**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mapeamento de genes de resistência a três raças de *Podosphaera xanthii* em
meloeiro (*Cucumis melo* L.)**

Ana Carolina Fazza

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2011**

Ana Carolina Fazza
Engenheiro Agrônomo

**Mapeamento de genes de resistência a três raças de *Podosphaera xanthii* em meloeiro
(*Cucumis melo* L.)**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Fazza, Ana Carolina

Mapeamento de genes de resistência a três raças de *Podosphaera xanthii* em meloeiro (*Cucumis melo* L.) / Ana Carolina Fazza. - - Piracicaba, 2011.
70 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Fungos fitopatogênicos 2. Mapeamento genético 3. Marcador molecular 4. Melão
5. Oídio 6. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 635.61
F287m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Ao meu amado marido Cristiano,
à nossa linda filha Maria Luíza,
aos meus pais Edson e Luci e
às minhas queridas irmãs Karina e Cristina,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas inspirações, fé e coragem, para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Ao Professor Luis Eduardo Aranha Camargo, pela orientação, amizade e por permitir que eu usufruísse de seu laboratório desde a Iniciação Científica.

Aos Professores do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos.

À ESALQ e ao Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao CNPq e à CAPES, pela concessão das bolsas de estudos.

À empresa Sakata Seed Sudamerica, em especial à amiga Katia Regiane Brunelli, por disponibilizar os isolados de *Podosphaera xanthii*.

Ao Dr. Leandro José Dallagnol, por realizar os cruzamentos e obter as sementes de meloeiro utilizadas neste trabalho.

Ao doutorando Bruno Marco de Lima, pela análise dos dados da genotipagem das plantas de meloeiro.

À doutoranda Ana Cristina Fazza, pela colaboração no cultivo das plantas de meloeiro, na inoculação e fenotipagem das mesmas, na otimização de PCR para obtenção de marcadores SSR e eletroforese em gel de poliacrilamida.

À Msc. Carolina Cristina Monteiro, pela intensa colaboração no cultivo das plantas de meloeiro, na inoculação e fenotipagem das mesmas, na eletroforese em gel de poliacrilamida e pelo entusiasmo na realização de todo o trabalho.

À mestranda Débora Targino Wassano, que foi uma surpresa bastante positiva, pela colaboração na eletroforese em gel de poliacrilamida.

À graduanda Mariana Abdal, pela colaboração em diversas etapas do trabalho.

Aos amigos Giselle, Fernanda Guedes, Thayne, Fernanda Raquel, Thaís, Jerônimo, Raphael e Mariana Cia por estarem ao meu lado todos os dias sempre me apoiando.

À minha amiga madrinha Juliana Teixeira por me acolher em sua casa no início do doutorado e por me iluminar com seus conhecimentos.

Às amigas da República Poisé por me receberem tão bem quando eu ainda não tinha uma casa!

Ao amigo Marcelo Fideles pelos cafés e discussões científicas, que muito engrandeceram meu entendimento sobre a vida e a ciência.

À minha cantora Pa Moreno, excelente Técnica do nosso laboratório, por me ensinar a lidar com os interesses alheios no ambiente de trabalho, por transformar o laboratório em uma extensão feliz da minha vida, onde há organização e disciplina. Por fim, também por contribuir com a minha maternidade, sem a qual eu não teria me transformado na pessoa que sou hoje e que trabalhou nesta tese!

À minha querida Raphaele, que sempre foi otimista com a realização do trabalho, por organizar o laboratório, regar minhas plantas e etiquetar tudo, tornando o mundo mais fácil de ser encontrado!

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial à Heloísa, Fernanda e Rodolfo por estarem sempre disponíveis quando eu solicitava.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho sem nem mesmo perceberem.

*“...Cada época é assim marcada pelo cunho da virtude ou do vício
que a devem salvar ou perder.*

*A virtude da vossa geração é a atividade intelectual, seu vício é a indiferença moral.
Digo somente atividade, porque o gênio se eleva de súbito e descobre de relance os horizontes
que a multidão só verá depois dele, enquanto a atividade é a reunião dos esforços de todos,
para atingir um alvo menos brilhante, mas que prova a elevação intelectual de uma época.*

*Submetei-vos ao impulso que vimos dar aos vossos Espíritos.
Obedecei à grande lei do progresso, que é a palavra da vossa geração.
Infeliz do Espírito preguiçoso, daquele que fecha o seu entendimento!...”*

*Lázaro, 1863
O Evangelho Segundo o Espiritismo*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A cultura do meloeiro.....	15
1.2 Oídio em meloeiro.....	15
1.3 Resistência a <i>Podosphaera xanthii</i> em PI 414723.....	16
1.4 Marcadores moleculares e mapeamento genético.....	18
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Material e métodos.....	21
2.1.1 Material vegetal.....	21
2.1.2 Isolados de oídio.....	21
2.1.3 Avaliação da resistência a <i>P. xanthii</i>	23
2.1.4 Extração de DNA.....	24
2.1.5 Marcadores microssatélites.....	25
2.1.6 Marcadores AFLP.....	26
2.1.7 Marcadores RGA.....	27
2.1.8 Construção do mapa de ligação.....	32
2.2 Resultados.....	34
2.2.1 Análise da resistência a <i>P. xanthii</i>	34
2.2.2 Genotipagem com marcadores microssatélites.....	41
2.2.3 Genotipagem com marcadores AFLP.....	42
2.2.4 Genotipagem com marcadores RGA.....	43
2.2.5 Construção do mapa de ligação e mapeamento de genes de resistência a <i>P. xanthii</i>	44
2.3 Discussão.....	51
2.3.1 Avaliação da resistência a <i>P. xanthii</i>	51
2.3.2 Mapeamento genético em meloeiro.....	52
3 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Mapeamento de genes de resistência a três raças de *Podosphaera xanthii* em meloeiro (*Cucumis melo* L.)

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma cultura de grande importância econômica para o comércio de exportação brasileiro e é cultivada principalmente na região Nordeste. A produção da cultura pode ser limitada por uma doença das partes aéreas, denominada oídio, sendo no Brasil, causada pelo fungo *Podosphaera xanthii*. Este patógeno apresenta diversas raças definidas com base na reação de um conjunto de cultivares diferenciadoras de meloeiro. Dentre estes genótipos, o acesso PI 414723 é resistente à maior parte das raças e a linhagem Védrrantais é suscetível. O presente trabalho teve como objetivos: (i) estudar a herança da resistência às raças 1, 3 e 5 de *P. xanthii* em indivíduos da geração F₂ do cruzamento PI 414723 x Védrrantais e (ii) mapear os genes de resistência a estas raças com base em marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), de repetições de sequências simples (SSR) e análogos de genes de resistência (RGA) também nesta população. A herança da resistência foi analisada em 87 indivíduos F₂ cultivados em condições de casa-de-vegetação. As três raças foram inoculadas em seis regiões equidistantes da nervura central em quatro folhas de cada planta. Plantas foram classificadas como resistentes ou suscetíveis com base em avaliações visuais do desenvolvimento do fungo nas folhas. As plantas foram classificadas como suscetíveis quando houve reprodução abundante de conídios e resistentes quando a reprodução foi inexistente ou escassa. Frequências de indivíduos resistentes e suscetíveis indicaram que a resistência às três raças é controlada por um gene dominante de efeito maior. Um mapa genético foi construído compreendendo 1.469 cM, consistindo de 207 marcadores (139 AFLP, 47 SSR, 18 RGA e três fenotípicos) e com uma distância média de 7,4 cM entre marcadores distribuídos em 12 grupos de ligação. Análises de co-segregação com marcadores indicaram que os genes de resistência estão localizados no grupo de ligação II. Em adição a isto, as análises indicaram ligação completa entre os genes de resistência às raças 1 e 5, sendo este gene denominado *Pm-x1.5*. Já o gene de resistência à raça 3 (*Pm-x3*) foi localizado a 5,1 cM dos demais. Um marcador AFLP (H35M75_156) foi localizado entre os dois genes a 1,3 cM de *Pm-x1.5* e 3,8 cM de *Pm-x3*. Este é o primeiro relato da localização genética de genes de resistência às raças 3 e 5 em PI 414723 e também o primeiro relato do mapeamento de marcadores RGA gerados pela técnica TRAP em meloeiro.

Palavras-chave: Resistência genética; Marcador molecular; Mapeamento genético; Oídio

ABSTRACT

Mapping of resistance genes to three races of *Podosphaera xanthii* in melon (*Cucumis melo* L.)

Melon (*Cucumis melo* L.) is a crop of great economic importance for the export trade in Brazil and is cultivated mainly in the Northeast. Crop yield can be affected by a disease of the aerial parts, called powdery mildew that in Brazil is caused by the fungus *Podosphaera xanthii*. This pathogen has several races characterized based on the reaction of a set of differential melon cultivars. Among these genotypes, the plant introgression PI 414723 is resistant to most races and the breeding line Védraçais is susceptible. This study aimed to: (i) study the inheritance of resistance to races 1, 3 and 5 of *P. xanthii* in the F₂ generation from the cross PI 414723 x Védraçais, and (ii) map resistance genes to these races in this same population based on amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) and resistance gene analog (RGA) markers. The inheritance of resistance was analyzed on 87 F₂ individuals grown under greenhouse conditions. The three races were inoculated simultaneously on four leaves of each plant. Plants were classified as resistant or susceptible based on visual assessments of fungal growth on the leaves. Plants were considered susceptible when there was abundant production of conidia and resistant when the production was scarce or non-existent. The frequencies of resistant and susceptible individuals indicated that resistance to all three races is controlled by a dominant major gene. A genetic map was constructed comprising 1469 cM, consisting of 207 markers (139 AFLP, 47 SSR, 18 RGA, and three phenotypic) with an average distance of 7.4 cM between markers distributed in 12 linkage groups. Co-segregation analysis with markers indicated that the resistance genes are located on linkage group II. Moreover, the analysis indicated complete linkage between resistance to races 1 and 5, and this gene was denominated *Pm-x1.5*. The gene for resistance to race 3 (*Pm-x3*) was located at 5.1 cM from *Pm-x1.5*. An AFLP marker (H35M75_156) was located between the two genes at 1.3 cM from *Pm-x1.5* and 3.8 cM from *Pm-x3*. These is the first report on the location of resistance genes to races 3 and 5 in PI 414723, and also the first report of RGA markers mapping using the TRAP technique in melon.

Keywords: Disease resistance; Molecular marker; Genetic mapping; Powdery mildew

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura do meloeiro

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família Cucurbitaceae, sendo cultivado tanto em regiões tropicais quanto temperadas num ciclo de 55 a 80 dias. É uma espécie autógama diplóide ($2n = 2x = 24$) com um tamanho estimado do genoma de 450 Mb (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991) e uma distância física média de 380 kb correspondente a 1 cM de distância genética (MORALES et al., 2005). *C. melo* é provavelmente originário da África e Ásia (KERJE; GRUM, 2000), apresentando frutos com ampla variação morfológica, fisiológica e bioquímica (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). O grau de variabilidade fenotípica reflete a alta variabilidade genética da espécie, como demonstrado com o emprego de marcadores moleculares (AKASHI et al., 2002; LÓPEZ-SESÉ et al., 2002; LUAN; DELANNAY; STAUB, 2008; SOLTANI et al., 2010; TZITZIKAS et al., 2009; TZURI et al., 2005-2006). O germoplasma africano, indiano e oriental apresenta maior variabilidade genética (AKASHI et al., 2002; DHILLON et al., 2007). Esse germoplasma também tem sido empregado em programas de melhoramento na busca por genes de resistência (BOISSOT et al., 2010; LIU et al., 2010; ZVIRIN et al., 2010). No Brasil, a principal região de cultivo é a Nordeste, onde há temperaturas elevadas e altos níveis de insolação que favorecem o desenvolvimento de frutos com alto teor de sólidos solúveis (SANTOS, 2004). Por oito anos consecutivos, entre os anos de 2001 e 2008, a produção de melão nesta região correspondeu a 95% do total nacional que, em 2009, resultou na exportação de 184 mil toneladas do fruto *in natura*, gerando divisas na ordem de US\$ 122 milhões de dólares (FNP Consultoria & Agroinformativos, 2011).

1.2 Oídio em meloeiro

Dentre os fatores limitantes à produção de melão está o oídio, uma doença foliar causada pelo fungo *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun & N. Shishkoff (SHISHKOFF, 2000) no Brasil (REIS; BUSO, 2004). Segundo McCreight (2006), 28 prováveis raças de *P. xanthii* podem ser identificadas de acordo com a reação de 31 genótipos de meloeiro, sendo que os genótipos mais empregados na caracterização destas são Iran H, Topmark, Védraçais, PMR 45, PMR 5,

PMR 6, WMR 29, Edisto 47, PI 414723, MR-1 e PI 124112. No Brasil, a raça 1 foi relatada primeiramente em 1985 (REIFSCHNEIDER et al., 1985) e, posteriormente, a raça 2-francesa (KOBORI et al., 2004). O aparecimento de novas raças no país implica no desenvolvimento de híbridos que sejam resistentes às raças mais comuns mundialmente, já que até o momento os principais híbridos aqui comercializados são resistentes somente à raça 1. Para avaliar a resistência de plantas de cucurbitáceas ao oídio, ensaios com discos foliares são bastante empregados, pois o uso de um sistema de inoculação onde as amostras são mantidas sob condições padronizadas reduz a variação experimental (COHEN, 1993; BERTRAND, 2002; EPINAT; PITRAT, BERTRAND, 1993; COHEN; BURGER; KATZIR, 2004; KRÍSTKOVÁ et al., 2004; KUZUYA et al., 2006; LONGZHOU et al., 2008; PERCHEPIED et al., 2005; PITRAT; BESOMBES, 2008). A inoculação de mais de uma raça na mesma folha também é um procedimento prático, pois reduz as perdas e escapes ocorridos com os discos foliares e fornece a informação da reação de uma planta a mais de uma raça de *P. xanthii* (YUSTE-LISBONA et al., 2010). Dentre os genótipos de meloeiro empregados na caracterização de raças de *P. xanthii* podem ser citados como resistentes a um maior número de raças as linhagens PI 414723, PI 124112, PI 124111, PMR 5 e PMR 6 (JAHN; MUNGER; McCREIGHT, 2002; PITRAT et al., 1996).

1.3 Resistência a *Podosphaera xanthii* em PI 414723

O acesso PI 414723 pertence ao Grupo Momordica (*Cucumis melo* subsp. *agrestis*), provém da Índia e é interessante do ponto de vista do melhoramento devido à sua resistência a alguns insetos e doenças, dentre estas o oídio. Este genótipo pertence ao banco de germoplasma dos Estados Unidos (“National Plant Germplasm System”) e está depositado na unidade “North Central Regional PI Station”, no estado de Iowa. É derivado do acesso PI 371795, também de origem indiana (Utthar Pradesh). Numa infestação de afídeos, uma única planta desta introdução ficou livre de insetos e foi autopolinizada, gerando a progênie 90234 que se mostrou resistente a afídeos. Sementes de 16 plantas foram misturadas dando origem a PI 414723 (S_1Sib_1) (McCREIGHT; BOHN; KISHABA, 1992). Em PI 414723 há cinco genes de resistência descritos. Inicialmente, McCreight (1984) descreveu um gene recessivo para resistência à raça 1 e McCreight et al. (1987) identificaram dois genes (símbolos *c* e *d*) recessivos para resistência à

raça 2-francesa, epistáticos entre si, sendo que a presença de um alelo dominante em qualquer um dos dois locos confere suscetibilidade. Pitrat (1991) identificou um gene dominante (*Pm-x*) para resistência à raça 2-francesa, posicionado no mesmo grupo de ligação que o marcador fenotípico “*halo clorótico*” cotiledonar (*h*) e os genes andromonóico (*a*) e o que confere resistência ao vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zym-1*). Posteriormente, *Pm-x* foi posicionado no grupo de ligação II por Périn et al. (2002). De acordo com Gilbert et al. (1994), o gene de resistência ao vírus do mosaico da melancia (*Wmv*) provavelmente é ligado a *Zym-1*, sendo também alocado no grupo II (PITRAT, 2006). Finalmente, Anagnostou, Jahn e Perl-Treves (2000) identificaram um gene dominante que confere resistência à raça 1 com base numa população F₂ e famílias F₃ do cruzamento PI 414723 x Topmark, sendo denominado de *Pm-7* conforme sugerido por Pitrat (2006). Este dado é contrastante ao de McCreight (1984), já que este estudou a herança da resistência neste mesmo cruzamento e relatou controle recessivo, o que levou Anagnostou, Jahn e Perl-Treves (2000) à hipótese de heterogeneidade genética de PI 414723.

