

CARMEM VALDENIA DA SILVA SANTANA

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELANCIA À
Monosporascus cannonballus **E CARACTERIZAÇÃO**
MOLECULAR POR MEIO DE MARCADORES RAPD

MOSSORÓ-RN

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARMEM VALDENIA DA SILVA SANTANA

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELANCIA À *Monosporascus*
cannonballus E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MEIO DE
MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

ORIENTADOR: DSC. RUI SALES JUNIOR
CO-ORIENTADORA: DSC. IONÁ SANTOS ARAÚJO
CO-ORIENTADOR: DSC. GLAUBER HENRIQUE DE
SOUZA NUNES

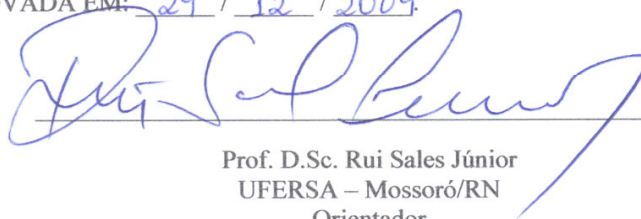
MOSSORÓ – RN
2009

CARMEM VALDENIA DA SILVA SANTANA


REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELANGIA À *Monosporascus cannonballus* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MEIO DE MARCADORES RAPD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

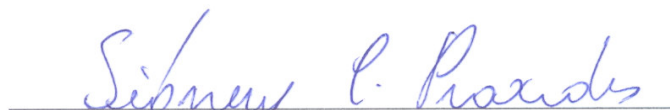
APROVADA EM: 29 / 12 / 2009



Prof. D.Sc. Rui Sales Júnior
UFERSA – Mossoró/RN
Orientador



Prof. D.Sc. Lindomar Maria da Silveira
UFERSA – Mossoró/RN
Conselheiro



Prof. D.Sc. Sidney Carlos Praxedes
UFRN – Natal/RN
Conselheiro

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da
UFERSA**

| | |
|-------|---|
| S232r | <p>Santana, Carmem Valdenia da Silva. Reação de genótipos de melancia à <i>Monosporascus cannonballus</i> e caracterização molecular por meio de marcadores RAPD / Carmem Valdenia da Silva Santana. -- Mossoró, 2009.</p> <p>92f. il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Fitotecnia - Área de concentração Proteção de Plantas) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação. Orientador: Prof. D.Sc. Rui Sales Júnior. Co-orientadora: Prof. D. Sc. Ioná Santos Araújo. Co-orientador: Prof. D. Sc. Glauber Henrique de Souza Nunes</p> <p>1.<i>Citrullus lanatus</i> L. 2.Fitopatógeno radicular. 3.Polimorfismo. 4.Marcador RAPD. I.Título.</p> <p>CDD: 634.651</p> |
|-------|---|

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

À minha querida família, por estar sempre presente na minha vida, me incentivando e apoiando a todo o momento. Amo vocês!

Dedico

À minha mãe, por todo amor, incentivo, compreensão e dedicação para que eu alcançasse mais esse objetivo na minha vida.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que tens me proporcionado viver e aprender e por estar sempre presente na minha vida.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) pelas oportunidades de ensino e por toda estrutura para realização de pesquisas científicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do Projeto de Pesquisa 478087/2008-0 e da bolsa de PQ n° 307396/2006-1.

À Pós-graduação em Fitotecnia, em especial a todos que compõem o corpo docente, pelos ensinamentos transmitidos durante o mestrado, contribuindo assim, para minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À meu orientador Rui Sales Junior pela orientação e conhecimentos transmitidos e pelo apoio no desenvolvimento da dissertação.

À minha Co-orientadora Ioná Santos Araújo por todos os ensinamentos, incentivo e força nos momentos que mais precisei.

À meu Co-orientador Glauber Henrique de Souza Nunes pelo auxílio no desenvolvimento da dissertação.

Aos Professores Sidnei Miyoshi Sakamoto e Luiz Augusto, por colaborar pela colaboração e gentileza.

À todos os bolsistas do Laboratório de Fitopatologia, em especial à Diêgo, Leidiane, Angélica e Vitor, por me ajudar bastante na condução do experimento, pela convivência e paciência durante esses dois anos de convivência.

Aos meus amigos de curso, em especial a Lonjoré, Sílvia Regina, Carlos Eduardo, Patrícia, Doralice, Dalila e Lisiane por todo apoio e incentivo.

Ao Professor Francisco Bezerra Neto pela preocupação, carinho e incentivo.

À minha família por tudo que representa na minha vida, pelo amor, dedicação, incentivo, paciência, compreensão demonstrados.

À todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

SANTANA, Carmem Valdenia da Silva. **Reação de genótipos de melancia à *Monosporascus cannonballus* e caracterização molecular por meio de marcadores RAPD.** 2009. 92f. (Dissertação) Mestrado em Agronomia: Fitotecnia – Universidade Federal Rural do Semi-Árido/UFERSA, Mossoró-RN, 2009.

Foram realizados dois experimentos, o primeiro objetivando avaliar a reação de genótipos de melancia à *Monosporascus cannonballus* e o segundo, caracterizar molecularmente os genótipos utilizando marcadores RAPD. Utilizou-se 29 genótipos de melancia, os quais foram semeados em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial e transplantadas 15 dias após semeio para vasos com capacidade para 2 kg. O primeiro experimento foi avaliado sessenta dias após transplante, tendo como variáveis: altura da planta, massa fresca e seca de parte aérea, volume de raiz, massa fresca e seca de raiz, danos às raízes, índice geral de doença, frequência de isolamento, população inicial e final de ascósporos e incremento populacional. O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento e a análise estatística foi realizada através de teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Além disso, visando relacionar os danos às raízes de melancia sobre as variáveis analisadas, os dados médios foram submetidos à análise de correlação de Spearman, aos níveis de 1 e 5% de probabilidade. Os genótipos ML-SF-44, ML-SF-45, Melancia 40, Nr 06, Kudam, Premium, Style, Bobbie, TPC-00247, TPX-03521, TPX-03522 e TPX-06637 foram classificados como medianamente resistentes. Os genótipos Crimson Sweet, Quetzali, ML-SF-43, ML-SF-41, Nr 03, Boston, Pixie, Ivona, Fashion, TPC-31181, Jenny, Vanessa, Nun 6034, Tiger Baby, Sy 7780 como suscetíveis e, Nr 02 e Sy 3151 classificados como muito suscetíveis. Houve correlação significativa entre danos às raízes e MFPA, VR, MFRAIZ e MSRAIZ. No segundo experimento, realizou-se a extração e quantificação dos DNAs dos 29 genótipos de melancia. A amplificação do DNA foi através da técnica de PCR utilizando 20 *primers* RAPD, dos quais, apenas 6 geraram produto de amplificação. A análise de dissimilaridade genética foi realizada utilizando-se o *software* Genes e o polimorfismo revelado por estes marcadores foi utilizado para estimar os coeficientes de similaridade de Jaccard médios para cada genótipo e realizar a análise de agrupamento pelo método de UPGMA. Formou-se 6 grupos distintos. O

grupo I foi formado pelo genótipo Crimson Sweet. O grupo II foi constituído pelos genótipos ML-SF-44 e ML-SF-41. O grupo III foi formado pela maioria dos genótipos (ML-SF-45, Nr 06, Ivona, TPX-03521, TPC-31181, TPX-06637, Melancia 40, TPC-00247, Kudam, TPX-03522, Fashion, Nr 03, Bobbie, Sy 7780, Jenny, Nun 6034, Premium, Boston, Pixie, Tiger Baby e Sy 3151), os quais são provenientes de empresas diferentes. Os grupos IV, V e VI foram constituídos por apenas um genótipo cada, o ML-SF-43, Vanessa e Nr 02, respectivamente. Os marcadores mais polimórficos foram OPF-02 e OPO-15, com formação de 11 e 10 bandas, respectivamente. Os genótipos ML-SF-43 e Nr 02 foram os mais divergentes.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus* L. Fitopatógeno radicular. Polimorfismo. Marcador RAPD.

ABSTRACT

SANTANA, Carmem Valdenia da Silva. **Reaction of genotypes the watermelon to *Monosporascus cannonballus* and characterization using molecular markers RAPD.** 2009. 92f. (Dissertation) Ms. in Agronomy: Plant Science – Universidade Federal Rural do Semi-Árido/UFERSA, Mossoró-RN, 2009.

