Navot & Zamir (1986) relatam a ocorrência de quatro locos enzimáticos, sendo Got-1, Got-2 e Got-4 segregantes, e este último corando fracamente. Os alelos mais rápidos de Got-1 e Got-2 pertenciam a *C. colocynthis*. O padrão de enzima dimérica também foi encontrado por Hashizume et al. (1996) que estabeleceram mapa de ligação a partir de cruzamentos entre uma melancia cultivada e uma forma selvagem de *C. lanatus*. Este estudo, realizado em gel de poliacrilamida, revelou polimorfismo. Sujhata & Seshadri (1989), estudando a posição taxonômica de *Praecitrullus fistulosus*, observaram padrão isoenzimático de GOT em *C. lanatus*, em gel de poliacrilamida, encontrando duas isoenzimas com os seguintes coeficientes de mobilidade: 0.22, 0.25.

Isocitrato desidrogenase (IDH) - Mostrou-se monomórfico, apresentando duas bandas de valores R_f 0,22 e 0,42 (Figura 2). Foi também apontado como monomórfico por Romão et al. (1992) e por Biles et al. (1989).

Leucil aminopeptidase (LAP) - Não mostrou atividade com a metodologia utilizada, em nenhum método de migração (tris-citrato e lítio-borato), embora tenha sido apontado como ativo e polimórfico por Romão et al. (1992).

Manitol desidrogenase (MADH) - Apresentou monomórfico com uma única banda de valor $R_f = 0.46$ (Figura 2).

Malato desidrogenase (MDH) - Apresentou padrão monomórfico com cinco bandas de ótima resolução com os seguintes valores R_f : 0,59, 0,46, 0,34, 0,27 e 0,046, interpretados como dois locos heterozigotos de enzima dimérica com sobreposição de bandas na região R_f 0,46. Esta enzima é dimérica segundo Kirkpatrick citado em Biles et al. (1989). Este sistema foi apontado como monomórfico por Romão et al. (1992) e por Biles et al. (1989), que apresentaram perfil eletroforético apresentado, para folha cotiledonar, com uma banda na região R_f 0,36 e duas bandas na região R_f 0,19. Mostrou-se monomórfico ainda nos estudos de Hashizume et al. (1996) em gel de poliacrilamida.

Peroxidase (PER): Foram detectadas quatro bandas nítidas, três anódicas e uma catódica, interpretadas como alelos de um único loco (Figura 8). Cao & Zhao (1994) apontaram a existência de cinco locos de peroxidase com bandas entre 0,07 e 0,82, totalizando 14 bandas no gel anódico. Navot & Zamir (1986), por sua vez, detectaram apenas três bandas anódicas nos parentais *C. lanatus* e *C. colocynthis*, que co-segregaram

Figura 7. Zimograma para o sistema PGI em melancia (amostra de Crimson Sweet é indicada com a seta; à direita, amostras de melancia de cavalo de Pilão Arcado e à esquerda, melancia de cavalo do Rio Grande do Norte)

Figura 8. Zimograma para o sistema PER em melancia (amostra de Crimson Sweet é indicada com a seta; à direita, amostras de melancia de cavalo de Pilão Arcado e à esquerda, melancia de cavalo do Rio Grande do Norte)

de modo a evidenciar um único loco, com a banda mais anódica sendo de *C. colocynthis*. Sujhata & Seshadri (1989) determinaram o padrão de peroxidases de *C. lanatus*, em gel de poliacrilamida, em estudo voltado para discutir a posição taxonômica de *Praecitrullus fistulosus* e encontraram seis bandas com os seguintes coeficientes de mobilidade: 0,07, 0,12, 0,19, 0,43, 0,54 e 0,57.

Em vinte e dois acessos foram detectadas no presente trabalho uma a duas bandas catódicas extras, possivelmente artefato da técnica.

Este sistema tem sido apontado como polimórfico por vários pesquisadores (Romão et al., 1992; Cao & Zhao, 1994), enquanto Biles et al. (1989) apontam-no como monomórfico, ao examinar oito cultivares de melancia. Biles & Martyn (1993) detectaram a presença de sete isoperoxidasas em diversos tecidos da planta, observando um aumento destas isoenzimas com o aumento do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* e com a maturação. Cao & Zhao (1994), da mesma maneira, observaram diferenças nos padrões de peroxidases, assim como de esterases e proteínas totais, com diferentes estágios de crescimento dos cotilédones, durante a germinação da semente. Biles et al. (1989) mostraram haver essa diferença também em peroxidases com variação da idade dos cotilédones da planta.

Xiquimato desidrogenase (SKDH) - mostrou-se polimórfico mas não apresentou boa resolução de bandas, não tendo sido, por isso, utilizado no estudo de diversidade genética. Romão et al. (1992) apontam esse sistema como monomórfico e Navot & Zamir (1986) descreveram dois locos de enzima monomérica, Skdh-1, monomórfico e Skdh-2, segregante. No trabalho de Biles et al. (1989) o sistema não apresentou bandas. Fonseca (dados não publicados) utilizando gel de poliacrilamida identificou dois locos de expressão monomérica.

Os sistemas enzimáticos ACO, ADH, CAT, G6PDH, MADH foram estudados pela primeira vez neste trabalho não tendo sido possível comparações com dados de literatura. No entanto, para os demais sistemas, com exceção do sistema ME, percebe-se uma

divergência nos padrões isoenzimáticos encontrados, para todos os sistemas, na literatura. Isso pode ser atribuído basicamente à técnica utilizada e às interpretações.

4.3. Análise da variabilidade genética

Na Tabela 10 são mostradas as frequências alélicas para os treze locos encontrados nos seis sistemas enzimáticos utilizados no estudo de variabilidade. Destes treze locos, dez foram polimórficos.

A partir das frequências alélicas encontradas nos acessos estudados (Tabela 10) determinou-se parâmetros que expressam a variabilidade genética mostrados na Tabela 11, onde também acham-se dados comparativos da literatura.

A porcentagem de locos polimórficos (P) (também designada polimorfismo da população), é uma média da variação genética usada em termos de proporção média de locos polimórficos, dividido pelo número total de locos da amostra. Para se determinar se um loco é polimórfico ou não, têm-se baseado na adoção de critérios quantitativos e arbitrários, que classificam as frequências alélicas de acordo com sua maior ou menor ocorrência na população, ou seja, se o alelo é mais ou menos comum. Dois critérios são frequentemente utilizados para definir se um loco é polimórfico ou não. O primeiro considera que a frequência do alelo mais comum não deve ser maior que 0,99 e o segundo, maior que 0,95, que é menos usado (Torggler et al., 1995). Adotou-se neste trabalho o termo polimorfismo para expressar a presença ou não de variação alélica, que tem sido uma tendência recente nos estudos de variação aloenzimática, segundo Torggler et al. (1995), no qual um loco polimórfico é aquele que possui mais de um alelo na população, independentemente da frequência de seus alelos, e o monomórfico aquele com apenas um alelo na população. Neste caso, o loco é considerado polimórfico se apresentar variação, independente das frequências alélicas.

Tabela 10. Frequências alélicas de populações de *Citrullus lanatus* agrupadas por regiões de coleta; e de melancias de cavalo e do cultivar Crimson Sweet.

	Loco⇒ alelo ¹	Acp1	Acp2	Cat-1	Cat-2	Cat-3	Est-1	Est-2	Est-3	Est-4	Per-1	Me-1	Pgi-1	Pgi-2
Região 1: Médio Sertão Maranhense	1	1,000	0,640	0,002	0,002	0,644	1,000	0,955	0,279	1,000	0,000	0,794	0,432	0,029
	2	-	0,360	0,893	0,065	0,025	-	0,019	0,124	-	0,108	0,306	0,578	0,971
	3	-	-	0,105	0,932	0,158	-	0,026	0,594	-	0,344	-	-	-
	4	-	-	-	-	0,172	-	-	-	-	0,548	-	-	-
	N ¹	166	168	214	214	218	209	209	209	208	199	201	207	205
Região 2: Depressão Sertaneja	1	1,00	0,629	0,023	0	0,846	1,000	1,000	0,107	1,000	0	0,918	0,456	0,000
	2	-	0,371	0,968	0,253	0,020	-	-	0,273	-	0,011	0,092	0,544	1,00
	3	-	-	0,009	0,747	0,085	-	-	0,620	-	0,386	-	-	-
	4	-	-	-	-	0,045	-	-	-	-	0,602	-	-	-
	N	210	210	221	219	224	220	220	220	219	220	217	217	218
Região 3: Região Central da Bahia	1	1,00	0,626	0,180	0,000	0,664	0,916	1,00	0,044	1,000	0	0,658	0,426	0,083
	2	-	0,374	0,668	0,075	0,043	0,084	-	0,227	-	0,030	0,342	0,574	0,917
	3	-	-	0,152	0,925	0,202	-	-	0,729	-	0,430	-	-	-
	4	-	-	-	-	0,092	-	-	-	-	0,540	-	-	-
	N	178	178	217	220	223	243	242	238	243	246	238	235	235
Melancia de Cavalo	1	1,000	0,568	0,581	0,125	0,713	0,077	1,000	0,077	1,000	0,294	1,00	0,441	0,934
	2	-	0,432	0,390	0,402	0,066	0,922	-	0,015	-	0,618	0,00	0,559	0,066
	3	-	-	0,029	0,463	0,118	-	-	0,908	-	0,044	-	-	-
	4	-	-	-	-	0,103	-	-	-	-	0,044	-	-	-
	N	74	74	68	68	68	65	65	65	65	68	62	68	68
Crimson Sweet	1	1,000	0,577	0,150	0,00	0,110	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,350	0,000
	2	-	0,423	0,800	0,00	0,000	0,000	-	0,000	-	0,000	0,000	0,650	1,000
	3	-	-	0,050	1,00	0,000	-	-	1,000	-	0,550	-	-	-
	4	-	-	-	-	0,000	-	-	-	-	0,450	-	-	-
	N	13	13	10	10	10	13	13	10	12	10	10	10	10

¹N = Número de indivíduos analisados

Tabela 11. Variabilidade genética em 13 locos de *Citrullus lanatus* e dados comparativos da literatura.