A exemplo de PI 414723, a resistência nos demais genótipos é predominantemente monogênica e dominante (KENIGSBUCH; COHEN, 1992; EPINAT; PITRAT; BERTRAND, 1993), embora existam também relatos de genes recessivos e modificadores (BOHN; WHITAKER, 1964; HARWOOD; MARKARIAN, 1968a; YUSTE-LISBONA et al., 2010). Até o momento, 12 genes de resistência a diversas raças de *P. xanthii* foram descritos (*Pm-1*, *Pm-2*, *Pm-3*, *Pm-4*, *Pm-5*, *Pm-6*, *Pm-7*, *Pm-8*, *Pm-w*, *Pm-x*, *Pm-y* e *Pm-z*) (PITRAT, 2006; LIU et al., 2010) e, dentre estes, quatro foram mapeados: *Pm-1* de PI 78374 (raça 1) no grupo de ligação (GL) IX (TEIXEIRA; SILVA-BARRETO; CAMARGO, 2008); *Pm-w* de WMR 29 (raça 2) no GL V; *Pm-x* de PI 414723 (raça 2) no GL II e *Pm-y* de VA 435 (raça 2) no GL XII (PITRAT, 1991; PÉRIN et al., 2002). Locos quantitativos (QTL) também foram mapeados. Perchepped et al. (2005) mapearam dois no cruzamento PI 124112 (resistente) x Védraçais (suscetível), identificando o QTL *PmV.1* para resistência à raça 3 localizado no GL V e *PmXII.1* para resistência à raça 5 no GL XII. Os autores também notaram que a resistência às raças 1 e 2 foi controlada pela interação epistática entre estes QTL. Outros dois QTL que conferem resistência às raças N1 e 1 foram detectados por Fukino et al. (2008) no cruzamento AR 5 (resistente) x ‘Earl’s Favourite (Harukei 3)’ (suscetível), sendo que em certas condições o QTL localizado no grupo II conferiu resistência às duas raças e pode ser o mesmo loco ou estar ligado a *Pm-x* de PI 414723, ao passo que o QTL localizado no grupo XII está relacionado à resistência à raça 1 e

pode ser o mesmo loco ou estar ligado a *Pm-y* de VA 435 (PITRAT, 1991; PÉRIN et al., 2002) ou a *PmXII.I* de PI 124112 (PERCHEPIED et al., 2005). Recentemente, Yuste-Lisbona et al. (2011) identificaram um QTL (*Pm-R*) para resistência às raças 1, 2 e 5 em TGR-1551 no grupo de ligação V, podendo também ser o mesmo ou estar ligado a *Pm-w* ou a *PmV.I*.

1.4 Marcadores moleculares e mapeamento genético

O melhoramento para resistência a doenças é um dos principais objetivos de qualquer programa de melhoramento vegetal, tarefa que pode ser facilitada pela seleção assistida por marcadores moleculares ligados a genes de resistência. Diversos mapas moleculares já foram publicados em meloeiro, diferindo quanto ao nível de saturação do genoma, aos genótipos dos genitores das populações segregantes e às características mapeadas (BAUDRACCO-ARNAS; PITRAT, 1996; BROTMAN et al., 2000; DANIN-POLEG et al., 2002; FUKINO et al., 2008; GONZALO et al., 2005; OLIVER et al., 2001; PERCHEPIED et al., 2005; PÉRIN et al., 2002; WANG et al., 1997). Diferentes tipos de marcadores foram empregados nestes mapas, sendo o AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) o mais utilizado por gerar muitos polimorfismos por reação de PCR, fato este que facilita a saturação de mapas genéticos pela identificação de muitos locos. No entanto, a eficiência deste marcador em identificar genes pode ser baixa, exatamente porque este método amplifica diversas sequências do genoma que, em sua maioria, não se referem a genes. Além disso, por ser um marcador majoritariamente dominante não é possível distinguir indivíduos heterozigotos de um dos genótipos homozigóticos, o que o torna parcialmente informativo, sendo desvantajoso para o mapeamento genético sem, no entanto, inviabilizar seu uso (JIANG; ZENG, 1997; MIKLAS et al., 2006; XIE; XU, 1999).

Marcadores microssatélites, também chamados de repetições de sequências simples (SSR), estão disponíveis em melão e são altamente polimórficos, codominantes e transferíveis entre cruzamentos, o que faz com que sejam utilizados como pontos de referência entre grupos de ligação, facilitando assim a fusão de mapas de ligação obtidos a partir de cruzamentos distintos (FUKINO et al., 2008; GONZALO et al., 2005). Estes marcadores compreendem um número variável de repetições em sequência, são marcadores genéticos loco-específicos altamente informativos e dispersos por todo o genoma vegetal e animal, ocorrendo tanto em regiões não

codificadoras como codificadoras (MIKLAS et al., 2006). Sua variação genética pode ser analisada com base na reação polimerásica em cadeia, usando oligonucleotídeos específicos às suas regiões flanqueadoras. Esses marcadores são recomendados para a construção de mapas genéticos altamente saturados em eucariotos (DANIN-POLEG et al., 2000). No caso do melão e outras cucurbitáceas, por exemplo, um alto nível de polimorfismo pode ser detectado com estes marcadores (CHIBA et al., 2003; DANIN-POLEG et al., 2001; KATZIR et al., 1996; RITSCHER et al., 2004).

Marcadores análogos a genes de resistência (RGA – resistance gene analogs) são marcadores gerados por PCR a partir de oligonucleotídeos que hibridizam em motivos de sequências conservadas entre genes de resistência qualitativa (genes R) e, por este motivo, originam marcas enriquecidas para estas classes de genes (MIKLAS et al., 2006). De acordo com Lalli et al. (2005), há cinco classes de genes de resistência, sendo que a classe mais abundante é a que codifica proteínas que contêm o domínio NBS-LRR (sítio de nucleotídeo ligante e região rica em leucina). A classe NBS-LRR é dividida em duas subclasses, a TIR-NBS-LRR e a não-TIR-NBS-LRR. As quatro classes restantes codificam proteínas de gene R com domínio LRR extracelular com receptor transmembrana e domínio quinase intracelular; proteínas transmembranas com domínio LRR extracelular, porém sem domínio quinase; proteínas de membrana com domínio *coiled-coil* e proteínas citoplasmáticas com domínio quinase serina/treonina.

Marcadores RGA podem ser amplificados via PCR pela técnica TRAP (polimorfismo amplificado de região marcada). Segundo esta técnica, fragmentos são amplificados por um oligonucleotídeo fixo desenhado a partir de uma sequência conhecida e um segundo a partir de uma sequência arbitrária (HU; VICK, 2003). Segundo Miklas et al. (2006), a técnica pode gerar marcadores tanto dominantes como codominantes. Não há relatos de marcadores TRAP em meloeiro. No entanto, oligonucleotídeos fixos podem ser concebidos a partir da análise *in silico* de sequências de nucleotídeos que codifiquem proteínas da família NBS-LRR, por exemplo. Sequências de nucleotídeos de fragmentos genômicos de meloeiro homólogos a genes R foram depositadas no GenBank com os números de acesso AF354504-AF354517 por Brotman et al. (2002) e podem servir para gerar oligonucleotídeos fixos para obter marcadores TRAP.

No caso de estudos de genes de resistência a doenças em melão, a família NBS-LRR é, em geral, a mais explorada como fonte de marcadores RGA, mas homólogos do gene *Pto*-quinase

também foram clonados (BROTMAN et al., 2000). Em geral, RGAs ocorrem em clusters e mapeiam próximos a genes R em melão, como observado por Brotman et al. (2002) ao estudarem sua segregação numa população de linhagens recombinantes derivada do cruzamento PI 414723 x Védrantais. Esta população foi avaliada para resistência ao vírus do mosaico amarelo da abobrinha (gene *Zym*), resistência ao vírus da mancha anelar do mamoeiro (gene *Prv*) e para os genes *Vat* (resistência a *Aphis gossypii* e à transmissão de diversos vírus por este afídeo), *Fom-1* (resistência a *Fusarium oxysporum melonis* raças 0 e 2) e *Fom-2* (resistência a *Fusarium oxysporum melonis* raças 0 e 1). De um total de onze RGAs mapeados por Brotman et al. (2002), cinco estavam ligados a genes R envolvidos em respostas a afídeo, vírus e fungos. O loco *Vat* parece ser parte de um agrupamento no grupo de ligação V que compreende o gene de resistência a afídeo, o gene *Pm-w* de resistência a *P. xanthii* e três homólogos NBS-LRR (clones NBS2, NBS46-7 e NBS5) (PITRAT, 1991; PÉRIN et al., 2002; BROTMAN et al., 2002).

Como se depreende do exposto acima, mapas genéticos constituem uma ferramenta imprescindível para estudos detalhados do genoma, onde se incluem análises de QTL, clonagem de sequências de DNA e estudos genômicos comparativos entre espécies relacionadas. A introdução PI 414723 apresenta alelos que conferem resistência a diferentes raças de *P. xanthii*, enquanto a cultivar Védrantais é suscetível à maioria das raças descritas, com exceção da raça 0. A partir dessas informações, no presente trabalho foi analisada a resistência a três raças de *P. xanthii* a partir de dados fenotípicos e genotípicos de indivíduos da geração F₂ do cruzamento PI 414723 x Védrantais. Um mapa genético de melão também foi construído co-localizando genes de resistência às três raças de *P. xanthii* com marcadores AFLP, SSR e RGA, totalizando 207 marcadores. Dentre os quais, apresentam-se como novos, os marcadores RGA gerados pela técnica TRAP. De igual forma, este é o primeiro relato do posicionamento de genes de resistência às raças 3 e 5 em grupos de ligação.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Material vegetal

Uma população F_2 desenvolvida pelo Laboratório de Genética Molecular da ESALQ/USP em 2008 foi gerada através do cruzamento entre PI 414723, pertencente ao Grupo *Momordica* (*Cucumis melo* subsp. *agrestis*) e Védraçais, pertencente ao Grupo *Cantaloupensis*, tipo Charentais (*Cucumis melo* subsp. *melon*). PI 414723 é uma introdução indiana, resistente às raças 0, 1, 2-francesa, 3, 4 e 5 de *P. xanthii* e suscetível à raça 2-americana. Védraçais é uma linhagem comercial francesa, suscetível às raças 1, 2-francesa, 2-americana, 3, 4 e 5 e resistente à raça 0 (JAHN; MUNGER, McCREIGHT, 2002). Cinco indivíduos F_1 (LGM-Ved11, LGM-Ved12, LGM-Ved13, LGM-Ved14 e LGM-Ved15) foram autofecundados, gerando cinco frutos de onde foram obtidas as sementes que constituíram cinco diferentes populações F_2 . Estes indivíduos F_1 foram genotipados com 14 marcadores microssatélites para confirmação de sua ascendência (dados não apresentados). Um fruto de LGM-Ved12 foi escolhido como fonte de sementes que constituíram a população F_2 . Para o estudo de herança da resistência de meloeiro às raças de *P. xanthii* e mapeamento genético foram cultivadas 87 plantas de indivíduos da geração F_2 . Como controles para a fenotipagem foram cultivadas três plantas de cada genitor e três plantas de indivíduos da geração F_1 .

2.1.2 Isolados de oídio

Foram utilizados três isolados de *Podosphaera xanthii* coletados pela empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. (SDA) entre os anos de 2004-2006. Os isolados são provenientes de campos de produção de melão e abobrinha situados nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará e São Paulo (Tabela 1). A pureza de cada isolado foi garantida pela inoculação periódica em cotilédones da cultivar Safira de pepino, acondicionados em placas de petri (90 mm de diâmetro) e contendo papel de filtro umedecido e esterilizado. Para tanto, plântulas de Safira foram cultivadas em bandejas contendo vermiculita em uma incubadora livre de oídio com fotoperíodo

ajustado para 12h luz/12 h escuro por aproximadamente 7 dias. Os cotilédones foram coletados e desinfestados em álcool 70 % (30 segundos), hipoclorito de sódio 0,3 % (30 segundos) e enxaguados em água destilada estéril por duas vezes. A inoculação de cada cotilédone foi realizada com auxílio de um pincel de cílio humano previamente desinfestado com álcool 70 % (NICOT; BARDIN, DIK, 2002). Após a inoculação, os cotilédones foram incubados em uma câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h luz/12 h escuro e temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 15 dias, quando o processo foi repetido para a manutenção de cada isolado e para a obtenção de inóculo para as etapas subsequentes do trabalho.

Os isolados foram classificados em raças com base na reação de genótipos diferenciadores de meloeiro conforme os sistemas de classificação de Jahn, Munger e McCreight (2002), McCreight (2006) e Thomas et al. (1984), que são complementares entre si (Tabela 2). Os genótipos de meloeiro empregados foram: Hale's Best Jumbo, Védrantais, PMR 45, PMR 5, Edisto 47, PI 414723, PI 124112 e WMR 29. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 500 ml contendo substrato Plantmax Hortaliças HA Eucatex[®] e mantidos em prateleiras sob fotoperíodo de 12 h luz/ 12 h escuro com lâmpadas fluorescentes de 20 W Osram Universal luz do dia especial. Discos foliares de 15 mm de diâmetro foram retirados da terceira e quarta folhas totalmente expandidas de cada planta (aproximadamente 30 dias após a semeadura) e foram dispostos em placas de petri conforme descrito anteriormente. De acordo com a metodologia proposta por Cohen (1993), a inoculação foi realizada pela aspersão de uma suspensão de conídios (5×10^4 conídios/ml) em água e 0,01% Tween 20. Para que fosse mantida a viabilidade dos conídios, o tempo máximo entre o preparo de inóculo e a inoculação foi de 15 minutos. Como controle, a aspersão foi realizada com água deionizada estéril. Os discos foliares foram incubados em câmara de germinação sob temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h luz/ 12 h escuro. Cada placa de petri continha um disco foliar de cada um dos oito genótipos diferenciadores. Cada isolado foi inoculado nos discos foliares em doze repetições (doze placas de petri).

A avaliação foi feita em cada disco foliar dez dias após a inoculação, observando-se a presença ou ausência de colônias do fungo. As plantas foram agrupadas em duas categorias para caracterizar as raças: genótipos sem reprodução do fungo foram considerados resistentes e genótipos com reprodução foram considerados suscetíveis.

