

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

Identificação de marcador molecular ligado ao gene *Pm-1* que confere resistência a raça 1 de oídio (*Podosphaera xanthii*) em melão (*Cucumis melo* L.)

Fatima Aparecida da Silva-Barreto

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba

2007

Fatima Aparecida da Silva-Barreto
Engenheiro Agrônomo

**Identificação de marcador molecular ligado ao gene *Pm-1* que confere
resistência a raça 1 de oídio (*Podosphaera xanthii*) em melão (*Cucumis melo* L.)**

Orientador:

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba

2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Silva-Barreto, Fatima Aparecida da

Identificação de marcador molecular ligado ao gene *Pm-1* que confere resistência a raça 1 de oídio (*Podosphaera xanthii*) em melão (*Cucumis melo* L.) / Fatima Aparecida da Silva-Barreto. - - Piracicaba, 2007.

54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Genes 2. Marcador molecular 3. Melão 4. Oídio 5. Resistência genética vegetal
I. Título

CDD 635.61

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

Aos meus pais Francisco e Maria,
meus irmãos Sônia, Jorge e Eduardo,
e às minhas sobrinhas Camila,
Caroline e Ana Beatriz pelo apoio
mesmo distante, amor e carinho
sempre, *DEDICO*.

"... A opinião é uma crença que tem consciência de ser insuficiente tanto subjetiva quanto objetivamente. Se a crença é apenas subjetivamente suficiente e se é ao mesmo tempo considerada objetivamente insuficiente, chama-se fé. Enfim, a crença suficiente tanto subjetiva quanto objetivamente chama-se ciência".

Emmanuel Kant

Ao Douglas, pela paciência,
companheirismo, dedicação e amor,
OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela confiança, orientação, apoio e dedicação.

Ao professor Hiroshi Kimati pelos ensinamentos, dedicação, serenidade e principalmente a alegria que sempre contagiou a todos.

Aos grandes amigos do LGM: Aninha, Bruno, Carol, Claudinha, Cynthia, Daniel, Danilo, Emerson, Erikinha, Fer, Izabela, Júlia (Ju), Juliana (Ju), Kátia, Lílian (Bibian), Marcelo, Márcia (Pá Moreno), Patrícia, Rapha, Sandra, Thayne (Thá), Reinaldo e Vivyan, pela parceria, amizade e companheirismo.

Aos funcionários da empresa Sakata Seed Sudamerica pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Fitopatologia: Carmem, Edivaldo, Fernanda, Heloísa, Jefferson, Liliane, Linda, Pedro, Rodolfo, Sandrinha e Sílvia, pelo auxílio.

A todos os professores pelo auxílio durante minha formação acadêmica.

Aos alunos do curso de pós-graduação pelos momentos passados juntos em aulas e outros eventos em especial Alessandra, Maria Cândida, Vanessa e Marisa.

À Amanda pelas conversas que foram essenciais nesta fase de minha vida e também ao Enzo por me ouvir.

A todos que colaboraram direta e indiretamente neste trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido pra realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Origem e importância econômica do meloeiro.....	9
2.2 Patossistema melão vs <i>Podosphaera xanthii</i>	10
2.3 Marcadores moleculares.....	12
2.3.1 Marcadores moleculares ISSRs.....	12
2.3.2 Marcadores baseados em iniciadores degenerados.....	13
2.3.3 Marcadores AFLPs.....	15
2.4 Seleção assistida por marcadores.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Material vegetal.....	17
3.2 Análise da reação das plantas da população RC1F1 à raça 1 de <i>Podosphaera xanthii</i>	18
3.3 Extração de DNA.....	19
3.4 Desenvolvimento e genotipagem de LQIs com marcadores RGAs.....	19
3.5 Genotipagem de LQIs com marcadores ISSR.....	21
3.6 Genotipagem de LQIs com marcadores gerados por meio de LM-PCR.....	23
3.7 Genotipagem de LQIs com marcadores AFLP.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Análise da reação das plantas da população RC1F1 à inoculação com o isolado da raça 1 de <i>Podosphaera xanthii</i>	29
4.2 Amplificação de fragmentos análogos a genes de resistência (RGAs).....	30
4.3 Genotipagem de LQIs com marcadores ISSR.....	33
4.4 Genotipagem das LQIs com marcadores gerados por meio de LM-PCR.....	33
4.5 Genotipagem das LQIs e RC1F1 por meio de AFLP.....	38
5 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS.....	50

RESUMO

Identificação de marcador molecular ligado ao gene *Pm-1* que confere resistência a raça 1 de oídio (*Podosphaera xanthii*) em melão (*Cucumis melo* L.)

A cultura do meloeiro é de grande importância econômica no Brasil, sendo a região Nordeste a principal produtora e exportadora do fruto. A baixa resistência aos principais patógenos é um dos fatores limitantes para a competitividade brasileira da cultura no mercado internacional. Uma das doenças mais importantes é o oídio, causado por *Podosphaera xanthii*. Geralmente, o controle de *P. xanthii* é obtido com o uso de fungicidas. Porém, é necessário empregar medidas mais econômicas e que não agridam o ambiente, como a utilização de cultivares resistentes. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores moleculares de vários tipos ligados ao gene *Pm-1* de resistência à raça 1 de *P. xanthii* com o intuito de auxiliar programas de melhoramento genético. Para tanto foram utilizadas duas linhagens quase-isogênicas (LQI) de melão AF426^{Pm1} (P1) e AF426^{Pm1} (P2), ambas pertencentes à variedade *inodorus*, que são contrastantes para ausência e presença, respectivamente, do gene *Pm-1*. Para a análise de co-segregação entre gene e marcadores candidatos, foi utilizada uma população de retrocruzamento RC1F1, fenotipada para resistência a raça 1 de oídio, obtida a partir do cruzamento entre linhagens. As técnicas de LM-PCR e AFLP resultaram em marcadores polimórficos, porém somente os encontrados com a técnica de AFLP puderam ser utilizados como marcadores no teste de co-segregação. Foram encontrados dois marcadores AFLP. No entanto, somente um, denominado HF155 mostrou-se ligado a uma distância de 4,9 cM do gene *Pm-1*. Devido à proximidade deste marcador ao gene este pode ser utilizado em programas de seleção assistida por marcadores, visando o melhoramento de linhagens com resistência ao *P. xanthii*.

Palavras-chave: *Podosphaera xanthii*; Oídio; AFLP; LM-PCR

ABSTRACT

Identification of molecular marker linked to the *Pm-1* gene that confers resistance to race 1 of to powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) in melon (*Cucumis melo* L.)

Melon crop is of great economical importance in Brazil being the Northeast region the main producer and exporter of the fruit. The low levels of resistance to pathogens is one of the restricting factors for the Brazilian competitiveness worldwide. One of the most important diseases is powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii*. Generally, the control of *P. xanthii* is achieved with the use of fungicides. However it is necessary to use less expensive control methods with a minimum environmental impact such as resistant cultivars. The objective of this work was to identify molecular markers linked to the *Pm-1* gene which confers resistance to race 1 of *P. xanthii* with the purpose of assisting breeding program. Two near isogenic lines (LQIs) of melon Agro AF426^{Pm1} (P1) and AF426^{Pm1} (P2), both belonging to the *inodorus* variety, which are respectively contrasting for absence and presence of *Pm-1* gene were analyzed. For the co-segregation analyses between gene and candidate markers, it was used the BC1F1 population was used screened for resistance to powdery mildew and obtained from a cross between the LQIs. The LM-PCR and AFLP techniques were efficient in the polymorphisms detection, however only those ones which were found using AFLP technique could be used as markers in the co-segregation test. It was found two markers with this technique but just the HF155 is located 4.9 cM of the *Pm-1* gene. Due the proximity of the HF155 marker to the *Pm-1* gene this one can be used in marker-assisted selection aiming to develop melon cultivars resistant to *P. xanthii*.

Keywords: *Podosphaera xanthii*; Powdery mildew; AFLP; LM-PCR

1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família das Cucurbitáceas, é uma espécie originada da África e tem um amplo centro de diversidade, que se estende do Mar Mediterrâneo ao leste asiático (DIAZ et al., 2003). No Brasil, a cultura do meloeiro é de grande importância econômica. Atualmente, a região Nordeste é a principal produtora do fruto com cerca de 330 mil toneladas de frutos por ano (FNP, 2005). Praticamente toda a produção brasileira ocorre no Nordeste e mais da metade é destinada à exportação, que é favorecida por ocorrer no período de entressafra da Espanha (setembro a março) que é o principal produtor europeu. Em 2006 o Nordeste brasileiro exportou US\$ 88.210.065,00, o equivalente a mais de 172 mil toneladas do fruto (SECEX, 2007).

A baixa resistência aos principais patógenos é um dos fatores limitantes para a competitividade brasileira desta cultura no mercado internacional. Entre os problemas fitossanitários mais importantes está o oídio, causado por *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castag) U. Braun & N. Shish. Geralmente, o controle de *P. xanthii* é obtido com o uso de fungicidas. Porém, este método nem sempre é eficiente, pois o fungo pode apresentar redução na sensibilidade aos produtos químicos. Além disto, sua utilização representa um custo adicional ao produtor. Portanto, torna-se necessário utilizar medidas que minimizem ou evitem tais perdas e não agridam o ambiente, como a utilização de cultivares resistentes, que normalmente são obtidas por meio de melhoramento convencional. No entanto, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) pode agilizar este processo, uma vez que possibilita a seleção precoce de cultivares resistentes, além de reduzir a necessidade de fenotipagem, diminuindo efetivamente os custos do programa de melhoramento.

Este trabalho, objetivou identificar marcadores moleculares de vários tipos ligados ao gene *Pm-1* de resistência à raça 1 de *P. xanthii* por meio de análise genética de linhagens quase isogênicas (LQIs) com o intuito de auxiliar e acelerar o programa de melhoramento genético desta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem e importância econômica do meloeiro

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família das Cucurbitáceas, é uma espécie originada da África e tem um amplo centro de diversidade, que se estende do Mar Mediterrâneo ao leste asiático (DIAZ et al., 2003). No Brasil, a cultura foi introduzida no século passado por imigrantes europeus em meados da década de 60 no Rio Grande do Sul (SOUSA et al., 1999).

A diversidade morfológica e fisiológica da espécie é grande, como tamanho da planta, tamanho do fruto, teor de sólidos solúveis, acidez da polpa, cor da polpa, cor da casca, sabor e aroma. O tipo mais adaptado ao clima brasileiro é o do grupo *inodorus*, que possui coloração uniforme, aroma ausente ou muito suave, comportamento não climatérico e uma alta durabilidade no armazenamento.

A região Nordeste é a principal produtora, com cerca de 330 mil toneladas de frutos por ano (FNP, 2005), devido ao emprego de alta tecnologia e às condições edafoclimáticas favoráveis, que permitem o cultivo da planta praticamente o ano todo. A região do Submédio São Francisco cultiva 2.500 ha de melão, concentrados nos municípios de Juazeiro, Curaçá e Sento Sé, no estado da Bahia, e Santa Maria da Boa Vista e Petrolina, em Pernambuco (ARAÚJO; CORREIA; ALELUIA, 2005). Mais da metade da produção é destinada à exportação, que é favorecida por ocorrer no período de entressafra da Espanha (setembro a março) que é o principal produtor europeu. Em 2006, o Nordeste brasileiro exportou US\$ 88.210.065,00, o equivalente a mais de 172 mil toneladas do fruto (SECEX, 2007).

A baixa resistência às principais doenças desta cultura é um dos fatores limitantes para a competitividade brasileira no mercado. Problemas fitossanitários agravados pelo cultivo intensivo e contínuo freqüentemente acometem a cultura no Nordeste brasileiro, destacando-se, entre eles, doenças causadas por *Podosphaera xanthii* (oídio), *Didymella bryoniae* (crestamento gomoso do caule), *Myrothecium roridum* (cancro seco das hastes), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (podridão aquosa dos frutos), *Xanthomonas cucurbitae* (manchas das folhas e frutos), *Papaya ringspot virus-type watermelon*, *Watermelon mosaic virus -2* e *Zucchini yellow mosaic virus*. Estas doenças, ao lado da mosca-branca (*Bemisia* spp.) e da larva minadora das folhas

(*Liriodendron spp.*), têm contribuído para o aumento do custo de produção e redução da produtividade e da qualidade dos frutos produzidos na região.

2.2 Patossistema melão vs *Podosphaera xanthii*

O oídio é uma das principais doenças das cucurbitáceas e ocorre em todas as regiões onde estas plantas são cultivadas (REIS; BUSO, 2004). O primeiro relato de sua ocorrência em melão na forma destrutiva ocorreu em 1925, no Vale Imperial na Califórnia (E. U. A.). O patógeno pode infectar plantas tanto em cultivo protegido como em campo, porém, com mais intensidade em condições de altas temperaturas e baixa umidade.