PARÂMETROS	POPULAÇÕES ESTUDADAS					DADOS DE LITERATURA					
	Região 1	Região 2	Região 3	MC ¹	CS ²	C. col ³	C..l.c ⁴	Cv. ⁵	Dicot	Alóg	Cult ¹⁰
Nº de alelos/loco (A)	2,308	2,000	2,230	2,231	1,385				1,46 ⁶	1,85 ⁸	3,08 ⁷
% de locos											
polimórficos (P)	76,9	61,5	76,9	69,2	30,8	0,37/0,10/0,05	47%	0	52,6 ⁶	64,3 ⁸	61,2 ⁵
Heterozigotidade observada (H _o)	0,284	0,215	0,281	0,220	0,273	-	-	-	0,159 ⁷	0,205 ⁹	0,890 ⁰
Heterozigotidade esperada (H _e)	0,269	0,221	0,293	0,273	0,250	-	-	-	-	-	-
Índice de fixação (f)	-0,056	0,027	0,041	0,194	-0,092	-	-	-	-	-	-
Tamanho médio da amostra por loco (N)	202,0	218,1	225,8	67,5	11,1	-	-	-	-	-	-

¹ Melancia de cavalo

² Crimson Sweet

³ Valores apresentados por ZAMIR *et. al.* (1984) para *C. colocynthis* de três regiões de Israel

⁴ Valores apresentados por ZAMIR *et. al.* (1984) para *C. lanatus* var *citroides* de Israel

⁵ Valores apresentados por ZAMIR *et. al.* (1984) para cultivares de *C. lanatus* de Israel e Sinai

⁶ Valores apresentados por HAMRICK & GODT (1997) para 80 espécies dicotiledôneas

⁷ Valores apresentados por HAMRICK *et al.* (1979) para 74 espécies dicotiledôneas

⁸ Valores apresentados por HAMRICK & GODT (1997) para 64 espécies primariamente alógamas

⁹ Valores apresentados por HAMRICK *et al.* (1979) para 36 espécies primariamente alógamas

¹⁰ Valores apresentados por HAMRICK & GODT (1997) para 113 espécies cultivadas

¹¹ Valores apresentados por HAMRICK & GODT (1997) para 704 espécies não cultivadas

A heterozigosidade esperada, chamada também de índice de diversidade genética, mede a probabilidade de que dois genes escolhidos ao acaso da população sejam diferentes (Torggler et al., 1995). Segundo Torggler et al. (1995), esta é a melhor medida de variação genética apresentando como vantagens a não dependência da definição arbitrária de polimorfismo, a insensibilidade relativa ao tamanho da amostra e a fácil interpretação em termos genéticos.

A heterozigosidade observada, por sua vez, estima a probabilidade de que dois alelos tomados ao acaso da população sejam diferentes. Esta medida está sujeita a limitações como: tamanho pequeno da amostra, que pode desviar as frequências genotípicas das proporções do equilíbrio em função dos erros de amostragem; efeito de seleção natural forte e endogamia (Torggler et al., 1995).

Os índices de fixação de Wright, chamado também de coeficiente de endogamia, são usados para quantificar os efeitos da endogamia em termos de redução na heterozigosidade, que podem ocorrer nas populações em equilíbrio. Esta medida permite medir a quantidade de endogamia pela comparação da proporção observada de genótipos heterozigotos (heterozigosidade observada) com a proporção de genótipos heterozigotos esperada para uma população de acasalamento ao acaso (heterozigosidade esperada) (Torggler et al., 1995).

Os valores de número de alelos por locos e porcentagem de locos polimórficos apresentados neste estudo, sugerem que as populações de melancia coletadas no Nordeste apresentam considerável variabilidade genética. São, em geral, bem maiores do que os valores apresentados pelo cultivar Crimson Sweet, aproximando-se mais dos valores das melancias de cavalo que, sendo não cultivadas, também são altas. Superam também os valores indicados pela literatura para plantas dicotiledôneas, alógamas e cultivadas.

Para populações de *C. colocynthis* de três diferentes regiões de Israel, por exemplo, analisadas por Zamir et al. (1984), a quantidade de locos polimórficos foi variável com valores de 0,05; 0,10 e 0,37. Os cultivares de *C. lanatus* foram completamente monomórficos e o acesso de melancia de cavalo apresentou valor de 47%. Os valores

encontrados neste estudo foram muito superiores, com exceção do cultivar Crimson Sweet. Essa disparidade se justifica pelo fato de que no trabalho de Zamir et al.(1984) foi estudado um número maior de locos e incluiu-se os locos dos sistemas monomórficos na determinação da porcentagem de locos polimórficos.

A heterozigosidade também supera os valores encontrados, em geral, para espécies de dicotiledôneas, espécies alógamas e tanto as cultivadas como não cultivadas, encontrados na literatura. De fato, a incidência de heterozigotos é alta e observou-se também que alguns dos sistemas enzimáticos monomórficos GDH, GOT e MDH descartados das análises de variabilidade, eram completamente heterozigotos.

Essa observação é coerente com a afirmação de Porter (1933), segundo o qual, muitas variedades de melancia estão sujeitas a cruzamentos abertos e são aparentemente heterozigotas para muitos caracteres, particularmente aqueles que afetam o vigor da planta, tamanho, formato e cor do fruto, cor e textura da polpa, teor de açúcar e certas características de semente. Neste estudo, encontrou-se altas taxas de cruzamento aparente, superiores a 90%, com exceção das melancias de cavalo, com taxa de 67,5%, evidenciando a intensa alogamia nas populações e na espécie de forma geral. No entanto, as cucurbitáceas, em geral, sofrem pouco efeito de endogamia. Porter (1933) estudou esses efeitos no cultivar Klondike; o vigor de planta, expresso em termos de crescimento vegetativo, não foi reduzido por seis gerações de endogamia. A endogamia tende a isolar linhas que produzem mais ou menos frutos por planta que variedades comerciais, mas a variação no peso médio dos frutos geralmente compensa a redução no número de frutos por planta. A produção total da planta, determinada pelo peso médio do fruto e número de frutos por planta, pode ser levemente aumentada ou diminuída por endogamia, indicando que relativamente poucos dos fatores que governam a produção estão em condição heterozigota em variedades comerciais.

Os índices de fixação encontrados diferem pouco de zero, indicando que as populações estão próximas do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apenas o grupo das melancias de cavalo mostrou um excesso de homozigotos de 19,4%.

Analisando-se, porém, a estatística F para locos individuais (Tabela 12) percebe-se que alguns apresentaram excesso de heterozigotos (F_{is}) enquanto outros apresentam deficiência de heterozigotos, indicando presença de deriva genética. O fato é compreensível considerando-se o pressuposto que os locos têm segregação independente. O comportamento do F_{it} , é também indicio de deriva genética nas populações. Esse fato pode ser atribuído ao tipo de amostragem realizada na ocasião da coleta. Em populações naturais, recomenda-se, para plantas alógamas, coleta de amostras de poucas sementes de muitas matrizes (Vencovsky citado por Lleras, 1988) mas no caso de coleta de cucurbitáceas em propriedades de agricultores, como a melancia, tal orientação não é de fácil aplicação, embora seja adequado a espécies cultivadas como, milho, feijão e outros espécies de grãos.

Tabela 12. Estatística F para todos os locos estudados de melancia para todas as populações avaliadas.