Tabela 1 – Descrição dos isolados de oídio usados nas avaliações

Isolado	Espécie	Raça	Local de procedência	Cultura	Ano de coleta
Px04	<i>P. xanthii</i>	1	Ibiúna/SP	abobrinha	Outubro-2004
Px08	<i>P. xanthii</i>	3	Quixerê/CE	melão	Set-2006
Px02	<i>P. xanthii</i>	5	Mossoró/RN	melão	Set-2004

Tabela 2 - Reação de genótipos de meloeiro quanto às raças de *P. xanthii*

Genótipo	Raça 0	Raça 1	Raça 2		Raça 3	Raça 4	Raça 5
			americana	francesa			
Hale's Best Jumbo ^c	nt	s	s	s	s	nt	nt
Védrantais ^a	R	s	s	s	s	s	s
PMR 45 ^a	R	R	s	s	s	s	s
WMR 29 ^a	R	R	H	R	nt	s	s
Edisto 47 ^a	R	R	s	R	s	R	s
PMR 5 ^{a,b}	R	R	R	R	s	R	R
PI 414723 ^a	R	R	s	R	R	R	R
PI 124112 ^a	R	R	R	R	R	R	R

^a Dados de Jahn; Munger e McCreight (2002); ^b Dados de McCreight (2006); ^c Thomas et al. (1984)

s = suscetível; R = resistente; nt = não testado; H = heterogêneo

2.1.3 Avaliação da resistência a *P. xanthii*

Oitenta e sete plantas da população F₂, três plantas de PI 414723, três plantas de Védrantais e três plantas F₁ foram cultivadas em vasos plásticos de 500 ml contendo substrato Plantmax Hortaliças HA Eucatex[®], em uma casa-de-vegetação sob temperatura de 25±2°C no campo experimental do Departamento de Fitopatologia da USP/ESALQ – Piracicaba - SP. Estas plantas foram mantidas nestas condições por 50 dias, de 13 de abril de 2010 a 02 de junho de 2010. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento representado por uma planta. Isolados das raças 1, 3 e 5 foram usados para avaliar a resistência dos genitores e de indivíduos das gerações F₁ e F₂, empregando-se o método de inoculação proposto por Yuste-Lisbona et al. (2010), no qual os três isolados foram inoculados numa mesma folha cada qual em dois locais equidistantes da nervura foliar central, denominados aqui lado esquerdo e lado direito da folha. Foram inoculadas a primeira, terceira, quarta e quinta folhas totalmente expandidas e presentes no ramo principal de cada planta. A inoculação ocorreu aos 29 dias após a semeadura (DAS), no caso da primeira folha, e aos 34 DAS, no caso das demais. As

folhas foram avaliadas individualmente duas vezes, uma aos 42 DAS e outra aos 50 DAS e o resultado que se repetiu no maior número de folhas foi o considerado para a planta. Foi considerada suscetível a planta na qual houve reprodução do fungo, com presença moderada a abundante de conídios no local da inoculação e foi considerada resistente a planta na qual não houve a reprodução do fungo ou que apresentou conidiação irrisória (YUSTE-LISBONA et al., 2010). O teste χ^2 foi usado para analisar os dados da fenotipagem de indivíduos F_2 a fim de verificar se a proporção de indivíduos resistentes:suscetíveis para cada raça estava de acordo com a esperada 3:1 para o caso de resistência conferida por um gene dominante de efeito maior. O mesmo teste foi usado com os dados de fenótipos dos indivíduos F_2 para verificar a ocorrência de segregação independente entre os genes de resistência. Os desvios foram considerados significativos assumindo um nível de probabilidade de $p < 0,01$.

2.1.4 Extração de DNA

O DNA genômico das plantas foi extraído pelo método CTAB (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), com mínimas modificações. Brevemente, amostras pulverizadas de tecido foliar foram adicionadas de tampão de extração (1 % CTAB; 50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,7 M NaCl; 0,1 % β - 2 - mercaptoetanol) e a suspensão resultante extraída consecutivamente em fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e em clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A precipitação do DNA ocorreu em etanol absoluto a -20°C por 30 minutos. Para a limpeza do *pellet*, em cada tubo foram adicionados 500 μL de 1 M NaCl, o mesmo foi incubado a 65°C por 10 minutos em banho seco. Após este período, os tubos foram incubados a 4°C por 45 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C . Ao sobrenadante foram adicionados 350 μL de isopropanol. Os *pellets* foram lavados duas vezes com etanol 70% e em seguida em 1 mL de etanol absoluto durante 2 a 3 minutos. O DNA foi seco, ressuspendido em 30 μL de tampão tris-EDTA com RNase (10 $\mu\text{g/ml}$) e incubado a 37°C por uma hora para a eliminação do RNA. A quantificação do DNA foi realizada com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

2.1.5 Marcadores microssatélites

Cinquenta e dois marcadores microssatélites (SSR – simple sequence repeats) polimórficos entre os genitores (Tabela 3) foram selecionados a partir dos mapas genéticos descritos por Fukino et al. (2008) e por Gonzalo et al. (2005). O critério utilizado para a seleção dos marcadores foi o posicionamento dos mesmos nos 12 grupos de ligação, de modo que sua distribuição entre os grupos fosse homogênea. Os microssatélites CMCTN86, CMATN89 e aqueles com iniciais TJ e ECM são provenientes de sequências expressas identificadas (EST), ao passo que os demais são genômicos. Para a PCR foram adicionados 20 ng de DNA, 0,6 μ M de cada iniciador, 1X PCR Master Mix (Promega – M7505) e água ultra pura estéril suficiente para completar 12 μ l. As condições de amplificação consistiram de um ciclo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos incluindo 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica de cada par de iniciadores por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. A cada produto de PCR foram adicionados 6 μ l de tampão de carregamento (10ml de formamida, 200 μ l de EDTA 0,5M pH 8,0, 10 mg de azul de bromofenol e 10 mg de xilene cianol). A seguir, foi realizada a desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguida de choque térmico no gelo, imediatamente antes de ser realizada a eletroforese. Os produtos de PCR dos marcadores microssatélites foram aplicados em gel de poliacrilamida 7,5%. Os géis foram preparados com 0,5 mm de espessura através do sistema “Sequi-gen GT” (BioRad) de 38 X 50 cm (TEIXEIRA; CAMARGO, 2006). Foi preparada uma solução estoque de acrilamida:bisacrilamida 19:1 (% p/v) 40% concentrada em água deionizada e armazenada a 4°C, a partir da qual foram diluídas as soluções de trabalho na concentração desejada de 7,5%, juntamente com uréia 7M em tampão 1X TBE (Tris base, ácido bórico e EDTA). O gel foi preparado a partir de 160 ml da solução de trabalho, 160 μ l de TEMED (Promega) e 1100 μ l de persulfato de amônio 10% (Promega). Após 20 minutos, o gel polimerizado foi submetido a uma eletroforese de aquecimento, à potência constante de 80 W e temperatura máxima de 50°C por 1 hora, com tampão 1X TBE na cuba do suporte e solução de acetato de sódio 0,5M em tampão 1X TBE na cuba inferior. Após esta etapa foi realizada a eletroforese dos produtos de PCR. As amostras foram aplicadas em três etapas no gel, foi feita a primeira aplicação com eletroforese por 45 minutos, em seguida uma segunda aplicação e novamente realizou-se a eletroforese por 45 minutos e então foram aplicadas as últimas amostras. Nas três aplicações, as amostras dos

genitores acompanharam as amostras da população segregante para verificação dos tamanhos dos alelos. Como referência para os produtos de PCR dos marcadores microssatélites foi usado o marcador de peso molecular 25 pb (Promega) preparado na concentração 1,34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ com 32% de tampão de carregamento (% v/v) e água ultra pura estéril suficiente para completar o volume. Após a eletroforese, o gel foi corado com uma solução de nitrato de prata de acordo com o protocolo de Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001).

2.1.6 Marcadores AFLP

A amplificação de fragmentos AFLP foi baseada na adaptação do protocolo de Vos et al. (1995). O DNA genômico foi clivado com duas enzimas, uma de corte raro, com sítio de restrição de 6 pares de bases, e uma de corte freqüente, com sítio de restrição de 4 pares de bases em uma reação contendo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albumina serina bovina (BSA), 1X tampão One-Phor-All (10 mM Tris – acetato pH 7,5, 10 mM acetato de magnésio, 50 mM acetato de potássio), 1 U enzima de corte raro, 1 U enzima de corte freqüente, num volume final de 20 μl , por 12 horas a 37°C para a digestão e 15 minutos a 70°C, para inativação das enzimas. Foram testadas as seguintes combinações de enzimas de corte raro e de corte freqüente, respectivamente: *EcoRI/MseI* e *HindIII/MseI*.

A segunda etapa consistiu na ligação dos adaptadores específicos para cada combinação de enzima (Tabela 4) pela adição de uma solução contendo 1 U T4 DNA Ligase, 1X tampão da enzima T4 DNA Ligase, 5 μM do adaptador para enzima de corte freqüente e 0,5 μM do adaptador para enzima de corte raro num volume final de 24 μl e incubação por 3 horas a 23°C. O adaptador para a enzima de corte raro foi diluído numa concentração de 5 pM em solução 0,5 X de tampão One-Phor-All (5 mM Tris – acetato pH 7,5, 5 mM acetato de magnésio, 25 mM acetato de potássio) e o adaptador para a enzima de corte freqüente foi diluído numa concentração de 50 pM em solução 0,5 X de tampão One-Phor-All. A hibridização das fitas de adaptadores foi realizada em termociclador por 10 minutos a 65 °C, 10 minutos a 37 °C e 10 minutos a 25°C. Após o processo, os adaptadores foram armazenados a -20°C.

A pré-amplificação de fragmentos foi realizada através de oligonucleotídeos de sequência arbitrária que contêm sequências específicas complementares às sequências dos adaptadores, além de um nucleotídeo adicional na extremidade 3' (Tabela 4). Foi realizada uma reação

contendo 1 X PCR Master Mix (Promega – M7505), 0,125 μ M do oligonucleotídeo complementar ao adaptador da enzima de corte raro com um nucleotídeo adicional, 0,125 μ M do oligonucleotídeo complementar ao adaptador da enzima de corte frequente com um nucleotídeo adicional, 2 μ l do produto do DNA digerido e ligado e água ultra pura estéril suficiente para completar 20 μ l. As condições de amplificação foram de um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Ao final da reação, foram adicionados 80 μ l de água ultra pura estéril e o produto foi armazenado a -20°C.

Por último, foi realizada a amplificação seletiva com oligonucleotídeos contendo a sequência dos adaptadores mais o nucleotídeo adicional, além de outros dois nucleotídeos seletivos (Tabela 4). Neste caso, a reação foi composta por 1 X PCR Master Mix (Promega – M7505), 0,125 μ M do oligonucleotídeo complementar ao adaptador da enzima de corte raro com três nucleotídeos adicionais, 0,150 μ M do oligonucleotídeo complementar ao adaptador da enzima de corte raro com três nucleotídeos adicionais, 2 μ l do produto da pré-amplificação e água ultra pura estéril suficiente para 12 μ l. As condições de amplificação foram de um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 13 ciclos incluindo 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e mais 23 ciclos incluindo 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR dos marcadores AFLP foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Como padrão de referência ao tamanho dos produtos dos marcadores foi usado o marcador de peso molecular 50 pb (Promega). Todas as demais etapas da eletroforese e coloração dos géis foram realizadas como descrito anteriormente.

2.1.7 Marcadores RGA

Marcadores RGA foram obtidos a partir da técnica TRAP como descrito por Hu e Vick (2003) e Miklas et al. (2006). Os oligonucleotídeos fixos foram desenhados observando-se os seguintes critérios: (a) seleção das sequências de DNA de homólogos de genes de resistência registradas como AF354505, AF354506, AF354507, AF354515, AF354516 e AF354517 por Brotman et al. (2002) no GenBank; (b) escolha do tamanho ótimo, tamanho máximo e o tamanho mínimo de 18 nucleotídeos do oligonucleotídeo; (c) escolha da T_m ótima, T_m máxima e mínima

do oligonucleotídeo de 53°C, 55°C e 50°C, respectivamente; (d) uso de um dos oligonucleotídeos escolhidos pelo programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>; verificado em 03.06.2009) (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Os oligonucleotídeos arbitrários foram os mesmos publicados por Li e Quiros (2001) e por Hu e Vick (2003), conforme Tabela 5.

A reação de PCR foi realizada num volume final de 12 µl, sendo composta por 100 ng de DNA, 1 X PCR Master Mix (Promega – M7505), 0,5 µM do oligonucleotídeo arbitrário, 0,8 µM do oligonucleotídeo fixo e água ultra pura estéril suficiente para completar o volume. As condições de amplificação consistiram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, doze ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR dos marcadores RGA foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Como padrão de referência ao tamanho dos produtos dos marcadores foi usado o marcador de peso molecular 50 pb (Promega). Todas as demais etapas da eletroforese e coloração dos géis foram realizadas como descrito anteriormente.

Tabela 3 – Nomenclatura, sequência, motivos, temperatura de anelamento e referência dos oligonucleotídeos dos marcadores SSR organizados por grupo de ligação (GL)

(continua)					
GL	Designação do SSR	Oligonucleotídeo <i>sense</i> 5' a 3' (acima) Oligonucleotídeo <i>antisense</i> 5' a 3' (abaixo)	Motivo de repetição e número de repetições	Ta (°C)	Fonte
I	CMCTN86	GTGACAGTTATCAAGGATGC AAGGGAATGCATGTGGAC	(CT) ₂₁	50	2
I	CMMS4-3	ACCGAAATCATAAGGAACATAAGAG TATGAGCTGTGTTGTGTATGAAAAC	(GA) ₁₉	53	4
I	CMMS22-2	CGTTATACAAGATAGAGATAGAGAG TTCAACTAATCCCCAAGACAAACAA	(GA) ₁₆	50	4
I	TJ27	AAGCGGAACAAGCTCATCTC CAAAAGCATCAATTGCTTGAA	(TCT) ₈	55	2
II	CMAGN68	GGAAGGAAATTAGCATGCAC GCCACTCTGTCTTTCTTCC	(AG) ₂₀	55	2
II	CMBR41	GTACCGCCTAGGGTTTCTCC CGAGGAAGAGAGAGAAGGGG	(CT)T ₄ (CT) ₅ (TTCA)(CT) ₂ (TTCA)(CT) ₃ (GTT)T ₄ (CTC)(GTT)T ₈ (CT)T ₄ (CT)T ₃	59	3
II	CMBR120	CTGGCCCCCTCCTAAACTAA CAAAAAGCATCAAAATGGTTG	(CT) ₂ N ₁₁ (CT) ₂ G ₂ (CT)T(CT)N ₇ (TC) ₁	54	3
II	CMMS3-2	AGTTTTTGGGCATTTTTAGTTGGAT GGCTTATCTCCACCCAACCATTCT	(GA) ₁₉	55	4
II	CMN08-40	TTATTACACACGCGCACACA GCTGAATTTTTGCTTCTGTATCC	(AC) ₂₆	52	7
II	ECM71	TGGAATGTTCTGCGAGGTT GCCTTTACGGATGATTACAG	(AG) ₁₂	55	6
II	TJ24	AAACACGGGCTTGAAGAAAA CCCAGAAGGTGAGAGAGACCT	(CTT) ₁₈	55	2
III	CMBR105	TGGTAAGCATTTTGAAATCACTTTT TTTGATGGTTGGAGGGGAA	(CT) ₁₂ C(CCCT) ₂ (CT)(CCCT)	56	3
III	CMCTN5	CACCTTAAAGTTTAGCCCC AAAAATGCAATGAACTGAGCGC	(CT) ₇ (AT)(CT) ₁₅ (AT) ₈ (AC) ₆	54	2
III	CMTCN66	CTCCGATCAATTTTACATCT GAATAAACTTGGTGTCCAAC	(TC) ₁₇	55	2
III	CMTA170	TTAAATCCCAAAGACATGGCG AGACGAAGGACGGTTAGCTTT	(TA) ₉ T(TA) ₃	54	1
III	CSWCT10	AGATCGGAATTGAAAAAG AAAGGGGCTTCCTCTCTA	(CT) ₉ CTTTTCT	55	5
III	TJ10	ACGAGGAAAACGCAAAATCA TGAACGTGGACGACATTTTT	(CTT) ₅ (CT) ₃	55	2
IV	CMBR104	CAAAAGGAAAAAGAAAAAGACAAA GGTATTATTTGCCCCCACCT	(GA) ₂₇	50	3
IV	CMTCN6	GCATTGCTCGATCAGTTTAC ACTCCGTCAAGATCCCAAAA	(TC) ₂ TT(TC) ₁₆	55	2
IV	CMTC168	ATCATTGGATGTGGGATTCTC ACAGATGGATGAAACCTTAGG	(TC) ₁₄	51	1
V	CMAGN61	GGAGACACAAGGAATATGTG ATAACAAAAGGGGCATAACAC	(AG) ₄ AA(AG) ₈	50	2
V	CMBR123	TCCGAAGTAAACATCAAAGACA GGTCAGTCAAGATAGTTACGGTTG	(TC) ₁₀	52	3
V	CMGAN3	GTTAAAGGCTATGGTATAGAAC AGAATAAGGTCCACATAAGG	(GA) ₁₀	55	2
V	CMMS2-3	ATCACCCACCCACCACTGCCAAAA CCTTGAAAAACCACCAACATAACAC	(GA) ₁₉	58	4
V	ECM109	CCCCCTTTCTCCTTCTTCTT GCTCTCATGGGAAACAGAGG	(AG) ₁₀	51	6
V	ECM213	CCATCTCTCTCCTCGACCTTC CGGAAAAAGGAGCTCAAAAGT	(AAG) ₁₁	51	6
VI	CMCTN38	TAAAACACTCTCGTGACTCC GATCTGAGGTTGAAGCAAAG	(CT) ₁₅ N ₅ (CT)C(CT) ₃	56	2
VI	CMTCN41	CCCCAAGATTCTGTATTAATC TGGTAGTAGAGATGATATAC	(TC) ₁₂	55	2