Two experiments were conducted, the first to evaluate the reaction of genotypes of watermelon to *Monosporascus cannonballus* and the second, to molecularly characterize these genotypes by RAPD. Twenty-nine genotypes of watermelon were used, sown in polystyrene trays containing commercial substrate, and transplanted to pots with a capacity of 2 kg 15 days after sowing. The first experiment was evaluated sixty days after transplanting, using the following variables: plant height, fresh (MFPA) and dry weight of aerial part, root volume (VR), root fresh (MFRAIZ) and dry (MSRAIZ) weight, damage to the roots, general disease index, frequency of isolation, initial and final population of ascospores, and population increase. The experimental set up was a completely random design with 5 replications for each treatment and the statistical analysis was carried out using the multiple comparison test of Kruskal-Wallis. Furthermore, to relate damage of the watermelon roots to the analyzed variables, the mean data were submitted to a Spearman correlation analysis, at 1 and 5% of probability. The Genotypes ML-SF-44, ML-SF-45, Watermelon 40, Nr 06, Kudam, Premium, Style, Bobbie, TPC-00247, TPX-03521, TPX-03522 and TPX-06637 were classified as moderately resistant. The Genotypes Crimson Sweet, Quetzali, ML-SF-43, ML-SF-41, Nr 03, Boston, Pixie, Ivona, Fashion, TPC-31181, Jenny, Vanessa, Nun 6034, Tiger Baby, Sy 7780 were classified as susceptible, and the Nr 02 and Sy 3151 as very susceptible. There was significant correlation between root damage and MFPA, VR, MFRAIZ and MSRAIZ. In the second experiment, the extraction and quantification of DNA was carried out for all 29 genotypes of watermelon. The DNA was amplified by PCR using 20 RAPD *primers*, of which only 6 led to an amplification product. The analysis of genetic dissimilarity was performed using the Genes software and the polymorphism revealed by the markers was used to estimate the average Jaccard's similarity coefficients for each genotype and perform a UPGMA cluster analysis. Six different groups were established. Group I was formed by the genotype Crimson Sweet. Group II was composed of the genotypes ML-SF-44 and ML-SF-41. Group III was formed by most of the

genotypes (ML-SF-45, Nr 06, Ivona, TPX-03521, TPC-31181, TPX-06637, Watermelon 40, TPC-00247, Kudam, TPX-03522, Fashion, Nr 03, Bobbie, Sy 7780, Jenny, Nun 6034, Premium, Boston, Pixie, Tiger Baby and Sy 3151), which come from different companies. Groups IV, V and VI were composed of just one genotype each: ML-SF-43, Vanessa and Nr 02, respectively. The most polymorphic markers were OPF-02 and OPO-15, with formation of 11 and 10 bands, respectively. The Genotypes ML-SF-43 and Nr 02 were the most divergent.

Keywords: *Citrullus lanatus* L. Root pathogen. Polymorphism. RAPD marker.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1-** Característica física e química do solo coletado em área comercial naturalmente infestada com *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 51
- Tabela 2-** Relação dos 29 genótipos de melancia e suas respectivas empresas. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 52
- Tabela 3-** Rank médio e médias de altura de plantas (AP) e massa fresca (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA) avaliadas em 29 genótipos de melancia cultivados em solo naturalmente infestado com *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 57
- Tabela 4-** Rank médio e médias de volume de raiz (VOL) e massa fresca (MFRAIZ) e seca de raiz (MSRAIZ) avaliadas em 29 genótipos de melancia cultivados em solo naturalmente infestado com *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 58
- Tabela 5-** Rank médio e médias de danos nas raízes (Danos), índice geral de doença (IGD), incremento populacional e frequência de isolamento (FI) de *Monosporascus cannonballus* avaliadas em 29 genótipos de melancia cultivados em solo naturalmente infestado com *M.cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 61
- Tabela 6-** Coeficientes de correlação de Spearman entre danos às raízes (DANOS) e altura de plantas (AP), massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, volume de raiz (VR), massa fresca (MFRAIZ) e seca (MSRAIZ) de raiz, frequência de isolamento (FI) e população final de ascósporos (PF), avaliadas em reação de 29 genótipos de melancia à *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 64

CAPÍTULO III

Tabela 1- Relação dos 29 genótipos de melancia e suas respectivas empresas. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 76

Tabela 2- Relação dos *primers* RAPD e respectivas sequências de bases utilizados na amplificação de fragmentos de DNA de 29 genótipos de melancia Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1-** Peritécios de *M.s cannonballus* infiltrados nas raízes. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 27

CAPÍTULO II

- Figura 1-** População final de ascósporos de *M. cannonballus* em solo naturalmente infestado, cultivado com 29 genótipos de melancia. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 62

- Figura 2-** Médias de temperatura (°C) registrada durante o experimento de reação dos 29 genótipos de melancia à *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 65

CAPÍTULO III

- Figura 1-** Quantificação de 22 DNAs em gel de agarose a 1%. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 80

- Figura 2-** Eletroforese de fragmentos RAPD (*primer* OPO-06) em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. A seta mostra o marcador RAPD polimórfico. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 81

- Figura 3-** Padrão de dissimilaridade genética obtido entre 27 genótipos de melancia definido pelo método de UPGMA. Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 83

LISTA DE ANEXO

ANEXO..... 88

Anexo 1- Matriz de distância genética entre 27 genótipos de melancia.
Mossoró-RN, UFERSA, 2009..... 89

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO..... | 17 |
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| GERAL..... | 17 |
| 2 REFERENCIAL | 21 |
| TEÓRICO..... | 21 |
| 2.1 IMPORTÂNCIA DA MELANCIA..... | 21 |
| 2.2 ORIGEM E BOTÂNICA..... | 21 |
| 2.3 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS FAVORÁVEIS..... | 23 |
| 2.4 DOENÇAS NA CULTURA DA MELANCIA..... | 23 |
| 2.4.1 “Colapso” ou “declínio” de ramos em melancia..... | 24 |
| 2.4.2 <i>Monosporascus cannonballus</i>..... | 24 |
| 2.4.3 Sintomatologia da doença..... | 26 |
| 2.4.4 Danos econômicos..... | 27 |
| 2.4.5 Controle..... | 28 |
| 2.4.5.1 Químico..... | 28 |
| 2.4.5.2 Físico..... | 29 |
| 2.4.5.3 Biológico..... | 29 |
| 2.4.5.4 Cultural..... | 30 |
| 2.4.5.5 Genético..... | 31 |
| 2.5 IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES EM PLANTAS..... | 32 |
| 2.5.1 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.1.1 Aplicações da técnica em estudos de variabilidade genética de plantas..... | 34 |
| REFERÊNCIAS..... | 36 |
| | |
| CAPÍTULO II - REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELANCIA À <i>Monosporascus cannonballus</i>..... | 46 |
| RESUMO..... | 46 |
| ABSTRACT..... | 47 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 48 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 51 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 56 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 66 |
| REFERÊNCIAS..... | 67 |
| | |
| CAPÍTULO III - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE MELANCIA POR MEIO DE MARCADORES RAPD | 71 |
| RESUMO..... | 71 |
| ABSTRACT..... | 72 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 73 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 76 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 80 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 84 |
| REFERÊNCIAS..... | 85 |

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

3 INTRODUÇÃO GERAL

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai] é atualmente uma das principais frutas em volume de produção mundial. Segundo dados da FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations) referentes a produção de melancia no ano de 2007, os principais países produtores são a China (68%), Turquia (3,9%), Irã (3,4%) e Brasil (2,2%), que juntos perfazem uma produção mundial de 77,5% (FAO, 2009).

Nos últimos anos, esta cultura vem se destacando como um importante produto do agronegócio brasileiro, ocupando a 7ª posição no *ranking* das frutas mais exportadas em 2008, com volume de exportação de 43.468,6 toneladas, o equivalente a 18,1 milhões de dólares (IBRAF, 2009), estando sua produção distribuída entre as regiões Sul, Nordeste, Sudeste e Norte.

No Nordeste, merecem destaque os estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, responsáveis por 19,12% da produção nacional dessa fruta, com uma área colhida de 21.125 hectares (AGRIANUAL, 2008). No Rio Grande do Norte, a melancia tem grande importância entre os pequenos, médios e grandes produtores em razão das boas condições climáticas e do promissor mercado consumidor, deixando de ser uma cultura explorada apenas no período das chuvas, onde a produção era destinada a mercados locais, para se tornar uma atividade tecnificada, destinando sua produção a grandes mercados nacionais e internacionais.

Apesar de sua grande importância agrícola, esta cultura ainda enfrenta muitos problemas fitossanitários, com consideráveis perdas, devido principalmente à ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus

(LOPES; REIS; LIMA, 2008). Entre elas, as causadas por patógenos radiculares têm se destacado, já que ocasiona um “colapso” ou “declínio” de ramos em momentos próximos a colheita. Trata-se de uma doença emergente na região, para a cultura da melancia. Porém, esta enfermidade já foi relatada em outros países em áreas de produção com características áridas e semi-áridas (BOUGHALLEB, 2001), refletindo em perdas de produtividade na cultura. Os sintomas se apresentam de forma rápida, com uma murcha generalizada da planta seguida de morte, geralmente na época de maturação dos frutos, onde a planta apresenta uma maior demanda por água (BOUGHALLEB; MAHJOUB, 2006).

Atualmente um dos fitopatógenos responsáveis por esta síndrome em melão e melancia no mundo é o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker (MARTYN; MILLER, 1996), estando descrito em melancia em países como Tunísia (MARTYN et al., 1994), Estados Unidos - Califórnia (BRUTON; DAVIS; GORDON, 1995), México (MARTYN et al., 1996), Itália (GENNARI et al., 1999) e mais recentemente no Egito (EL-DESOUKY e EL-WAKIL, 2003). No Brasil, o fungo foi relatado pela primeira vez em 2008, em áreas de cultivo de melancia nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (SALES JUNIOR et al., 2010).

Inúmeros programas de controle foram elaborados para deter essa enfermidade em meloeiro, ainda que o controle químico desse patógeno tenha sido pouco efetivo (COHEN et al., 1999). A resistência genética seria uma excelente alternativa, embora se desconheça cultivares comerciais ou porta-enxerto de cucurbitáceas com níveis aceitáveis de tolerância ou resistência (WOLFF; MILLER, 1998; SALES JUNIOR et al., 2002; DIAS et al., 2004).