Loco	$F_{(IS)}$	$F_{(IT)}$	$F_{(ST)}$
Acp-1	-0,003	-0,001	0,002
Acp-2	-0,567	-0,562	0,004
Cat-1	0,730	0,788	0,215
Cat-2	0,801	0,841	0,202
Cat-3	0,191	0,295	0,128
Est-1	0,453	0,899	0,816
Est-2	0,455	0,470	0,028
Est-3	0,555	0,620	0,147
Per-1	-0,545	-0,222	0,209
Em-1	0,558	0,635	0,174
Pgi-1	-0,677	-0,670	0,004
Pgi-2	0,187	0,833	0,794
Média	0,014	0,243	0,232

Essa diversidade encontrada nas populações de melancia do Nordeste contrasta com os poucos estudos isoenzimáticos no gênero *Citrullus*, desenvolvidos até o

momento que, em geral, mostram variação quando se compara tipos de tecidos ou estágios de desenvolvimento (Biles et al, 1989; Cao e Zhao, 1994) mas nenhum ou pouco polimorfismo dentro das espécies tem sido encontrado (Zamir et al., 1984; Navot & Zamir, 1986; Biles et al., 1989; Romão et al., 1992; Assis, 1994). Nestes estudos, os materiais utilizados em geral são cultivares, e polimorfismo isoenzimático, quando encontrado, está relacionado a inclusão de variedades tradicionais do Nordeste brasileiro (Romão et al., 1993; Assis, 1994) ou variedades espontâneas como no estudo de Zamir et al. (1984) que estudaram 12 cultivares de melancia, 31 acessos de *C. colocynthis* e um acesso de *C. lanatus* das dunas Halutza, em Israel, encontrado crescendo próximo a plantas de *C. colocynthis* de Israel, em 12 sistemas enzimáticos, não identificando nenhum loco polimórfico em *C. lanatus*, exceto no acesso das dunas Halutza.

Apesar da baixa variabilidade isoenzimática descrita para melancia cultivada, esta apresenta ampla variabilidade morfológica, principalmente em relação a caracteres de fruto (formato, cor e espessura da casca, cor e textura da polpa) e semente (cor, peso e tamanho) segundo Romão (1995) que atribui a variabilidade genética morfológica observada nas variedades tradicionais de melancia do Nordeste foi a fatores como forma de cultivo nas pequenas propriedades, sem a utilização dos chamados insumos modernos, estabelecendo um processo de seleção das sementes para o plantio seguinte de acordo com o critério e necessidade de cada produtor, além da diversidade de situações ecológicas, no tempo e no espaço.

Além dos relatos de baixo polimorfismo intraespecífico em melancia (Zamir et al., 1984), em outras espécies de cucurbitáceas pouca variação também tem sido encontrada. Estudando oito acessos de moranga (*Cucurbita maxima*) do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa, de diferentes origens, Amaral Jr. et al. (1994) encontraram monomorfismo inter e intrapopulacional, em três dos cinco sistemas enzimáticos utilizados (EST, ACP, GOT, MDH e PER) e sugerem que os caracteres isoenzimáticos tenham sido mais sensíveis à pressão de seleção conduzindo à fixação gênica. Perl-Treves et al (1985) estudando a filogenia de *Cucumis*, gênero com mais de trinta espécies, utilizaram onze

sistemas enzimáticos dos quais apenas catalase foi monomórfico e os demais tiveram 2 a 8 alelos. Muito pouca variação foi encontrada dentro de uma população (fossem espécie, acesso ou variedade).

Cinco dos dez locos polimórficos, encontrados nas populações de melancia do Nordeste, apresentaram padrões bem diferenciados entre os acessos de melancia cultivada e os acessos de melancia de cavalo, sugerindo a existência de dois “gene pools” distintos. No entanto, vários acessos mostraram introgressão de alelo do outro “gene pool” (Tabela 13).

O alelo mais catódico de Est-1 foi característico de melancia de cavalo (Figura 5), e foi encontrado em três acessos de melancia, todos da Bahia (Região 3), a saber, 91-026, 91-028 e 91-031, coletados em Barro Alto, Canarana e Xique-Xique, respectivamente.

Em Pgi-1, a banda mais rápida também é característica dos acessos de melancia de cavalo e está presente em quatro acessos de melancia, um (91-078) da região 1 (Maranhão), e três da região 3 (Bahia), 91-028, 91-011 e 91-038, coletados em Canarana, Ibipêba e Barra, respectivamente. Da mesma maneira, a banda mais lenta deste loco foi observada no acesso de melancia de cavalo, do Rio Grande do Norte (Figura 7). Essas observações evidenciam um fluxo gênico entre os dois gene pools.

Das quatro bandas de peroxidase, as duas mais rápidas foram típicas dos acessos de melancia de cavalo, aparecendo em variadas frequências em três acessos de melancia do Maranhão (91-073, 91-074 e 91-084), um da Depressão Sertaneja (87-008) e dois da Bahia (91-008 e 91-031). Da mesma maneira, as duas bandas mais lentas foram detectadas apenas no acesso de melancia de cavalo do Rio Grande do Norte entre as melancias não cultivadas. É possível que as duas bandas características de melancia de cavalo sejam resultado de introgressão de *C. colocynthis* em melancia de cavalo. Navot & Zamir (1986) detectaram três bandas anódicas de peroxidase, em cruzamentos entre *C. lanatus* e *C. colocynthis*, sendo a banda mais anódica de *C. colocynthis*.

Tabela 13. Acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas avaliados que apresentaram introgressão de alelos.

Acesso/ População	Região	Loco com introgressão
87-008	DS	Per-1
91-008	BA	Per-1
91-011	BA	Pgi-2
91-026	BA	Est-1
91-028	BA	Est-1, Pgi-2
91-031	BA	Est-1
91-031	BA	Per-1
91-038	BA	Pgi-2
91-073	MA	Per-1
91-074	MA	Per-1
91-078	MA	Pgi-2
91-084	MA	Per-1
MC	Rio Grande do Norte	Per-1, Pgi-2, Est-1

Também os locos Cat-1 e Me-1 apresentaram diferenças entre os dois gene pools. Em Me-1, o alelo 2 está ausente nas melancias de cavalo (Tabela 10) e em Cat-1, o alelo 2 é o mais freqüente nas melancias cultivadas enquanto o alelo 2 é o mais comum não cultivadas.

Percebe-se, ainda, na Tabela 10 que os alelos dos locos Cat-1, Cat-2, Est-1, Est-3, Per-2, Pgi-2 e Me-1 exibem alterações claras de classe de freqüência quando se compara a melancia de cavalo com as populações das três regiões.

A Tabela 14 apresenta alguns caracteres morfológicos dos acessos avaliados por Romão (1995) incluindo aqueles que diferenciam em maior grau as melancias de cavalo das cultivadas. A melancia de cavalo, segundo Assis (1994), se caracteriza por frutos grandes, polpa branca e, em geral, sementes verdes.

Tabela 14. Caracteres morfológicos de acessos de melancia do BAG-Cucurbitáceas da EMBRAPA-Semi-Árido.

Acesso	Comprimento (cm)	Peso (g)	Nº de ramos	% Frutos com polpa branca	% Frutos com polpa vermelha ¹	Cores das sementes ²
MÉDIO SERTÃO MARANHENSE (MA)						
91-083	25,23	317,25	5,563	0	18,75	P/Md
91-073	31,70	283,50	5,688	12,5	18,75	Md
91-093	33,50	428,00	4,750	0	31,25	P/Mc/Me Mo/Mp//Cp
91-072	18,23	282,25	5,313	6,67	40,00	P/MD/Me/Bz
91-087	27,83	228,75	5,375	6,25	81,25	Bz
91-071	27,45	323,25	5,315	12,5	45,45	C
91-122	26,48	318,00	4,375	0	25,00	Me/Mp//Md/P
91-104	26,40	398,25	5,375	12,5	56,25	P/Md
91-081	27,20	264,00	6,563	43,75	62,50	Me/P/Md
91-107	19,28	235,75	6,313	0	31,25	P/Me
91-074	26,59	288,50	4,250	6,25	18,75	C
91-078	29,33	373,00	5,063	0	43,75	P
91-084	30,00	266,25	6,313	0	31,25	Mo/Md/Cp/P
DEPRESSÃO SERTANEJA(DS)						
85-030	17,80	197,00	5,438	12,5	14,28	Mp/Me/C/P
87-022	23,86	277,75	6,000	50,00	0	Mc/Me/P
87-029	20,25	293,00	5,375	18,75	20,00	Mp/Me/P
85-041	19,85	324,25	5,875	12,50	31,25	P
87-015	26,40	280,75	5,438	6,25	50,00	P
87-005	32,45	425,75	4,938	0	85,71	C
87-018	29,45	491,25	6,313	0	93,75	P/Me
87-010	24,83	277,50	5,375	31,25	33,33	P/Me
87-017	18,13	216,00	6,500	6,25	25,00	P/Cp
87-025	16,18	202,33	5,563	16,67	25,00	P/Me/Mc
87-013	27,13	464,50	5,313	6,25	60,00	P/C
87-019	20,43	199,00	7,188	25,00	0	P/Me
87-008	27,70	320,00	5,938	0	75,00	C
REGIÃO CENTRAL DA BAHIA (BA)						
91-064	23,75	179,50	5,823	75,00	0	Mp/Cp
91-026	24,13	276,25	5,750	12,50	37,50	P/Md
91-038	24,18	243,25	5,188	6,25	18,75	P
91-042	16,38	178,75	6,125	100,00	0	P
91-001	16,80	176,00	6,938	0	1,88	P/Md
91-061	21,23	273,00	5,938	18,75	18,75	P/Me/Md
91-031	15,90	164,00	6,250	56,25	0	Mp/P/C/Mp
91-043	13,83	134,50	7,250	37,50	0	P/
91-002	16,05	139,75	5,688	87,50	0	P
91-030	16,28	159,00	6,250	50,00	0	Mo/P
91-011	24,45	264,50	5,250	6,25	37,50	Cp/Mp/P
91-028	25,73	408,25	5,500	6,25	80,00	P/Cp
91-008	18,93	253,50	5,583	0	31,25	P/Me

¹Inclui frutos vermelho claro a vermelho escuro

² Predominantes: P - preto, Md - mosqueado, Mc - marrom claro, Me - marrom escuro, Mo - mosqueado, C - creme, Cp - creme com pintas pretas, Bz - bronzeado, Mp - marrom com pintas pretas

Fonte: Romão¹

¹ ROMÃO, R.L. (Unieversidade Estadual de Feira de Santana). Dados relacionados à dissertação de mestrado e não publicados (Romão, 1995). Comunicação pessoal, 1998.