Tabela 3 – Nomenclatura, sequência, motivos, temperatura de anelamento e referência dos oligonucleotídeos dos marcadores SSR organizados por grupo de ligação (GL)

(conclusão)					
GL	Designação do SSR	Oligonucleotídeo <i>sense</i> 5' a 3' (acima) Oligonucleotídeo <i>antisense</i> 5' a 3' (abaixo)	Motivo de repetição e número de repetições	Ta (°C)	Fonte
VI	CMTCN50	TCTACTTCCATGAATCCATC TAGAATGGTTAGGAAACCTT	(TC) ₁₆ (TA) ₁₂	55	2
VII	CMAGN75	TGGGTTTTCTTCTACTACTG TGCTTTTACTCTCATTCAAC	(AG) ₁₈	53	2
VII	CMBR52	CAGCGATGATCAACAGAAACA GGCTGACACTCCCTGTACCT	(GA) ₂₆	58	3
VII	CMBR84	GCGATGATCAACAGAAACAGG ACCATTCAGGCTGACACTCC	(GA) ₂₈	54	3
VII	CMMS004	GCCCAACGGACACACTCACTCACAC GAGGGAGTAAGAATAAGAAGAAGAA	(GA) ₁₆ (GA) ₁₂	60	4
VIII	CMACC146	CAACCCGACTACTAAGTACG CGACCAAACCCATCCGATAA	(ACC) ₉	51	1
VIII	CMCTT144	CAAAAGGTTTCGATTGGTGGG AAATGGTGGGGGTTGAATAGG	(CTT) ₁₀ CTAC(CTT) ₄	51	1
VIII	CMTCN56	CTTTTCTCTTCTTCTATTCTC ATCCAAAAGGAATCGGAAAG	(TC) ₁₁	55	2
IX	CMATN22	CGGCAATCATCTTATCTTTC AAGATTGAAGTGGGAAAATG	(AC) ₇ (AT) ₈	54	2
IX	CMMS35-5	AACGGGATTTTGGAGGCATATTCGG CTCCCCAGTGTATCAGCCAAATCTC	(GA) ₂₁	55	4
IX	CMTC47	GCATAAAAGAATTTGCAGAC AGAATTGAGAAGAGATAGAG	(TC) ₉ (CT) ₆	51	1
IX	ECM180	GGGCTACCATGCATGTTTAAT GGTAATTGATTTTCTTGTCTCG	(AT) ₉	51	6
X	CMBR55	GAGGCCTTTGTGGTTCGTAA AAAGAAATGGATAAAGGAAACAGA	(CT) ₁₀ T(TC) ₄	50	3
X	CMCTN71	TCAATTTTGGCCAAACAAGC CAAGGACACAGATTTAATAC	(CT) ₁₁	54	2
X	CMGA172	CAATCGCAGATACTTCCACG TGCTTGTCCCAACGGTGTCTAT	(GA) ₉	51	1
X	ECM49	TCACACCTTTAACTTTTCTCTCC TCGATGAAGCTGAATGGAAG	(AG) ₂₂	59	6
XI	CMATN89	CACTACCTTAAACAGAAATTG GGACAATTTAGGGAGGATC	(AT) ₁₃ A(AT) ₂	54	2
XI	CMGA104	TTACTGGGTTTTGCGGATTT AATTCCGTATTCAACTCTCC	(GA) ₁₄ AA(GA) ₃	51	1
XI	CMGAN12	TTTTTGTCTTATATGAGGG GTTGCATAATGCTAATTTGG	(GA) ₂₁	55	2
XI	TJ33	GGAAGCTTCATTTGGGTCTATG GGAGGAGGATGAAGATGAAGC	(AAG) ₁₀	55	2
XII	CMAGN32	CAGATTAGAAGAAAAAGAGG AGCAGACAGCATATAAAGCT	(AG) ₁₄	55	2
XII	CMBR111	TTTTCTCCATTTAACTTAGCC AAGAGAGAAGCCATGGATGAA	(CT) ₁₄	54	3
XII	CMBR150	TTTTTACTGTGTGTTTTGATTTGTT TTGGTGGACTGGAATCCATA	(CTT)(CT) ₂ C ₂ (CT) ₇ N ₃ (GT) ₃ T ₂ N ₂ (CT)T ₃ (GT)T ₂ N ₂ (CTT) ₃	56	3
XII	TJ29	AGCCTAAGCCACCGATTTT TTCCCAAGTGGGGTTATGAG	(TC) ₁₀	55	2

1 = Danin-Poleg et al. (2001); 2 = Gonzalo et al. (2005); 3 = Ritschel et al. (2004); 4 = Chiba et al. (2003); 5 = Fazio; Staub e Chung (2002); 6 = Fernandez-Silva et al. (2008); 7 = Fukino et al. (2007).

Tabela 4 – Sequências de adaptadores, de oligonucleotídeos e combinações usadas na amplificação de fragmentos para marcadores AFLP

Sequências de adaptadores de cada enzima (sentido 5' ao 3')	Sequências de oligonucleotídeos (sentido 5' ao 3') ¹	Combinações usadas na Pré-amplificação	Combinações usadas na Amplificação Seletiva
<i>EcoRI</i> CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTCTAC	E01 GACTGCGTACCAATTC <u>A</u>	E01M01	E33M40
	E33 GACTGCGTACCAATTC <u>AAG</u>	E01M02	E35M35
	E35 GACTGCGTACCAATTC <u>ACA</u>		E38M43
	E38 GACTGCGTACCAATTC <u>ACT</u>	H01M01	E38M48
	E40 GACTGCGTACCAATTC <u>AGC</u>	H01M02	E40M34
	E42 GACTGCGTACCAATTC <u>AGT</u>	H01M03	E40M51
	E43 GACTGCGTACCAATTC <u>ATA</u>	H02M03	E40M56
	E46 GACTGCGTACCAATTC <u>ATT</u>		E42M31
<i>HindIII</i> CTCGTAGACTGCGTACC AGCTGGTACGCAGTCTAC	H01 GACTGCGTACCAGCTT <u>A</u>		E42M35
	H02 GACTGCGTACCAGCTT <u>C</u>		E42M43
	H33 GACTGCGTACCAGCTT <u>AAG</u>		E42M51
	H35 GACTGCGTACCAGCTT <u>ACA</u>		E43M44
	H36 GACTGCGTACCAGCTT <u>ACC</u>		E46M35
	H45 GACTGCGTACCAGCTT <u>ATG</u>		E46M40
	H55 GACTGCGTACCAGCTT <u>CGA</u>		E46M48
			E46M56
<i>MseI</i> GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT	M01 GATGAGTCCTGAGTAA <u>A</u>		
	M02 GATGAGTCCTGAGTAA <u>C</u>		
	M03 GATGAGTCCTGAGTAA <u>G</u>		H33M43
	M31 GATGAGTCCTGAGTAAAA <u>A</u>		H35M75
	M34 GATGAGTCCTGAGTAA <u>AAT</u>		H36M37
	M35 GATGAGTCCTGAGTAA <u>ACA</u>		H36M41
	M37 GATGAGTCCTGAGTAA <u>ACG</u>		H36M42
	M40 GATGAGTCCTGAGTAA <u>AGC</u>		H45M77
	M41 GATGAGTCCTGAGTAA <u>AGG</u>		H55M77
	M42 GATGAGTCCTGAGTAA <u>AGT</u>		
	M43 GATGAGTCCTGAGTAA <u>ATA</u>		
	M44 GATGAGTCCTGAGTAA <u>ATC</u>		
	M48 GATGAGTCCTGAGTAA <u>CAC</u>		
	M51 GATGAGTCCTGAGTAA <u>CCA</u>		
	M56 GATGAGTCCTGAGTAA <u>CGC</u>		
	M75 GATGAGTCCTGAGTAA <u>AGTA</u>		
	M77 GATGAGTCCTGAGTAA <u>AGTG</u>		

¹As sequências dos oligonucleotídeos com iniciais 'E' e 'M' também podem ser verificadas na lista padrão da empresa Keygene <<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/keygeneAFLPs.html>>. Verificado em: 29.10.10.

Tabela 5 – Descrição dos oligonucleotídeos arbitrários, dos oligonucleotídeos fixos e das combinações de ambos usados na amplificação de fragmentos para marcadores RGA

Designação do Oligonucleotídeo Arbitrário Sequência sentido 5' a 3'	Designação do Oligonucleotídeo Fixo Sequência sentido 5' a 3' Identificação do acesso à sequência do RGH de <i>C. melo</i> no GenBank ³	Combinação na PCR Oligonucleotídeo arbitrário/ Oligonucleotídeo fixo
Ga3-800 ¹ TCATCTCAAACCATATACAC	NBS-2 CACCAATGCCTGTAGTTG AF354505	
Ga5-800 ¹ GGAACCAAACACATGAAGA	NBS-3 TCCGACGAAGGAAGTAAT AF354506	em1/ NBS-5
em1 ² GACTGCGTACGAATTAAT	NBS-5 AAACCTTAGCCAAAGTCG AF354507	em2/ NBS-2
em2 ² GACTGCGTACGAATTTGC		em3/ NBS-5
em3 ² GACTGCGTACGAATTGAC	NBS45-8 TTGTTTCAGACACCCAAAC AF354515	em3/ NBS45-8
	NBS46-7 GCTAGCCAATTTGAAGGT AF354516	em3/ NBS46-7
	NRT-A4 GGAAACCAGATTTGAAGC AF354517	Ga3-800/ NRT-A4
		Ga3-800/ NBS-3
		Ga5-800/ NBS-2
		Ga5-800/ NBS-5

¹ Hu e Vick (2003); ² Li e Quiros (2001); ³ RGH = homólogo de gene de resistência. Acesso ao GenBank: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Verificado em: 28.10.2010.

2.1.8 Construção do mapa de ligação

Para cada marcador dominante RGA e AFLP foram anotados o número total de fragmentos amplificados, os fragmentos polimórficos entre os genitores e, nestes casos, a presença e ausência destes nos indivíduos F₂. No caso dos marcadores microsatélites foram anotados os polimorfismos entre os genitores e a presença dos alelos em homozigose ou em heterozigose nos indivíduos F₂. As frequências de classes genotípicas de cada loco marcador foram analisadas pelo teste χ^2 , corrigido pelo método de Bonferroni para as proporções esperadas de 3:1 (presença:ausência de fragmento) para os marcadores dominantes e 1:2:1 (homozigoto A:heterozigotoAB:homozigoto B) para os marcadores codominantes. A correção de Bonferroni pressupõe o cálculo de um novo valor α para cada teste, a partir de um valor α^* para múltiplos testes, que neste caso foi de $\alpha^* = 0,05$ (Equação 1). O α^* é a probabilidade de ocorrer pelo menos

um falso positivo nos m testes realizados (Equação 2). A distorção da segregação foi considerada significativa quando $p\text{-valor} < \alpha$.

$$\alpha = \frac{\alpha^*}{m} \quad (1)$$

$$\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^m \quad (2)$$

Um mapa de ligação foi construído com base nos dados de segregação de marcadores na população F_2 com auxílio do programa MAPMAKER, versão 3.0 (LANDER et al., 1987). Os marcadores moleculares e fenotípicos (resistência/suscetibilidade às raças de *P. xanthii*) foram associados com o comando *group* adotando-se um valor de $\text{LOD} \geq 3.5$. Marcadores dentro dos grupos foram ordenados usando o comando *order* também com $\text{LOD} \geq 3.5$. Os marcadores microsatélites foram usados como referência para definição dos grupos de ligação. As distâncias foram calculadas com a função de Kosambi (KOSAMBI, 1944):

$$-d = 0,25 \ln [(1 + 2\theta)/(1 - 2\theta)]$$

onde, d é a distância entre o gene e o marcador em centiMorgans e θ é a fração de indivíduos recombinantes. Os mapas foram desenhados com auxílio do programa MapChart, versão 2.2 (VOORRIPS, 2002). A identificação dos grupos de ligação seguiu a definida por Périn et al. (2002).

2.2 Resultados

2.2.1 Análise da resistência a *P. xanthii*

Ao todo 87 indivíduos da população F₂ foram avaliados para resistência às raças 1, 3 e 5 de *Podosphaera xanthii* e genotipados com marcadores moleculares. A fenotipagem desta população foi realizada pela visualização do desenvolvimento fúngico nas folhas inoculadas como descrito anteriormente e os indivíduos foram classificados como resistentes ou suscetíveis. Os sinais de oídio foram visíveis nas folhas de plantas suscetíveis 16 dias após a inoculação, notados pela presença de colônias com abundante conidiação do fungo, que se caracterizam pela aparência pulverulenta de coloração branca. Plantas de Védrantais apresentaram desenvolvimento típico do fungo para as três raças como ilustrado na Figura 1A. Já em plantas de PI 414723 (Figuras 1B e 2) e em indivíduos F₁ (Figura 3) não houve o desenvolvimento do fungo ou a conidiação foi muito escassa nos locais de inoculação das três raças. Em alguns casos em PI 414723 e em indivíduos F₁ foram observadas reações do tecido foliar ao desenvolvimento do patógeno. Uma das reações consistiu no amarelecimento do tecido na região de inoculação (Figuras 2A e 3B) e a outra no encharcamento do tecido na região de inoculação (Figura 3D), que é um sintoma relacionado ao extravasamento celular. De modo geral, houve consistência entre as avaliações em folhas diferentes da mesma planta (Tabela 6). A inoculação ocorreu em quatro folhas de cada planta, no entanto a avaliação ocorreu em quatro, em três e em duas folhas em 41,4%, em 35,6% e em 17,25% das plantas inoculadas, respectivamente, devido a falhas de diversas causas. Em cinco indivíduos (5,75% das plantas) somente uma folha pôde ser avaliada e, nestes casos, a análise meticulosa foi crucial para a determinação do fenótipo de cada planta. A senescência da primeira folha inoculada foi a principal causa dos dados faltantes. O desenvolvimento de fungos oportunistas e necroses foliares também foram causas de falhas. Escapes de inoculação também foram observados em algumas inoculações em plantas suscetíveis e no genitor Védrantais (Tabela 6).