Vários agentes causais do oídio em cucurbitáceas são conhecidos, mas as espécies *Podosphaera xanthii* e *Golovinomyces cichoracearum* parecem ser as mais freqüentes e importantes (STADNIK; KOBORI; BETTIOL, 2001). A diferenciação entre estas duas espécies é feita de acordo com os critérios propostos por Ballantyne (1975), onde são observadas a forma dos conídios (ovóide em *P. xanthii* e cilíndrica em *G. cichoracearum*), a presença de corpos de fibrosina (presentes em *P. xanthii* e ausentes em *G. cichoracearum*) e a forma dos tubos germinativos (bifurcados em *P. xanthii* e sem bifurcação em *G. cichoracearum*).

No Brasil, o oídio é causado por *Podosphaera xanthii* (STADNIK; KOBORI; BETTIOL, 2001). O patógeno é caracterizado morfológicamente por apresentar crescimento branco e pulverulento, correspondente ao micélio, conidióforos e conídios (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005), o que pode ocorrer tanto na face abaxial como adaxial da folha, causando redução da área fotossintética da planta. A doença também reduz o rendimento da cultura pela diminuição do tamanho e número de frutos (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996) e afeta o sabor dos frutos (McGRATH; THOMAS, 1996) apud McGrath, (2001), reduzindo severamente a quantidade de sólidos solúveis totais (SANTOS et al., 2005). Na região Nordeste do Brasil, essa doença é mais freqüente no final do ciclo vegetativo, causando prejuízos adicionais pelo encurtamento do ciclo, impedindo a colheita de frutos tardios (REGO, 1995, VIANA et al., 2001).

Fungo biotrófico, freqüentemente exhibe um alto grau de especialização pelo hospedeiro. Assim, *Podosphaera xanthii* apresenta várias raças. Até pouco tempo a

raça 1 era a única registrada no Brasil (STADNIK; RIVERA, 2001, REIS; BUSO; VIEIRA, 2002). Recentemente, alguns autores (KOBORI et al., 2002, REIS; BUSO, 2004; FAZZA et al., 2005) registraram a presença da raça 2 em diversas regiões do Brasil.

O controle químico do oídio é realizado por meio de pulverizações com fungicidas de contato a base de enxofre ou fungicidas sistêmicos, que são mais eficientes e recomendados (SALES JÚNIOR et al., 2002, KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). Algumas medidas preventivas também podem auxiliar no manejo da doença, como eliminação dos restos culturais logo após a colheita e eliminação de plantas hospedeiras remanescentes. Evitar plantios em áreas que recebam ventos que passam por outros cultivos de cucurbitáceas também é muito importante, pois as culturas de abóbora, abobrinha, melancia e pepino constituem fonte de inóculo para a cultura (FAZZA, 2006).

A relação planta patógeno no patossistema melão vs *Podosphaera xanthii* opera no sistema gene-a-gene proposto por Flor (1971). Portanto, apresenta resistência raça-específica ou do tipo monogênica, onde apenas um gene está envolvido na resposta da planta contra uma raça específica do patógeno. Vários genes de resistência em melão já foram relatados. Recentemente Pitrat, (2002) publicou uma lista que contém 162 locos relacionados principalmente à resistência de pragas e doenças, características fenotípicas da planta e QTLs (Quantitative Trait Loci) de resistência ao PMV (vírus do mosaico do pepino). Os genes *Pm*, que constam da lista, conferem resistência a algumas raças de *Podosphaera xanthii*, como o gene *Pm-1*, que confere resistência à raça 1. Este gene foi identificado por Jagger; Whitaker; Porter, (1938), selecionado e incorporado na cultivar comercial de melão denominada PMR 45.

2.3 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares representam polimorfismo na seqüência nucleotídica do DNA existentes entre indivíduos. Quando estes polimorfismos estão localizados próximos a genes de interesse, podem ser utilizados para acompanhar sua segregação em cruzamentos experimentais. Vários tipos de marcadores de DNA estão disponíveis, diferenciando-se entre si quanto aos custos de aplicação, facilidade de uso e consistência de resultados (BORÉM; CAIXETA, 2006). Entre eles, os baseados em PCR (Polymerase Chain Reactions) como AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RGAs (Resistance Genes Analogs), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats) e LM-PCR (Ligation Mediated PCR) são os mais utilizados.

2.3.1 Marcadores moleculares ISSRs

Marcadores do tipo ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) são utilizados para análises genéticas diversas, como comparações taxonômicas e filogenéticas e mapeamento em uma grande gama de organismos. Neste marcador, um primer específico para uma região microssatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats) em particular é usado para amplificar a região genômica entre dois SSR's opostos e do mesmo tipo. Pode ser aplicado em qualquer espécie que contenha um número suficiente de SSR bem distribuídos pelo genoma, não sendo necessários dados sobre seqüência genômica. O primeiro trabalho relatando o uso desta técnica foi de (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994).

O uso de ISSR é mais vantajoso que o de RAPD, pois revela maior número de polimorfismos por iniciador pois um número maior de regiões genômicas é amostrado (HANTULA; DUSABENYAGASANI; HAMELIN, 1996). Esta técnica tem sido usada em diversas espécies como batata (PREVOST; WILKINSON 1999), trigo (NAGAOKA; OGIHARA, 1997), café (RUAS et al., 2003) e feijão (MÉTAIS et al., 2000).

Oliver et al., (2001), sugerem que seqüências repetitivas ocorrem com freqüência no genoma de melão. Amplificações de marcadores ISSR foram utilizadas na classificação intraespecífica de melão e construção de mapa de ligação (STEPANSKY; KOVALSKI; PERL-TREVES, 1999; OLIVER et al., 2001). Périn et al., (2002)

compuseram um mapa genético baseado em duas populações de linhagens recombinantes, onde foram alocados vários tipos de marcadores distribuídos em doze grupos de ligação. No grupo de ligação IX está o gene *Prv-1*, que confere resistência ao vírus PRSV-W que causa mosaico em melão.

Dois dos marcadores de ISSR, utilizados em nosso trabalho, denominados UBC 824 e UBC 884, foram selecionados do trabalho de Périn et al., (2002) por acreditarmos que poderiam também pertencer ao mesmo grupo de ligação onde está localizado o gene *Pm-1* que confere resistência a raça 1 de *P. xanthii*.

2.3.2 Marcadores baseados em iniciadores degenerados

Genes de resistência contra diferentes patógenos têm sido clonados de diferentes espécies vegetais. A comparação destas seqüências revelou similaridades estruturais entre eles (LEISTER et al., 1996), o que permite a amplificação de genes análogos de resistência via PCR (Polymerase Chain Reactions) em outras espécies vegetais, utilizando primers degenerados desenhados com base em seqüências de domínios conservados, como os domínios NBS (Sítio de Adesão de Nucleotídeo) e LRR (Repetição Rica em Leucina) (CALENGE et al., 2005). Estes fragmentos amplificados são denominados de RGAs (resistance gene analogs). Os domínios NBS e LRR podem estar envolvidos no fenômeno de reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro durante o processo de infecção de acordo com (HUTCHESON, 1998; SCHAAL; OLSEN, 2000; DANGL; JONES, 2001; BERGELSON et al., 2001), apud Malvas, (2003).

A utilização de domínios conservados para a síntese de primers degenerados é uma ótima estratégia para o desenvolvimento de marcadores moleculares voltados para o mapeamento de genes de resistência. Na literatura, há vários relatos de ligação entre RGAs e genes de resistência. Os primeiros trabalhos que relataram o uso desta estratégia foram realizados por Kanazin; Marek; Schoemaker, (1996) e Yu; Buss; Saghal-Marroof, (1996). Esta técnica tem sido usada com sucesso em diferentes espécies vegetais como arroz, cevada, milho e trigo (COLLINS et al., 1998; COLLINS et al., 2001; SEAH et al., 1998; LEISTER et al., 1999; MAGO; NAIR; MOHAN, 1999).

Brotman et al., (2002), obtiveram uma coleção de RGAs em melão utilizando primers degenerados desenhados com base nos motivos NBS e mostraram que

existem múltiplos e diversos homólogos a genes R no genoma do melão e que alguns deles parecem ser conservados entre os gêneros de Cucurbitaceae. As seqüências de nucleotídeos destes fragmentos foram depositados no GenBank sob números de acesso AF354504 – AF354517.

Quatro famílias de genes homólogos a genes de resistência foram identificadas em melão por PCR. Três destes foram locados em um mapa genético de melão, sendo um pertencente ao grupo de ligação 7 e os outros dois ao grupo 4 (GARCIA-MAS et al., 2001). Até o momento não há dados de ligação a algum gene de resistência de interesse na população mapeada. Porém, o grupo de ligação 7 deste trabalho corresponde ao grupo 5 de ligação do mapa genético de melão de Baudracco-Arnas; Pitrat, (1996), onde está locado o gene *Fom-1* (GARCIA-MAS et al., 2001).

A técnica de LM-PCR, introduzida por Muller; Wold, (1989) também pode ser utilizada com base na amplificação de regiões conservadas de genes de resistência. Consiste na digestão do DNA genômico por enzima de restrição, seguido de ligação de adaptadores e duas reações: uma com apenas um iniciador homólogo à região conservada do genoma como domínios NBS de genes R, somente para extensão da fita de DNA e outra utilizando dois iniciadores, um homólogo à região conservada e outro homólogo à seqüência do adaptador para amplificar o fragmento de interesse.

A eficiência da técnica foi demonstrada na identificação de marcadores RGAs ligados a genes de resistência nas culturas da batata, tomate, aveia, cenoura, maçã e soja (VAN DER LINDEN et al., 2004; CALENGE et al., 2005, HAYES; SAGHAI-MAROOF, 2000). No entanto, não há relato do uso desta técnica em melão.

2.3.3 Marcadores AFLPs

Segundo Vos; Hogers; Bleeker, (1995), a técnica de AFLP é baseada na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, seguida de amplificação seletiva dos fragmentos obtidos e resolução em gel de acrilamida. O grande atrativo desta técnica é que permite o estudo de grande número de fragmentos (50-100 por combinação de iniciadores) por gel analisado. Várias enzimas de restrição e primers podem ser utilizados, gerando um padrão eletroforético com inúmeros fragmentos possibilitando uma eficiente análise de polimorfismo.

Comparando as técnicas de AFLP, RAPD e RFLP, Garcia-Mas et al., (2000) e Park et al., (2000), concluíram que a técnica de AFLP é a mais eficiente para detectar polimorfismos em melão, tanto por sua melhor resolução quanto pelo maior número de polimorfismos que permite analisar.

A técnica de AFLP foi utilizada para identificação de marcadores ligados a genes de interesse agrônomico em melão (WANG; THOMAS; DEAN, 1997, OLIVER et al., 2001), milho (CASTIGLIOLI et al., 1999) e batata (VAN ECK et al., 1995) dentre inúmeras outras culturas. Dois marcadores AFLP ligados ao gene *Fom-1*, que confere resistência a raça 2 de *Fusarium. oxysporum. f. sp. melonis*, foram descritos por Karsies; Dean; Thomas, (2000). Recentemente, trabalho realizado em nosso laboratório resultou na identificação de marcador proximamente ligado ao gene *Prv-1* de resistência a PRSV-W (TEIXEIRA; CAMARGO, 2006).

2.4 Seleção assistida por marcadores

Alguns estudos sobre variabilidade genética em melão utilizam marcadores bioquímicos ou moleculares, porém, poucas são as informações publicadas sobre mapas genéticos e identificação de marcadores moleculares associados a genes de interesse econômico na espécie (TEIXEIRA, 2004).

O uso de resistência genética em linhagens de melão é uma alternativa segura e também um complemento ao controle químico do oídio. A utilização de cultivares resistentes que normalmente são obtidas por meio de melhoramento convencional, baseado na observação do fenótipo das plantas selecionadas após inoculação do

patógeno, é uma excelente estratégia no controle da doença, pois minimiza ou evita danos na cultura e não agride o ambiente. No entanto, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) pode agilizar este processo, pois possibilita a redução das operações relacionadas a inoculações, fenotipagem para resistência e manutenção de isolados, além de não ser influenciada por condições ambientais, como pode ocorrer com a fenotipagem convencional. Estes atributos são particularmente importantes no caso de oídio, uma vez que se trata de um parasita obrigatório, exigindo constante repicagem para sua manutenção. Durante esse processo, podem ocorrer contaminações ou até mesmo perda do isolado, causada por algum problema técnico.