Os acessos portadores de alelos de melancia de cavalo em Est-1 e Pgi-2, apresentaram os maiores frutos na região BA, com 25,7 cm, o mesmo não se aplicando aos acessos com introgressão do alelo de Per-1 (Tabela 14). Na região do Médio Sertão Maranhense, esta relação não pode ser analisada pois se caracteriza por frutos grandes, apresentando, inclusive, os maiores frutos em relação às demais regiões (Romão, 1995).

Em relação à presença de polpa branca, este caráter é observado em todos os acessos com introgressão isoenzimática, com exceção de 91-078 e 91-084, porém, está presente nos demais, muitas vezes em altíssimas proporções como em 91-081 (MA), 87-022 (DS), 91-064, 91-043 e 91-031 (BA) (Tabela 14). A ocorrência de frutos com polpa branca em acessos que não apresentam introgressão isoenzimática pode ser devida ou a uma outra fonte de polpa branca, que não a melancia de cavalo, ou a uma falha de interpretação de cor, em que a cor amarelo canário, dominante sobre a rosa, tenha sido avaliada como branca. De fato, a epistasia relatada para cor da polpa toma este um caráter complexo de difícil interpretação, e ainda não foi completamente determinado seu modo de herança. Segundo Rhodes & Zhang (1995), “o gene W_f é epistático ao segundo gene b (ou $C?$) que condiciona cor de polpa amarela (ou amarelo canário?) e vermelha. Os genótipos $W_f B_$ e $W_f _bb$ apresentam polpa branca, $w_f w_f B_$ polpa amarela e $w_f w_f bb$ polpa vermelha”.

Os acessos de melancia de cavalo do BAG de Cucurbitáceas apresentam, em geral, cores verde e vermelho, encontradas também na espécie selvagem *C. colocynthis*. As cores verde e vermelho não foram observadas em nenhum dos acessos estudados das três regiões. O acesso de melancia de cavalo, originário do Rio Grande do Norte apresenta frutos com aspecto externo muito semelhantes ao cultivar Crimson Sweet, que é uma das variedades mais cultivadas, no entanto, internamente, apresenta polpa branca típica e sementes avermelhadas.

O fluxo gênico, evidenciado pela introgressão de alelos isoenzimáticos e caracteres morfológicos, é decorrente da alogamia desta espécie e da compatibilidade de cruzamento entre melancia de cavalo e melancias cultivadas, demonstrada por Assis et al. (1994). Romão (1995) atribuiu à formação de um banco de sementes no solo com sementes da

melancia cultivada (*C. lanatus*) e da melancia-de-cavalo, à existência de populações não cultivadas sendo que o fluxo gênico entre essas taxa promove o aumento da variabilidade nos cultivos de melancia.

Assis (1994) discute que a atuação da seleção humana poderia ser uma das barreiras de cruzamentos entre as melancias de cavalo e as cultivadas, tendo como consequência um isolamento dos alelos de *C. colocynthis* que a melancia de cavalo carrega, facilitando um processo de especiação mas registra que em raças locais de melancia cultivadas por pequenos agricultores do Nordeste é comum encontrar-se frutos com polpa branca evidenciando a ocorrência de cruzamentos entre estes materiais. As evidências isoenzimáticas aqui apresentadas confirmam esse evento de fluxo gênico.

Esse tipo de introgressão parece ser um evento comum que amplia a variabilidade isoenzimática em *C. lanatus*. Zamir et al.(1984) só encontraram variabilidade isoenzimática em um acesso de *C. lanatus* coletado nas dunas Halutza (Israel) próximo a plantas de *C. colocynthis*. Este acesso, da mesma maneira que os acessos de melancia de cavalo, mostrou introgressão da espécie selvagem *C. colocynthis* em relação a variação isoenzimática e características morfológicas de fruto.

Além disso, são comuns os relatos de cruzamentos naturais entre *C. lanatus* e *C. colocynthis*. Singh (1978) encontrou um desses híbridos na Índia, onde ambas as espécies estão bem representadas nas regiões semi-áridas de Rajastan. *C. lanatus*, *C. colocynthis*, e outra forma intermediária foram encontradas próximas umas das outras. Observações morfológicas e citológicas reforçam a relação de proximidade entre ambas as espécies.. Maheshwari (1978) também relatou uma variedade de forma quase intermediária entre *C. colocynthis* e *C. lanatus*; Fulks et al. (1979) encontraram, no Arizona, híbridos naturais entre *C. colocynthis* e *C. lanatus* cv. “citron”, que foram cultivados adjacientemente durante o ano anterior, e que exibiam também polpa branca, mas com frutos maiores e sem o amargor característico; e Sukhankuliev (1989), durante expedição na antiga União Soviética, encontrou, próxima de plantas raras de *C. colocynthis*, uma melancia selvagem considerada um híbrido ou uma nova espécie.

Foram também relatados na Austrália (Herrington et al., 1986) e no Texas, nos Estados Unidos, como invasoras de culturas como algodão e sorgo em solos arenosos (Smith & Cooley, 1973). Além disso, híbridos artificiais foram obtidos por Shimotsuma (1963).

A variedade sul-africana estudada por Navot & Zamir (1986) que apresenta características intermediárias entre *C. lanatus* e *C. colocynthis* e tratada como *C. lanatus* var. *citroides*, é considerada por estes autores, com base em dados isoenzimáticos, como o verdadeiro progenitor da melancia cultivada, enquanto Fursa & Gavrilyuk (1990), com base em análises imunoquímicas, defendem a hipótese que *Citrullus lanatus* originou de *C. lanatus cordophanus*, também uma variedade semi-cultivada, encontrada no Sudão. Shimotsuma (1960, 1963) e Maheshwari (1978), consideram *C. colocynthis* ancestral da melancia cultivada sendo os alelos característicos da melancia cultivada mutantes envolvidos no processo de domesticação.

Os frutos das espécies selvagens são caracterizadas por polpa de cor branca e sabor extremamente amargo. Esse amargor é causado por alta concentração de uma substância chamada cucurbitacina E glicosídeo (Herrington et al., 1986) e é controlado por um gene (*Bi*) que é dominante sobre o caráter do não-amargor (Robbinson et al., 1976; Navot et al., 1990). O sabor amargo estaria presente também em outras espécies selvagens de Cucurbitaceae (Joubert, 1980).

A cor vermelha da polpa é influenciada por um gene recessivo (red), mas de acordo com Navot et al. (1990), a herança da cor da polpa é um caráter mais complexo, inclusive, envolvendo efeito epistático.

Estas duas características foram as mais importantes no processo de domesticação, havendo uma forte pressão para seleção de cor vermelha da polpa e sabor não amargo. De acordo com Navot et al. (1990), a seleção para mutantes raros que eliminaram o amargor dos frutos e adicionaram cor vermelha foi responsável pelo monomorfismo isoenzimático encontrado nos acessos de melancia cultivada. No entanto, a possibilidade de cruzamento com melancias não cultivadas provoca um fluxo

gênico entre os dois “gene pools”, ampliando a variabilidade isoenzimática, como demonstra os dados apresentados.

O caráter amargor não foi encontrado nos acessos de melancia de cavalo do Nordeste, porém, a polpa branca, típica de espécies selvagens de cucurbitáceas, é característica destas melancias. É possível que os alelos isoenzimáticos característicos de melancia de cavalo estejam ligados ao caráter recessivo de polpa branca porém, o único estudo de grupos de ligação envolvendo locos morfológicos e isoenzimáticos é o de Navot et al. (1990) que mostrou ligação entre Pgm-1 e *Bi* e Gdh-2 e *Bi*. Os sistemas PGM e GDH não foram incluídos nas análises do presente trabalho por terem se mostrado monomórficos nos testes preliminares.

Dentre as três regiões analisadas, a Depressão Sertaneja foi a que apresentou menor variabilidade das melancias estudadas, considerando parâmetros de heterozigosidade, porcentagem de locos polimórficos e número de alelos por locos (Tabela 11). No entanto, esta região foi apontada por Romão (1995) como aquela que apresenta populações com maior diversidade, com base na caracterização morfométrica de, praticamente, os mesmos acessos utilizados neste estudo. Além disso, como discutido anteriormente, os acessos com introgressão de alelos isoenzimáticos de melancia de cavalo não são exatamente os que possuem maiores frequências de frutos de polpa branca.

Isso caracteriza uma não correlação entre marcadores isoenzimáticos e morfológicos. Muito se tem pesquisado e discutido com relação a compreensão do significado do polimorfismo molecular. Na maioria dos estudos a variabilidade molecular parece não estar relacionada com a variação morfológica a nível interespecífico ou intraespecífico (Damerval et al., 1987).