Na população F₂, a maioria das plantas apresentou a mesma reação às três raças, como nos casos do indivíduo 25, que foi resistente às três raças, e do indivíduo 27, suscetível (Figura 4). A Figura 5 mostra detalhes da reação de uma planta resistente às três raças (planta 24). A Figura 6 ilustra a reação do indivíduo 58 resistente às três raças com detalhes dos locais de inoculação,

neste caso há aparente infecção, porém a produção de conídios é escassa. Em contraste, a Figura 7 ilustra a reação de suscetibilidade de um indivíduo às três raças, onde se observa o desenvolvimento do fungo com abundante conidiação nos locais de inoculação. Foram observadas quatro plantas resistentes às raças 1 e 5 e suscetíveis à raça 3, indicando se tratarem de recombinantes. A possibilidade de escape da inoculação foi analisada através de cuidadoso exame das plantas. Observam-se na Figura 8, folhas dos indivíduos 33 e 114, onde há desenvolvimento do fungo no local de inoculação da raça 3 e ausência nos locais de inoculação das raças 1 e 5. A mesma figura ilustra as folhas dos indivíduos 35 e 63 e os detalhes das reações evidenciando ausência de desenvolvimento do patógeno nos locais de inoculação das raças 1 e 5 e presença inequívoca de colônias no local de inoculação da raça 3. Esta análise detalhada reforça a hipótese de que estes sejam indivíduos recombinantes, o que sugere a existência de dois genes de resistência ligados, sendo um para as raças 1 e 5 e outro para a raça 3, denominados *Pm-x1.5* e *Pm-x3*, respectivamente.

A fenotipagem para as raças 1 e 5 apresentou 75 indivíduos resistentes e 12 suscetíveis. Esta segregação não difere da segregação 3:1 ($p\text{-valor} = 0,01459$), esperada no caso de um gene dominante de efeito maior. A fenotipagem para a raça 3 apresentou 71 indivíduos resistentes e 16 suscetíveis, adaptando-se à segregação 3:1 ($p\text{-valor} = 0,15454$). A hipótese de distribuição independente dos genes de resistência às raças 1 e 5 e o gene de resistência à raça 3 foi rejeitada, como esperado.

Tabela 6 – Descrição da reação foliar e fenótipos dos genitores (PI 414723 e Védrantais) e dos indivíduos F₁ e F₂ quanto às raças 1, 3 e 5, respectivamente

(continua)

Planta	1ª Folha		3ª Folha		4ª Folha		5ª Folha		Fenótipo
	LE	LD	LE	LD	LE	LD	LE	LD	
PI414723	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
Védrantais	sss	sRs	sss	sss	sss	sss	sss	sss	s
F ₁	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
1	sss	-ss	-RR	sss	sss	sss	ssR	ssR	s
2	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
4	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
5	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
6	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
7	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
8	---	---	RRR	RRR	---	---	---	---	R
11	---	---	RRR	RRR	---	---	---	---	R
15	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	---	---	R
16	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
23	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
24	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
25	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
27	RsR	RsR	sss	sss	sss	sss	---	---	s
29	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
32	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
33	---	---	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR
35	---	---	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR
36	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
37	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
38	---	---	---	---	sRs	sRs	---	---	s
39	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
40	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	---	---	R
46	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
48	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
51	sss	Rss	sRR	ssR	sss	sss	sss	sRR	s
52	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
54	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
55	---	---	---	---	sss	sss	sss	sss	s
56	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
58	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
59	RRR	RRR	sss	sss	sss	sss	ss-	sss	s
61	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
62	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
63	---	---	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR
65	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
66	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
67	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
69	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
73	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
74	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
75	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
76	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
77	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
78	ssR	sRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R-R	RRR	R
80	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
81	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
82	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R

Tabela 6 – Descrição da reação foliar e fenótipos dos genitores (PI 414723 e Védrantais) e dos indivíduos F₁ e F₂ quanto às raças 1, 3 e 5, respectivamente

Planta	1ª Folha		3ª Folha		4ª Folha		5ª Folha		Fenótipo
	LE	LD	LE	LD	LE	LD	LE	LD	
83	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
84	sss	sRs	ssR	ssR	ssR	ssR	ssR	ssR	s
85	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
87	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
88	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
89	---	---	RRR	RRR	---	---	---	---	R
90	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
93	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
95	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
97	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
98	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
99	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
100	ssR	ssR	sss	sss	sss	sss	sss	sss	s
101	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
103	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
105	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
107	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
109	RsR	Rss	sss	sss	sss	sss	sss	sss	s
110	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
111	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
114	RRR	RRR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR	RsR
115	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
116	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
118	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R
120	---	---	sss	sss	sss	sss	sss	sss	s
121	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
124	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
128	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
129	sss	sss	ssR	ssR	ssR	ssR	ssR	sss	s
130	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
131	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
135	---	---	---	---	RRR	RRR	---	---	R
136	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
138	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
139	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
142	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
143	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	RRR	R
146	sRs	sRs	sss	sss	sss	sss	sRR	sss	s
147	---	---	---	---	RRR	RRR	RRR	RRR	R

LE = lado esquerdo 1; LD = lado direito; s = suscetível; R = resistente; - = contaminação com fungo oportunista ou necrose ou senescência foliar.

Figura 1 – Folhas de Védrantais (A) e PI 414723 (B) inoculadas com as raças 1, 3 e 5 (loais indicados pelas setas), apresentando reações de suscetibilidade e de resistência, respectivamente

Figura 2 – Detalhe da reação de PI 414723 às raças 1, 3 e 5 em A, B e C, respectivamente, indicando locais de inoculação pelas setas e ausência de desenvolvimento do fungo

Figura 3 - Reação de uma planta F₁ às raças 1, 3 e 5 (A) e detalhes das reações à raça 1 (B), com produção escassa de conídios e 3 (C) e 5 (D), onde há ausência de desenvolvimento do fungo. Locais das inoculações indicados pelas setas

Figura 4 – Folhas de uma planta F_2 resistente às raças 1, 3 e 5 (A) e de uma planta suscetível (B)

Figura 5 – Detalhes de uma planta F_2 (A) resistente às raças 1 (B), 3 (C) e 5 (D)

Figura 6 – Detalhes de uma planta F_2 (A) resistente às raças 1 (B), 3 (C) e 5 (D). Em C e D há exemplos de escassa produção de conídios

Figura 7 – Detalhes de uma planta F_2 (A) suscetível às raças 1 (B), 3 (C) e 5 (D)

Figura 8 – Folhas de plantas F_2 recombinantes (indivíduos 33-A e 114-B) resistentes às raças 1 e 5 e suscetíveis à 3. Detalhes dos indivíduos 35 (C) e 63 (G) resistentes às raças 1 (D; H) e 5 (E; I) e suscetíveis à 3 (F; J)

2.2.2 Genotipagem com marcadores microssatélites

Os pesos moleculares dos cinquenta e dois locos microssatélites apresentaram-se bastante próximos ou idênticos aos descritos na literatura (Tabela 7). Quando analisados nos indivíduos F₂ somente 1,13 % foram considerados como dados perdidos num total de 4.524 dados analisados. Além disto, nenhum loco apresentou distorção com relação à segregação esperada de 1:2:1 (p -valor < 0,00020) com correção de Bonferroni. A Figura 9 ilustra um gel de poliacrilamida com os fragmentos amplificados do loco TJ33, demonstrando a aplicação das amostras em três momentos diferentes, prática que otimizou a utilização de um gel na eletroforese, pois todas as amostras da população puderam ser avaliadas em um único gel.

Tabela 7 – Tamanhos observados de fragmentos amplificados com oligonucleotídeos dos marcadores SSR para os genótipos PI 414723 e Védrañtais, em pares de bases (pb)

Oligonucleotídeo	Tamanho observado (pb)		Oligonucleotídeo	Tamanho observado (pb)	
	PI 414723	Védrañtais		PI 414723	Védrañtais
CMACC146	146	152	CMMS004	210	190
CMAGN61	165	160	CMMS2-3	214	213
CMAGN68	259	187	CMMS3-2	490	500
CMAGN32	160	170	CMMS4-3	175	165
CMAGN75	140	160	CMMS22-2	110	120
CMATN22	170	166	CMMS35-5	280	270
CMATN89	138	145	CMN08-40	182	296
CMBR104	130	200	CMTA170	120	122
CMBR105	150	160	CMTC168	200	206
CMBR111	115	111	CMTC47	174	170
CMBR120	167	163	CMTCN41	120	130
CMBR123	162	159	CMTCN50	124	130
CMBR150	250	251	CMTCN56	96	80
CMBR41	162	168	CMTCN6	150	145
CMBR52	111	120	CMTCN66	120	130
CMBR55	90	115	CSWCT10	175	180
CMBR84	110	124	ECM180	160	158
CMCTN38	146	154	ECM109	153	122
CMCTN5	211	190	ECM49	130	140
CMCTN71	182	160	ECM71	147	142
CMCTN86	160	184	ECM213	141	129
CMCTT144	192	190	TJ10	120	140
CMGAN3	202	207	TJ24	145	170
CMGA104	140	125	TJ27	171	174
CMGA172	120	114	TJ29	137	135
CMGAN12	176	182	TJ33	200	196

Figura 9 – Detalhe de um gel de poliacrilamida do microsatélite TJ33. Ao lado do marcador (25 pb), na primeira linha de aplicação das amostras, observam-se o indivíduo F₁, os genitores PI 414723 (PI = 200 pb) e Védrantais (Ved = 196 pb) e o controle negativo (B). Os demais indivíduos representados por números correspondem à população segregante F₂

2.2.3 Genotipagem com marcadores AFLP

Foram analisadas 23 combinações de oligonucleotídeos de AFLP, gerando um total de 1.173 locos dos quais 165 (14%) foram polimórficos. Destes locos polimórficos somente 0,4% foram considerados dados perdidos quando analisados na população F₂ de um total de 14.355 dados analisados. Dos 165 locos analisados, seis (3,7%) apresentaram distorção com relação à segregação esperada de 3:1 (p -valor < 0,00020) com correção de Bonferroni, sendo que três destes marcaram alelos do genitor masculino (PI 414723) e três do genitor feminino (Védrantais). A Tabela 8 apresenta as combinações analisadas e o número de polimorfismos obtidos em cada combinação. A Figura 10 exemplifica um loco polimórfico amplificado na população segregante, onde há ausência do fragmento em PI 414723 e presença em Védrantais e no indivíduo F₁, este loco foi incorporado ao mapa genético.

Tabela 8 – Combinações de oligonucleotídeos de AFLP e número de polimorfismos por combinação

Combinação de oligonucleotídeos	Número de polimorfismos	Combinação de oligonucleotídeos	Número de polimorfismos	Combinação de oligonucleotídeos	Número de polimorfismos
E33M40	5	E42M35	13	H33M43	7
E35M35	8	E42M43	8	H35M75	5
E38M43	9	E42M51	5	H36M37	3
E38M48	9	E43M44	10	H36M41	9
E40M34	7	E46M35	5	H36M42	7
E40M51	3	E46M40	10	H45M77	5
E40M56	11	E46M48	9	H55M77	4
E42M31	8	E46M56	5	Total	165

Figura 10 – Detalhe de um gel de poliacrilamida de AFLP, onde há a segregação (presença e ausência) do marcador H35M75_156 com 156 pb, indicado pela seta, na população F_2 do cruzamento PI 414723 $\times$ Védrañtais. Ao lado do marcador está o indivíduo F_1 , seguido dos genitores PI 414723 (PI = fragmento ausente) e Védrañtais (Ved = fragmento presente) e do controle negativo (B)

2.2.4 Genotipagem com marcadores RGA

Foram analisadas nove combinações de oligonucleotídeos de RGA, gerando um total de 213 locos dos quais 29 (13,6%) foram polimórficos. Destes locos polimórficos somente 0,8% foram considerados dados perdidos quando analisados na população F_2 de um total de 2.523 dados analisados. Dos 29 locos polimórficos genotipados, sete (24%) apresentaram distorção em relação à segregação esperada de 3:1 (p -valor < 0,00020) com correção de Bonferroni, sendo que cinco destes locos distorcidos marcaram alelos do genitor masculino (PI 414723) e dois do genitor feminino (Védrañtais). A Tabela 9 apresenta as combinações analisadas e o número de locos polimórficos obtidos em cada combinação. A Figura 11 exemplifica dois locos polimórficos amplificados na população segregante, no primeiro loco com 135 pares de bases há ausência do fragmento em PI 414723 e presença em Védrañtais e no indivíduo F_1 e no segundo loco com 127 pares de bases há presença do fragmento em PI 414723 e no indivíduo F_1 e ausência em Védrañtais, estes dois locos foram incorporados ao mapa.

Tabela 9 – Combinações de oligonucleotídeos de RGA e número de polimorfismos por combinação

Combinação de oligonucleotídeos	Número de polimorfismos
em1/ NBS-5	1
em2/ NBS-2	2
em3/ NBS-5	2
em3/ NBS45-8	4
em3/ NBS46-7	9
Ga3-800/ NRT-A4	3
Ga3-800/ NBS-3	4
Ga5-800/ NBS-2	2
Ga5-800/ NBS-5	2
Total	29

Figura 11 – Detalhe de um gel de poliácridamida de RGA, onde há a segregação (presença e ausência) dos marcadores GA5-800/NBS2_135 (135 pb) e GA5-800/NBS2_127 (127 pb), indicados pelas setas, na população F₂. Ao lado do marcador está o indivíduo F₁, seguido dos genitores PI 414723 (PI) e Védrantais (Ved) e do controle negativo (B)

2.2.5 Construção do mapa de ligação e mapeamento de genes de resistência a *P. xanthii*

O mapa de ligação foi gerado a partir de dados de segregação de 207 marcadores, incluindo três marcadores fenotípicos relativos à resistência às raças 1, 3 e 5, 139 AFLP, 47 microssatélites e 18 RGA. Cinco marcadores microssatélites, 26 AFLP e 11 RGA, dos quais cinco AFLP e sete RGA eram distorcidos, não foram posicionados no mapa genético. Apenas um loco AFLP distorcido foi incorporado ao mapa genético. O mapa resultante compreendeu 1.469 cM com uma média de 7,4 cM entre marcadores divididos pelos 12 grupos de ligação. Um resumo do mapa genético é apresentado na Tabela 10, contendo os grupos de ligação e o número de marcadores alocados nos grupos. Os grupos foram identificados pelos marcadores microssatélites descritos por Fukino et al. (2008) e Gonzalo et al. (2005) e nomeados de acordo com Périn et al. (2002) (Figuras 12a-d). Os marcadores AFLP foram distribuídos entre os doze grupos de ligação. Os marcadores RGA apresentaram-se distribuídos entre oito grupos de ligação. O número de marcadores por grupos de ligação variou de nove (grupo XII) a 24 (grupo

I). O comprimento médio foi de 122,4 cM por grupo, variando de 69,8 cM (grupo IX) a 170,9 cM (grupo I). A distância média entre marcadores por grupo variou de 4,3 cM (grupo VI) a 11,0 cM (grupo XII), sendo o maior intervalo entre dois marcadores de 37,5 cM (grupo II).