Alguns trabalhos têm sido realizados visando a obtenção de plantas resistentes a patógenos, merecendo destaque o estudo realizado por Sales Junior et al. (2002) que, avaliando o comportamento de melão e melancia em solo inoculado com *M. cannonballus*, concluíram que as duas cultivares de melancia estudadas apresentaram um bom comportamento em relação ao fungo. No entanto, trabalhos realizados por diversos autores têm relatado a suscetibilidade da melancia a outros patógenos, tais como *Phytophthora capsici* Leonian (HENZ; LIMA, 1994),

Didymella bryonae (Fuckel) Rehm (DIAS; QUEIRÓZ; MENEZES, 1996) e *Fusarium oxysporum* [Schlechtend : Fr f.sp. *niveum* (EFSm) W.C Snyder Hans] (HUH et al., 2002). Essa suscetibilidade pode está ligada a fatores genéticos, pois segundo Queiróz (1993) a melancia cultivada apresenta base genética muito estreita, contribuindo assim para a suscetibilidade à diversas doenças. Por isso, é importante que o estudo de reação de genótipos a diversos fitopatógenos seja realizado conjuntamente com a caracterização molecular das espécies vegetais em questão, tornando os resultados mais consistentes, pois serão analisados à nível de DNA, ou seja, sem influência de fatores ambientais.

Nesse sentido, os marcadores de DNA têm sido utilizados para seleção de genótipos resistentes a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região, avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento dos pais de híbridos, desenvolvimento de mapas genéticos, determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose, testes de pureza genética, associação com caracteres quantitativos, estudos de interação genótipo-ambiente, entre outros (RAFALSKI; TINGEY, 1993; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998a, 1998b).

Atualmente existem diversas classes de marcadores moleculares utilizados para esse fim, dentre eles pode-se citar os marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), que se caracteriza por ser uma técnica simples, rápida, de fácil execução, baixo custo e aplicável a qualquer tipo de organismo. A técnica RAPD tem se mostrado extremamente útil para caracterizar a variabilidade genética de muitas espécies, inclusive em espécies de melancia, devido a sua facilidade de execução (FERREIRA, 2000; LEVI et al., 2002; CAPELITO; UNEDA; MAURO, 2004). Análises de polimorfismo de DNA com marcadores RAPD vêm sendo amplamente utilizadas na identificação e seleção eficiente dos genótipos que carregam combinações específicas de genes de resistência (FOOLAD; JONES; RODRIGUES, 1993; HALEY; AFANADOR; KELLY, 1994).

Alguns trabalhos de estudo de diversidade genética em melancia utilizando marcadores RAPD têm sido realizados. Lee et al. (1996) avaliou 39 acessos de

melancia cultivada e observou que 15 *primers* amplificaram os fragmentos de DNA e que cada *primer* produziu de três a cinco fragmentos por genótipo, totalizando 166 fragmentos detectados, sendo que desses, 100 (62%) foram polimórficos e 62 (38%) foram monomórficos.

Já Levi et al. (2000) estimou a divergência genética entre 30 acessos de *Citrullus* usando RAPD e encontrou três grupos distintos, *C. colocynthis* (L.) Schrad., *C. lanatus* var. *citroide* (L. H. Bailey) Mansf. e *C. lanatus* var. *lanatus*. O nível de variação dentro de *C. colocynthis* e *C. lanatus* var. *citroide* foi alto quando comparado com *C. lanatus* var. *lanatus* (74,2%, 82,8% e 87,5%, respectivamente), mostrando baixa variação entre as melancias cultivadas (93,1%) de similaridade.

Tendo em vista a importância econômica da melancia para o estado do Rio Grande do Norte, é interessante que trabalhos que avaliem a reação de genótipos de melancia à *M. cannonballus*, assim como a variabilidade genética existente entre esses materiais vegetais sejam estudados, visando a obtenção de genótipos resistentes/tolerantes ao patógeno em questão. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a reação de genótipos de melancia à *Monosporascus cannonballus* e caracterizar geneticamente a variabilidade desses materiais vegetais através de marcadores RAPD.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 IMPORTÂNCIA DA MELANCIA

A melancia é atualmente umas das principais frutas em volume de produção mundial. A China, Turquia, Irã e Brasil, são seus maiores produtores, correspondendo com mais de 77% da produção mundial (FAO, 2009). No Brasil é uma das cucurbitáceas mais cultivadas, destacando-se nos últimos anos como um importante produto do agronegócio brasileiro, ocupando a 7ª posição no *ranking* das frutas mais exportadas em 2008, com volume de exportação de 43.468,6 toneladas, o equivalente a 18,1 milhões de dólares (IBRAF, 2009).

No Brasil, a produção dessa fruta está distribuída entre as regiões Sul (34,34%), Nordeste (30,10%), Sudeste (14,9%) e Norte (11,9%), sendo que os principais estados produtores são Rio Grande do Sul, São Paulo, Bahia, Rio Grande do Norte, Goiás e Tocantins, participando com 26,15%, 12,3%, 9,43%, 7,72%, 6,77% e 5,7% da produção nacional, respectivamente (VILELA, 2006). Segundo Agriannual (2008), os estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, foram responsáveis por 19,12% da produção nacional dessa fruta, com uma área colhida de 21.125 hectares. No estado do Rio Grande do Norte, mais precisamente no pólo agrícola Mossoró-Assu, a melancia está entre os produtos mais produzidos e exportados, deixando de ser uma cultura explorada apenas no período das chuvas, para se tornar uma atividade tecnificada, praticada por pequenas, médias e grandes empresas, destinando sua produção a grandes mercados como o CEAGESP-SP e, mais recentemente, ao mercado externo (TORRES, 2007).

4.2 ORIGEM E BOTÂNICA

A melancia é uma olerícola pertencente a família Cucurbitaceae, classificada dentro da divisão Magnoliophyta (Spermatophyta), classe Magnoliopsida

(Campanulales), subclasse Dileniidae (Dicotiledone), ordem Violales (BARROSO, 1978; JOBST; KING; HEMLEBEN, 1998) que tem como provável centro de origem regiões quentes da África (FILGUEIRA, 2003).

É uma planta herbácea, anual, que possui caule rastejante, fino, angular, provido de pêlos e de gavinhas ramificadas (PUIATTI; SILVA, 2005). O sistema radicular é extenso, mais desenvolvido horizontalmente, concentrando-se nos primeiros 30 cm do solo.

O hábito de florescimento é monóico e, tanto as flores masculinas como femininas se encontram nas ramas principais, na axila das folhas (FILGUEIRA, 2003). Segundo Rhodes e Zhang (1995) estudos sobre a expressão do sexo têm demonstrado a existência de populações monóicas e andromonóicas, sendo que nas primeiras, a planta apresenta flores masculinas e femininas, enquanto nas andromonóicas a planta possui flores masculinas e hermafroditas.

O fruto é uma baga indeiscente com variabilidade em forma (globular, esférica, oval, cilíndrica), sabor (°Brix) e cor da superfície externa (verde claro, verde escuro, com ou sem listras) e interna (vermelho e amarelo). A coloração amarela dos frutos deve-se a presença de carotenos e xantofilas e a vermelha, é devido à presença de licopeno, um caroteno com elevada atividade antioxidante. As sementes podem apresentar tamanhos diversos e cores variando de cinza a preto, as quais ficam embebidas na placenta, que é a principal parte comestível do fruto (PUIATTI; SILVA, 2005).

Suas cultivares podem ser divididas em três grupos: globular, alongado e sem semente. A cultivar Crimson Sweet, do grupo globular, é a mais plantada nas regiões produtoras do Brasil. Possui frutos globulares ou globular-alongados, casca rajada, de coloração verde-clara e verde-escura, com frutos que pesam de 10 a 13 kg e tem polpa de boa qualidade. Do grupo alongado, a cultivar típica é a Charleston Gray, que produz frutos cilíndricos, com casca verde-clara e finas estrias de coloração escura e peso de fruto variando de 12 a 15 kg. As cultivares sem sementes são híbridos auto-estéreis que produzem melancias globulares, de coloração verde-escura ou rajada em dois tons de verde, com polpa vermelho-viva, de alta qualidade e com peso que variam de 5 a 8 kg (FILGUEIRA, 2003).

4.3 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS FAVORÁVEIS

No Brasil, a melancia encontra excelentes condições climáticas, tais como alta temperatura e luminosidade, e baixa umidade relativa do ar para o seu desenvolvimento (MOITOKÉ; SALOMÃO; SIQUEIRA, 1998). A região Nordeste apresenta essas condições edafoclimáticas, propiciando alta produtividade a esta cultura, colocando-a em uma posição de destaque na fruticultura tropical (MEDEIROS et al., 2006).

A germinação das sementes requer temperatura relativamente alta, sendo que a maioria das cultivares apresenta boa germinação com temperaturas de 25 a 35° C, emergindo uma semana após a sementeira. As cultivares triplóides (sem sementes) exigem temperaturas mais elevadas do que as diplóides, com o ideal acima de 30 °C. Durante o ciclo, o ótimo fica em torno de 30 °C (dia) e 20 °C (noite). No caso da floração, a temperatura mínima para permitir a abertura das anteras é de 18 °C. O crescimento da planta e a produção de frutos com alto teor de sólidos solúveis (°Brix) são favorecidos em regiões de dias longos, quentes, com baixa umidade do ar e do solo, tornando os frutos mais saborosos (PUIATTI; SILVA, 2005).