Portanto, o desenvolvimento de marcadores ligados a genes de resistência a estes patógenos compreende um importante passo para agilização de programas de melhoramento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas duas linhagens quase-isogênicas (LQI) de melão (*Cucumis melo* L.): AF426^{Pm1} (P1) e AF426^{Pm1} (P2), ambas pertencentes à variedade *inodorus*, que possuem 99,88 % de similaridade entre si. (TEIXEIRA, 2004). Estas linhagens são contrastantes para ausência e presença, respectivamente, do gene *Pm-1* de resistência a raça 1 de *Podospheera xanthii*. A linhagem resistente P2 foi desenvolvida pela empresa Sakata Seed Sudamerica através de cruzamento da linhagem suscetível recorrente P1 Amarelo CAC, com a linhagem doadora do gene *Pm-1* AF125^{Pm1} (P3), seguido de cinco retrocruzamentos com a linhagem suscetível recorrente P1. Após o quinto retrocruzamento, realizou-se a autofecundação de indivíduos resistentes para estabelecer a homozigose para o gene de resistência. A linhagem AF125^{Pm1}, também chamada de 'Cinco', foi derivada do melhoramento da linhagem W5 e possui um pedigree complexo, envolvendo cruzamento inicial entre as linhagens PMR 45 e PI 180280. É do tipo charentais, variedade *cantalupensis* (THOMAS; WEBB, 1982). Apresenta alta resistência às raças 1 e 2 de *Podospheera xanthii*, a *Pseudoperonospora cubensis*, a PRSV-W (*Papaya ringspot virus – type watermelon*) e resistência moderada à queima da folha causada por *Alternaria cucumerina*. Possui também características fenotípicas desejáveis como porte médio, folhagem densa e compacta, e frutos oblongos de polpa firme de cor laranja e sabor doce que não são alterados mesmo após alguns dias de estocagem, viabilizando seu transporte a longas distâncias (THOMAS; WEBB, 1982).

Para o estudo de ligação entre marcadores candidatos e gene de resistência, foi utilizada uma população segregante RC1F1 de aproximadamente 150 indivíduos proveniente do retrocruzamento P1x(P1xP2), também desenvolvida pela empresa Sakata Seed Sudamerica.

3.2 Análise da reação das plantas da população RC1F1 à raça 1 de *Podosphaera xanthii*

Para análise da reação das plantas da população RC1F1 à raça 1 de *Podosphaera xanthii*, aproximadamente 150 plantas foram cultivadas em câmara sob condições ambientais controladas na Estação Experimental de Bragança Paulista da empresa Sakata Seed Sudamerica. Na câmara, a umidade permaneceu entre 89 e 98 %, o fotoperíodo foi de 12 horas e temperaturas diurna de 30 °C e noturna de 25 °C.

O inóculo foi mantido em cotilédones de pepino da cultivar Safira em placas de petri com papel de filtro umedecido no fundo. Estas placas foram mantidas em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C.

Após a germinação das sementes em bandeja, cada plântula foi transplantada para um vaso contendo substrato e 26 dias após o transplante folhas das plantas RC1F1 foram coletadas das plantas e desinfestadas superficialmente através da imersão em álcool 70 %, seguida de duas lavagens em água destilada. Foram retirados 4 discos de folha de aproximadamente 1,5 cm, de cada uma das plantas. Em seguida, os discos foram postos dentro de placas de petri e inoculados com conídios, com auxílio de um pincel de cílio. As placas foram mantidas em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C.

Como controle, foi feita inoculação em indivíduos de cada linhagem AF426^{pm1}, AF426^{Pm1} e AF125^{Pm1}, além de indivíduos das linhagens diferenciais para raças de *P. xanthii*, para evitar erros durante a fenotipagem devidos a contaminação por isolados de outras raças. Estas linhagens foram PMR 6, Hale's Best Jumbo e PMR 45, sendo que PMR 6 é suscetível à raça 1, Hale's Best Jumbo é suscetível às raças 1 e 2 e PMR 45 é resistente às duas raças, segundo classificação de THOMAS et al., (1984).

Sintomas foram avaliados doze dias após a inoculação com auxílio de lupa. Foram consideradas suscetíveis plantas cujos discos de folha apresentavam sinais do patógeno em sua superfície.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA das linhagens parentais (P1 e P2), da doadora do gene de resistência (P3) e das plantas RC1F1 foi realizada por meio da maceração de aproximadamente 0,3 g de folhas congeladas em presença de nitrogênio líquido em tubos de 1,5 mL, seguida de incubação a 65 °C por 45 minutos com 600 µL de solução CTAB (0,7 M NaCl, 1 % CTAB, 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1 % 2-mercaptoetanol). Em seguida, foi acrescentada solução FCIA – fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), na quantidade de 500 µL por tubo, seguindo-se centrifugação por 12 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga de bancada para separar a fase orgânica da aquosa. O sobrenadante foi colocado em outro tubo onde foram adicionados 500 µL de FCIA (25: 24: 1) e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. Ao novo sobrenadante foi adicionado 400 µL de isopropanol, seguido de incubação por 30 minutos a -20 °C. Após este período, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos, ocorrendo assim a precipitação do DNA. O pellet foi lavado com etanol 75 % por 1 minuto, com etanol 90 % por mais 1 minuto e, finalmente, com etanol 100 % por 1 minuto. Depois de seco, o DNA foi ressuspendido em 30 µL de solução de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA – pH 8,0) e RNase numa concentração de 10 µg/mL e incubado à 37°C por 1 hora para digestão do RNA.

3.4 Desenvolvimento e genotipagem de LQIs com marcadores RGAs

Para amplificação de fragmentos análogos a genes de resistência (RGA), pares de iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer 3 (<http://alces.med.umn.edu/bin/webprimers>) com base em seqüências de 14 fragmentos análogos a genes de resistência de melão depositadas no GenBank com os números de acesso AF354504 – AF354517 (BROTMAN et al., 2002) descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüências de fragmentos análogos a genes de resistência de melão depositadas no GenBank por BROTMAN et al., 2002 e seqüências de iniciadores desenhadas para amplificação dos mesmos

IDENTIFICAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS NO GENBANK	INICIADORES
AF 354504 <i>Cucumis melo</i> NBS-1	5'GGGGTGGGGAAGACG3' F 5'TCGTCGAGGACAACAAAACT3' R
AF 354505 <i>Cucumis melo</i> NBS-2	5'GGGGATGGGGAAGACG3' F 5'CGACTGCACGTTTTGAAAGTT3' R
AF 354506 <i>Cucumis melo</i> NBS-3	5'GGGGTGGGGAAGACG3' F 5'TCGAGGACAATAAGCACCTTT3' R
AF 354507 <i>Cucumis melo</i> NBS 5	5'CCAATTTGAAGGATGTTGCTT3' F 5'CGTCGTCGAGGACTATAAGAA3' R
AF 354508 <i>Cucumis melo</i> NBS 7	5'GGGGTGGGGAAGACGA3' F 5'TTCTAAATAATCATTTGAGGGGTGA3' R
AF 354509 <i>Cucumis melo</i> NBS 17-5	5'GGGGTGGGAAAACGACT3' F 5'TGTCTTGCATTTCTGTTTGA3' R
AF 354510 <i>Cucumis melo</i> NBS 23-2	5'GGGAAGACGACTTTGG3' F 5'TCAAGAACTATAAGAACTTTCCTC3' R
AF 354511 <i>Cucumis melo</i> NBS 26-2	5'GGTTGGGAAGACAACGAT3' F 5'CAACACGAGAAGTGTCTTTT3' R
AF 354512 <i>Cucumis melo</i> NBS 37-4	5'GGAAAAAGCAGCATGTCGTA3' F 5'TCAAATTAAGAACATAAGCCCGTTA3' R
AF 354513 <i>Cucumis melo</i> NBS 39-2	5'GGGAAGACGACACTCGCTAA3' F 5'CAAACCTTTATGTTCTCAAACA3' R
AF 354514 <i>Cucumis melo</i> NBS 42-12	5'GGGGTGGGGAAGACGAC3' F 5'CACGTCATCGAGGACAAGAA3' R
AF 354515 <i>Cucumis melo</i> NBS 45-8	5'GGGTGGGGAACAGCACTA3' F 5'CGTCGTCCAAAACCAACA3' R
AF 354516 <i>Cucumis melo</i> NBS 46-7	5'ATGGGGAAGACGACTTTGG3' F 5'TCGTTAGGATCTCATAGAGTAGGC3' R
AF354517 <i>Cucumis melo</i> NRT-A4	5'GTGGGGGAAACGACACTG3' F 5'CGTCATCAAGGACCATCAAA3' R

As reações de PCR adaptadas de Brotman et al., (2002) foram realizadas em um volume total de 25 µL, com as seguintes concentrações finais: 0,04 unidades/µL de enzima *Taq* polimerase, tampão da enzima 1 X, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP's, 0,2

mg/mL de BSA (albumina de soro bovino), 0,25 μ M de cada iniciador e 1 ng/ μ L do DNA alvo.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1min, 1min para hibridização do iniciador com temperatura definida para cada par utilizando termociclador de gradiente, e extensão a 72°C por 1 min e 30 s, seguido de extensão final por 10 min a 72°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % corado com “Sybr®-safe DNA gel stain” (Invitrogen) 0,5 X. Como marcador de peso molecular foi utilizado marcador 100 pb (Invitrogen).

Endonucleases de restrição que possuíam sítios dentro de cada um dos fragmentos RGAs foram selecionadas com auxílio do programa Genamic Expression (<http://genamics.com/expression/index.htm>). As reações de digestão dos fragmentos amplificados dos parentais e respectivo híbrido foram feitas em volume total de 25 μ L utilizando 20 μ L do produto da PCR e as enzimas *AluI* [0,3 u/ μ L], *HindIII* [0,6 u/ μ L], *EcoRI* [0,2 u/ μ L] e *TaqI* [1,2 u/ μ L] individualmente, cada uma com seu tampão específico concentrado 1X. As reações com as enzimas *AluI*, *HindIII* e *EcoRI* foram realizados sob temperatura de incubação de 37°C durante 2 h. Já a reação com a enzima *TaqI* foi conduzida a 65°C por 12 h. Os fragmentos digeridos foram corados com Sybr®-safe DNA gel stain (Invitrogen) e posteriormente visualizados em gel de Amplisize® agarose (Bio Rad) 5 %.

3.5 Genotipagem de LQIs com marcadores ISSR

Para as reações de amplificação foram utilizados separadamente dois iniciadores de ISSR descritos no trabalho de Périn et al., 2002, denominados UBC 824 e UBC 884. Estes foram escolhidos por estarem locados no grupo de ligação IX do mapa genético de melão onde está locado também o gene *Prv-1* de resistência a PRV-W. Portanto, havia uma possibilidade de encontrar estes marcadores segregando também junto ao gene *Pm-1* de resistência a *P. xanthii* na população utilizada em nosso trabalho. As reações de amplificação foram adaptadas de Périn et al., (2002) sendo realizadas em um volume total de 20 μ L, com as seguintes concentrações finais: 0,04 u/ μ L de enzima

Taq polimerase, tampão da enzima 1 X, 2,0 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 0,5 μM de cada iniciador e 1 ng/μL do DNA alvo.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido por 44 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, 45 segundos para hibridização do iniciador com temperatura de anelamento de 42°C e extensão a 72°C por 2 min, seguido de extensão final por 5 min a 72°C. Os produtos obtidos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6 %. Para o preparo das amostras foram acrescentados 8μL de tampão de carregamento (10 mL de formamida: 200 μL de EDTA 0,5 M pH 8,0: 10 mg de azul de bromofenol: 10 mg de xilene cianol). Em seguida foi realizada desnaturação do produto por 5 minutos a 94°C e logo em seguida, colocado em gelo por no mínimo 5 minutos. As amostras foram colocadas em gel preparado com matriz de poliacrilamida 6%, com 0,5 mm de espessura. O sistema eletroforético utilizado foi “Sequi-gen GT” (BioRad).

O gel foi preparado com 120 mL de solução matriz, 120 μL de TEMED (Promega) e 800 μL de persulfato de amônio 10 % (Promega). Após a polimerização, foi realizada “pré-corrída”, a 80 W por 1 hora, em cuba contendo TBE 1 X na parte superior e solução de acetato de sódio 0,5 M preparada em TBE 1 X na parte inferior. A temperatura máxima para a eletroforese foi de 50 °C. Após este período, 15 μL do produto da PCR já desnaturado, foram aplicados em cada poço. Como marcador molecular utilizou-se marcador de 50 pb (Promega) preparado na proporção de 8 μL do marcador: 128 μL de água milliQ:68 μL do tampão de carregamento, desnaturado nas mesmas condições dos produtos de PCR. A eletroforese foi efetuada sob as mesmas condições da “pré-corrída”, por período de 4 horas.