Os genes de resistência às raças 1, 3 e 5 foram mapeados no grupo de ligação II, que apresentou 126,8 cM, compreendendo, além destes marcadores fenotípicos, 11 marcadores AFLP, sete microssatélites e nenhum RGA, totalizando 21 marcadores. Os genes de resistência às raças 1 e 5 apresentaram ligação completa como antecipado com base na análise fenotípica e receberam a denominação *Pm-x1.5*, já o gene de resistência à raça 3 posicionou-se a 5,1 cM destes, sendo denominado *Pm-x3*. O marcador AFLP H35M75_156, presente no genitor suscetível e ausente no resistente, foi localizado entre os genes de resistência a 1,3 cM de *Pm-x1.5* e 3,8 cM de *Pm-x3*. Devido à sua natureza dominante, a análise detalhada dos genótipos marcadores dos quatro indivíduos recombinantes para este marcador pouco acrescenta à hipótese de recombinação entre os locos *Pm-x1.5* e *Pm-x3*, já que todos apresentam o marcador, não sendo possível saber se são homozigotos ou heterozigotos (Tabela 11). Esta hipótese é explicada pela análise fenotípica dos indivíduos recombinantes, principalmente do indivíduo 63, que apresentou evidente reação de resistência às raças 1 e 5 e suscetibilidade à raça 3, como demonstrado anteriormente.

Tabela 10 – Resumo do mapa genético da geração F₂ (PI 414723 x Védraçais), apresentando tipo e número de marcadores por grupo de ligação, o comprimento de cada grupo e a distância média entre marcadores por grupo (função de mapeamento de Kosambi e distâncias em centiMorgans)

Grupo de ligação	Marcadores				Total	Comprimento (cM)	Distância média (cM)
	SSR	AFLP	RGA	Fenotípico			
I	3	18	3	-	24	170,9	7,12
II	7	11	0	<i>Pm-x1.5; Pm-x3</i>	21	126,8	6,04
III	6	12	3	-	21	122,1	5,81
IV	3	17	2	-	22	155,8	7,08
V	4	7	0	-	11	92,3	8,4
VI	2	16	1	-	19	81,7	4,30
VII	4	15	0	-	19	139,4	7,34
VIII	2	11	2	-	15	112,3	7,49
IX	4	10	1	-	15	158,4	10,56
X	4	11	5	-	20	140,0	7,00
XI	4	7	0	-	11	69,8	6,35
XII	4	4	1	-	9	99,5	11,06
Média	3,9	11,6	1,5	-	-	122,4	7,4
Total	47	139	18	2	207	1.469	-

Tabela 11 – Genótipos dos indivíduos recombinantes para os locos dos genes *Pm-x1.5* e *Pm-x3*, incluindo o marcador dominante H35M75_156 e os marcadores codominantes CMBR 41 e CMBR 120

Planta F ₂	<i>Pm-x1.5</i>		H35M75_156	<i>Pm-x3</i>	CMBR 41	CMBR 120
	Raça 1	Raça 5				
33	R ₋	R ₋	V ₋	rr	cc	mm
35	R ₋	R ₋	V ₋	rr	cc	mm
114	R ₋	R ₋	V ₋	rr	cc	mm
63	R ₋	R ₋	V ₋	rr	Cc	Mm

R = alelo dominante que confere resistência (PI 414723); r = alelo recessivo (Védraçais); V = alelo de Védraçais do marcador dominante; C = alelo dominante (PI 414723); c = alelo recessivo (Védraçais); M = alelo dominante (PI 414723); m = alelo recessivo (Védraçais)

Figura 12a – Mapa genético da população F_2 (PI 414723 x Vêdrantais). Os números dos grupos de ligação estão de acordo com Périn et al. (2002). As distâncias em centimórgans estão marcadas ao lado esquerdo e os nomes dos marcadores ao lado direito de cada grupo de ligação. Os marcadores para os genes de resistência estão em verde, os microsatélites em vermelho, os AFLP em preto e os RGA em azul sublinhado

Figura 12b – Mapa genético da população F_2 (PI 414723 x Védantais). Os números dos grupos de ligação estão de acordo com Périn et al. (2002). As distâncias em centimorgans estão marcadas ao lado esquerdo e os nomes dos marcadores ao lado direito de cada grupo de ligação. Os marcadores para os genes de resistência estão em verde, os microsátélites em vermelho, os AFLP em preto e os RGAs em azul sublinhado

Figura 12c – Mapa genético da população F_2 (PI 414723 x Védrañtais). Os números dos grupos de ligação estão de acordo com Périn et al. (2002). As distâncias em centimorgans estão marcadas ao lado esquerdo e os nomes dos marcadores ao lado direito de cada grupo de ligação. Os marcadores para os genes de resistência estão em verde, os microsatélites em vermelho, os AFLP em preto e os RGA em azul sublinhado

Figura 12d – Mapa genético da população F_2 (PI 414723 x Védantais). Os números dos grupos de ligação estão de acordo com Périn et al. (2002). As distâncias em centimorgans estão marcadas ao lado esquerdo e os nomes dos marcadores ao lado direito de cada grupo de ligação. Os marcadores para os genes de resistência estão em verde, os microsatélites em vermelho, os AFLP em preto e os RGA em azul sublinhado

2.3 Discussão

2.3.1 Avaliação da resistência a *P. xanthii*

A resistência de meloeiro ao oídio tem sido analisada principalmente por dois métodos de inoculação, sendo que um consiste na inoculação das folhas *in vivo* (YUSTE-LISBONA et al., 2010) e o outro na inoculação de discos foliares *in vitro* (COHEN, 1993). No primeiro método, a inoculação é realizada nas folhas sem a remoção das mesmas e as plantas são mantidas em ambiente controlado sob condições de cultivo. Este método possibilita a inoculação de diferentes isolados numa mesma folha, minimizando assim a variação experimental e simulando condições naturais de desenvolvimento da doença. O método de discos foliares, embora geralmente seja satisfatório para a avaliação da reação de meloeiro ao oídio (COHEN; EYAL, 1995; HOSOYA et al., 1999; HOSOYA et al., 2000), pode, em determinadas condições, apresentar resultados insatisfatórios como a morte dos discos foliares e a correlação negativa entre a reação de discos e de planta inteira (COHEN, 1993).

Como descrito anteriormente, a reação observada na maioria das folhas foi a considerada para determinar a resistência ou suscetibilidade de uma planta. Escapes da inoculação foram identificados quando não houve o desenvolvimento do fungo em uma folha e em outra (s) folha (s) a suscetibilidade foi incontestável. Nestes casos, observou-se ausência de reação do tecido, o que evidencia o provável escape por inviabilidade do patógeno ou condição ambiental desfavorável à doença. Além disso, em poucos casos não foram observadas nem mesmo as estruturas do inóculo, evidenciando a perda do mesmo. As reações foliares observadas em alguns casos em PI 414723 e em plantas das gerações F₁ e F₂ podem fazer parte do complexo processo de resposta da planta hospedeira ao patógeno, onde se encaixa a reação de hipersensibilidade, como a descrita neste mesmo material por Kuzuya et al. (2006) para a resistência às raças 1, 2-francesa e 5, sendo ainda mais importante neste processo o acúmulo de calose. Pontos de encharcamento também foram identificados nos genótipos MR-1, PI 124111, PI 124112 e PI 313970 resistentes ao oídio, quando as plantas foram cultivadas sob forte pressão de inóculo da raça 2-americana (McCREIGHT, 2002).

De acordo com os resultados da análise da segregação, a resistência às raças 1, 3 e 5 é controlada por um gene dominante de efeito maior em PI 414723. O resultado corrobora estudos anteriores que relatam este mesmo tipo de controle em genótipos de meloeiro (COHEN;

COHEN, 1986; EPINAT; PITRAT; BERTRAND, 1993; KENIGSBUCH; COHEN, 1989, 1992; PERCHEPIED et al., 2005; PITRAT, 1991; TEIXEIRA; SILVA-BARRETO; CAMARGO, 2008). No caso da raça 1 em PI 414723, Anagnostou, Jahn e Perl-Treves (2000) relataram um gene de resistência dominante (*Pm-7*), contradizendo McCreight (1984) que reportou um gene recessivo para resistência a esta raça. Esta aparente contradição pode ser explicada pela heterogeneidade genética de PI 414723. A resistência à raça 3 foi relatada nas introduções PI 414723, PI 124111, MR-1, PI 124112 e em Edisto 47 (McCREIGHT, 2006), no entanto o modo de herança da resistência somente havia sido descrito para PI 124112 e o respectivo gene de efeito principal (*PmV.1*) mapeado (PERCHEPIED et al., 2005). A resistência à raça 5 foi identificada em PI 414723, PI 124111, MR-1, PI 124112, PMR5, PMR6 e AR Hale's Best Jumbo, mas de igual forma, o modo de herança da resistência foi descrito somente para PI 124112 e o respectivo gene (*PmXII.1*) mapeado (PERCHEPIED et al., 2005). Apesar da conhecida resistência de PI 414723 às raças 3 e 5, ainda não havia sido elucidado seu modo de herança a elas. A existência de indivíduos recombinantes foi demonstrada pela análise cuidadosa de quatro plantas, onde foi confirmada uma reação local do tecido às raças 1 e 5 e a consequente ausência de esporulação do fungo e, ao contrário, o desenvolvimento abundante de estruturas reprodutivas da raça 3. Esta análise torna evidente que o gene que confere resistência às raças 1 e 5 (*Pm-x1.5*) é distinto do gene que confere resistência à raça 3 (*Pm-x3*). Em outros genótipos, como PMR 5, WMR 29, PI 124111, PI 124112, AR 5 e TGR-1551 a resistência a mais de uma raça também se dá por mais de um gene como demonstrado por outros autores (EPINAT; BERTRAND; PITRAT, 1993; FUKINO et al., 2004; HARWOOD; MARKARIAN, 1968b; KENIGSBUCH; COHEN, 1989; PERCHEPIED et al., 2005; YUSTE-LISBONA et al., 2010).

2.3.2 Mapeamento genético em meloeiro

O emprego de genitores geneticamente distantes (DANIN-POLEG et al., 2001) resultou numa frequência satisfatória de locos polimórficos em todos os tipos de marcadores, o que facilitou a obtenção de variabilidade suficiente para a construção do mapa. Não obstante, o marcador AFLP apresentou 14% de polimorfismos entre os genitores, correspondendo a um valor inferior ao observado por Périn et al. (2002) (21,7%) entre os mesmos genótipos e cerca da metade do valor observado entre PI 124112 e Védrañtais (29,8%) por Perchepped et al. (2005). O

número de combinações de oligonucleotídeos do presente trabalho foi o mesmo analisado por Périn et al. (2002), sendo 19 combinações (82,6%) comuns a ambos os trabalhos. Em contraste, estes autores obtiveram um valor cerca de três vezes maior de fragmentos polimórficos por combinação. Este menor número de polimorfismos por combinação em relação aos outros trabalhos pode ser devido ao método de revelação dos marcadores que, no caso dos dois artigos em questão deu-se por autoradiografia, ao passo que no presente estudo deu-se por coloração com nitrato de prata que, segundo Christensen et al. (1999) é um método menos sensível. O marcador RGA apresentou 13,6% de polimorfismos, o que representa um valor inferior aos 35% observados por Brotman et al. (2002) no cruzamento Topmark x PI 414723. Apesar desta discrepância, que pode ser creditada ao método pelo qual os marcadores foram gerados, os marcadores RGA obtidos pela técnica TRAP, por serem baseados em PCR, são de mais fácil manipulação do que a técnica RFLP empregada por Brotman et al. (2002). Dentre os 68 marcadores microssatélites inicialmente analisados (dados não apresentados), 52 (76,5%) foram polimórficos entre os genitores PI 414723 e Védrañtais, correspondendo a um valor superior aos observados por Danin-Poleg et al. (2002) entre PI 414723 e Dulce (52%), por Gonzalo et al. (2005) entre ‘Piel de Sapo’ e PI 161375 (49,6%), por Perchepped et al. (2005) entre Védrañtais e PI 124112 (37,7%) e por Fukino et al. (2008) entre AR 5 e Harukei 3 (30,8%). Este alto índice polimórfico era esperado em melão, como já demonstrado por Fernandez-Silva et al. (2008), que identificaram 88% de polimorfismos de microssatélites entre genótipos de meloeiro.

Mais de uma dezena de mapas moleculares elaborados com diferentes tipos de marcadores já foi publicada em meloeiro, sendo os microssatélites os mais usados como pontos de referência para a fusão de mapas genéticos e os marcadores dominantes, como AFLP, para a saturação destes mapas (BAUDRACCO-ARNAS; PITRAT, 1996; DANIN-POLEG et al. 2000; DANIN-POLEG et al., 2002; FUKINO et al., 2008; GONZALO et al. 2005; FERNANDEZ-SILVA et al., 2008; OLIVER et al. 2001; PARIS et al., 2008; PERCHEPIED et al., 2005; PÉRIN et al. 2002; SILBERSTEIN et al. 2003; WANG et al. 1997; YUSTE-LISBONA et al., 2011b; ZALAPA et al. 2007). O número de grupos de ligação observado no mapa genético corresponde ao número básico de cromossomos em melão ($x = 12$), como também observado por Oliver et al. (2001), Périn et al. (2002) e Gonzalo et al. (2005). Em outros mapas genéticos de meloeiro este número variou de 13 (DANIN-POLEG et al., 2000) a 35 grupos (PERCHEPIED et al., 2005). A distância média entre marcadores obtida neste mapa (7,4 cM) encontra-se entre valores já obtidos

em outros trabalhos, onde foram observadas distâncias médias de 2,5 cM (PÉRIN et al., 2002) a 17,7 cM (BAUDRACCO-ARNAS; PITRAT, 1996). O comprimento total do mapa (1.469 cM) foi superior ao tamanho estimado do genoma de 1.182 cM (Oliver et al., 2001), que pode variar de acordo com o método empregado (BAUDRACCO-ARNAS; PITRAT, 1996), mas foi próximo ao de outros mapas como os de Danin-Poleg et al. (2000), Silberstein et al. (2003) e Périn et al. (2002), que apresentaram tamanhos de 1.390 cM, 1.421 cM e 1.654 cM, respectivamente. A maioria dos marcadores não ligados ao mapa foi dominante, totalizando 37 marcadores (26 AFLP e 11 RGA) perante cinco codominantes. Segundo, Oliver et al. (2001), esta discrepância ocorre devido ao fato de marcadores dominantes serem menos informativos para análises de ligação.

Nenhum loco microssatélite apresentou distorção com relação à segregação esperada, no entanto os marcadores AFLP e RGA apresentaram 3,7% e 24% de locos distorcidos, respectivamente, representando 5,3% de distorção perante todos os locos analisados. Este nível de distorção está abaixo do observado por outros autores em cruzamentos de meloeiro, com valores variando de 5,8% a 14% (BAUDRACCO-ARNAS; PITRAT, 1996; OLIVER et al., 2001; WANG et al. 1997), o que significa reduzida ocorrência de seleção pré ou pós zigótica nesta população gerada do cruzamento de um acesso selvagem com uma linhagem comercial.