4.4 DOENÇAS NA CULTURA DA MELANCIA

A cultura da melancia enfrenta muitos problemas fitossanitários com consideráveis perdas devidas, principalmente, a ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus (LOPES; REIS; LIMA, 2008), ocasionando uma redução na produtividade e na qualidade dos frutos, haja vista que uma pequena mancha na casca leva ao descarte do fruto para o mercado, além de elevar o custo de produção com o uso excessivo de defensivos (CÉSAR; SANTOS, 2001).

Diversas doenças causadas por patógenos radiculares têm ocasionado perdas em produtividade à cultura da melancia, entre elas tem-se o “colapso” da melancia ou “declínio de ramos, causado por diferentes fitopatógenos habitantes do solo,

considerada como um grande problema principalmente em regiões áridas e semi-áridas (BOUGHALLEB, 2001) que ocasiona murcha rápida da planta na época de maturação dos frutos, podendo resultar em alguns casos, em perdas totais da cultura (BOUGHALLEB; MAHJOUB, 2006).

4.4.1 “Colapso” ou “declínio” de ramos em melancia

É considerada uma doença de importância agrícola, que envolve inúmeros agentes fitopatogênicos associados a esta síndrome, já que com muita frequência os referidos microrganismos se apresentam em ataque conjunto (BRUTON, 1998). Segundo Martyn e Miller (1996) um dos agentes fúngicos mais importantes responsáveis por esta síndrome em cultivos de melão e melancia no mundo é *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker, descrito em melancia na Tunísia (MARTYN et al., 1994), Estados Unidos - Califórnia – Estados Unidos (BRUTON; DAVIS; GORDON, 1995), México (MARTYN et al., 1996), Itália (GENNARI et al., 1999) e Egito (EL-DESOUKY; EL WAKIL, 2003). Estudos posteriores realizados por Alcântara, Rasmussen e Stanghellini (1997), em Israel, identificaram *M. cannonballus* como o agente mais agressivo envolvido na referida síndrome, corroborando o que havia sido descrito anteriormente.

No Brasil, o fungo foi relatado pela primeira vez em áreas de cultivo de melancia em 2008 e 2009, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (SALES JUNIOR et al., 2010).

A infecção da planta pode ocorrer através de propágulos (micélio ou ascósporos) que sobreviveram no solo ou em restos culturais, os quais estimulados por exsudados radiculares e pela microbiota existente no solo desenvolvem-se, invadem os tecidos, colonizam e destroem o córtex das raízes (STANGHELLINI; KIM; WAUGH., 2000).

4.4.2 *Monosporascus cannonballus*

Monosporascus cannonballus é um fungo habitante do solo, pertencente à classe Ascomycetes, que produz esporos sexuados chamados ascósporos (POLLACK; UECKER, 1975), e de fase assexuada (conídios) ainda desconhecida (SIVANESAN, 1991). Os Ascomycetes, em geral, produzem oito ascósporos dentro de cada asca, no entanto, *M. cannonballus* produz um ascósporo por asca (e raramente dois), característica essa que o diferencia das demais espécies deste gênero (BELTRÁN, 2006).

Este fungo apresenta peritécios globosos, pretos, de formato esférico com diâmetro de 500 µm (SIVANESAN, 1991), os quais geralmente aparecem no final do ciclo da cultura, infiltrados em raízes afetadas (SALES JUNIOR et al., 2002), e que são facilmente visíveis a olho nu, ou ainda, observados em lupa. Esses peritécios por sua vez formam ascas periformes, de parede grossa, com diâmetro entre 30-50 µm (BELTRÁN, 2006), com capacidade de sobreviver no solo por longos períodos na ausência de hospedeiro, constituindo o inóculo primário para as infecções radiculares (MARTYN; MILLER, 1996; STANGHELLINI et al., 1996; WAUGH et al., 2003). Durante o ciclo de vida do patógeno essas ascas desaparecem deixando livre os ascósporos. Esses, por sua vez, são lisos, de coloração negra brilhante, e semelhantes a bala de canhão (POLLACK; UECKER, 1974).

O micélio fúngico apresenta coloração esbranquiçada que escurece com o tempo, formando peritécios com 20-30 dias (MARTYN et al., 1992). O fungo se adapta bem a clima árido e semi-árido devido às suas características termófilas (BRUTON, GARCÍA-JIMENEZ; ARMENGOL, 1999; PIVONIA et al., 2002), com temperatura ótima de crescimento variando entre 25 e 35 °C, ocorrendo inibição em temperaturas abaixo de 15 °C e acima de 40 °C (MARTYN; MILLER, 1996). Devido a sua característica termófila, o Nordeste brasileiro se apresenta como um excelente ambiente para o desenvolvimento deste patógeno. Por este motivo, a solarização do solo, como uma estratégia isolada, é incapaz de controlar esta enfermidade (REUVENI, KRIKUN; SHANI, 1983).

A faixa de pH que permite o melhor crescimento *in vitro* do patógeno varia entre 6 e 7, podendo este, crescer em pH igual a 9 (MARTYN; MILLER, 1996).

Apresenta tolerância a níveis relativamente altos de sódio e cloreto de cálcio (8-10%) e tem ótimo crescimento micelial em potencial osmótico de -0,6 a -0,8 MPa (FERRIN; STANGHELLINI, 2006).

Outros fatores como umidade do solo e manejo da cultura, também exercem grande influência sobre a população de *M. cannonballus* no solo. Elevadas densidades de ascósporos têm sido registradas em solos com temperaturas entre 25 e 30 °C (WAUGH et al., 2003) e sem saturação de umidade (BELTRÁN et al., 2005).

Embora não haja informações na literatura sobre a propagação do agente patogênico, aparentemente, *M. cannonballus* é capaz de sobreviver no solo por algum tempo. Uematsu e Sekiyama (1990) relataram que plantas de melão cultivadas em solo infestado que tinha sido armazenado de 1 a 5 anos, desenvolveram os sintomas da doença e que o patógeno foi isolado das raízes.

4.4.3 Sintomatologia da doença

Os sintomas da doença iniciam-se com o amarelecimento gradual e a seca das folhas mais velhas, o qual avança rapidamente para as folhas mais jovens, causando a seca e morte prematura das plantas (MARTYN; MILLER, 1996). O sistema radicular da planta é severamente prejudicado, iniciando-se os sintomas com pardeamento nas raízes primárias e posteriormente nas secundárias, passando pelo hipocótilo, onde se observa uma redução do córtex em torno dos vasos (MERTELY et al., 1991). Os sintomas são facilmente observados nos períodos próximos à colheita, estando o sistema radicular comprometido, chegando ao seu apodrecimento e perda da funcionalidade, não suprindo as necessidades hídricas da cultura, ocasionando a murcha generalizada. Ao final do cultivo, podem ser observados peritécios do fungo infiltrados nas raízes (Figura 1), os quais apresentam aspecto de pontos negros e redondos (MERTELY et al., 1991; SALES JUNIOR et al., 2001; 2002).



Figura 1- Peritécios de *M.s cannonballus* infiltrados nas raízes. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

Um rápido aumento na densidade do inóculo de *M. cannonballus* no solo tem sido associado com a morte das raízes do meloeiro, a partir de duas semanas da colheita, atingindo o seu máximo, com dois a quatro meses após a morte das plantas, o que pode ser consequência da redução nos níveis de nutrientes disponíveis para o patógeno e estímulo à formação de estruturas reprodutivas (WAUGH et al., 2003; STANGHELLINI et al., 2004; BELTRÁN et al., 2005).

4.4.4 Danos econômicos

O “declínio” de ramas em melancia é uma doença considerada de importância agrícola, tendo em vista dizimar cultivos de cucurbitáceas em todo o mundo (SALES JUNIOR et al., 2003; 2004). Devido aos danos causados na raiz, o *M. cannonballus* provoca a perda da capacidade de absorção de água pela planta e consequentemente, a absorção de nutrientes necessários durante o período de maturação dos frutos, ocasionando perdas de produção de até 100% (MARTYN; MILLER, 1996).

Atualmente, na Espanha, o “declínio” de ramas provocado por *M. cannonballus* é uma grave doença que tem causado prejuízo em campos de melão e melancia (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000; BELTRÁN et al., 2005).

Estudos realizados por García-Jimenez et al. (2000), mostram que a produção de melão na Espanha diminuiu em torno de 40% em apenas 15 anos,

principalmente devido à referida enfermidade, com predominância de patógenos radiculares como *M. cannonballus* e *Acremonium cucurbitacearum* Alvaro-Garcia, W. Gams & J. García-Jimenez.

No Brasil, em cultivos de meloeiro no Rio Grande do Norte, essa enfermidade apresentou índice de frequência de 15% em dois campos de produção comercial em 2002 (SALES JUNIOR et al., 2003). Em levantamentos conduzidos na mesma região no ano seguinte, o fungo foi isolado de 30% das áreas que apresentaram a doença (ANDRADE et al., 2005).

4.4.5 Controle

Embora inúmeras pesquisas venham sendo realizadas utilizando diferentes estratégias para redução dos danos causados por *M. cannonballus*, vários são os fatores que contribuem para dificultar o seu controle, entre eles pode-se citar o cultivo intensivo e sucessivo, presença de ascósporos no solo remanescente do ano anterior, dificuldade na aplicação e incorporação de defensivos no solo, ampla gama de plantas hospedeiras, utilização de *mulching* plástico e a falta de genótipos resistentes ou altamente tolerantes à doença (MARTYN, 2002). Entretanto, tem se alcançado bons resultados, utilizando o manejo integrado da doença, o qual dificulta o desenvolvimento do patógeno. Dentre essas pode-se citar a utilização de plantas resistentes, enxertia, manipulação do sistema de irrigação, técnica de solarização, controle químico a base de fungicida e uso de outros fumigantes, de forma isolada ou em combinação com a solarização do solo (COHEN et al., 2000).