A revelação dos géis foi realizada segundo protocolo adaptado de Creste; Tulmann Neto; Figueira, (2001). Os géis foram fixados em 2 L de solução 1 % ácido acético glacial e 10 % álcool etílico durante 10 minutos sob agitação constante. Após este período, procedeu-se lavagem por 1 minuto em 2 litros de água destilada sob agitação, sendo a seguir efetuada uma etapa de pré-tratamento por 2 min e 40 s em ácido nítrico 1,5 %, lavando-se novamente com água. A seguir, os géis foram tratados

com solução de nitrato de prata a 0,2 %, sob agitação, por 20 minutos, passando posteriormente por 2 novas lavagens em 2 litros de água, desta vez sendo cada lavagem realizada por 30 segundos. A seguir, os fragmentos AFLPs foram revelados após incubação em solução gelada contendo 30 g/L de carbonato de sódio mais 600 $\mu\text{L/L}$ de formaldeído 37 %. Os géis foram fixados em solução de ácido acético a 5 % por 5 minutos, sob agitação. Posteriormente, foi realizada uma última lavagem por um minuto com água destilada. Após este processo, os géis foram secos a temperatura ambiente por mais de doze horas.

Os géis foram colocados sobre transiluminador de luz branca e analisados para, a) o número total de fragmentos obtidos em cada linhagem com cada combinação de iniciadores; b) o número total de fragmentos polimórficos entre a linhagem doadora do gene de resistência e as linhagens quase isogênicas; e c) a presença de fragmentos polimórficos entre as linhagens resistentes e a quase isogênica suscetível. Para os casos de polimorfismos, o tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com padrão de peso molecular de 50 pb (Promega).

Foram considerados candidatos a marcadores do gene de resistência *Pm-1* aqueles fragmentos presentes nas linhagens resistentes AF125^{Pm1} (P3) e AF426^{Pm1} (P2) e ausentes na linhagem suscetível AF426^{pm1} (P1).

3.6 Genotipagem de LQIs com marcadores gerados por meio de LM-PCR

O protocolo utilizado para desenvolver esta técnica foi adaptado de Van Der Linden et al., (2004). Para iniciar as amplificações, foram feitas restrições de aproximadamente 150 ng de DNA genômico em reações separadas para cada enzima em reação de 50 μL com as seguintes concentrações finais: tampão da enzima 1 X, enzima 0,1 u/ μL , BSA 0,1 mg/mL e DNA genômico 3 ng/ μL . O período e a temperatura de incubação variaram de acordo com a enzima utilizada. As enzimas utilizadas nas reações foram: *HaeIII*, *RsaI*, *AluI*, *EcoRV* e *DraI*.

O preparo dos adaptadores foi feito em uma reação de 10 μL que apresentou as seguintes concentrações finais: tampão One Phor All 0,5 X, adaptador-1, 25 μM e adaptador-2, 25 μM . Após a mistura e homogeneização dos componentes, foi efetuado

o pareamento das fitas simples de DNA de adaptadores em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research), por 10 minutos a 65°C, 10 minutos a 37°C e 10 minutos a 25°C.

A ligação dos adaptadores ocorreu em reação de 10 µL nas seguintes concentrações finais: 0,09 u/µL de T4 DNA ligase, tampão da ligase 1 X, 2,7 mM dos adaptadores acrescentada ao DNA previamente digerido. A reação foi incubada por 23°C por três horas.

Para reações assimétricas (contendo apenas um iniciador) de PCR foram utilizados iniciadores específicos para melão (homólogos aos motivos NBS de genes de resistência) selecionados de acordo com o trabalho de Brotman et. al., 2002 e Brotman et al., 2005 denominados aqui de iniciadores NBS. Os iniciadores específicos foram utilizados em reações separadas, uma contendo o iniciador senso e a outra o iniciador anti-senso. A reação em volume total de 20 µL apresentou as seguintes concentrações finais: iniciador NBS 0,5 µM, 10 mM de dNTP, 0,05 u/µL de *Taq* DNA polimerase, tampão da *Taq* polimerase 1 X, 1,5 mM MgCl₂, e 2 µL de DNA digerido e ligado. Esta reação teve início com desnaturação a 95°C por 5 minutos, passando a seguir por 30 ciclos compostos de 95 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento estimada pelo cálculo da TM (temperatura de melting) para cada iniciador em °C por 1 minuto e 40 segundos 72 °C por 2 minutos, havendo um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. A TM é a temperatura em que aproximadamente 50% das moléculas de DNA já estão desnaturadas é determinada pela seguinte fórmula (NEWTON; GRAHAM, 1997):

$$TM \text{ } ^\circ\text{C} = (A+T) \times 2 + (C+G) \times 4,$$

onde, TM °C = temperatura de melting (°C), A= número de nucleotídeos adenina, T= número de nucleotídeos timina, C= número de nucleotídeos citosina e G= número de nucleotídeos guanina.

Para reações de PCR exponencial, foram utilizados, em conjunto, iniciador NBS específico e iniciador com seqüência complementar à do adaptador. A reação com volume total de 50 µL apresentou as seguintes concentrações finais: iniciador NBS 0,2 µM, iniciadores do adaptador 0,2 µM, 0,2 mM de dNTP, 0,04 u/µL de *Taq* DNA polimerase, tampão da *Taq* polimerase 1 X, 1,5 mM MgCl₂ e os 25 µL da reação

anterior. Esta reação teve início com desnaturação a 95 °C por 5 minutos, passando a seguir por 30 ciclos compostos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento estimada pelo cálculo da T_M para cada iniciador em °C por 1 minuto e 40 segundos, 72°C por 2 minutos, havendo um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos obtidos nas reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, revelados e analisados como descrito no item 3.5.

Foram considerados candidatos a marcadores do gene de resistência *Pm-1* aqueles fragmentos presentes nas linhagens resistentes AF125^{Pm1} (P3) e AF426^{Pm1} (P2) e ausentes na linhagem suscetível AF426^{Pm1} (P1). A seqüência dos adaptadores e dos iniciadores utilizados nas reações estão na tabela 2.

Tabela 2 - Iniciadores e adaptadores utilizados nas reações de amplificação de fragmentos por meio de LM-PCR

Oligonucleotídeos	Seqüências
Adaptadores	Adaptador 1 5'ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA 3'
	Adaptador 2 5'TGGGATCTATACTT 3' (com grupo amino)
Iniciador do adaptador	5'ACTCGATTCTCAACCCGAAAG 3'
Iniciadores específicos para melão	NBS 1 CAPS 5'TATTGCTAAAGCTGTTTTCAAAAGCG3' F 5'AACAAAACTTTTCGATTTCTAAGTT3' R
	NBS 5 5' CCAATTTGAAGGATGTTGCTT3' F 5'CGTCGTCGAGGACTATAAGAA3' R
	NBS 23-2 5'GGGAAGACGACTTTGG3' F 5'TCAAGAACTATAAGAACTTTCTCT3' R
	NBS 37-4 5'GGAAAAAGCAGCATGTCGTA3' F 5'TCAAATTAAGAACATAAGCCCCTT3' R
	NBS 46-7 5'ATGGGGAAGACGACTTTGG3' F 5'TCGTTAGGATCTCATAGAGTAGGC3' R

3.7 Genotipagem de LQIs com marcadores AFLP

O protocolo utilizado para as reações de AFLP foi adaptado de Vos; Hogers; Bleeker, (1995). O DNA genômico das linhagens AF426^{Pm1}, AF426^{pm1} e AF125^{Pm1} foi digerido com enzimas de restrição, uma de corte freqüente *MseI* (New England Biolabs) e a de corte raro *HindIII*, (Pharmacia) em reação de 20 µL com as seguintes concentrações finais: tampão One Phor All (OPA) 1 X, BSA 0,1 µg/mL, 0,1 u/µL de cada uma das enzimas e 7,5 ng/µL de DNA genômico. A incubação foi a 37°C por 3 horas, sendo feita, posteriormente, a desnaturação das enzimas a 70 °C por 15 minutos.

Em seguida, os adaptadores foram ligados às extremidades dos fragmentos em reação de 4 µL nas seguintes concentrações finais: 0,09 u/µL de T4 DNA ligase, tampão da ligase 1 X, 50 pmol do adaptador *MseI* e 5 pmol do adaptador *HindIII*, acrescentado aos 20 µL DNA previamente digerido. A incubação foi a 20°C por três horas.

Para preparo dos adaptadores *MseI*, foram misturados *MseI* - adaptador 1 (5'- GAC GAT GAG TCC TGA G -3'), *MseI* - adaptador 2 (5'- TAC TCA GGA CTC AT -3'), tampão One Phor All 10 X até concentração final de 0,5 X (OPA; Amersham) e água ultra pura no volume necessário para uma concentração final de adaptadores de 50pmol. Para o preparo dos adaptadores *HindIII*, foram misturados *HindIII* - adaptador 1 (5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3') e *HindIII* - adaptador 2 (5'- AGC TGG TAC GCA GTC TAC -3'), tampão One Phor All 10 X até concentração final de 0,5 X (OPA; Amersham) e água ultra pura no volume necessário para a obtenção de uma solução de adaptadores com concentração final de 5pmol.

Após os componentes serem misturados e homogeneizados, efetuou-se o pareamento das fitas simples de DNA de adaptadores em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research), por 10 minutos a 65°C, 10 minutos a 37°C e 10 minutos a 25°C.

A reação de pré-amplificação com volume final de 20 µL apresentou as seguintes concentrações finais: 1,5 ng/µL de iniciadores com seqüências complementares a cada um dos adaptadores (com mais um oligonucleotídeo seletivo), 0,4 mM de dNTP, 0,15 u/µL de *Taq* DNA polimerase, tampão da *Taq* polimerase 1X, 1,5 mM MgCl₂, e 3 µL de 7,5 ng/µL DNA digerido e ligado. Esta reação se iniciou com desnaturação a 94°C por 2

minutos, passando a seguir por 26 ciclos compostos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, havendo um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Ao final deste processo, foram acrescentados 80 µL de água MilliQ a cada um dos tubos.

Por fim, realizou-se a reação de amplificação seletiva com volume total de 20 µL com iniciadores contendo 2 nucleotídeos a mais, além do já constante nos iniciadores da reação de pré-amplificação nas concentrações de 2,5 ng/µL do iniciador correspondente à enzima de corte raro *HindIII* (5'GACTGCGTACCAGCTT**NNN**3') e de 2,5 ng/µL do iniciador correspondente à enzima de corte freqüente *MseI* (5'GATGAGTCCTGAGTA**NNN**3'), dNTP's 0,2 mM, tampão da *Taq* DNA polimerase 1 X, MgCl₂ 2 mM, 0,05 u/µl de *Taq* DNA polimerase e 2,0 µL da reação de pré-amplificação. Esta reação iniciou a 94°C por 2 minutos, passando a seguir por 12 ciclos compostos de 94°C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Após isto, foram realizados 23 ciclos compostos de 94°C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, havendo um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. As enzimas, seqüências dos adaptadores e dos iniciadores utilizados nas reações estão descritos na tabela 3.

Os produtos obtidos nas reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, revelados e analisados como descrito no item 3.5.

Foram considerados candidatos a marcadores do gene de resistência *Pm-1* aqueles fragmentos presentes nas linhagens resistentes AF125^{Pm1} (P3) e AF426^{Pm1} (P2) e ausentes na linhagem suscetível AF426^{Pm1} (P1).

Tabela 3 - Enzimas, seqüências dos adaptadores e dos iniciadores utilizados na análise genética das linhagens

ENZIMAS		SEQÜÊNCIAS
<i>Mse</i> I	Adaptador	5'GACGATGAGTCCTGAG3' 3'TACTCAGGACTCAT5'
	Iniciador da pré-amplificação	5'GATGAGTCCTGAGTAAN3'
	Iniciadores da amplificação seletiva (extensões NNN)	5'GATGAGTCCTGAGTAANN3'
<i>Hind</i> III	Adaptador	5'CTCGTAGACTGCGTACC3' 3'CATCTGACGCATGGTCGA5'
	Iniciador da pré-amplificação	5'GACTGCGTACCAGCTT3'
	Iniciadores da amplificação seletiva (extensões NNN)	5'GACTGCGTACCAGCTTNN3'

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da reação das plantas da população RC1F1 à inoculação com o isolado da raça 1 de *Podosphaera xanthii*

Durante a análise foi possível observar clara diferença na reação à inoculação do patógeno entre as linhagens resistentes e a suscetível. A linhagem doadora do gene de resistência AF125^{Pm1} (P3) e a linhagem quase isogênica AF 426^{Pm1} (P2), mostraram-se extremamente resistentes, assim como o híbrido P3 x P1, enquanto na linhagem quase isogênica suscetível AF426^{Pm1} houve desenvolvimento do patógeno, tendo sido possível observar sem dificuldades a presença de conídios e conidióforos na superfície dos discos de folhas.

Quanto a proporção de indivíduos resistentes e suscetíveis, esta ocorreu de maneira esperada. Em 143 indivíduos analisados, observaram-se 81 suscetíveis e 62 resistentes, proporção que não difere estatisticamente daquela esperada no caso de segregação do tipo monogênica e dominante para resistência, de acordo com o teste de χ^2 com $\alpha = 1\%$ (Tabela 4). Os resultados confirmaram a segregação de um gene dominante de resistência neste cruzamento, conforme esperado.