Wilson (1989) contrastou dados isoenzimáticos e morfológicos em análise comparativa de 76 amostras de *Cucurbita* incluindo *C. pepo*, *C. mixta* e *C. moschata*, além de outras espécies não domesticadas e observou que os dados moleculares não refletiram a distinção morfológica mais extrema entre as populações domesticadas e não domesticadas

enquanto que houve um alto nível de congruência de variação nos caracteres fruto/semente/pedúnculo que definiram os “taxa” domesticados.

Outro exemplo, diz respeito à coleção de germoplasma de soja da USDA que foi caracterizada com base na variação de caracteres morfológicos (Perry & McIntosh, 1991) e variação isoenzimática (Perry et al., 1991). Na análise morfológica foram estudados 2.250 acessos de um total de aproximadamente 10.000 acessos, originados de quinze regiões geográficas diferentes, utilizando-se de 17 caracteres vegetativos e de inflorescência, que mostraram diferenças entre regiões na sua distribuição e variação e foram considerados úteis na construção de uma coleção nuclear, mostrando as redundâncias existentes na coleção. A análise isoenzimática foi realizada em 2.236 acessos de todas as quinze regiões, com base em cinco sistemas enzimáticos que exibiram sete locos variáveis com treze alelos. A análise permitiu o agrupamento em cinco grupos, um deles incluindo 10 das cinco regiões, indicando que as frequências alélicas desses locos foram discriminadores pobres da diversidade fenotípica da soja que apresenta mais que 99% de auto-polinização.

Um outro exemplo, envolvendo planta de fecundação cruzada, é dado por Damerval et al. (1987) que compararam cinco linhas de milho baseados em três conjuntos de variáveis: variações qualitativas de proteínas (presença/ausência) revelada por eletroforese em gel de poliacrilamida com focagem isoeletrica (IEF-PAGE), no estágio de plântulas; variações quantitativas nas proteínas (pontos com mais ou menos intensidade) no mesmo estágio fisiológico; e habilidade geral de combinação de quatorze características morfológicas e agronômicas herdáveis, nos estágios adulto e juvenil. Distâncias entre as linhas foram definidas, baseado em variações qualitativas e quantitativas das proteínas. Essas distâncias não foram correlacionadas e não tiveram os mesmos padrões de divergência entre linhas.

Exceções com relação à não correlação da variabilidade isoenzimática e morfológica existem e são aqueles casos em que se detectaram marcadores isoenzimáticos como marcadores de características de interesse; isso ocorre devido a ligação gênica ou participação direta da enzima na expressão do caráter. Segundo Hamrick & Godt (1997),

associações entre aloenzima e caracteres quantitativos existem em algumas espécies enquanto em outras existe pouca ou nenhuma associação.

Reuveni & Bothma (1985) observaram diferenças na isoenzima peroxidase em melões suscetíveis e resistentes a oídio (*Sphaeroteca fuliginea* [Schl. Ex. F. (Poll.)]). Também em melão a atividade de isoenzima peroxidase foi associada a resistência a *Pseudomonas cubensis* (Shimoni et al., 1992).

Provvidenti (1991) encontrou marcador isoenzimático para resistência ao ZYMV (vírus do mosaico amarelo do pepino) e tolerância ao frio em melancia, investigando padrões eletroforéticos de PGI, tendo identificado dois locos, Pgi-1 e Pgi-2, este último com três padrões de bandas diferentes. A banda homodímera rápida (aa) esteve presente em diversas plantas de um acesso resistente PI 482308, o homodímero intermediário (bb) foi notado em plantas das quatro PI resistentes, enquanto que o homodímero lento (cc) foi presente em todas as variedades cultivadas testadas. Foi, então, realizado um 'test cross' para observar a possível ligação entre *zym* e uma das três bandas homodímeras da isoenzima fosfoglucoisomerase (*Pgi-2b*) mas observou-se que os dois genes segregavam independentemente. Os resultados indicaram os homodímeros aa e bb como marcadores para resistência a ZYMV e tolerância ao frio.

Navot et al. (1990) estabeleceram ligação entre amargor nos frutos de melancia, governado pelo gene dominante *Bi* e o marcador isoenzimático Pgm-1, com distância de 11,3 cM. Do mesmo modo, a cor vermelha da polpa, governada por gene recessivo *red* foi encontrada ligada ao marcador isoenzimático *Gdh-2* com distância de 12,8 cM.

Biles et al. (1989) observaram que um cultivar de melancia suscetível a fusariose ("Black Diamond") não apresentava duas bandas em perfil de proteínas totais quando comparada a outras sete cultivares.

Weeden et al. (1984) analisaram dados de resistência ao vírus do mosaico da melancia-2 e de 12 isoenzimas de populações de um cruzamento entre *Cucurbita maxima* X *C. ecuadorensis* e encontraram um gene envolvido na resistência em *C. ecuadorensis* que

está ligado ao loco Aldo-p que controla a aldolase específica dos plastídeos. A maioria das plantas que exibiram um fenótipo Aldo-p heterozigoto foi resistente.

Associações entre isoenzimas e resistência a doenças, causadas por fungos, bactérias ou nematóides, também já foram detectadas em milho (Rakha et al., 1984; Shimoni et al., 1992), soja (Chen et al., 1993; Rennie et al., 1987; Palmer et al., 1992; Kim et al., 1990; Simte & Desgupta, 1987), tomate (Medina Filho, 1983), arroz (Wang et al., 1993), repolho (Qin et al., 1993), cevada (Konish et al., 1989; Feurerstein et al. 1990) e trigo (McMillin et al., 1993, Koebner & Worland, 1989).

Também são encontrados estudos que estabelecem associação entre marcadores isoenzimáticos e caracteres morfológicos em milho (Agnell et al. 1988), em arroz (Cho, 1992; Ishikawa et al., 1991; Benito et al., 1991), em *Solanum* (Jongedijk et al., 1990), em feijão comum (Koenig & Gepts, 1989), em soja (Hedgs & Palmer, 1992), entre outros.

O fato da Região da Depressão Sertaneja ter apresentado menor variabilidade das melancias em relação às demais pode ser atribuído a alguns fatores. Primeiro, deve-se considerar que as coletas realizadas nesta região constituem as primeiras coletas do BAG de Cucurbitáceas, quando ainda não havia uma estratégia de coleta bem definida. Segundo Queiroz et al.¹. as coletas realizadas entre os anos de 1985 e 1987 foram realizadas em uma área de abrangência relativamente pequena, pois envolveu apenas oito comunidades em seis municípios, onde a melancia é um cultivo comercial, não se restringindo a pequenas áreas como, por exemplo, no Distrito de Massaroca, município de Juazeiro. Ainda segundo Queiroz et al. neste distrito se tem verificado substituição das variedades locais pelo cultivar Crimson Sweet. Assim, deve haver nessas áreas influência de melancias comerciais na formação dos genótipos amostrados, o que explicaria a maior proximidade dos parâmetros de diversidade genética dessa região com aqueles apresentados por cultivares melhorados como a Crimson Sweet (Tabela 11).

¹ QUEIROZ, M.A. de.; ARAÚJO, J.P. de; DIAS, R.deC.S. (Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido - EMBRAPA Semi-Árido) Avaliação preliminar de acessos de melancia. I. Variabilidade genética em amostras de melancia coletadas em seis municípios do semi-árido nordestino (Em elaboração)

A Tabela 15 mostra o número de alelos por classe de frequência (f) considerando-se critérios estabelecidos por Santos (1991) e pode-se observar que a região da Depressão Sertaneja apresentou a menor proporção de alelos intermediários e a maior para alelos comuns de melancia que as demais regiões, uma tendência dos cultivares melhorados, como se pode observar no cultivar Crimson Sweet. No entanto, a quantidade de alelos raros é equivalente às demais regiões.

Tabela 15. Distribuição dos alelos presentes em populações de melancia em três classes de frequência para treze locos enzimáticos estudados.

Classe	Populações ¹				
	MA	DS	BA	MC	CS
Raros ($f < 0,1$)	7 (23,3%)	7 (25,9%)	7 (25,0%)	8 (27,6%)	1 (4,8%)
Intermediários ($0,1 < f < 0,6$)	13 (43,3%)	8 (29,6%)	10 (35,7%)	12 (41,4%)	11 (52,4%)
Comuns ($f > 0,6$)	10 (33,3%)	11 (40,7%)	11 (39,3%)	9 (31,0%)	9 (42,9%)
TOTAL	30	26	28	29	21

¹ MA- Médio Sertão Maranhense, DS - Depressão Sertaneja, BA- Região Central da Bahia, MC, melancias de cavalo, CS- cultivar Crimson Sweet.

Pode-se observar também a tendência inversa da melancia de cavalo que, sendo não cultivada, apresenta mais alelos raros e menos alelos comuns.