4.4.5.1 Químico

O controle dessa enfermidade têm sido difícil e até o momento não há um método de controle eficiente, já que o controle químico é pouco efetivo no campo (COHEN et al., 1999).

Segundo Martyn (2002) a fumigação do solo utilizando-se brometo de metila antes do plantio tem se mostrado a técnica mais efetiva na desinfestação.

Entretanto, tal prática tem elevado impacto ambiental negativo, e o uso do produto já não é mais permitido no Brasil (GUIMARÃES et al., 2008).

Diversos estudos têm sido realizados objetivando-se encontrar moléculas com efeito fungicida sobre *M. cannonballus*. Em testes *in vitro*, realizado com diferentes concentrações de produtos em relação à patógenos radiculares, observou-se a inibição total do crescimento do referido patógeno com os ingredientes ativos (i.a) Captan e Procimidone, na concentração de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e, Carboxin-Thiram e Tiofanato metílico à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (ALVES et al., 2002 a e b).

Cohen et al. (1999) e Medeiros et al. (2006) observaram que os ingredientes ativos Fluazinam e Propiconazole apresentaram potencial de utilização no controle de *M. cannonballus*, tendo em vista a inibição do crescimento micelial *in vitro* do referido patógeno, em percentual de 100% e 68%, respectivamente. Guimarães et al. (2008) encontrou resultado semelhante, onde o Fluazinam foi eficiente para controle do referido fungo em condições de casa-de-vegetação.

Entretanto, apesar dos diversos estudos envolvendo princípios ativos, não há existência de produtos registrados para o controle desta enfermidade (MEDEIROS; SALES JUNIOR; MICHEREFF, 2006).

4.4.5.2 Físico

Técnicas de solarização associadas com reduzidas taxas de fumigação do solo têm mostrado potencial para o controle do *M. cannonballus* (MARTYN, 2002).

4.4.5.3 Biológico

Essa estratégia ainda está sendo estudada como alternativa de controle da doença. Estudos realizados por Cohen et al. (2000) usando isolados hipovirulentos de *M. cannonballus* está sendo investigado como controle biológico. Isolados infectados com um ou maisRNAs de fita dupla (dsRNAs) tem sua virulência reduzida (hipovirulentos), sendo que esses dsRNAs podem ser transmitidos para os

isolados virulentos através de anastomose, conferindo assim a perda de virulência. Até agora a hipovirulência transmissível como potencial no controle da doença foi observada apenas experimentalmente em condições de casa-de-vegetação.

Por outro lado, a utilização de antagonistas no controle de *M. cannonballus* tem sido pouco evidenciada, ainda que os estudos em laboratório e em casa-de-vegetação tenham apresentado resultados promissores. Zhang et al. (1999) demonstraram o potencial de espécies de *Trichoderma* spp., para o controle desse patógeno. Já Sales Junior et al (2007) estudando seu controle biológico com *Chaetomium* observou que a infestação de substrato com concentrações de 4 e 8×10^5 UFC g⁻¹ (unidade formadora de colônia por grama) propiciou o controle do patógeno.

4.4.5.4 Cultural

Dentre as diversas práticas culturais utilizadas no controle de fitopatógenos radiculares, a enxertia tem sido muito utilizada em diversos países. A enxertia entre cucurbitáceas atualmente é uma estratégia bastante utilizada no manejo de patógenos radiculares no Mediterrâneo e tem diminuído rapidamente a população destes (COHEN et al., 2000). Segundo Cohen et al. (2000; 2007) o cultivo de melancia e melão enxertados com abóbora está se tornando um dos mais promissores frente ao controle de *M. cannonballus*. Em Oklahoma, pesquisadores têm utilizado melancia enxertada para controle de doenças de solo e para melhorar a qualidade dos frutos comercializados (TAYLOR et al., 2006).

Algumas espécies do gênero *Cucurbita* são consideradas tolerantes ao patógeno (MERTELY et al., 1993), no entanto, não se sabe se isto é devido à resistência que a planta apresenta ou à sua tolerância a infecção devido ao seu amplo sistema radicular e a maior capacidade de regeneração, impedindo a formação de propágulos (BELTRÁN et al., 2008). Segundo o mesmo autor, apesar dessas espécies do gênero *Cucurbita* apresentar resistência à *M. cannonballus* é preciso que se façam mais estudos a fim de avaliar a compatibilidade dos enxertos.

Beltrán et al. (2008) fazendo um comparativo epidemiológico de *M. cannonballus* em melão, melancia e enxertos entre culturas em melancia observou peritécios nas raízes de *Cucurbita* e ainda, que a população de ascósporos no solo permaneceu estável, diferentemente do que ocorreu com melão e melancia.

Segundo Koren e Edelstein (2004) em Israel, o uso de melancia enxertada é responsável por cerca de 65% da área plantada total da cultura. Estudos realizados em condições de campo em Israel mostraram que a incidência de *M. cannonballus* em meloeiro enxertado foi menor do que naquelas plantas não enxertadas, concluindo assim, que a enxertia é um método efetivo de controle para a doença, mas ainda são necessárias pesquisas para determinar a combinação perfeita para cada caso (COHEN et al., 2000).

4.4.5.5 Genético

A utilização de cultivares resistente parece ser a forma mais interessante no controle do “declínio” de ramas, embora apresente algumas dificuldades, tais como a obtenção de cultivares que apresentem características agronômicas desejáveis e o tempo necessário para sua obtenção (DÍAZ RUÍZ; GARCÍA-JIMÉNEZ, 1994; BLANCARD, LECOQ; PITRAT, 1996). A resistência de cultivares à *M. cannonballus* têm sido incluída recentemente como alternativa de controle (COHEN et al., 2000) ainda que se desconheça cultivares comerciais com níveis aceitáveis de resistência ao patógeno (WOLFF; MILLER, 1998; SALES JUNIOR et al., 2002; DIAS et al., 2004).

Café Filho, Duniway e Davis (1995) dizem que a caracterização do nível de resistência das cultivares é muito importante, na medida em que é possível, com o plantio de genótipos resistentes, evitar a doença ou mesmo reduzir sua incidência em áreas onde o patógeno está presente ou em épocas em que as condições climáticas são favoráveis a sua ocorrência e ao desenvolvimento da doença.

Alguns trabalhos têm objetivado encontrar fontes de resistência de cucurbitáceas à *M. cannonballus*, merecendo destaque o estudo realizado por Sales Junior et al. (2002) que, avaliando o comportamento de melão e melancia em solo

inoculado com *M. cannonballus*, concluíram que as duas cultivares de melancia estudadas foram resistentes ao fungo, sendo necessária, no entanto, a avaliação de mais genótipos para obtenção de resultados mais consistentes. Estudo realizado por Crosby (2001) avaliando germoplasma de *Cucumis melo* L. *agrestis* (Naud) Pangalo em solo inoculado com *M. cannonballus*, encontrou três genótipos resistentes ou imunes ao patógeno e concluiu que há a possibilidade de introduzir genes que condicionam resistência.

Diversos trabalhos têm relatado a suscetibilidade da cultura a outros patógenos, tais como *Fusarium oxysporum* (HUH et al., 2002), *Didymella bryoniae* (DIAS; QUEIRÓZ; MENEZES, 1996) e *Phytophthora capsici* (HENZ; LIMA, 1994). Essa suscetibilidade pode está ligada a fatores genéticos, pois segundo Queiróz (1993) a melancia apresenta base genética muito estreita, contribuindo assim para a suscetibilidade à diversas doenças. Por isso, é importante que o estudo de reação de genótipos à fitopatógenos seja realizado conjuntamente com a caracterização molecular das espécies vegetais em questão, tornando os resultados mais consistentes, pois serão analisados à nível de DNA, ou seja, sem influência de fatores ambientais.

4.5 IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES EM PLANTAS

Os marcadores moleculares geram uma grande quantidade de caracteres adicionais que, quando combinados com características fenotípicas, fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As aplicações de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética têm aumentado, tanto em estudos genéticos como em programas de melhoramento (BRAMMER, 2000). Segundo Rout e Mohapatra (2006) a caracterização de plantas com uso de marcadores moleculares é uma ferramenta ideal para conservação de recursos genéticos vegetais e para a obtenção de informações para o melhoramento das plantas.

O advento dos marcadores moleculares possibilitou a discriminação genotípica, de forma hábil, pois permite o estudo da variação genética ao nível de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), sem influência de fatores ambientais. O estudo da variabilidade genética da melancia resgatada em cultivos tradicionais do Nordeste brasileiro, apesar de já ter sido iniciada, principalmente através de caracterização morfológica (ROMÃO, 1995) ainda não foi suficientemente explorada, não sendo encontrado relato sobre a distribuição da variabilidade genética da melancia nas diversas regiões do Nordeste (SILVA et al., 2007).

Os marcadores moleculares têm sido empregado com sucesso na análise genética de plantas, na caracterização da variabilidade existente entre os indivíduos para avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e seus híbridos intra e interespecíficos, na verificação da pureza genética, no mapeamento genético e na seleção de caracteres específicos e de interesse (BECKMANN-CAVALCANTI et al., 2007) e em incorporação de genes de resistência em cultivares comerciais, principalmente a fitopatógenos (RESENDE; SILVA, 2001).