Tabela 4 - Resultados da avaliação fenotípica de indivíduos da população RC1F1 para resistência à raça 1 de *P. xanthii*

	Indivíduos Resistentes	Indivíduos Suscetíveis	$\chi^2(\alpha=1\%)$
Valores observados	62	81	1,26
Valores esperados	71,5	71,5	1,26
Total			2,52

4.2 Amplificação de fragmentos análogos a genes de resistência (RGAs)

Dos quatorze pares de iniciadores utilizados, apenas quatro amplificaram fragmentos RGA com o tamanho esperado (Figura 1), (NBS-5 com 186pb, NBS 23-2 com 236pb, NBS 37-4 com 187pb e NBS 46-7 com 151pb). Os outros geraram múltiplos fragmentos ou fragmentos de tamanhos muito acima do esperado, ou ainda não resultaram em amplificação. Nestes casos foram feitas alterações nas concentrações dos reagentes utilizados nas reações e também modificações nos programas de amplificação com redução de tempo de extensão. No entanto, mesmo após vários testes os resultados foram negativos para estes iniciadores (dados não apresentados).

Os produtos das PCR dos fragmentos, NBS-5, NBS 23-2, NBS 37-4 e NBS 46-7 dos parentais e híbrido foram digeridos com as endonucleases de restrição *HindIII*, *AluI*, *EcoRI* e *TaqI*. Porém, a digestão dos fragmentos não gerou nenhum polimorfismo entre as LQIs (Figuras 2, 3, 4 e 5). A ausência de polimorfismo pode ser explicada devido a grande semelhança entre as linhagens utilizadas no trabalho, além de a região genômica amplificada de interesse (NBS) ser muito conservada, e também ao uso de um número reduzido de endonucleases. Desta forma, estes marcadores não puderam ser utilizados neste trabalho.

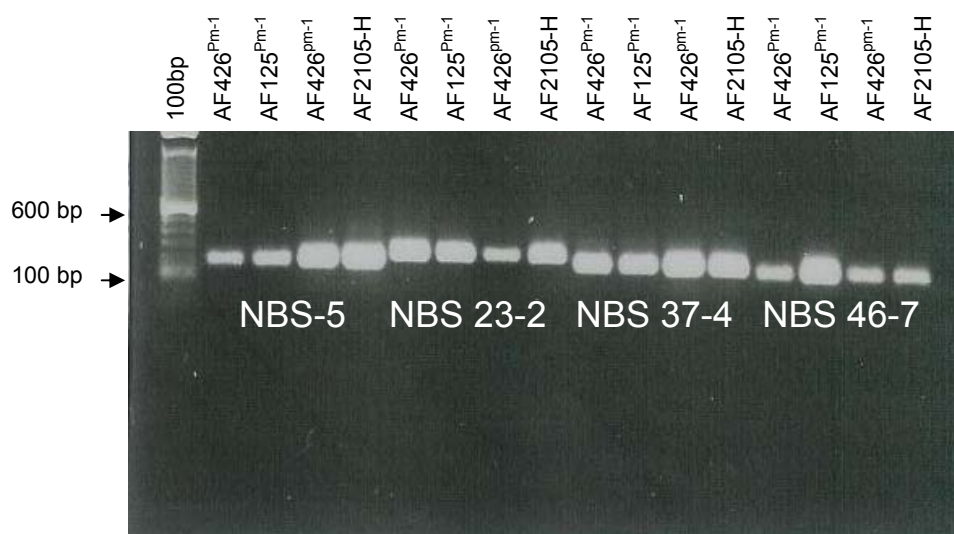


Figura 1 - Amplificação de regiões NBS nas linhagens com tamanhos de fragmentos esperados

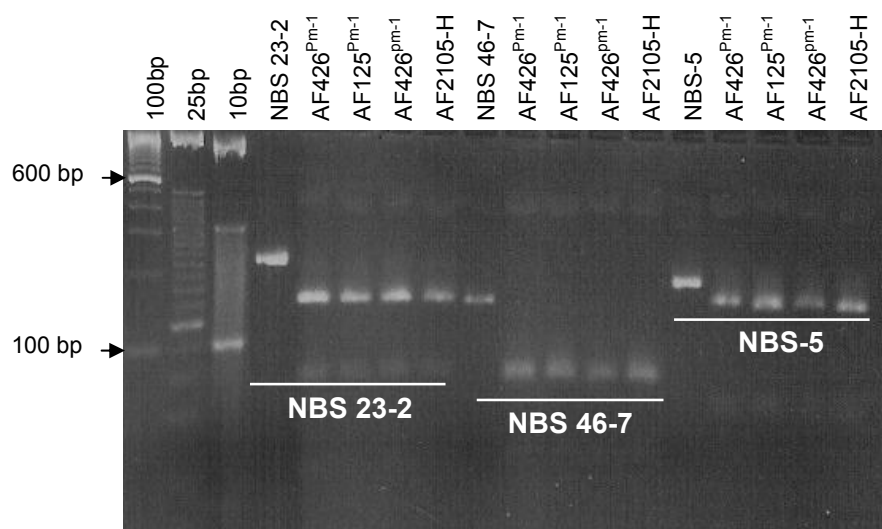


Figura 2 - Fragmentos NBS amplificados nas linhagens e digeridos com a enzima *HindIII*

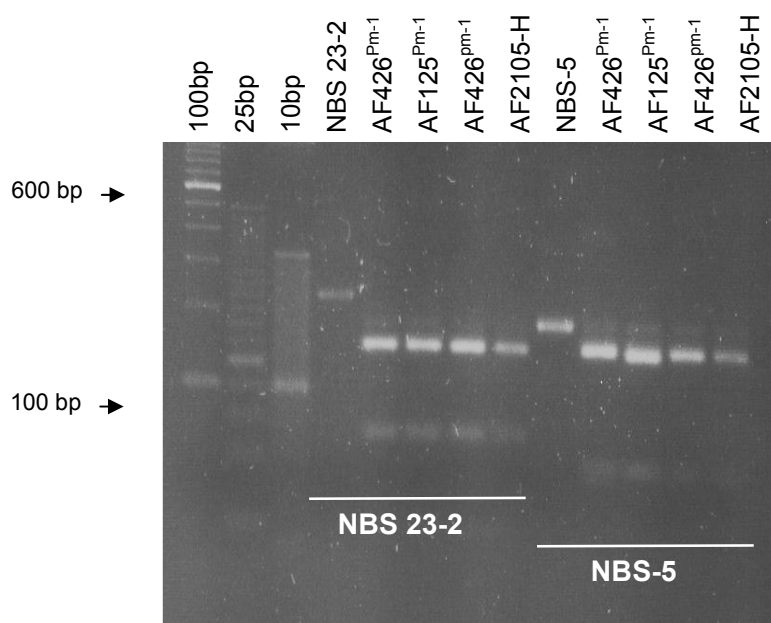


Figura 3 - Fragmentos NBS amplificados nas linhagens e digeridos com a enzima *AluI*

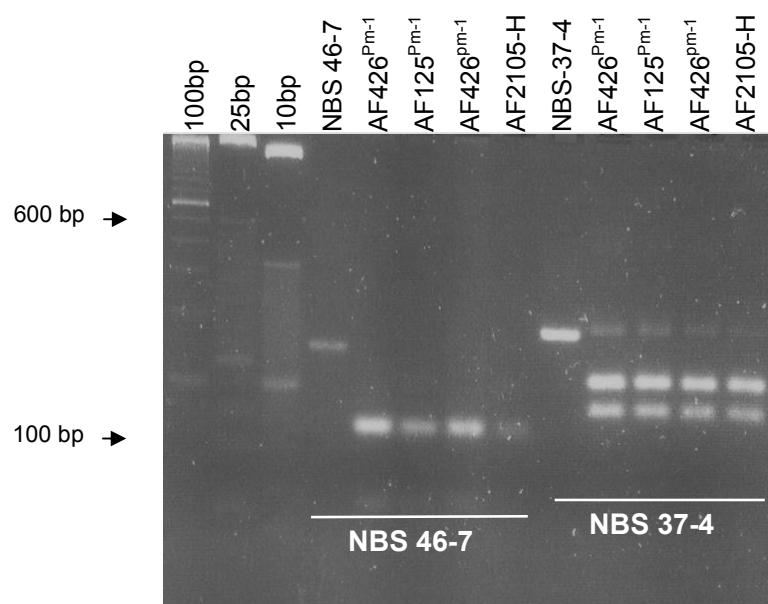


Figura 4 - Fragmentos NBS 46-7 e 37-4 amplificados nas linhagens digeridos respectivamente com as enzimas *AluI* e *EcoRI*

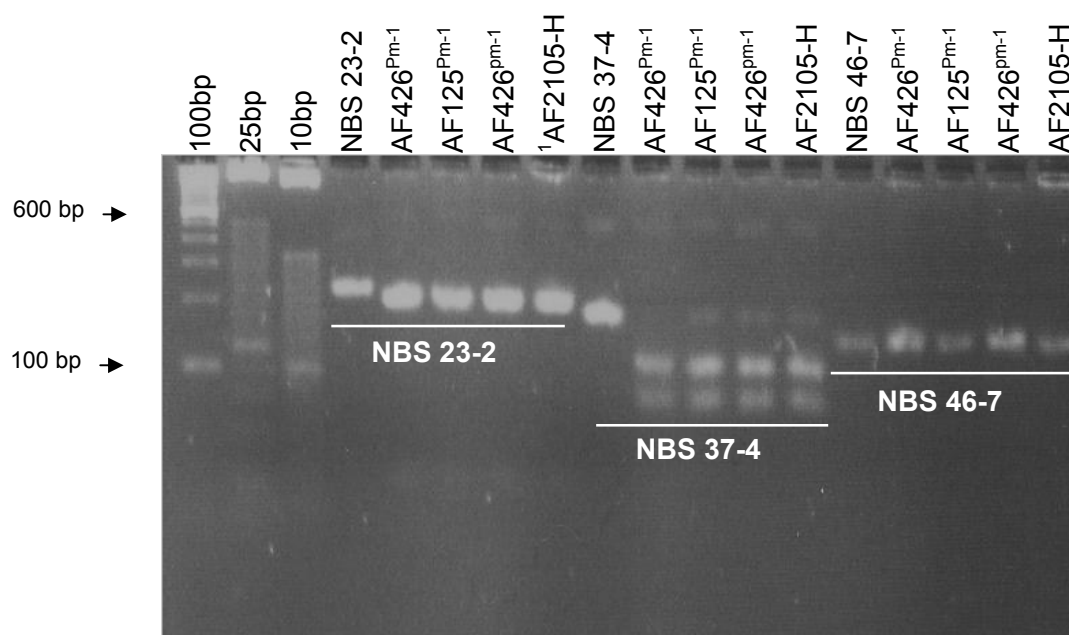


Figura 5 - Fragmentos NBS amplificados nas linhagens e digeridos com a enzima *TaqI*

4.3 Genotipagem de LQIs com marcadores ISSR

O iniciador UBC 824 gerou 43 fragmentos e o iniciador UBC 884 gerou 18 fragmentos, porém, nenhum polimorfismo de interesse foi encontrado nas reações de ISSR, ou seja, presença de banda nas linhagens resistentes AF125^{Pm1} (P3) e AF426^{Pm1} (P2) e ausência na linhagem suscetível AF426^{Pm1} (P1). (Dados não apresentados).

4.4 Genotipagem das LQIs com marcadores gerados por meio de LM-PCR

As combinações de enzimas e iniciadores utilizadas foram analisadas em gel desnaturante de poliácridamida 6 %, como exemplificado na figura 6. Os dados da análise feita quanto ao número de fragmentos total e polimorfismos gerados por cada combinação entre as LQIs e LDR encontram-se na tabela 5. Um total de 2146 fragmentos foram analisados, sendo encontrados 1159 fragmentos quando usado o iniciador senso e 987 quando usado o anti-senso. O número médio de fragmentos encontrados foi de 57,5 quando usado o iniciador senso e 49,35 quando usado o iniciador anti-senso. O número de fragmentos polimórficos encontrados foi de 31 quando usado o iniciador senso e 60 quando usado o iniciador anti-senso, entre as

LQIs foi encontrado apenas 1 fragmento polimórfico quando usado o iniciador senso e 1 quando usado o iniciador anti-senso, detectado na linhagem suscetível. Como a população utilizada RC1F1 é proveniente do cruzamento entre uma linhagem suscetível homocigota com uma linhagem resistente seguido de retrocruzamento com a linhagem suscetível, todos os indivíduos da população apresentariam a marca selecionada entre as LQIs, apresentando-se monomórfico na população.

A utilização da técnica de LM-PCR não foi descrita anteriormente na cultura do melão, porém sua eficiência tem sido demonstrada na identificação de marcadores RGAs para resistência nas culturas da batata, tomate, aveia, cenoura e maçã (VAN DER LINDEN et al., 2004, CALENGE et al., 2005).