Em especial, tratando-se do grupo de ligação II, onde foram localizados os genes de resistência *Pm-x1.5* (resistência às raças 1 e 5) e *Pm-x3* (resistência à raça 3), Périn et al. (2002) localizaram o gene *Pm-x* identificado por Pitrat (1991) como o gene que confere resistência à raça 2-francesa. Este autor demonstrou que ligados ao gene *Pm-x* também estavam os genes *a* (andromonóico), *h* (halo cotiledonar) e *Zym-1* (resistência ao vírus ZYMV-0), no entanto a ordem dos genes permaneceu indefinida. O gene *Pm-x* não foi localizado diretamente no grupo de ligação II por Périn et al. (2002), mas sim indiretamente com base no mapeamento dos genes *a*, *h* e *Zym-1*, ligados a ele, que foram localizados na porção terminal do grupo. Portanto, tomados em conjunto, estas evidências apontam para a provável existência de um cluster de genes de resistência a *P. xanthii* neste grupo de ligação, envolvendo *Pm-x*, *Pm-x1.5* e *Pm-x3*. Em adição a isto, recentemente Fukino et al. (2008) identificaram dois QTL em AR 5 para resistência às raças 1 e N1, sendo que um deles, de resistência à raça N1, também foi localizado próximo aos microssatélites CMBR8 e CMBR120 também pertencentes ao grupo de ligação II. No presente estudo, o primeiro marcador não foi incluído no mapa por ser monomórfico entre os genitores, mas o segundo foi localizado a uma distância de 32,6 cM de *Pm-x1.5* e 27,5 cM de *Pm-x3* o que,

numa primeira análise, indicaria que o QTL não faz parte deste suposto cluster. No entanto, levando-se em conta que QTL são entidades estatísticas hipotéticas que dependem da densidade do mapa criado e consequentemente do número de marcadores localizados no grupo de ligação e que, no caso do grupo II definido por Fukino et al. (2008) este apresentou-se truncado e com apenas oito marcadores, não se pode descartar a hipótese de que este QTL faça parte do cluster ou mesmo que seja um dos três genes que o compõe. É possível ainda que o cluster compreenda também os genes de resistência aos vírus ZYMV-0 (*Zym-1*) e WMV2 (*Wmr*), também descritos em PI 414723 (GILBERT et al., 1994, PITRAT, 2006). A saturação desta região genômica com outros marcadores pode fornecer informação mais precisa para esta hipótese. A ocorrência de cluster de genes de resistência a *P. xanthii* foi recentemente demonstrada por Yuste-Lisbona et al. (2011a), que localizaram no grupo V dois genes de resistência pertencentes à família NBS-LRR, sendo um para as raças 1 e 2 (MRGH5) e outro para a raça 5 (MRGH63), ambos ligados aos genes de resistência *Pm-w* e *Vat* de WMR 29. Além do meloeiro, clusters de genes de resistência a oídios também já foram descritos em várias outras espécies, como pepino (GRUMET et al., 2000), macieira (DUNEMANN et al., 2007), videira (COLEMANN et al., 2009), cevada (SEEHOLZER et al., 2010) e trigo (SRICHUMPA et al., 2005). A disposição em cluster parece ser uma característica de genes de resistência, especialmente dos pertencentes à classe NBS-LRR. A organização em clusters favorece altas taxas de *crossing-over* desigual e conversão gênica, que resultam em variabilidade genética (MICHELMORE; MEYERS, 1998) necessária para contrabalancear o alto nível de variabilidade genética de oídios em geral e em especial de *P. xanthii*, onde mudanças na composição racial de populações é frequente (COHEN et al., 2004; LEBEDA et al., 2008). Em adição a isso, combinações específicas de isolados e genes de resistência levam a diferentes níveis de resistência em diferentes estágios de desenvolvimento da planta (FUKINO et al., 2004; BOITEUX et al., 1995), deste modo enquanto a herança monogênica é sugerida por determinado cruzamento, o *background* genético pode afetar a expressão de um gene de resistência de efeito maior (GILBERT et al., 1994). Por conseguinte, a utilização de marcadores na seleção assistida deve levar em conta a natureza da resistência dos genótipos empregados no programa de melhoramento, a fim de que haja sucesso na associação destes marcadores com a característica, pois nem sempre a universalidade de marcadores para a resistência é alcançada, como observado para os marcadores identificados por Yuste-Lisbona et al. (2011a).

O acesso PI 414723 além de possuir os genes *Pm-x*, *Pm-x1.5* e *Pmx-3*, contém também o gene de resistência à transmissão de vírus por *Aphis gossypii* (*Vat*) localizado no grupo de ligação V (BROTMAN et al., 2002; DOGIMONT, 2008). No entanto, o loco *Vat* inclui o gene *Pm-w* de resistência às raças 1, 2 e 3 em WMR 29 e análogos deste loco foram encontrados em PI 414723 (DOGIMONT, 2008), o que sugere um rearranjo neste agrupamento gênico em PI 414723, onde o loco *Vat* permanece no grupo de ligação V e o genes de resistência a oídio no grupo de ligação II. Segundo Freeling et al. (2008), em *Arabidopsis*, cerca de 91% dos genes da família NBS-LRR sofreu transposição. A existência de uma família de *transposon* num cluster de genes de resistência em melão (LEEUEWEN; MONFORT; PUIGDOMENECH, 2007) demonstra que há a possibilidade, durante o processo evolutivo, de transduplicação do cluster de genes de resistência a *P. xanthii* e a permanência de uma cópia única de *Vat* no grupo V.

Nenhum marcador RGA foi mapeado no grupo de ligação II, no entanto estes 18 marcadores apresentaram-se distribuídos entre oito grupos de ligação, dentre os quais há grupos que abrigam genes de resistência (IX, VIII e XII). No grupo IX encontram-se os genes *Fom-1* de resistência às raças 0 e 2 de *Fusarium oxysporum melonis* (PÉRIN et al., 2002), *Pm-1* de resistência à raça 1 de *P. xanthii* (TEIXEIRA; SILVA-BARRETO; CAMARGO, 2008) e os alelos de resistência ao potivírus WMV-1 (*Prv¹* e *Prv²*) (PITRAT; LECOQ, 1983; TEIXEIRA; CAMARGO, 2006; WEBB, 1979). No grupo VIII, Yuste-Lisbona et al. (2011) identificaram uma possível região onde se localiza o gene recessivo complementar para resistência às raças 1, 2 e 5 de *P. xanthii*. Por fim, no grupo XII estão mapeados os genes de resistência ao carmovírus NSV (*nsv*) (COUDRIET et al., 1981), às raças 2 (*Pm-y*) (PITRAT, 1991; PÉRIN et al., 2002) e 5 (*PmXII.1*) de *P. xanthii*, à raça 1 de *Golovinomyces cichoracearum* (*PmXII.1*) e a *Pseudoperonospora cubensis* (*pcXII.1*) (PERCHEPIED et al., 2005). O grupo de ligação X, que apresentou o maior número de marcadores RGA não possui genes de resistência localizados descritos na literatura.

A maioria das cultivares utilizadas comercialmente apresenta resistência às raças 0, 1 e 2 de oídio (PITRAT et al., 1996). Como sugerido pelo piramidamento gênico, a resistência em alguns genótipos já se dá por mais de um gene (EPINAT; BERTRAND; PITRAT, 1993; FUKINO et al., 2008; PERCHEPIED et al., 2005; YUSTE-LISBONA et al., 2010), demonstrando a possibilidade da geração de cultivares com resistência a um maior número de raças. Os resultados do presente trabalho indicaram que os genes de resistência de PI 414723 são

distintos dos descritos em materiais como PI 124112 (PERCHEPIED et al., 2005) e TGR-1551 (YUSTE-LISBONA et al., 2010). Testes de alelismo, a exemplo dos realizados por McCreight et al. (1987) e Epinat, Bertrand e Pitrat (1993), também são necessários, envolvendo PI 414723 e outros genótipos resistentes, como PMR 5 que é ancestral de AR 5 (McCREIGHT; KISHABA; BOHN, 1984). A incorporação dos genes de PI 414723 aqui relatados em pirâmides gênicas pode ser grandemente facilitada se o marcador AFLP (H35M75_156), proximamente ligado a eles, for convertido em um marcador codominante. Desta forma, considerando que o emprego de cultivares com resistência múltipla é de extrema importância e necessidade face à ampla área de cultivo do meloeiro e ocorrência generalizada da doença, o uso de PI 414723 em programas de melhoramento da cultura favorece a geração de cultivares com resistência a viroses, inseto e oídio.

3 CONCLUSÕES

- O controle genético da resistência às raças 1, 3 e 5 de *P. xanthii* em PI 414723 é conferido por um gene dominante de efeito maior;
- O gene de resistência às raças 1 e 5 (*Pm-x1.5*) é distinto do gene de resistência à raça 3 (*Pm-x3*);
- Os genes *Pm-x1.5* e *Pm-x3* estão ligados entre si e localizados no grupo de ligação II;
- O acesso PI 414723 apresenta um bom potencial para ser empregado em programas de melhoramento, por possuir genes de resistência a oídio distintos de outros mapeados em genótipos resistentes.

REFERÊNCIAS

- AKASHI, Y.; FUKUDA, N.; WAKO, T.; MASUDA, M.; KATO, K. Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melons, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes. **Euphytica**, Heidelberg, v. 125, p. 385-396, 2002.
- ANAGNOSTOU, K.; JAHN, M.; PERL-TREVES, R. Inheritance and linkage analysis of resistance to zucchini yellow mosaic virus, watermelon mosaic virus, papaya ringspot virus and powdery mildew in melon. **Euphytica**, Heidelberg, v. 116, p. 265-270, 2000.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 9, n.4, p. 208-218, 1991.
- BAUDRACCO-ARNAS, S.; PITRAT, M. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 93, p. 57-64, 1996.
- BERTRAND, F. AR Hale's Best Jumbo, a new differential melon variety for *Sphaerotheca fuliginea* races in leaf disk tests. In: CUCURBITACEAE 2002, 2002, Naples. **Proceedings...**Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 234-237.
- BOHN, G.W.; WHITAKER, T.W. Genetics of resistance to powdery mildew race 2 in muskmelon. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 54, p. 587-591, 1964.
- BOISSOT, N.; THOMAS, S.; SAUVION, N.; MARCHAL, C.; PAVIS, C.; DOGIMONT, C. Mapping and validation of QTLs for resistance to aphids and whiteflies in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.121, n.1, p.117-125, 2010.
- BOITEUX, L.S.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; PESSOA, H.B.S.V. Phenotypic expression of quantitative and qualitative components of partial resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea* race 1) in melon (*Cucumis melo*) germplasm. **Plant Breeding**, Hoboken, v. 114, p. 185-187, 1995.
- BROTMAN, Y.; SILBERSTEIN, L.; KOVALSKI, I.; KLINGLER, J.; THOMPSON, G.; KATZIR, N.; PERL-TREVES, R. Linkage groups of *Cucumis melo*, including resistance gene homologues and known genes. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 510, p. 441-448, 2000.
- BROTMAN, Y.; SILBERSTEIN, L.; KOVALSKI, I.; PERIN, C.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; KLINGLER, J.; THOMPSON, G.A.; PERL-TREVES, R. Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 104, p. 1055-1063, 2002.
- CHIBA, N; SUWABE, K; NUNOME, T; HIRAI, M. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. **Breeding Science**, Tokyo, v. 53, p. 21-27, 2003.

CHRISTENSEN, M.; SUNDE, L.; BOLUND, L.; ORNTOFT, T.F. Comparison of three methods of microsatellite detection. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation**, London, v. 59, p. 167-178, 1999.

COHEN, R. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 513-517, 1993.

COHEN, S.; COHEN, Y. Genetics and nature of resistance to race 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in *Cucumis melo* PI 124111. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 11, p. 1165-1167, 1986.

COHEN, Y., EYAL, H. Differential expression of resistance to powdery mildew incited by race 1 and 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in *Cucumis melo* genotypes at various stages of plant development. **Phytoparasitica**, Heidelberg, v. 23, p. 223-230, 1995.

COHEN, R.; BURGER, Y.; KATZIR, N. Monitoring physiological races of *Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), the causal agent of powdery mildew in cucurbits: factors affecting race identification and the importance for research and commerce. **Phytoparasitica**, Heidelberg, v. 32, n. 2, p. 174-183, 2004.

COLEMAN, C.; COPETTI, D.; CIPRIANI, G.; HOFFMANN, S.; KOZMA, P.; KOVÁCS, L.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R.; GASPERO, G. Di The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. **BMC Genetics**, London, v. 10, p. 89, 2009.

COUDRIET, D.L.; A.N. KISHABA; G.W. BOHN Inheritance of resistance to muskmelon necrotic spot virus in a melon aphid resistant breeding lines of muskmelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, p. 789-791, 1981.

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

DANIN-POLEG, Y.; REIS, N.; TZURI, G.; KATZIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 102, p. 61-72, 2001.

DANIN-POLEG, Y.; REIS, N.; BAUDRACCO-ARNAS, S.; PITRAT, M.; STAUB, J.E.; OLIVER, M.; ARUS, P.; deVICENTE, C.M.; KATZIR, N. Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 963-974, 2000.

DANIN-POLEG, Y.; TADMOR, Y.; TZURI, G.; REIS, N.; HIRSCHBERG, J.; KATZIR, N. Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. **Euphytica**, Heidelberg, v. 125, p. 373-384, 2002.

- DHILLON, N.P.S.; RANJANA, R.; SINGH, K.; EDUARDO, I.; MONFORTE, A.J.; PITRAT, M.; DHILLON, N.K.; SINGH, P.P. Diversity among landraces of Indian snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Heidelberg, v.54, n.6, p.1267-1283, 2007.
- DOGIMONT, C.; CHOVELON, V.; TUAL, S.; BOISSOT, N.; RITTENER, V.; GIOVINAZZO, N.; BENDAHMANE, A. Molecular diversity at the Vat/Pm-W resistance locus in melon. In: CUCURBITACEAE 2008/EUCARPIA MEETING ON GENETICS AND BREEDING OF CUCURBITACEAE, 9., 2008, Avignon. **Proceedings...** Alexandria: ASHS Press, 2008. p. 219-227.
- DUNEMANN, F.; PEIL, A.; URBANIETZ, A.; GARCIA-LIBREROS, T. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *Pll* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene. **Plant Breeding**, Hoboken, v. 126, p. 476-481, 2007.
- EPINAT, C.; PITRAT, M.; BERTRAND, F. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildews. **Euphytica**, Heidelberg, v. 65, p. 135-144, 1993.
- FAZIO, G.; STAUB, J.E.; CHUNG, S.M. Development and characterization of PCR markers in cucumber. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, p. 545-557, 2002.
- FERNANDEZ-SILVA, I.; EDUARDO, I.; BLANCA POSTIGO, J.; ESTERAS, C.; PICO, B.; NUEZ VINALS, F.; ARUS, P.; GARCIA-MAS, J.; MONFORTE, A. Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 118, p. 139-150, 2008.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220 p.
- FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Melão. In _____. **Agrianual 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2011. p. 355-358.
- FREELING, M.; LYONS, E.; PEDERSEN, B.; ALAM, M.; MING, R.; LISCH, D. Many or most genes in Arabidopsis transposed after the origin of the order Brassicales. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, p. 1924-1937, 2008.
- FUKINO, N.; KUNIHISA, M.; MATSUMOTO, S. Characterization of recombinant inbred lines derived from crosses in melon (*Cucumis melo* L.), AR 5 'Harukei No. 3'. **Breeding Science**, Tokyo, v. 54, p. 141-145, 2004.
- FUKINO, N.; SAKATA, Y.; KUNIHISA, M.; MATSUMOTO, S. Characterisation of novel simple sequence repeat (SSR) markers for melon (*Cucumis melo* L.) and their use for genotype identification. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Leuven, v. 82, n. 2, p. 330-334, 2007.

FUKINO, N.; OHARA, T.; MONFORTE, A.J.; SUGIYAMA, M.; SAKATA, Y.; KUNIHISA, M.; MATSUMOTO, S. Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.).