É possível observar também, com base na Tabela 14, que os acessos da região DS apresentam, principalmente em relação a região BA, uma maior quantidade de frutos de cor vermelho claro a vermelho intenso o que seria um indício que, de fato, essas coletas foram mais seletivas que as subsequentes, realizadas a partir de 1991, já que os materiais

encontrados nesta região também devem ter sofrido introgressão gênica de melancia de cavalo, pois esta ocorre nesta região com alta frequência havendo, inclusive, considerável incidência de frutos de polpa branca. No BAG de Cucurbitáceas, os acessos de melancia de cavalo são todos originários de localidades da Depressão Sertaneja: os municípios baianos de Mirangaba (Cana Brava), Ourolândia (Casa Nova), Tucano, Pilão Arcado, Valente, Catinga do Moura e Vale do Jaguaribe; Ouricuri e Afrânio, em Pernambuco e um acesso do Rio Grande do Norte. Além destes, outros acessos foram coletados na Chapada Diamantina. A ocorrência de melancia de cavalo no Nordeste parece, então, ser ampla, considerando ainda que os 12 acessos em que a introgressão foi observada eram de municípios diferentes

Assim, sugere-se que a variabilidade genética das melancias desta região tenha sido subestimada devido a coletas não sistematizadas e novas coletas deveriam ser realizadas.

Com base nos coeficientes de identidade genética de Nei obtidos (Tabela 16) foi construído um dendrograma (Figura9) onde nota-se que as populações de melancia formadas pelos acessos das regiões Médio Sertão Maranhense (1) e Central da Bahia (3) são as mais semelhantes e se agrupam com as da região da Depressão Sertaneja com bastante identidade (0,98269). As melancias melhoradas, representadas pelo cultivar Crimson Sweet, foram um pouco mais divergente enquanto que o grupo das melancias de cavalo divergiu consideravelmente dos grupos que representam as variedades locais ou etnovariedades do Nordeste. A pequena divergência entre as etnovariedades de melancia e as melhoradas é explicada mais pelo maior nível de monomorfismo das últimas, resultante do processo de melhoramento, que causou maior fixação de alelos e consequentemente menor número de alelos por loco, conforme a Tabela 11, do que por diferenças nos tipos de alelo. Essas diferenças seriam maiores quando comparados os dois “gene pools” (melancias cultivadas e não cultivadas), como discutido anteriormente. Por outro lado, Ferreira et al.(1998) estudaram a divergência genética entre sete populações de melancia com base em caracterização morfológica, incluindo três cultivares (Crimson Sweet, Charleston Gray, e New Hampshire Midget) e quatro etnovariedades do Nordeste, obtendo dois grupos

divergentes, um constituído por Crimson Sweet e outro pelos demais. Neste caso, dois cultivares foram agrupados com etnovariedades do Nordeste.

Tabela 16. Agrupamentos de populações de melancia, formados com base nos valores de identidade genética de Nei (1978) .

Ciclo	Agrupamento	Nível de agrupamento
1	Populações 01 e 03	0.98950
2	Grupo 01 e População 02	0.98269
3	Grupo 02 e População 05	0.95671
4	Grupo 03 e População 04	0.72457

Segundo Esquinas-Alcazar & Gulick (1983) a composição de aloenzimas pode ser uma ferramenta útil na identificação de acessos duplicados. De acordo com os valores de similaridade percebe-se que, com base nos sistemas enzimáticos, as populações das três regiões apresentam agrupamentos próximos, estando pouco diferenciadas das variedades comerciais de melancia, distinguindo-se com maior intensidade apenas do grupo formado pelas melancias de cavalo. Embora as isoenzimas sejam, em algumas circunstâncias, um marcador molecular que discrimina bem genótipos, no caso da melancia isso não tem se verificado. Por exemplo, Geric et al. (1989) não conseguiram nenhum marcador para monitorar a pureza varietal de um híbrido de melancia utilizando os sistemas IDH, MDH, PGD, PGM e PHI (fosfo-hexose isomerase), embora tenham conseguido para híbridos de pepino, tomate e cenoura.. Assim, como as frequências alélicas de isoenzimas foram discriminadores fracos da diversidade fenotípica e os acessos individuais não apresentam grandes divergências que levassem a divergências consideráveis entre regiões, as análises isoenzimáticas não seriam indicadas para formação de coleção nuclear (“core collection”).

Figura 9. Dendrograma resultante da análise de agrupamento a partir de frequências alélicas de 13 locos isoenzimáticos em melancia usando a identidade genética de Nai (1978) e o método UPGMA. (1) Região do médio Sertão Maranhense; (2) Região da Depressão Sertaneja; (3) Região Central da Bahia ; (4) Grupo de melancias de cavalo; (5) Cultivar Crimson Sweet.

5. CONCLUSÕES

1. Das três regiões analisadas, a Depressão Sertaneja é a que possui a menor variabilidade isoenzimática.
2. Os padrões isoenzimáticos apontam para dois “gene pools” distintos, formados por melancias cultivadas e outro por melancias não cultivadas.
3. Ocorre fluxo gênico entre os dois “gene pools”, que é responsável por parte da variabilidade isoenzimática encontrada nas populações de melancia.
4. Quando comparada com a caracterização morfológica, a caracterização isoenzimática do germoplasma de melancia indica padrões de variabilidade diferentes pois subestima a variabilidade genética existente.
5. A caracterização isoenzimática não é recomendada para formação de coleção nuclear (“core collection”) do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas..

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNELL, D.M.; SISCO, P.H.; STUBER, C.W. Linkage relationship between isozyme and morphological markers on chromosome 1L. **Maize Genet. Coop. Newsl.**, v.62, p.102, 1988.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- AMARAL Jr., A.T.; CASALI, V.W.D.; ALFENAS, A.C.; et al. Análise isozímica de acessos de moranga. **Hort. Bras.** V.12, n.1, p.37-44, 1994.
- ANGHEL, I.. Studies on the citology and evolution of the *Citrullus vulgaris*. **Comum. Bot.**, Bucureste, v.11,p.49-55, 1969.
- ARAÚJO, J.P. de. **A cultura da melancia**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1989. 9P. (Boletim técnico, 35)
- ARAÚJO, J.P. de et al. Avaliação de germoplasma de melancia em Petrolina, PE, usando a resistência a oídio (*Sphaeroteca fuliginea*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 27, 1987. Curitiba. **Resumos...** Curitiba: SOB, 1987.

- ARAÚJO, J. P. de, SOUZA, R. de C. Avaliação de germoplasma de melancia com provável resistência mecânica ao vírus WMV-1 em Petrolina (PE). **Hort. Bras.**, Brasília, v.6, n.1, p.45, 1988.
- ARAÚJO, J. P. de et al. Avaliação de linhas de melancia visando resistência ao vírus WMV-1. **Hort. Bras.**, Brasília, v.7, n.1, p.41. 1989.
- ASSIS, J.G. de A. **Estudos genéticos no gênero *Citrullus***. Jaboticabal, 1994. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Universidade Estadual Paulista.
- ASSIS, J.G. de A.; ARAÚJO, S.M.C. de; QUEIROZ, M.A. de. Hibridação entre cultivares e uma população silvestre de melancia. **Hort. Bras.** V.12, n.1, p.10-13. 1994
- ASSIS, J.G. de A. et al. Comparação eletroforética de proteínas totais e isoenzimas de um genótipo subespontâneo e genótipos cultivados e selvagens de *Citrullus*. In: Congresso Nacional de Botânica, Ribeirão Preto. **Anais...**, Ribeirão Preto, 1995
- ÁVILA, A. C. de. Viroses de Cucurbitáceas. **Inf. Agropec.** Belo Horizonte, v.8, n.85, p.52-53, 1982.
- ÁVILA, A. C. et al. Identificação do vírus do mosaico da melancia em melão (*Cucumis melo*) e melancia (*Citrullus lanatus*) na região do Submédio São Francisco. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v.9, n.1, p.113-117, 1984.
- BENITO, C. et al. A map of rye chromosome 2R using isozyme and morphological markers. **Theor. App. Genet.** v.82, n.1, p.112-116. 1991.
- BILES, C. L., MARTYN, R. D. Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.31, n.4, p.499-506, 1993.
- BILES, C. L., MARTYN, R. D., WILSON, H. D. Isozymes and general proteins from various watermelon cultivars and tissue types. **HortScience**, Virginia, v.24, n.5, p.810-812, 1989.