A dificuldade na obtenção de fragmentos polimórficos entre as LQIs utilizadas deve-se a grande semelhança entre estas, que é de 99,88 % segundo Teixeira, (2004). Por esse motivo para ampliar a chances de encontrar um polimorfismo de interesse a utilização de um número maior de combinações entre iniciadores e enzimas deveria ser testado.

Segundo Trognitz et al., (2002), teoricamente o número de fragmentos gerados com este método pode refletir o número de cópias do gene de interesse no genoma. Falhas ocorridas durante o processo de amplificação, fragmentos muito grandes ou a presença de sítios de restrição dentro do fragmento alvo podem ser responsáveis pela limitação da técnica (LIU et al., 2004). Se possível, devem-se utilizar endonucleases que não possuam sítios de restrições dentro do fragmento alvo.

O número de fragmentos encontrados poderia ser maior de acordo com Garrity; Wold, (1992) com o uso da *Avent* polimerase nas reações de amplificação, porém o custo elevado inviabiliza o seu uso neste trabalho. Um ciclo de 3 min a 94°C conhecido como condição “hot start” foi utilizado neste trabalho, pois, diminui a geração de fragmentos inespecíficos e amplificação que ocorre durante o preparo da reação, melhorando os resultados do perfil de bandas gerado.

Nenhum polimorfismo de interesse foi encontrado, ou seja, presença de banda nas linhagens resistentes AF125^{Pm1} (P3) e AF426^{Pm1} (P2) e ausência na linhagem suscetível AF426^{Pm1} (P1).

Apesar de não encontrarmos marcadores ligados ao gene *Pm-1* de resistência a *P. xanthii* em nosso trabalho utilizando esta técnica, Hayes; Saghai-Marroof, (2000) identificaram quatro marcadores ligados ao gene *Rsv-1* que confere resistência ao vírus do mosaico da soja demonstrando a utilidade deste método na geração de marcadores ligados a importantes genes de resistência a doenças.

Tabela 5 - Comparações dos números de fragmentos polimórficos e monomórficos encontrados entre as LQIs S e R e a LDR em função das combinações entre primers e enzimas utilizadas na técnica de LM-PCR

Combinações	Número total de fragmentos	Número de polimorfismos	Número de polimorfismos entre as LQI's	Número de polimorfismos entre LQI S e o par LDR e LQI R	Combinações	Número total de fragmentos	Número de polimorfismos	Número de polimorfismos entre as LQI's	Número de polimorfismos entre LQI S e o par LDR e LQI R
<i>Eco</i> RV/ NBS 5F	68	0	0	0	<i>Eco</i> RV/ NBS 5R	68	5	0	0
<i>Eco</i> RV/ NBS 23-2F	58	5	0	0	<i>Eco</i> RV/ NBS 23-2R	41	4	0	0
<i>Eco</i> RV/ NBS 37-4F	49	6	0	0	<i>Eco</i> RV/ NBS 37-4R	41	1	0	0
<i>Eco</i> RV/ NBS 46-7F	54	1	0	0	<i>Eco</i> RV/ NBS 46-7R	38	1	0	0
<i>Dra</i> I/ NBS 5F	65	0	0	0	<i>Dra</i> I/ NBS 5R	65	5	1	0
<i>Dra</i> I/ NBS 23-2F	68	1	0	0	<i>Dra</i> I/ NBS 23-2R	57	7	0	0
<i>Dra</i> I/ NBS 37-4F	69	3	1	0	<i>Dra</i> I/ NBS 37-4R	35	1	0	0
<i>Dra</i> I/ NBS 46-7F	57	1	0	0	<i>Dra</i> I/ NBS 46-7R	38	2	0	0
<i>Rsa</i> I/ NBS 5F	69	0	0	0	<i>Rsa</i> I/ NBS 5R	69	5	0	0
<i>Rsa</i> I/ NBS 23-2F	47	0	0	0	<i>Rsa</i> I/ NBS 23-2R	68	6	0	0
<i>Rsa</i> I/ NBS 37-4F	72	3	0	0	<i>Rsa</i> I/ NBS 37-4R	30	2	0	0
<i>Rsa</i> I/ NBS 46-7F	38	0	0	0	<i>Rsa</i> I/ NBS 46-7R	55	2	0	0
<i>Hae</i> III / NBS 5F	72	0	0	0	<i>Hae</i> III/ NBS 5R	72	3	0	0
<i>Hae</i> III / NBS 23-2F	49	2	0	0	<i>Hae</i> III/ NBS 23-2R	53	2	0	0
<i>Hae</i> III / NBS 37-4F	66	3	0	0	<i>Hae</i> III/ NBS 37-4R	42	0	0	0
<i>Hae</i> III / NBS 46-7F	37	0	0	0	<i>Hae</i> III/ NBS 46-7R	37	4	0	0
<i>Alu</i> I/ NBS 5F	58	0	0	0	<i>Alu</i> I/ NBS 5R	58	5	0	0
<i>Alu</i> I/ NBS 23-2F	50	0	0	0	<i>Alu</i> I/ NBS 23-2R	56	2	0	0
<i>Alu</i> I/ NBS 37-4F	79	6	0	0	<i>Alu</i> I/ NBS 37-4R	32	2	0	0
<i>Alu</i> I/ NBS 46-7F	36	0	0	0	<i>Alu</i> I/ NBS 46-7R	32	1	0	0
Total	1159	31	1	0	Total	987	60	1	0
Média	57,95	1,55	0,05	0	Média	49,35	3	0,05	0
% polimorfismos	-	2,67	0,086	0	% polimorfismos	-	6,2	0,10	0

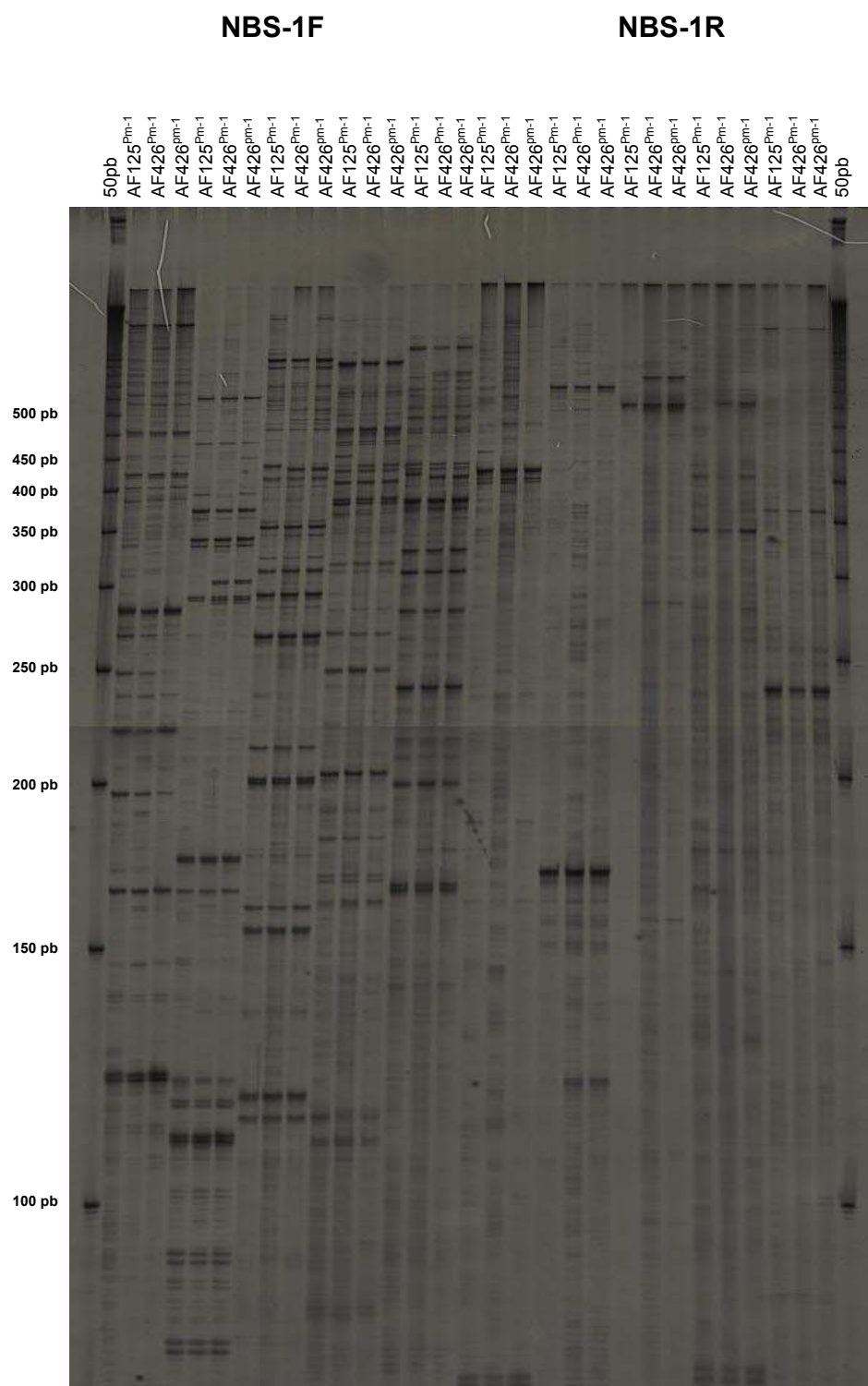


Figura 6 - Gel de LM-PCR com primers específicos para melão NBS -1F combinado com as enzimas *EcoRI*, *DraI*, *HaeIII*, *RsaI* e *AluI* respectivamente e NBS-1R combinado com as enzimas *EcoRI*, *DraI*, *HaeIII*, *RsaI* e *AluI* respectivamente com fragmentos amplificados nas LQIs

4.5 Genotipagem das LQIs e RC1F1 por meio de AFLP

Foram testadas 85 combinações do tipo *MseI*+NNN em conjunto com *HindIII*+NNN onde foram analisados um total de 3.640 fragmentos. Destes, cerca de 5,82 % apresentaram-se polimórficos entre a linhagem doadora AF125^{Pm1} e as quase isogênicas AF426^{Pm1} e AF426^{Pm1} e 0,98 % apresentaram-se polimórficos entre as linhagens quase isogênicas AF426^{Pm1} e AF426^{Pm1}. O fragmento polimórfico de interesse (presença de bandas nas linhagens resistentes doadora e quase isogênica resistente e ausência na linhagem quase isogênica suscetível) foi reproduzido em ampliações independentes, apresentando-se também polimórfico nos indivíduos fenotipados da população segregante RC1F1.

Este fragmento foi denominado de WB200 (Figura 7), amplificado com os iniciadores *MseI*+CGC / *HindIII*+ATC. Outro fragmento polimórfico detectado anteriormente por Teixeira, (2004) denominado HF155 (Figura 8), também foi selecionado para reprodução em ampliações independentes utilizando os iniciadores *MseI*+GTA / *HindIII*+ACA, apresentando-se também polimórfico nos indivíduos da população segregante RC1F1.

Para análise dos dados da fenotipagem da população RC1F1 para resistência a oídio, o teste χ^2 foi empregado com a finalidade de verificar se a proporção de indivíduos resistentes e suscetíveis estava de acordo com a esperada (Tabela 7 e Tabela 8). No caso de segregação de um alelo de resistência dominante e de retrocruzamento com o parental suscetível, esta seria de 1:1. Foi analisada a co-segregação entre gene e marcador candidato admitindo-se segregação independente entre ambos como hipótese nula. No caso de marcador presente no genitor resistente, por exemplo, a proporção entre indivíduos resistentes com presença do fragmento, resistentes sem presença do fragmento, suscetíveis com fragmento e suscetíveis sem fragmento seria de 1:1:1:1. No presente trabalho, o valor de χ^2 foi significativo, admitindo-se assim a hipótese alternativa de ligação entre gene e fragmento. A distância entre gene e marcador foi então calculada utilizando a fórmula de Kosambi.

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

onde d representa a distância entre gene e marcador em centiMorgans e θ é a fração de indivíduos recombinantes.

Foram avaliados indivíduos da população RC1F1, fenotipada para oídio (Tabela 6; anexos e Tabela 8; anexos). Ao calcular as distâncias entre as possíveis marcas encontradas e o gene de resistência *Pm-1*, pela fórmula de Kosambi estas foram de 58 cM para WB200 e 4,9 cM para HF155 mostrando que, esta última marca está proximamente ligada ao gene de interesse.

Tabela 7 - Resultado das frequências esperadas e observadas e do χ^2 calculado para a marca WB200

	FO	FE	Desvio (FE-FO)	Desvio ²	χ^2 ($\alpha=1\%$)
R1	42	37	5	25	0,68
R0	20	37	17	289	7,81
S1	41	37	4	16	0,43
S0	45	37	8	64	1,73
Total	148	148	-	-	10,65

O uso de resistência genética em linhagens de melão é uma alternativa segura e também um complemento ao controle químico desta doença porém, informações sobre a genética e os mecanismos de genes de resistência são importantes antes da sua introdução no melhoramento genético.