Theoretical and Applied Genetics, Heidelberg, v. 118, p. 165-175, 2008.

GILBERT, R.Z.; KYLE, M.M.; MUNGER, H.M.; GRAY, S.M. Inheritance of resistance to watermelon mosaic virus in *Cucumis melo* L. **HortScience**, Alexandria, v. 29, p. 107-110, 1994.

GONZALO, M.J.; OLIVER, M.; GARCIA-MAS, J.; MONFORT, A.; DOLCET-SANJUAN, R.; KATZIR, N.; ARÚS, P.; MONFORTE, A.J. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 110, p. 802-811, 2005.

GRUMET, R.; KABELKA, E.; MCQUEEN, S.; WAI, T.; HUMPHREY, R. Characterization of sources of resistance to the watermelon strain of *Papaya ringspot virus* in cucumber: allelism and co-segregation with other potyvirus resistances. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 101, p. 463-472, 2000.

HARWOOD, R.R.; MARKARIAN, D. The inheritance of resistance to powdery mildew in the cantaloupe variety Seminole. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 59, p. 126-130, 1968a.

HARWOOD, R.R.; MARKARIAN, D. A genetic survey of resistance to powdery mildew in Muskmelon. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 59, p. 213-217, 1968b.

HOSOYA, K.; NARISAWA, K.; PITRAT, M.; EZURA, H. Race identification in powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo*) in Japan. **Plant Breeding**, Hoboken, v. 118, p. 259-262, 1999.

HOSOYA, K.; KUZUYA, M.; MURAKAMI, T.; KATO, K.; NARISAWA, K.; EZURA, H. Impact of resistant melon cultivars on *Sphaerotheca fuliginea*. **Plant Breeding**, Hoboken, v. 119, p. 286-288, 2000.

HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 21, p. 289-294, 2003.

JAHN, M.; MUNGER, H.M.; McCREIGHT, J.D. Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In: BÉLANGER, R.R.; BUSHNELL, W.R.; DIK, A.J.; CARVER, L.W. **The Powdery mildews: A Comprehensive treatise**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2002. chap. 15, p. 239-248.

JIANG, C.; ZENG, Z.-B. Mapping quantitative trait loci with dominant and missing markers in various crosses from two inbred lines. **Genetica**, Heidelberg, v.101, p. 47-58, 1997.

KATZIR, N.; DANIN-POLEG, Y.; TZURI, G.; KARCHI, Z.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 93, 1282-1290, 1996.

- KENIGSBUCH, D.; COHEN, Y. Independent inheritance of resistance to race 1 and race 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in muskmelon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 206-208, 1989.
- KENIGSBUCH, D.; COHEN, Y. Inheritance and allelism of genes for resistance to races 1 and 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in muskmelon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, p. 626-629, 1992.
- KERJE, T.; GRUM, M. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 510, p. 37-44, 2000.
- KOBORI, R.F.; SUZUKI, O.; WIERZBICKI, R.; VECCHIA, P.T.D.; CAMARGO, L.E.A. Occurrence of *Podosphaera xanthii* race 2 on *Cucumis melo* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1161, 2004.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, Hoboken, v. 12, n. 3, p. 172-175, 1944.
- KRÍSTKOVÁ, C.; LEVEDA, A.; SEDLÁKOVÁ, B. Virulence of Czech cucurbit powdery mildew isolates on *Cucumis melo* genotypes MR-1 and PI 124112. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 257-265, 2004.
- KUZUYA, M.; YASHIRO, K.; TOMITA, K.; EZURA, H. Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) resistance in melon is categorized into two types based on inhibition of the infection processes. **Journal of Experimental Botany**, Cary, v. 57, n. 9, p. 2093-2100, 2006.
- LALLI, D.A.; DECROOCQ, V.; BLENDIA, A.V.; SCHURDI-LEVRAUD, V.; GARAY, L.; LE GALL, O.; DAMSTEEGT, V.; REIGHARD, G.L.; ABBOTT, A.G. Identification and mapping of resistance gene analogs (RGAs) in *Prunus*: a resistance map for *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 111, p. 1504-1513, 2005.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALEY, M.; LINCOLN, S.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural population. **Genomics**, Amsterdam, v. 1, p. 174-181, 1987.
- LEBEDA, A.; KRÍSTKOVÁ, E.; SEDLÁKOVÁ, B.; MCCREIGHT, J.D.; COFFEY, M.D. New concept for determination and denomination of pathotypes and races of cucurbit powdery mildew. In: CUCURBITACEAE 2008/EUCARPIA MEETING ON GENETICS AND BREEDING OF CUCURBITACEAE, 9., 2008, Avignon. **Proceedings...** Alexandria: ASHS Press, 2008. p. 125-134.
- LEEUEWEN, H. van; MONFORT, A.; PUIGDOMENECH, P. Mutator-like elements identified in melon, Arabidopsis and rice contain ULP1 protease domains. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 277, p. 357-364, 2007.
- LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 103, p. 455-461, 2001.

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

LONGZHOU, L.; XIAOJUN, Y.; RUN, C.; JUNSONG, P.; HUANLE, H.; LIHUA, Y.; YUAN, G.; LIHUANG, Z. Quantitative trait loci for resistance to powdery mildew in cucumber under seedling spray inoculation and leaf disc infection. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 156, p. 691-697, 2008.

LÓPEZ-SESÉ, A.I. ; STAUB, J.; KATZIR, N.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L. Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. **Euphytica**, Heidelberg, v. 127, p. 41-51, 2002.

LUAN, F.; DELANNAY, I.; STAUB, J.E. Chinese melon (*Cucumis melo* L.) diversity analyses provide strategies for germplasm curation, genetic improvement, and evidentiary support of domestication patterns. **Euphytica**, Heidelberg, v. 164, p. 445-461, 2008.

McCREIGHT, J.D. Evidence of a recessive powdery mildew resistance gene in muskmelon PI 414723. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Raleigh, v. 7, p.45, 1984.

McCREIGHT, J.D. Reactions of 20 melon cultigens to powdery mildew race 2U.S. In: CUCURBITACEAE 2002, 2002, Naples. **Proceedings...**Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 72-77.

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

McCREIGHT, J.D.; BOHN, G.W.; KISHABA, A.N. 'Pedigree' PI 414723 melon. **Cucurbit Genetics Cooperative**, Raleigh, v.15, p. 51-52, 1992.

McCREIGHT, J.D.; KISHABA, A.N.; BOHN, G.W. AR Hale's Best Jumbo, AR 5, and AR Topmark: Melon aphid-resistant muskmelon breeding lines. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 2, p. 309-310, 1984.

McCREIGHT, J.D.; PITRAT, M.; THOMAS, C.E.; KISHABA, A.N.; BOHN, G.W. Powdery mildew resistance genes in muskmelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 1, p. 156-160, 1987.

MIKLAS, P.N.; HU, J.; GRUNWALD, N.J.; LARSEN, K.M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 910-916, 2006.

- MICHELMORE, R.W.; MEYERS, B.C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 1113-1130, 1998.
- MORALES, M.; ORJEDA, G.; NIETO, C.; VAN LEEUWEN, H.; MONFORT, A.; CHARPENTIER, M.; CABOCHE, M.; ARUS, P.; PUIGDOMENECH, P.; ARANDA, M.A.; DOGIMONT, C.; BENDAHDANE, A.; GARCIA-MAS, J. A physical map covering the nsv locus that confers resistance to Melon necrotic spot virus in melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 111, p. 914-922, 2005.
- NICOT, P.C.; BARDIN, M.; DIK, A.J. Basic methods for epidemiological studies of powdery mildew: Culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. In: BÉLANGER, R.R.; BUSHNELL, W.R.; DIK, A.J.; CARVER, L.W. **The Powdery mildews: A Comprehensive treatise**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2002. chap. 5, p. 83-99.
- OLIVER, M.; GARCIA-MAS, J.; CARDUS, M.; PUEYO, N.; LOPEZ-SESE, A.; ARROYO, M.; GOMEZ-PANIAGUA, H.; ARUS, P.; DE VINCENTE, M.C. Construction of a reference linkage map for melon. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 836-845, 2001.
- PARIS, M.K.; ZALAPA, J.E.; McCREIGHT, J.D.; STAUB, J.E. Genetic dissection of fruit quality components in melon (*Cucumis melo* L.) using a RIL population derived from exotic 3 elite US Western Shipping germplasm. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 22, p. 405-419, 2008.
- PERCHEPIED, L.; BARDIN, M.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M. Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 556-565, 2005.
- PÉRIN, C.; HAGEN, L.S.; DE CONTO, V.; KATZIR, N.; DANIN-POLEG, Y.; PORTNOY, V.; BAUDRACCO-ARNAS, S.; CHADOEUF, J.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred lines populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 104, p. 1017-1034, 2002.
- PITRAT, M. Linkage groups in *Cucumis melo* L. **Journal of Heredity**, Hoboken, v. 82, p. 406-411, 1991.
- PITRAT, M. 2006 Gene list for melon. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Raleigh, v. 28-29, p. 142-163, 2005-2006.
- PITRAT, M.; BESOMBES, D. Inheritance of *Podosphaera xanthii* resistance in melon line '90625'. In: CUCURBITACEAE 2008/EUCARPIA MEETING ON GENETICS AND BREEDING OF CUCURBITACEAE, 9., 2008, Avignon. **Proceedings...** Alexandria: ASHS Press, 2008. p. 135-142.
- PITRAT, M.; LECOQ, H. Two alleles for Watermelon Mosaic Virus 1 resistance in melon. **Cucurbit Genetics Cooperative Reporter**, Raleigh v. 6, p. 52-53, 1983.

PITRAT, M.; RISSER, G.; BERTRAND, F.; BLANCARD, D.; LECOQ, H. Evaluation of a melon collection for disease resistances. In: CUCURBITACEAE '96: CUCURBITS TOWARDS 2000/EUCARPIA MEETING ON CUCURBIT GENETICS AND BREEDING, 6., 1996, Málaga. **Proceedings...** Alexandria: ASHS Press, 1996. p. 49 - 58.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; BOITEUX, L.S.; OCCHIENA, E.M. Powdery mildew of melon (*Cucumis melo*) caused by *Sphaerotheca fuliginea* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, p. 1069–1070, 1985.

REIS, A.; BUSO, J.A. Levantamento preliminar de raças de *Sphaerotheca fuliginea* no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p. 462-465, 2004.

RITSCHER, P.S.; LINS, T.C.; TRISTAN, L.; BUSO, G.S.C.; BUSO, J.A.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 4, p. 9, 2004. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/9>>. Acesso em: 04 abril 09.

ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS, D.S. **Cucurbits**. Cambridge: CAB International, 1997. 226p.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Eds.) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

SANTOS, A.A.; CRISÓSTOMO, J.R.; CARDOSO, J.W. **Avaliação de híbridos de melão quanto às principais doenças nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 14p.

SEEHOLZER, S.; TSUCHIMATSU, T.; JORDAN, T.; BIERI, S.; PAJONK, S.; YANG, W.; JAHOOOR, A.; SHIMIZU, K.K.; KELLER, B.; SCHULZE-LEFERT, P. Diversity at the *Mla* powdery mildew resistance locus from cultivated barley reveals sites of positive selection. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, n. 4, p. 497-509, 2010.

SHISHKOFF, N. The name of the cucurbit powdery mildew: *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish. comb. nov. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90:S133, 2000.

SILBERSTEIN, L.; KOVALSKI, I.; BROTMAN, Y.; PERIN, C.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; KLINGLER, J.; THOMPSON, G.; PORTNOY, V.; KATZIR, N.; PERL-TREVES, R. Linkage map of *Cucumis melo* including phenotypic traits and sequence-characterized genes. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 761-773, 2003.

SOLTANI, F.; KASHI, A.; ZAMANI, Z.; MOSTOFI, Y.; AKASHI, Y.; KATO, K. Characterization of Iranian melon landraces of *Cucumis melo* L. groups Flexuosus and Dudaim by analysis of morphological characters and random amplified polymorphic DNA. **Breeding Science**, Tokyo, v.60, n.1, p.34-45, 2010.

SRICHUMPA, P.; BRUNNER, S.; KELLER, B.; YAHIAOUI, N. Allelic series of four powdery mildew resistance genes at the *Pm3* locus in hexaploid bread wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 885-895, 2005.

TEIXEIRA, A.P.M.; CAMARGO, L.E.A. A molecular marker linked to the *Prv*¹ gene that confers resistance to Papaya ringspot virus-type W in melon. **Plant Breeding**, Hoboken, v. 125, p. 187-190, 2006.

TEIXEIRA, A.P.M.; SILVA-BARRETO, F.A., CAMARGO, L.E.A. An AFLP marker linked to the *Pm-1* gene that confers resistance to *Podosphaera xanthii* race 1 in *Cucumis melo*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 547–550, 2008.

THOMAS, C.E.; KISHABA, A.N.; McCREIGHT, J.D.; NUGENT, P.E. The importance of monitoring races of powdery mildew on muskmelon. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Raleigh, v.7, p.58-59, 1984.

TZITZIKAS, E.N.; MONFORTE, A.J.; FATIHI, A.; KYPRIOTAKIS, Z.; IACOVIDES, T.A.; IOANNIDES, I.M.; KALAITZIS, P. Genetic diversity and population structure of traditional greek and cypriot melon cultigens (*Cucumis melo* L.) based on simple sequence repeat variability. **HortScience**, Alexandria, v.44, n.7, p.1820-1824, 2009.

TZURI, G.; PORTNOY, V.; DAUBE-MOZES, N.; KATZIR, N. Genetic diversity of melon (*Cucumis melo* L.) estimated by SSR markers. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Raleigh, v. 28-29, p. 14-16, 2005-2006.

VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Hoboken, v. 93, p. 77–78, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Hoboken, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, Y.; THOMAS, C.E.; DEAN, R.A. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 95, p. 791–798, 1997.

WEBB, R.E. Inheritance of resistance to watermelon mosaic virus in *Cucumis melo* L. **HortScience**, Alexandria, v. 14, p. 265-266, 1979.

XIE, C.; XU, S. Mapping quantitative trait loci with dominant markers in four-way crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.98, p. 1014-1021, 1999.

YUSTE-LISBONA, F.J.; LÓPEZ-SESÉ, A.I.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L. Inheritance of resistance to races 1, 2 and 5 of powdery mildew in the melon TGR-1551. **Plant Breeding**, Hoboken, v. 129, p. 72-75, 2010.

YUSTE-LISBONA, F.J.; CAPEL, C.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L.; CAPEL, J.; LÓPEZ-SESE, A.I.; LOZANO, R. Codominant PCR-based markers and candidate genes for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 122, p. 747-758, 2011a.

YUSTE-LISBONA, F.J.; CAPEL, C.; SARRIA, E.; TORREBLANCA, R.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L.; CAPEL, J.; LOZANO, R.; LÓPEZ-SESE, A.I. Genetic linkage map of melon (*Cucumis melo* L.) and localization of a major QTL for powdery mildew resistance. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 27, p. 181-192, 2011b.

ZALAPA, J.E.; STAUB, J.E.; McCREIGHT, J.D.; CHUNG, S.M.; CUEVAS, H. Detection of QTL for yield-related traits using recombinant inbred lines derived from exotic and elite US Western Shipping melon germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 114, p. 1185-1201, 2007.

ZVIRIN, T.; HERMAN, R.; BROTMAN, Y.; DENISOV, Y.; BELAUSOV, E.; FREEMAN, S.; PERL-TREVES, R. Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1.2. **Plant Pathology**, Hoboken, v.59, n.3, p.576-585, 2010.