A caracterização molecular da diversidade genética entre os genótipos permite informações fundamentais para auxiliar os melhoristas na escolha de genitores, que poderão integrar esquemas de cruzamentos, visando à constituição de populações básicas no estabelecimento de esquemas de seleção (OLIVEIRA et al., 2007).

Os marcadores moleculares geram grandes quantidades de informações que, combinadas às características morfoagronômicas, fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos (OLIVEIRA et al., 2007). Atualmente existem diversas classes de marcadores moleculares, dentre eles pode-se citar o RAPD, técnica que utiliza a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para detectar fragmentos específicos de DNA (WILLIAMS et al., 1990).

4.5.1 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

RAPD é uma técnica simples, rápida, de fácil execução, baixo custo, que não emprega radioatividade, e aplicável a qualquer tipo de organismo. Exige quantidade mínima de DNA para a análise genotípica de um indivíduo, permite gerar grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA e oferecem a possibilidade de amostrar regiões de DNA repetitivo, uma vez que os *primers* utilizados para a detecção de variação ao nível de DNA são arbitrários (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

O polimorfismo evidenciado pelo RAPD é detectado em função de mutações no(s) sítio(s) de ligação do *primer*, que impedem o seu pareamento e a consequente amplificação, ou devido à ocorrência de deleções ou inserções na região compreendida entre os dois sítios, que alteram o segmento amplificado. Como na maioria das vezes essas mutações impedem a amplificação do segmento de interesse, diz-se que a herança do RAPD é dominante, pois apenas duas classes fenotípicas são detectadas, presença ou ausência da banda de DNA (ALZATE-MARIN et al., 2005).

4.5.1.1 Aplicações da técnica em estudos de variabilidade genética de plantas

A técnica RAPD tem se mostrado extremamente útil para caracterizar a variabilidade genética de muitas espécies, inclusive em espécies de melancia, devido a sua facilidade de execução (FERREIRA, 2000; LEVI et al., 2002; CAPELOTO; UNEDA; MAURO, 2004). Apesar da importância do conhecimento da diversidade genética existente entre materiais genéticos de melancia poucos trabalhos têm sido realizados nesse sentido.

Silva et al. (2006) realizou um estudo de caracterização morfológica e molecular de 42 acessos de melancia coletados em três regiões distintas do estado da Bahia utilizando seis *primers* RAPD. No que tange à caracterização molecular foram formados 28 grupos, que em alguns casos coincidiram com o agrupamento a

partir dos dados morfológicos. Foram identificados 64 marcadores RAPD, destes, 31 foram polimórficos. Observou-se ainda, uma variabilidade genética de 46,3% dentro de acessos, 29% entre os acessos dentro da mesma região e 24,6% entre acessos coletados em diferentes regiões. Os marcadores RAPD revelaram polimorfismo, variando de 11% a 61%, concluindo que estes marcadores podem ser utilizados na caracterização de acessos de melancia.

Um estudo realizado por Capeloto, Uneda e Mauro (2004) de caracterização molecular entre e dentro de 18 acessos de melancia através de RAPD-PCR utilizando 59 *primers* observou variabilidade entre os acessos avaliados. Os resultados desse estudo mostraram que a maioria dos acessos apresentaram considerável divergência entre as amostras tomadas podendo ser então observada a variabilidade existente dentro do genótipo. O agrupamento dos genótipos formou dois grupos distintos. Já nas análises dentro dos 18 genótipos, foi possível observar variabilidade entre as 20 progênies utilizadas.

Lee et al. (1996) utilizaram 39 acessos de melancia cultivada utilizando 15 *primers* RAPD que amplificaram fragmentos de DNA. Cada *primer* produziu de três a sete fragmentos por genótipo, sendo que, dos 162 fragmentos detectados, 100 (62%) foram polimórficos e os 62 (38%) restantes foram monomórficos. O dendograma construído revelou quatro grupos distintos de acessos de melancia.

Alguns estudos de caracterização de variabilidade em melão através de marcadores RAPD têm sido realizados, sendo que os *primers* RAPD utilizados para melão têm reproduzido bons resultados em melancia e em outras cucurbitáceas. Buso, Tavares e Buso (2002) avaliando a variabilidade genética de acessos de melão tipo Cantaloupe utilizando marcadores moleculares RAPD selecionou 63 marcadores RAPD para construção do dendograma e observou uma média de 3 bandas polimórficas por *primer*. Foram formados dois grupos distintos, um formado pela maioria dos acessos e o segundo apenas por dois acessos de melão. Apesar da baixa variabilidade observada, alguns acessos foram divergentes, concluindo que os marcadores RAPD mostraram-se de grande utilidade para a rápida análise da variabilidade genética de acessos de melão Cantaloupe.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário de Agricultura Brasileira**. p.306-309. 2008.

AGRICULTURAL STATISTICS DATABASE. FAO. World Agricultural Information Center. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>> 2009. Acesso em: 20 Nov. 2009.

ALCÂNTARA, T. P.; RASMUSSEN, S.L. STANGHELLINI, M. E. Biological characterization of *Monosporascus cannonballus*. **Phytopathology**, v.87, n.3, 1997.

ALVES, M. Z.; ITO, S. C. S.; SALES JUNIOR, R.; KOBAYASHI, E. K.; RIBEIRO, M. D. Comportamento “*in vitro*” de patógenos de solos frente a diferentes concentrações de fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.74, 2002a.

ALVES, M. Z.; ITO, S. C. S.; ROCHA, R. H. C.; SALES JUNIOR, R. Eficiência “*in vitro*” de produtos fungicidas sobre patógenos de raízes de meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.74-75, 2002b.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.333-342, 2005.

ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J.; BIONDI, C. M.; NASCIMENTO, C. W. A. SALES JUNIOR, R. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.326-331, 2005.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Livro Técnico e Científico. EDUSP, São Paulo, 225p. 1978.

BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; LUZ, F. J. F.; CHAGAS, E. A.; PIVETTA, F. L. Diversidade genética de porta-enxertos de roseiras por meio do marcador molecular *f*AFLP. **Revista Biologia e Ciências da Terra**, v.7, n.1, p.92-98, 2007.

BELTRÁN, R.; VICENT, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Comparative epidemiology of *Monosporascus* root rot and vine decline in muskmelon, watermelon, and grafted watermelon crops. **Plant Disease**, v.92, p.158-163, 2008.

BELTRÁN, R.; VICENT, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Quantification of *Monosporascus cannonballus* ascospores in muskmelon fields in Eastern Spain. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.248-250, 2007.

BELTRÁN, R. **Estudios epidemiológicos y de patogenicidad de *Monosporascus cannonballus* Pollack y Uecker**. 2006. 315f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidad Politécnica de Valencia, Espanha, 2006.

BELTRÁN, R., VINCENT, A., SALES JUNIOR., R., GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Population dynamics of *Monosporascus cannonballus* ascospores in marsh soils in eastern Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.113, p.357-365, 2005.

BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar**. Madri: Mundi-Prensa, 301 p. 1996.

BOUGHALLEB, N.; MAHJOUR, M. E. Watermelon Sudden Decay in Tunisia: Identification of Pathogenic Fungi and Determination of Primary Agents. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, n.6, p.1095-1103, 2006.

BOUGHALLEB, N. **Sudden decay of watermelon in Tunisia: Identification of fungi and biology of *Fusarium* spp.** Post-graduate certificate in Protection of Plants and Environment. High Horticultural School of Chott-Mariem, 4042, Sousse-Tunisie, 83 p, 2001.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p.html. (Embrapa Trigo. Documentos Online 3). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm. Acesso em: 27 Set. 2009.

BRUTON, B. D.; GARCÍA JIMENEZ, J.; ARMENGOL, J. Analysis of the relationship between temperature and vine declines caused by *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on muskmelon. **Subtropical Plant Science**, v.51, p.23-28, 1999.

BRUTON, B. D. **Soilborne diseases in Cucurbitaceae:** Pathogen virulence and host resistance. In: McCreight, J. (Ed.) CUCURBITACEAE 98. American Society for Horticultural Science. Press, p.143-166. 1998.

BRUTON, B. D.; DAVIS, R. M.; GORDON, T. R. Occurrence of *Acremonium* sp. and *Monosporascus cannonballus* in the major cantaloupe and watermelon growing areas of California. **Plant Disease**, v.79, p.754, 1995.

BUSO, G. S. C.; TAVARES, H. M. F.; BUSO, J. A. **Avaliação da variabilidade genética de acessos de melão tipo Cantaloupe utilizando marcadores moleculares RAPD.** Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.19 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

CAFÉ FILHO, A. C.; DUNIWAY, J. M.; DAVIS, R. M. Effects of the frequency of furrow irrigation on root and fruit rots of squash caused by *Phytophthora capsici*. **Plant Disease**, v.79, p.44-48, 1995.

CAPELOTO, A.; UNEDA, S. H. T.; MAURO, A. O. Caracterização molecular entre e dentro de acessos de melancia através de RAPD – PCR. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. 5º ed. 2004.

CÉSAR, N. S.; SANTOS, G. R. Doenças da cultura da melancia no Projeto Formoso, Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.411, 2001.

CHILOSI G.; REDA R.; ALEANDRI, M. P.; CAMELE, I.; ALTIERI, L.; MONTUSCHI, C.; LANGUASCO, L.; ROSSI, V.; AGOSTEO, G. E.; MACRÌ, C.; CARLUCCI, A.; LOPS, F.; MUCCI, M.; RAIMONDO, M. L.; FRISULLO, S. Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy. **EPPO Bulletin**, v.38, p.147–154, 2008.