A identificação do marcador HF155 pode agilizar o processo de seleção assistida pois, possibilita o desenvolvimento de outros marcadores de utilização mais rápida e fácil que o AFLP, como o desenvolvimento de marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), exigindo apenas reação de amplificação e análise em gel de agarose.

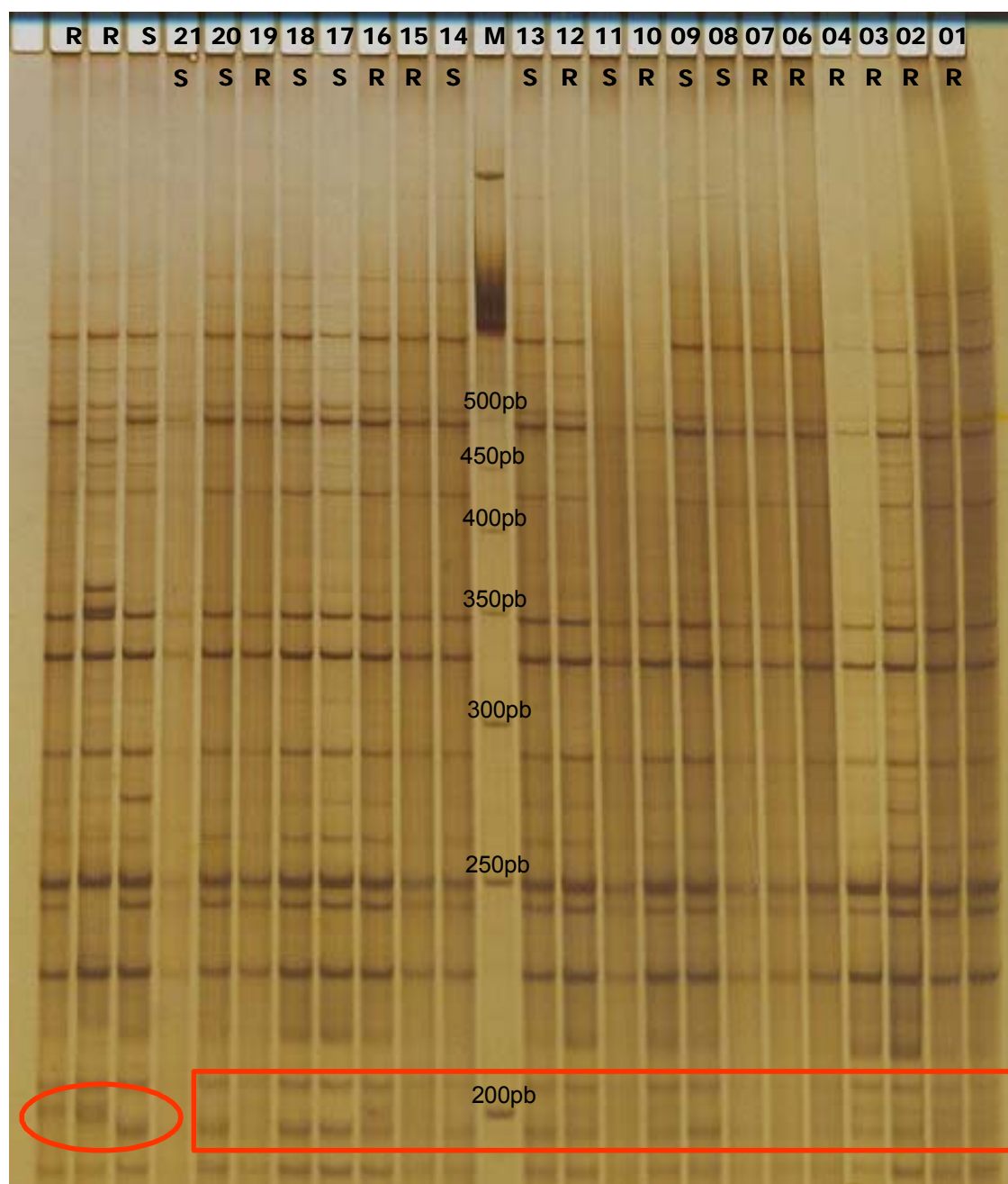


Figura 7 - Gel de AFLP identificando o marcador WB200, encontrado nas linhagens e segregando nos indivíduos da população RC1F1

Tabela 9 - Resultado das frequências esperadas e observadas e do χ^2 calculado para a marca HF155

	FO	FE	Desvio (FE-FO)	Desvio²	χ^2 ($\alpha=1\%$)
R1	62	35,75	26,25	689,06	19,27
R0	0	35,75	35,75	1.278,06	35,75
S1	7	35,75	28,78	828,28	23,12
S0	74	35,75	38,25	1.463,06	40,92
Total	143	143	-	-	119,07

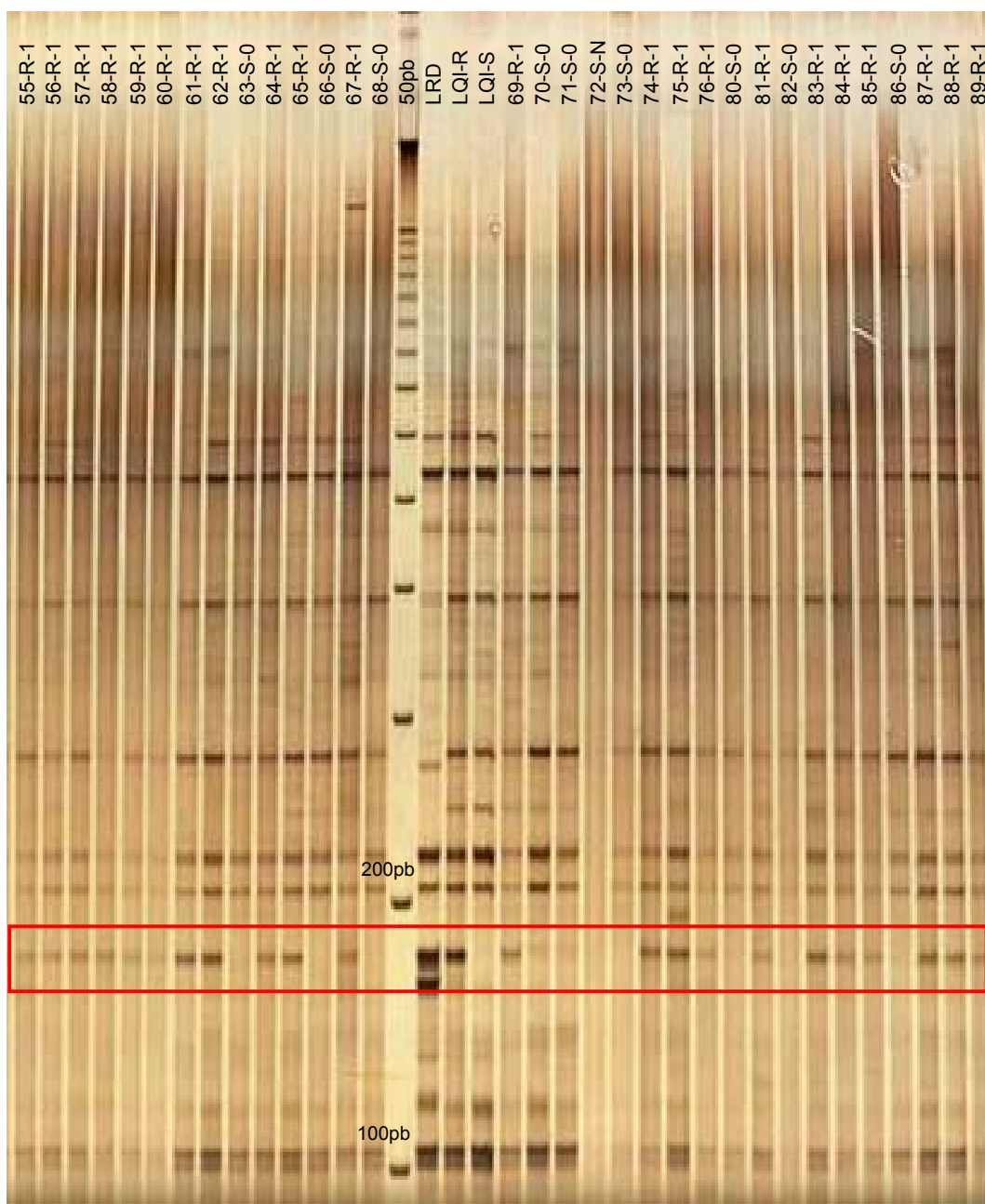


Figura 8 - Gel de AFLP identificando o marcador HF155, encontrado nas linhagens e segregando nos indivíduos da população RC1F1

5 CONCLUSÕES

- 1 - A técnica AFLP foi eficiente na detecção de marcadores moleculares ligados a gene de resistência em melão.
- 2 - O fragmento WB200 não se encontra ligado ao gene de resistência a *Pm-1*, sendo a distância entre ele e o gene de 58 cM. Este fragmento não foi considerado marcador do gene *Pm-1*.
- 3 - O fragmento HF155 encontram-se ligado ao gene de resistência a *Pm-1*, sendo a distância entre ele e o gene de 4,9 cM. Este fragmento foi considerado marcador do gene *Pm-1*.
- 4 - O marcador HF155 pode ser utilizado em programas de melhoramento com seleção assistida por marcadores devido à sua grande proximidade do gene *Pm-1*.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.L.P; CORREIA R.C; ALELUIA, J.C.N. **Custo de produção e rentabilidade do melão do Submédio São Francisco**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2005. 4 p. (Comunicado Técnico, 121).
- BALLANTYNE, B. Powdery mildew on Cucurbitaceae: identity, distribution, host range and sources of resistance. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, Kingsford, v. 99, p. 100-120, 1975.
- 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**, New York, v. 93, p. 57-64, 1996.
- BORÉM, A. CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.
- BROTMAN, Y.; KOVALSKI, I.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; PORTNOY, V.; KATZIR, N.; PERL-TREVES, R. Molecular markers linked to *Papaya ringspot virus* resistance and *Fusarium* race 2 resistance in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 337-345, 2005.
- BROTMAN, Y.; SIBERSTEIN, 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**, New York, v. 104, p. 1055-1063, 2002.
- CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN DE WEG, E.; SCHOUTEN, H.J.; VAN ARKEL, G.; DENANCÉ, C.; DUREL, C.E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 660-668, 2005.
- CASTIGLIOLI, P.; AJMONE-MARSAN, P.; VAN WIJK, R.; MOTTO, M. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution, **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 425-431, 1999.
- COLLINS, N.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J.; PRYOR, A.J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 375-381, 2001.
- COLLINS, N.; WEBB, C.A.; SEACH, S.; ELLIS, J.G.; HULBERT, S.H.; PRYOR, A. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, p. 968-978, 1998.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 19, p. 299-306, 2001.

DIAZ, J.A.; MALLOR, C.; SORIA, C.; CAMERO, R.; GARZO, E.; FERERES, A.; ALVAREZ, J.M.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, L.; LUIS-ARTEAGA, M.; MORIONES, E. Potencial sources of resistance for melon to nonpersistently aphid-borne viruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 960-964, 2003.

FAZZA, A.C. **Caracterização e ocorrência de agentes causais de oídio em cucurbitáceas no Brasil e reação de germoplasma de meloeiro**. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FAZZA, A.C.; KOBORI, R.F.; SUZUKI, O.S.; CAMARGO, L.E.A. Ocorrência da raça 2 de *Podospheera xanthii* em melão em Mossoró (RN). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 136, 2005. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005 Brasília.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Melão. In: _____. **Agriannual 2005**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005, p. 414-415.

GARCIA-MAS, J.; OLIVER, M.; GÓMEZ-PANIAGUA, H.; DE VICENTE, M.V. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 860-864. 2000.

GARCIA-MAS, J.; VAN LEEUWEN, H.; MONFORT, A.; DE VICENTE M.C.; PUIGDOMÉNECH, P.; ARUS, P. Cloning and mapping of Resistance gene homologues in melon. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 165-172, 2001.

GARRITY, P.A.; WOLD, B.J. Effects of different DNA polymerases in ligation-mediated PCR: Enhanced genomic sequencing and in vivo footprinting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 1021-1025, 1992.

GENAMICS EXPRESION. Disponible em:
<<http://genamics.com/expression/index.htm>> Acesso em: 20 mar. 2005.

HANTULA, J.; DUSABENYAGASANI, M.; HAMELIN, R.C. Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 26, p. 159-166, 1996.

HAYES, A.J.; SAGHAI-MAROOF, M. Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLP. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 1279-1283, 2000.

JAGGER, I.C.; WHITAKER T.W.; PORTER, D.R. Inheritance in *Cucumis melo* of resistance to powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 28, p. 761, 1938.

KANAZIN, V.; MAREK, L.F.; SCHOEMAKER, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 11746-11750, 1996.