- CAO, W.H.; ZHAO, Y.R. An analysis on isoenzyme and soluble protein in watermelon. **Acta Agriculturae Boreali Sinica**, v.9, n.2, p.64-71, 1994.
- CARVALHO, N.M. de; CASTELLANE, P.D.; VIEIRA, R.D. **Produção de sementes de melancia**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1988. 30p.
- CHEN, Y. et al. Analysis of the peroxidase isozyme and lipase isozyme zymograms in soybean varieties and their F1 hybrids with different degrees of resistance to SMV. **Soybean Science**. v.12, n.1, p.30-36. 1993 *apud* **Resumo em CAB ABSTRACTS on CD-ROM**, 1994.
- CHO, Y.G. Genetics of esterase isozymes and RFLP markers and their linkage with a semi-dwarf gene (sd-1) in rice (*Oryza sativa* L.) **Res, Rep. Rur. Devel. Admin. Biot.**, v.34, p.37-77, 1992. **Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM**, 1993.
- COSTA, C. P. da, PINTO, C. A. B. P. Melhoramento da melancia. In: **Melhoramento de hortaliças**, revisão. Piracicaba: ESALQ/USP, 1977. v.2, cap.8, p.196-209.
- DAMERVAL, C.; HÉBERT, Y.; de VIENNE, D. Is the polymorphism of proteins amounts related to phenotypic variability? A comparison of two-dimensional electrophoresis data with morphological traits in maize. **Theor. Appl. Genet.**, v.74, p.194-202, 1987.
- DIAS, R. de C. S. **Características fisiológicas de *Didymella bryoniae* (Ankersn) Renh e frutos de resistência em melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.)**. Recife, 1993. 103p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- DIAS, R. de C. S., ARAUJO, J. P. de, QUEIROZ, M. A. de. Resistência de populações de *Citrullus* ao oídio (*Sphaeroteca fuliginea*). **Hort. Bras.**, Brasília, v.7, n.1, p.52, 1989.
- ESQUINAS-ALCAZAR, J.T.; GULICK, P.J. **Genetic Resources of Cucurbitaceae**. Rome, IBPGR, 1983. 101p. (IBPGR - 82/84)
- FERREIRA, M.A.J da F.; QUEIROZ, M.A.de; BRAZ, L.T.; CHURATA-MASCA, M.G.C. Divergência genética entre sete populações de melancia (*Citrullus lanatus*), com base

- em características morfológicas. In: Congresso Nacional de Genética, 44, SBG, 1998. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.3, supplement,. 1998.
- FEURERSTEIN, U.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. Linkage of rust resistance genes from wild barley (*Hordeum spontaneum*) with isozyme markers. **Plant Breeding**, v.104, n.4, p.318-324, 1990.
- FILGUEIRA, F. A.R. **Manual de Olericultura**. v.1, 2.ed. São Paulo, Ed. Ceres, 1981. 336p.
- FLORA of Irak**. v. 4, p.191-208 , 1980.
- FULKS, B.K.; SCHEERENS, J.C.; BEMIS, W.P. Natural hybridization of two *Citrullus* species. **Journal of Heredity**, New York, v.70, p.214-215, 1979.
- FURSA, T.B.; GAVRILYUK, I.P. Phylogenetic relations in the genus *Citrullus* Schrad. according to data from immunochemical analysis of the seed protein. **Sbornik Nauchnykh Prikladnoi Botanike, Genetike i Seleksii**, v.133, p.19-26, 1990. /Resumo in **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1990-91.
- GERIC, I., ZLOKOLICA, M.; GERIC, C. Use of isozymes in the seed production of vegetable crops. **Resumo em CAB ABSTRACTS on CD-ROM**. 1989.
- HAMRICK, J.L.; GODT, J.W. Allozyme diversity in cultivated crops. **Crop Science**, v.37, p.26-30, 1997.
- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Ann. Ver. Ecol. Syst.**, v.10, p.173-200, 1979.
- HARA, H. The correct author's name of *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae). **Taxon**, v.18, p.346-347, 1969.
- HASHIZUME, T.; SHIMANAMOTO, I.; HARUSHIMA, Y et al. Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus* (thumb.) Matsum. & Nakai) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Euphytica**, v.90, p.265-273, 1996.

- HEDGS, B.R.; PALMER, R.G. Inheritance of malate dehydrogenase nulls in soybean. **Biochemical Genetics**, v.30, n.9/10. p.491-502, 1992.
- HERRINGTON, M.E.; BROWN, P.J.; CARR, A R.. Introgression as a source of bitterness in watermelon. **HortSc.** v. 21, p.1237-1238 , 1986
- IBGE. (on line) Disponível na Internet via www. URL: <http://www.ibge.gov.br/informações/estat1.htm>. 23 de novembro de 1998.
- ISHIKAWA, R. et al. Linkage analysis of nine isozymes genes on the conventional linkage map in rice. **Jap. J. Genet.**, v.41, n.2, p.265-272, 1991. Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1992.
- JEFFREY, C. Further notes on Cucurbitaceae: III. Some Southern African taxa. **Kew Bulletin**. Londres, v.30. p.475-493. 1975
- JONGEDIJK, E.; van der WOLK, J.M.A.S.A.; SUURS, L.C.J.M. Analysis of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) isozyme variants in diploid tuberous *Solanum*; inheritance and linkage relationship to ds1 (desinapse), y (tuber flesh colour), cr (crumpled) and yc (yellow cotyledon). **Euphytica**, v.45, n.2, p.155-167, 1990.
- JOUBERT, T.G. la G.. Hibridization between a cultivated and a wild south african *Cucumis melo* L. **Agroplantae**, v.12: p.9-11, 1980
- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **Amer. J. Bot.**, v.77, n.5, p.693-712, 1990.
- KIM, Y.H.; HUANG, F.H.; RIGGS, R.D. Resistance of soybean to *Heterodora glycines* and isozyme patterns of peroxidase of soybean roots. **Korean Journal of Plant Pathology**, v.6, n.2, p.285-288, 1990./Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1993.
- KNERR, L.D.; MEGLIC, V.; STAUB, J.E. A fourth malate dehydrogenase (MDH) locus in cucumber. **HortScience**, v.30, n.1, p.118-119, 1995.
- KOEBNER, R.M.D.; WORLAND, A.J. Linkage in wheat of an isozyme marker to resistance to eyespot from VPM1. **Annual Report, AFRC Institute**, 1988. v.24. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1989.

- KOENIG, R.; GEPTS, P. Segregation and linkage of genes for seed proteins, isozymes and morphological traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Heredity**, v.80, n.6, p.455-459, 1989.
- KONISHI, T.; KAWADA, N.; YOSHIDA, H.; et al.. Linkage relationship between two loci for the barley yellow mosaic resistance of Mokusekku 3 and esterase isozymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) **Japanese Journal of Breeding**. v.39, n.4, p.423-430, 1989.
- LALTA PRASAD; GAUTAM, N. C.; SINGH, S. P. Studies on genetic variability and character association in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb) Mansf.) **Vegetable Science**, v.15, n.1, p.86-94, 1988.
- LIMA, M.F.; DIAS, R.C.S.; QUEIROZ, M.A.de Avaliação de setenta e sete acessos de melancia (*Citrullus lanatus*) ao vírus do mosaico da melancia II. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 13, 1998, Feira de Santana, **Anais...** Feira de Santana: SBG (regionais do Nordeste)/UEFS, 1998.
- LLERAS, E. Coleta de recursos genéticos vegetais. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, Jaboticabal, SP, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAV-UNESP/CENARGEN/EMBRAPA, 1988. p.23-42.
- MAHESHWARI, J. K. Nomenclatural revision of some cultivated watermelons. **Indian J. For.**, Dehra Dun, p.179-181. 1978.
- MAKISHIMA, N. Situação das cucurbitáceas no Brasil. **Hort. Bras.**, Brasília, v.9, n.2, p.99-101, 1991.
- MARCON, G. **Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco.** Piracicaba, 1988. 179p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

- McMILLIN, D.E.; JOHNSON, J.W.; ROBERTS, J.J. Linkage between endopeptidase Ed-D1d and a gene conferring leaf rust resistance (Lr19) in wheat. **Crop Science**, v.33, n.6, p.1201-1203. 1993.
- MEDINA FILHO, H.P. **Eletroforese em gel de amido: aplicações em genética e melhoramento de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1983. 15p.
- MOHR, H. C. Watermelon Breeding. In: BASSET, M. I. **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi, 1986. 584p.
- MOORE, G.A.; COLLINS, G.B. New challengers confronting plant breedings. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J (ed.) **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A.. Elsevier, Amsterdam, 1983, 516p.
- NAVOT, N., SARFATTI, M., ZAMIR, D. Linkage relationships of genes affecting bitterness and flesh color in watermelons. **Journal of Heredity**, New York, v.81, n.2, p.162-165. 1990.
- NAVOT, N., ZAMIR, D. Linkage relationships of 19 protein coding genes in watermelon. **Theor. Appl. Genet.**, Berlim, v.72, p.274 -278, 1986.
- NAVOT, N., ZAMIR, D. Isozyme and seed phylogeny of the genus *Citrullus* (*Cucurbitaceae*). **Plant Syst. Evol.**, Vienna, v.156, p.61-67, 1987.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.
- NIJS, A.P.M.; VISSER, D.L. Relationships between African species of the genus *Cucumis* L. estimated by the production, vigour and fertility of F₁ hybrids. **Euphytica**, v.34, p.279-290, 1985.
- ONOFEGHARA, F.A.; KOROMA, S.A. Histochemical localization of alkaline phosphatases and β -glucosidases in Cucurbitaceae. **Ann. Bot.** v.38, p.705-710, 1974a.
- ONOFEGHARA, F.A.; KOROMA, S.A. Histochemical localization of enzymes in the Cucurbitaceae. **Ann. Bot.**, v.38, p.477-483, 1974b.