COHEN, R.; BURGER, J.; HOREV, C.; KOREN, A.; EDELSTEIN, M. Introducing grafted cucurbits to modern agriculture. The Israeli experience. **Plant Disease**, v.91, p.916-923, 2007.

COHEN, R.; PIVONIA, S., BURGER, J.; EDELSTEIN, M.; GAMLIEL, A.; KATAN, J. Toward integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. **Plant Disease**, v.84, p.496-505, 2000.

COHEN, R.; PIVONIA, S.; SHTIENBERG, D.; EDELSTEIN, M.; RAZ, D.; GERSTIL, Z.; KATAN, J. Efficacy of Fluazinam in suppression of *Monosporascus cannonballus*, the causal agent of sudden wilt of melons. **Plant Disease**, v.83, p.1137-1141, 1999.

CROSBY, K. M. Screening *Cucumis melo* L. *Agrestis* germplasm for resistance to *Monosporascus cannonballus*. **Subtropical Plant Science**, v.53, p. 24-26, 2001.

DIAS, R. C. S.; PICÓ, B.; ESPINOS, A.; NUEZ, F. Resistance to melon vine decline derived from *Cucumis melo* ssp. *Agrestis*: Genetic analysis of root structure and root response. **Plant Breeding**, v.123, n. 1, p. 66-72, 2004.

DIAS, R. C. S.; QUEIRÓZ, M. A. MENEZES, M. Identificação de fontes de resistência em melancia a *Didymella bryonae*. **Horticultura Brasileira**, v.14, p.15-17, 1996.

DÍAZ RUÍZ, J.R.; GARCÍA-JIMENEZ, J. **Enfermedades de las cucurbitáceas en España**. Madrid: Phytoma, 1994. 155p.

EL-DESOUKY S. M.; EL-WAKIL A. A. Occurrence of *Monosporascus* root rot and vine decline of cantaloupe and watermelon in Egypt. **Egyptian Journal Phytopathology**, v.31, p.141–150, 2003.

FERREIRA M. A. J. F. **Sistema reprodutivo e potencial para o melhoramento genético de uma população de melancia** [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]. Piracicaba: USP-ESALQ. 105p. 2000. (Tese) Doutorado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p. 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p. 1995.

FERRIN, D. M.; STANGHELLINI, M. E. Effect of water potential on mycelial growth and perithecial production of *Monosporascus cannonballus* *in vitro*. **Plant Pathology**, v.55, p.421–426, 2006.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2ª edição revista e ampliada. Viçosa, 412p. 2003.

FOOLAD, M. R.; JONES, R. A. RODRIGUES, R. L. RAPD marker for constructing intraspecific tomato gene maps. **Plant Cell Reports**, v.12, p.293-297, 1993.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J.; SALES, R.; JORDÁ, C.; BRUTON, B. D. Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain. **EPPO Bull**, v.30, p.169-173, 2000.

GENNARI, S.; MIROTTI, A.; SPORTELLI, M. *Monosporascus cannonballus* on watermelon. **Informatore Fitopatologico**, n.1/2, p.38-40, 1999.

GUIMARÃES, I. M.; SALES JUNIOR, R.; SILVA, K. J. P.; MICHEREFF, S. J.; NOGUEIRA, D. R. S. Efeito de fluazinam no controle *Monosporascus cannonballus*, agente causal do declínio de ramas em meloeiro. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 4, p.147-153, 2008.

HALEY, S. D.; AFANADOR, L. K. KELLY, J. D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling-and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, v.34, p.1061-1066, 1994.

HENZ, G. P.; LIMA, M. F. Avaliação de fatores que afetam a reação de *Cucurbita* spp. a *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.560-565, 1994.

HUH, Y.C.; OM, Y.H.; LEE, J.M. Utilization of *Citrullus* germplasm with resistance to *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*) for watermelon rootstocks. **Acta Horticulturae** (International Society for Horticultural Science), v.588, p.127-132, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. IBRAF. Disponível em <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em: 15 Set. 2009.

JOBST, J.; KING, K.; HEMLEBEN, V. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. **Theoretical and Applied Genetics**, v.9, p.204-219, 1998.

KOREN, A.; EDELSTEIN, M. Advantages and limitations of grafted vegetable transplants in Israel. **HortScience**, v.39, p.873, 2004.

LEE, S. J.; SHIN, J. S.; PARK, K. W.; HONG, Y. P. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf.] germoplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.719-725, 1996.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; WEHNER, T. C.; ZHANG X. Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. **Hortscience**, v.36, p.1096-1101, 2002.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; KEINATH, A. P.; WEHNER, T. C. Estimation of genetic diversity among *Citrullus* accessions using RAPD markers. **Acta Horticulturae**, v.510, p.385-390, 2000.

LOPES, C. A.; REIS, A.; LIMA, M. F. **Principais doenças da cultura da melancia no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 10 p. (Circular Técnica nº61).

MARTYN, R. D. *Monosporascus* root rot and vine decline of melons. The Plant Health Instructor, 2002. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/education/lessonsplantpath/Monosporascus/top.htm>> Acesso em: 25 Out. 2009.

MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. **Plant Disease**, v.80, p.716-725, 1996.

MARTYN, R. D.; BATTEN, J. S.; PARK, Y. J.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Mexico. **Plant Disease**, v.80, p.1430, 1996.

MARTYN, R. D.; LOVIC, B. R.; MADDOX, D. A.; GERMASH, A.; MILLER, M. E. First report of *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Tunisia. **Plant Disease**, v.78, p.1220, 1994.

MARTYN, R. D.; MERTELY, J. C.; MILLER, M. E.; KATSAR, C.; BAASIRI, M. E. Morphology and germination of *Monosporascus cannonballus* ascospores. **Phytopathology**, v.82, p.1115, 1992.

MEDEIROS, E. V.; SALES JUNIOR, R.; MICHEREFF, S. J.; BARBOSA, M. R. Controle de *Monosporascus cannonballus* por Tiazolidina-2,4-Diona e efeito sobre o agente de controle biológico *Trichoderma* spp. **Revista Caatinga**, v.19, n.1, p.44-50, 2006.

MEDEIROS, E. V.; SALES JUNIOR, R.; MICHEREFF, S. J. Eficiência de fungicidas no controle “in vitro” de *Monosporascus cannonballus*. **Revista Caatinga**, v.19, n 4, p.360-368, 2006.

MERTELY, J. C.; MARTYN, R. D.; MILLER, M. E.; BRUTON, B. D. An expanded host range for the muskmelon pathogen *Monosporascus cannonballus*. **Plant Disease**, v.77, p.667-673, 1993.

MERTELY, J. C.; MARTYN R, D.; MILLER M. E.; BRUTON B. D. Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot/vine decline disease of muskmelon. **Plant Disease**, v.75, n. 11, p.1133-1137, 1991.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998 a.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.14-17, 1998 b.

MOITOKE, S. Y.; SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L. **Cultura da Melancia**. Viçosa: UFV. Boletim de Extensão, 40. 25p. 1998.

OLIVEIRA, A. C. B.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. 17p. (Documentos IAC, 81).

PIVONIA, S.; COHEN, R.; KATAN, J.; KIGEL, J. Effect of fruit load on the water balance of melon plants infected with *Monosporascus cannonballus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.39-49, 2002.

POLLACK, F. G.; UECKER, F. A. Development and cytology of *Monosporascus cannonballus*. **Botanical Gazette**, v.136, p.333-340, 1975.

POLLACK, F. G.; UECKER F. A. *Monosporascus cannonballus*, an unusual Ascomycete in cantaloupe roots. **Mycologia**, v.66, p.346-349, 1974.

PUIATTI, M.; SILVA, D. J. H. Cultura da melancia. In: FONTES, P. C. R. **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa: UFV. 486p. 2005.

QUEIRÓZ, M. A. Potencial do germoplasma de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v.11, n. 1, p.7-9, 1993.

RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites, and machines. **Trends in Genetics**, v.9, p.275-280, 1993.

RESENDE, L. V.; SILVA, M. M. **Biotecnologia e proteção de plantas**. In: Proteção de plantas na agricultura sustentável / eds. Sami Jorge Michereff, Reginaldo Barros. – Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

REUVENI, R.; KRIKUN J. E.; SHANI N. The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melon plants in an arid area of Israel. **Phytopathology**, v.73, n.9, p.1223-1226, 1983.

RHODES, B.; ZHANG, X. Gene list for watermelon (*Citrullus lanatus*). **Report Cucurbit Genetics Cooperative**. Madison, n.18, p.68-84, 1995.

ROMÃO, R. L. Dinâmica **evolutiva e variabilidade genética de populações de melancia** [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] **em três regiões do Nordeste Brasileiro**. Mestrado (Dissertação) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1995.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A. Use of molecular markers in ornamental plants: a critical reappraisal. **European Journal of Horticultural Science**, v.71, n.2, p.53-68, 2006.

SALES JUNIOR, R.; SANTANA, C. V. S.; NOGUEIRA, D. R. S.; SILVA, K. J. P.; GUIMARÃES, I. M.; MICHEREFF, S. J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. First Report of *Monosporascus cannonballus* on Watermelon in Brazil. **Plant Disease**, v.94, p. 278, 2010.

SALES JUNIOR, R.; BELTRÁN, R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; MEDEIROS, E. V. Controle biológico de *Monosporascus cannonballus* com *Chaetomium*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.70-74, 2007.