KARSIES T.; DEAN R.; THOMAS C. Toward the development of molecular markers linked to race 2 *Fusarium* wilt resistance in melon (*Cucumis melo*). **Acta Horticulturae**, Belgium, n. 510, p. 415-420, 2000.

KOBORI, R.F.; SUZUKI, O.; WIERZBICK, R.; DELLA VECCHIA, P.T.D.; CAMARGO, L.E.A. Ocorrência da raça 2 de *Sphaerotheca fuliginea* em melão no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Jaboticabal, v. 27, p. 123, 2002. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife.

KUROZAWA, C. PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas (abóbora, abobrinha, chuchu, melancia, melão, moranga, pepino). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 32, p. 293-302.

LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A PCR-based approach for isolating pathogen Resistance genes from potato with potencial for wide application in plants. **Nature Genetics**, New York, v. 14, p. 421-429, 1996.

LEISTER, D.; KURTH, J.; LAURIE, D.A.; YANO, M.; SASAKI, K.; GRANER, A.; SCHULZE-LEFERT, P. RFLP and physical mapping of resistance gene homologues in rice (*O. sativa*) and barley (*H. Vulgare*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 509-520, 1999.

LIU, D.; LIU, C.; DEVRIES, S.; WALDMAN, F.; COTE, R.J.; DATAR, R.H. LM-PCR permits highly representative whole genome amplification of DNA isolated from small number of cells and paraffin-embedded tumor tissue sections. **Diagnostic Molecular Pathology**, New York, v. 13, p. 105-115, 2004.

MAGO, R.; NAIR, S.; MOHAN, M. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 50-57, 1999.

MALVAS, C.C. **Clonagem e caracterização genética de locos homólogos a genes de resistência em *Brassica oleracea* L. e *Zea mays* L.** 2003. 79 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

McGRATH, M.T. Fungicide Resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and challenges. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 236-245, 2001.

MÉTAIS, J.; AUBRY, C.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 1207-1214, 2000.

MULLER, P.R.; WOLD, B. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. **Science**, Washington, v. 246, p. 780-786, 1989.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 597-602, 1997.

NEWTON, C.; GRAHAM, A. **PCR the introduction to biotechniques** (2^o Ed.). Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1997. 192 p.

OLIVER, M.; GARCIA-MAS, J.; CARDÚS, M.; PUEYO, N.; LÓPEZ-SESÉ, A.I.; ARROYO, M.; GÓMEZ-PANIAGUA, H.; ARÚS, P.; de VICENTE, M.C. Construction of a reference linkage map for melon. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 836-845, 2001.

PARK, Y.H.; SENSOY, S.; CRISPIN, W.; ANTONISE, R.; PELEMAN, J.; HAVEY, M.J. A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs and loci conditioning resistance to *Papaya ringspot* and *Zucchini mosaic viruses*. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 1003-1010, 2000.

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 line populations. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 1017-1034, 2002.

PITRAT, M. **2002 Gene list for melon**. Cucurbit Genetic Cooperative Report, 2002. Disponível em: <<http://cucurbitsvr.hort.ncsu.edu/cgc/cgcgenes/gene02melon.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2007.

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 107-112, 1999.

REGO, A.M. Doenças causadas por fungos em cucurbitáceas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, p. 48-54, 1995.

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

REIS, A.; BUSO, J.A.; VIEIRA, J.V. Seleção de linhagens de melão do tipo valenciano para resistência a *Sphaerotheca fuliginea* raça 1. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 156, 2002. Suplemento.

RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; RAMPIM, L.; CARVALHO, V.P.; RUAS, E.A.; SERA, T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 319-327, 2003.

SALES JÚNIOR, R.; VILLELA, A.L.G.; AMARO FILHO, J.; SILVA, G.F.; COSTA, F.M. Eficiência de difenoconazole no controle de oídio do melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 122, 2002. Suplemento.

SANTOS, A.A.; VIANA, F.M.P.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C. Efeito do oídio na produção e no teor de sólidos solúveis totais de frutos do meloeiro. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 36, p. 354-357, 2005.

SEAH, S.; SIVASITHAMPARAM, K.; KARAKOUSIS, A.; LAGUDAH, E.S. Cloning and characterization of family of disease resistance gene analogs from wheat and barley. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 937-945, 1998.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em:
<<http://www.portaldoexportador.gov.br>>. Acesso em: 20 jan. 2007.

SOUSA, V.F.; RODRIGUES, B.H.N.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; COELHO, E.F.; VIANA, F.M.P.; SILVA, P.H.S. **Cultivo do meloeiro sob fertirrigação por gotejamento no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 1999. 68 p. (Circular Técnica, 21).

STADNIK, M.J.; KOBORI, R.F.; BETTIOL, W. Oídios de cucurbitáceas. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (Ed.). **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001, cap. 9, p. 217-254.

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

TEIXEIRA, A.P.M. **Identificação de marcadores moleculares ligados a gene de resistência ao vírus do mosaico (PRSV-W) em melão (*Cucumis melo* L.)**. 2004. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

THOMAS, C.E.; WEBB, R.E. Cinco muskmelon. **HortScience**, Saint Joseph, v. 17, p. 585-684, 1982.

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**, North Carolina, v. 7, p. 58-59, 1984.

TROGNITZ, F.; MANOSALVA, P.; GYSIN, R.; NINIO-LIU, D.; SIMON, R.; DEL HERRERA, M.R.; TROGNITZ, B.; GHISLAIN, M.; NELSON, R. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* × dihaploid *S. tuberosum* hybrids. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 587-597, 2002.

VAN DER LINDEN, C.G. Efficient targeting of plant disease Resistance loci using NBS profiling. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, p. 384-393, 2004.

VAN ECK, H.J.; VAN DER VOORT, J.R.; DRAAISTRA, J.; VAN ZANDVOORT.; VAN ENCKEVORT. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-imbred potato offspring. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, p. 397-410, 1995.

VIANA, F.M.P.; SANTOS, A.A.; FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C. **Recomendação para controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na Região Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 21 p. (Circular Técnica, 12).

VIRTUAL GENOME CENTER. Disponível em:
<<http://alces.med.umn.edu/bin/webprimers>>. Acesso em: 12 mar. 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

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

YU, Y.G.; BUSS, G.R.; SAGHAI-MAROOF, M.A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 11751-11756, 1996.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprint by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR amplification. **Genomics**, Orlando, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1996. 234 p.

ANEXOS

Tabela 6 - Resultados da fenotipagem (Fen) e da genotipagem (Gen) dos indivíduos (Ind) da população segregante RC1F1 para o fragmento WB200. R=resistente, S=suscetível, 1=presença do fragmento e 0=ausência do fragmento (continua)

Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.
1	R	1	41	S	0	81	S	1	121	S	1	154	S	1
2	R	1	42	R	1	82	S	0	123	S	0	155	R	1
3	R	1	43	D	1	83	S	1	124	R	0	156	S	1
4	S	1	44	S	0	84	S	1	125	R	1	157	R	1
5	R	0	46	S	0	85	S	1	126	R	1	158	R	0
6	S	1	47	S	1	86	S	0	127	S	1	159	D	1
7	D	9	48	R	0	87	R	0	128	R	1	160	R	1
8	R	9	49	R	1	88	R	1	129	S	1	161	R	0
9	S	0	50	S	0	89	R	0	130	D	1	162	R	0
10	S	1	51	S	1	90	R	1	131	R	1	163	S	0
11	R	9	52	R	0	91	S	9	132	D	0	164	R	1
12	R	1	53	R	0	92	S	0	133	S	0	165	S	1
13	S	0	54	R	1	93	S	0	134	S	0	166	D	1
14	S	0	55	S	0	94	S	9	135	R	1	167	D	1
15	R	0	56	R	1	95	S	1	136	S	0	168	R	1
16	R	1	57	R	9	96	R	0	137	R	0	169	D	9
17	R	0	58	R	1	97	S	1	138	S	0	170	S	0
18	S	0	59	S	0	98	S	1	139	R	0	171	S	0
19	R	1	60	R	0	99	S	1	140	R	0	172	S	0
20	S	0	61	S	1	100	R	1	141	S	9	173	S	0
21	S	9	62	S	0	101	D	1	142	S	1	174	S	0
22	R	9	63	S	1	102	S	1	143	D	0	176	S	0
23	R	9	64	D	1	103	S	1	144	S	9	177	R	1
24	S	0	65	R	1	104	S	0	145	S	9	178	R	1
25	S	1	66	R	0	105	S	1	146	D	1	179	S	1
26	R	9	67	R	9	106	S	0	147	S	1	180	R	1
27	S	1	68	R	1	107	R	1	148	D	1	181	S	1

Tabela 6 - Resultados da fenotipagem (Fen) e da genotipagem (Gen) dos indivíduos (Ind) da população segregante RC1F1 para o fragmento WB200. R=resistente, S=suscetível, 1=presença do fragmento e 0=ausência do fragmento (conclusão)

Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.
28	R	0	69	D	1	108	R	1	149	S	1	182	S	1
29	R	1	70	R	9	109	S	0	150	D	1	183	S	0
30	R	9	71	D	0	110	R	1	151	S	1	184	S	0
31	S	0	72	S	0	111	S	1	152	S	1	185	S	0
32	D	1	73	S	0	112	R	1	153	R	1	186	R	1
33	S	9	74	R	0	113	S	0	154	S	1	187	S	1
34	R	9	75	S	0	114	R	1	155	R	1	188	S	0
35	S	0	76	D	1	116	S	1	156	S	1	189	R	1
37	R	1	77	S	9	117	S	1	157	R	1	190	S	1
38	S	9	78	D	1	118	S	0	158	R	0	191	S	1
39	S	0	79	R	1	119	R	1	159	D	1	193	S	0
40	R	1	80	S	1	120	D	0	160	R	1			

Tabela 8 - Resultados da fenotipagem (Fen) e da genotipagem (Gen) dos indivíduos (Ind) da população segregante RC1F1 para o fragmento HF155. R=resistente, S=suscetível, 1=presença do fragmento e 0=ausência do fragmento. (continua)

Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.
1	R	1	62	S	0	110	R	1	162	R	1	179	S	0
2	R	1	63	S	0	111	S	0	163	S	0	180	R	1
3	R	1	65	R	1	113	S	0	164	R	1	181	S	0
4	S	0	66	R	1	114	R	1	165	S	0	182	S	0
6	S	0	67	R	1	116	S	0	168	R	1	183	S	0
8	R	1	68	R	1	117	S	0	170	S	0	185	S	1
9	S	1	72	S	0	119	R	1	171	S	0	186	R	1
10	S	0	73	S	0	121	S	1	172	S	0	187	S	0
11	R	1	74	R	1	123	S	0	173	S	0	188	S	0
12	R	1	75	S	0	124	R	1	174	S	0	189	R	1
13	S	0	77	S	0	125	R	1	176	S	0	190	S	0
14	S	0	79	R	1	126	R	1	177	R	1	191	S	0
15	R	1	80	S	0	127	S	0	178	R	1	193	S	0
16	R	1	82	S	0	128	R	1	179	S	0			
17	R	1	83	S	0	129	S	0	180	R	1			
19	R	1	84	S	0	131	R	1	181	S	0			
20	S	0	85	S	0	133	S	0	182	S	0			
21	S	0	86	S	0	134	S	0	183	S	0			
22	R	1	87	R	1	135	R	1	185	S	1			
23	R	1	88	R	1	136	S	0	186	R	1			
25	S	0	89	R	1	137	R	1	187	S	0			
30	R	1	90	R	1	138	S	0	188	S	0			
34	R	1	91	S	0	139	R	1	189	R	1			
41	S	0	92	S	0	140	R	1	190	S	0			
44	S	1	93	S	0	141	S	0	191	S	0			
46	S	0	94	S	0	142	S	1	193	S	0			
47	S	0	95	S	0	144	S	0	162	R	1			
48	R	1	96	R	1	145	S	0	163	S	0			

Tabela 8 - Resultados da fenotipagem (Fen) e da genotipagem (Gen) dos indivíduos (Ind) da população segregante RC1F1 para o fragmento HF155. R=resistente, S=suscetível, 1=presença do fragmento e 0=ausência do fragmento. (conclusão)

Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.	Ind.	Fen.	Gen.
49	R	1	97	S	0	147	S	0	164	R	1			
50	S	0	98	S	0	149	S	0	165	S	0			
51	S	0	99	S	0	152	S	0	168	R	1			
52	R	1	100	R	1	153	R	1	170	S	0			
53	R	1	102	S	1	154	S	0	171	S	0			
54	R	1	104	S	1	155	R	1	172	S	0			
55	S	0	105	S	0	156	S	0	173	S	0			
56	R	1	106	S	0	157	R	1	174	S	0			
57	R	1	107	R	1	158	R	1	176	S	0			
58	R	1	108	R	1	160	R	1	177	R	1			
61	S	0	109	S	0	161	R	1	178	R	1			