- PALMER, R.G.; LIM, S.M.; HEDGES, B.R. Testing for linkage between the Rxp locus and nine isozyme loci in soybean. **Crop Science**, v.32, n.3, p.681-683, 1992.
- PERL-TREVES, R.; ZAMIR, D.; NAVOT, N.; GALUN, E. Phylogeny of Cucumis based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. **Theor. Appl. Genet.**, v.71, p.430-436. 1985.
- PERRY, M.C.; McINTOSH, M.S. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: II. Allozyme traits. **Crop Sci.** v.31, p.1150-1155. 1991
- PERRY, M.C.; McINTOSH, M.S.; STONER, A.K.. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: II. Allozyme frequencies. **Crop Sci.** v.31, p.1156-1160. 1991
- PORTER, D.R. Watermelon breeding. **Hilgardia**. v.7, n.15, p.585-624, 1933.
- PROVVIDENTI, R. Inheritance of resistance to the Florida strains of zucchini yellow mosaic virus in watermelon. **HortScience**, v.26, n.24, p.207-208. 1991.
- QIN, Z.W.; LI, Y.H.; WANG, C. et al. Study on the relationship between isozymes and resistance to black rot in cabbage. **Resumos em CAB ABSTRACTS on CD-ROM**. 1993.
- QUEIROZ, M. A. de. Potencial de germoplasma de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Hort. Bras.**, Brasília, v.11, n.1, p.7-9, 1993.
- RAKHA, F.A.; EL-METAINY, A.; SABRAH, N. Peroxidase isozymes in relation to resistance to stalk-rot disease caused by *Fusarium moniliforme* in maize inbred lines. **Maize Gen. Coop. Newsl.**, v.58, n.2, 1984.
- RAMOS, S. R. R., QUEIROZ, M. A. de. Coleta de germoplasma de *Citrullus lanatus*, *Cucumis* sp. e *Lagenaria siceraria*. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 8, 1992, São Luís, **Resumos...** São Luís: SBG (regionais do Nordeste)/UFMA/UEMA. 1992. p.65.
- RAY, D.T., SHERMAN, J.D. Desynaptic chromosome behavior of the *gms* mutant in watermelon. **J. Hered.** v.79, p.397-399. 1988.

- RENNIE, B.D.; BEVERSDORF, W.D.; BUZZELL, R.I. The potencial use of isozymes as genetic markers for disease resistance: na example from the soybean *Phytophthora* system. **Cann. J. Pl. Sc.** V.67, n.1, p.285. 1987.
- REUVENI, R.; BOTHMA, G.C. The relationships between peroxidases activity and resistance to *Sphareoteca fuliginea* in melons. **Phytopath. Z.**, v.114, p.260-267. 1985.
- RHODES, B.B. Genes affecting foliage color in watermelon. **J. Hered.** v.77, p.134-135. 1986.
- RHODES, B.; ZHANG, X. Gene list for watermelon. **Cucurbit Genetics Cooperative Report.** v.18, p.69-84. 1995.
- ROBBINSON, R. et al. Genes of the cucurbitaceae. **HortSc.**, Virginia, v.11, n.6, p.554-568, 1976.
- ROMÃO, R.L.; MAIA, M. de M.D.; QUEIROZ, M.A. de. Estudo do polimorfismo isoenzimático em tecidos somáticos de *Citrullus spp.* In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 8, 1992, São Luís, **Resumos...** São Luís: SBG (regionais do Nordeste)/UFMA/UEMA. 1992. p.70.
- ROMÃO, R.L. **Dinâmica evolutiva e variabilidade em populações de melancia *Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. & Nakai em três regiões do Nordeste brasileiro.** Piracicaba, 1995. 75p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo..
- ROMÃO, R. L.; ASSIS, J. G. de A.; QUEIROZ, M. A. de. Caracterização botânico-agronômica de 14 acessos de melancia do BAG Cucurbitáceas do CPATSA/EMBRAPA. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 40. 1994, Caxambú, **Resumos...** Caxambú: SBG, 1994. p.350.
- SANTOS, M.M. **Polimorfismo isoenzimático de populações subespontâneas de dendê (*Elaeis guienensis* Jacq.) do Estado da Bahia e sua relação genética com seis procedências africanas.** Ribeirão Preto, 1991. 105p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

- SCANDALIOS, J.G. Genetic isozyme variations in *Zea mays*. Honolulu, 1965. 95p. Thesis (Ph.d) - University of Hawaii. 1974.
- SHIMONI, M.; BAR-ZUR, A.; REUVENI, R. The relation between isozymes of β -1,3-glucanase and resistance of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) to *Verticillium dahliae*. **Phytopat. Z.** v.112, p.193-197, 1992.
- SHIMOTSUMA, M. Cytogenetical studies in the genus *Citrullus*, IV. Intra and Interspecific hybrids between *C. colocynthis* Schr. and *C. vulgaris* Schrad. **Jpn. J. Genet.**, Mishima, v.35, n.10. p.303-312, 1960.
- SHIMOTSUMA, M. Cytogenetical studies in the genus *Citrullus*, VII. Inheritance of several characteres in watermelons. **Jpn. J. Breed.**, Mishima, v.13, n.10. p.235 -240. 1963.
- SILVA, F.B.R. e; RICHÉ, G.R.; TONNEAUL, J.P. et al. **Zoneamento agroecológico do Nordeste: diagnóstico do quadro natural e agrossocioeconômico**. Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA/ Recife: EMBRAPA-CNPMS-Coordenadoria Regional Nordeste, 1993. 2v. 1 mapa. (EMBRAPA-CPATSA. Documentos, 80).
- SIMTE, H.C.; DESGUPTA, D.R. Sequential changes in proteins of soybean, inoculated with the root-knot nematode, *Melodogyne incognita*. **Indian Journal of Nematology**, v.17, n.2, p.241-246. 1987.
- SINGH, A.K. Cytogenetics of semi-arids plants. III. A natural interspecific hybrid of Cucurbitaceae (*Citrullus colocynthis* Scharad x *C. vulgaris* Schrad). **Cytologia**. Tokyo, v.43, n.3/4, p.569-574. 1978.
- SITTERLY, W. R. Breeding for disease resistance in cucurbits. **Ann. Rev. Phytopathol.**, Palo Alto, v.10. p.471-490. 1972.
- SMITH,D.T.; COOLEY, A W.. Wild watermelon emergence and control. **Weed Science**. 21:570-573. 1973.

- SOUZA, R. de C., ARAÚJO, J. P. de, QUEIROZ, M. A. de. Avaliação da resistência de acessos de melancia ao oídio (*Sphaeroteca fuliginea*). **Hort. Bras.**, Brasília, v.6, n.1, p.82. 1988.
- SUJHATA, V.S.; SESHADRI, V.S. Taxonomic position of round melon (*Praecitrullus fistulosus*). **Cucurbit Genetic Cooperative**. V.12, p.86-87.1989.
- SUKHANKULIEV, K.K. New site for wild watermelon. **Izvestiya Akademii Nauk Turkmenskoi SSP Seriya Biologicheskii**, v.4, p.60-63, 1989. /Resumo em **CAB Abstract. On CD-ROM**. 1990-91
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics**. Illinois Natural History Survey, 1989. 43p.
- TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B., TORGGLER, S.P. **Isoenzimas**. Variabilidade Genética em Plantas. Ribeirão Preto: SBG. 1995. 186p.
- TRIVEDI, R.N., ROY, R.P. Cytological studies in *Cucumis* and *Citrullus*. **Cytologia**, Tokyo, v.35, p.561-569. 1970,
- VASHISTHA, R.N.; PARTAP, P.S.; PANDITA, M.L. Gene effects of certain quantitative characters in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) **Indian J. Hortic.**, Bangalore, v.41, p.273-276. 1984.
- WANG, M., ZHANG, X. P. Isozyme analysis of hybrids and their parents of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). **Report, Cucurbit Genetic Cooperative**, USA, v.11, p.57, 1988a *apud Plant Breed. Abstr.*, 1989. (ref. nº 059-06194).
- WANG, M., ZHANG, X. P. Evaluation and utilization of the valuable African watermelon germplasm. **Report, Cucurbit Genetic Cooperative**, USA, v.11, p.69, 1988b.

- WANG, Y.; XU, Z.Z.; MU, Y.S.; XU, Y.Y. Preliminary study on the relationships between the activity of peroxidase isoenzymes and resistance to blast in rice. **Resumo em CAB ABSTRACTS on CD-ROM**, 1993.
- WEEDEN, N.F.; ROBINSON, R.W.; IGNART, F. Linkage between an isozyme locus and one of the genes controlling resistance to watermelon mosaic virus 2 in *Cucurbita ecuadorensis*. **Cucurbit Genetic Cooperative Report**, v.7, p.86-87. 1984. **Resumo em CAB ABSTRACTS on CD-ROM**. 1985.
- WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (Ed.) **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. cap.1. p.5-45.
- WILSON, H.D. Discordant patterns of allozyme and morphological variation in Mexican *Cucurbita*. **Systematic Botany**, v.14, n.4, p.612-623. 1989.
- WINTER, B. de. A new species of *Citrullus* (Benincaseae) from Namib Desert, Namibia. **Bothalia**, v.20. n.2, 1990.
- WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**. V.6, p.11-178, 1921.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v.4:.
- ZAMIR, D., NAVOT, N., RUDICH, J. Enzyme polymorphism in *Citrullus lanatus* and *C. colocynthis* in Israel and Sinai. **Pl. Syst. Evol.**, Vienna, v.146, p.163-170. 1984.