SALES JUNIOR., R., NASCIMENTO, I. J. B., FREITAS, L. S., BELTRÁN, R., ARMENGOL, J., VICENT, A.; GARCIA-JIMÉNEZ, J. First report of *Monosporascus cannonballus* on melon in Brazil. **Plant Disease**, v.88, p.84, 2004.

SALES JUNIOR., R.; OLIVEIRA, O. F.; SENHOR, R. F.; ALVES, M. Z. *Monosporascus cannonballus* agente causal do colapso em plantas de melão no Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n.5, p.567, 2003.

SALES JUNIOR, R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; KOBORI, R. F. Comportamento de cultivares de meloeiro e melancia inoculados com *Acremonium cucurbitacearum* e *Monosporascus cannonballus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.2, p.206-210, 2002.

SALES JUNIOR, R.; ARMENGOL, J.; VICENT, A.; GARCIA-JIMÉNEZ, J. Evaluación de daños en raíces de melón y sandía y frecuencia de aislamiento de

Acremonium cucurbitacearum y *Monosporascus cannonballus* en una parcela afectada de colapso. **Boletín Sanidad Vegetal Plagas** v.27, p.177-183, 2001.

SILVA, M. L.; QUEIRÓZ, M. A.; FERREIRA, M. A. J.; ARAGÃO, C. A. Variabilidade genética de acessos de melancia coletados em três regiões do estado da Bahia. **Revista Caatinga**, v.20, n.4, p.93-100, 2007.

SILVA, M. L.; QUEIRÓZ, M. A.; FERREIRA, M. A. J.; BUSO, G. S. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.4, p.405-409, out./dez. 2006.

SIVANESAN A. *Monosporascus cannonballus*. **Mycopathologia** v.114, p.53-54, 1991.

STANGHELLINI, M.E.; WAUGH, M. M.; RADEWALD, K. C.; KIM, D. H.; FERRIN, D. M.; TURINI, T. Crop residue destruction strategies that enhance rather than inhibit reproduction of *Monosporascus cannonballus*. **Plant Pathology** v.53, p.50-53, 2004.

STANGHELLINI, M. E.; KIM, D. H.; WAUGH, M. M. Microbe-mediated germination of ascospores of *Monosporascus cannonballus*. **Phytopathology**, v.90, n.3, p.243-247, 2000.

STANGHELLINI, M. E.; KIM, D. H.; RASMUSSEN, S. L. Ascospores of *Monosporascus cannonballus*: germination and distribution in cultivated and desert soils in Arizona. **Phytopathology** v.86, p.509-514, 1996.

TAYLOR, M.; BRUTON, B.; FISH, W.; ROBERTS, W. **Cost benefit analysis of using grafted watermelons for disease control and the freshcut market**. P.277-285 in: Proc. Cucurbitaceae 2006. G. J. Holmes, ed. Universal Press, Raleigh, NC. 2006.

TORRES, S. B. Germinação e desenvolvimento de plântulas de melancia em função da salinidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n 3, p.77-82, 2007.

UEMATSU, S.; SEKIYAMA, K. Comparison of morphological characteristics and pathogenicity of *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker collected in Japan, distribution in melon plants with root rot symptoms and survival in soils under laboratory conditions. **Soil Microorganisms**, v.35, p.7-12, 1990.

VILELA, N. J.; AVILA, A. C.; VIEIRA, J. V. **Dinâmica do agronegócio brasileiro da melancia: produção, consumo e comercialização**. Embrapa, 2006. 12 p. (Circular Técnica nº 42).

WAUGH, M. M.; KIM, D. H.; FERRIN, D. M.; STANGHELLINI, M. E. Reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*. **Plant Disease**, v.87, p.45-50, 2003.

WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535. 1990.

WOLFF, D. W.; MILLER, M. E. Tolerance to *Monosporascus* root rot and vine decline in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. **HortScience**, v.33, p. 287-290, 1998.

ZHANG, J. X.; BRUTON, B. D.; HOWELL, C.R.; MILLER, M. E. Potential of *Trichoderma virens* for biocontrol of root rot and vine decline in *Cucumis melo* L. caused by *Monosporascus cannonballus*. **Subtropical Plant Science**, v.51, p.29-37, 1999.

CAPÍTULO II

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELANCIA À *Monosporascus cannonballus*

RESUMO

A melancia (*Citrullus lanatus* L.) é atualmente uma das principais frutas em volume de produção mundial. Nos últimos anos diversas doenças têm causado danos à cultura, entre essas, pode-se citar o “colapso” de melancia ou “declínio” de ramos, tendo como um dos principais agentes fúngicos envolvidos nessa síndrome, o *Monosporascus cannonballus*. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a reação de 29 genótipos de melancia à *M. cannonballus*. As avaliações foram feitas sessenta dias após transplante, tendo como variáveis a altura da planta (AP), massa fresca (MFPA) e seca de parte aérea (MSPA), volume de raiz (VR), massa fresca (MFRAIZ) e seca de raiz (MSRAIZ), danos às raízes (Danos), índice geral de doença (IGD), frequência de isolamento (FI) e população inicial e final de ascósporos (PF). O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento e a análise estatística foi realizada através de teste de comparações múltiplas utilizando teste de Kruskal-Wallis. Além disso, visando comparar os danos às raízes de melancia sobre as variáveis analisadas, os dados médios foram submetidos à análise de correlação de Spearman, aos níveis de 1 e 5% de probabilidade. Os genótipos ML-SF-44, ML-SF-45, Melancia 40, Nr 06, Kudam, Premium, Style, Bobbie, TPC-00247, TPX-03521, TPX-03522 e TPX-06637 foram classificados como medianamente resistentes. Os genótipos Crimson Sweet, Quetzali, ML-SF-43, ML-SF-41, Nr 03, Boston, Pixie, Ivona, Fashion, TPC-31181, Jenny, Vanessa, Num 6034, Tiger Baby, Sy 7780 como suscetíveis e, Nr 02 e Sy 3151 classificados como muito suscetíveis. Houve correlação significativa entre danos às raízes e MFPA, VR, MFRAIZ, MSRAIZ, o que não ocorreu com AP, MSPA e FI e população final de ascósporos (PF).

Palavras-chave: Genótipo. Correlação; Melancia. Raiz.

ABSTRACT

REACTION OF THE WATERMELON GENOTYPES TO THE *Monosporascus cannonballus*

Watermelon (*Citrullus lanatus* L.) is currently one of the main fruits in volume considering the world fruit production. In recent years, several diseases have caused damage to the crop, among these, the "collapse" of watermelon or vine decline can be mentioned, being the *Monosporascus cannonballus* the major etiologic agent involved in this syndrome. Thus, the present study had the objective to evaluate the reaction of 29 genotypes of watermelon to *M. cannonballus*. Evaluations were made sixty days after transplanting, considering the variables plant height (AP), fresh (MFPA) and dry (MSPA) aerial part, root volume (VR), root fresh (MFRAIZ) and dry (MSRAIZ) weight, damage to roots (Damages), general disease index (IGD), frequency of isolation (FI), and the initial and final population of ascospores (PF). The experimental set up was a completely random design with 5 replications for each treatment and the statistical analysis was carried out using the multiple comparison test of Kruskal-Wallis. Furthermore, to compare the damage of the watermelon roots to the analyzed variables, the mean data were submitted to a Spearman correlation analysis, at 1 and 5% of probability. The Genotypes ML-SF-44, ML-SF-45, Watermelon 40, Nr 06, Kudam, Premium, Style, Bobbie, TPC-00247, TPX-03521, TPX-03522 and TPX-06637 were classified as moderately resistant. The Genotypes Crimson Sweet, Quetzali, ML-SF-43, ML-SF-41, Nr 03, Boston, Pixie, Ivona, Fashion, TPC-31181, Jenny, Vanessa, Nun 6034, Tiger Baby, Sy 7780 were classified as susceptible, and the Nr 02 and Sy 3151 as very susceptible. There was significant correlation between root damage and MFPA, VR, MFRAIZ and MSRAIZ, which did not occur with AP, MSPA and FI and final population of ascospores (PF).

Keywords: Genotype. Correlation. Watermelon. Root.

1 INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus* L.) é atualmente uma das principais frutas em volume de produção mundial. Nos últimos anos, essa cultura vem se destacando como um importante produto do agronegócio brasileiro, ocupando a 7ª posição no *ranking* das frutas mais exportadas em 2008, com volume de exportação de 43.468,6 toneladas, o equivalente a 18,1 milhões de dólares (IBRAF, 2009), estando sua produção distribuída entre as regiões Sul, Nordeste, Sudeste e Norte.

Na região Nordeste merecem destaque os estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, responsáveis por 19,12% da produção nacional dessa fruta, com uma área colhida de 21.125 há (AGRIANUAL, 2008). No estado do Rio Grande do Norte, a melancia tem ganhado grande importância nos últimos anos entre os pequenos, médios e grandes produtores em razão das boas condições climáticas e do promissor mercado consumidor.

Apesar de sua grande importância agrícola, esta cultura enfrenta muitos problemas fitossanitários, sendo as doenças fúngicas responsáveis por consideráveis perdas na produção. Dentre estas, as doenças causadas por patógenos radiculares têm se destacado, já que ocasionam um “colapso” ou “declínio” de ramos em momentos próximos a colheita. Trata-se de uma doença emergente na região em cultivos de melancia, relatada em áreas de produção com características áridas e semi-áridas (BOUGHALLEB, 2001) e que vem refletindo em perdas de produtividade na cultura. No mundo existem poucos trabalhos sobre essa síndrome na cultura da melancia, entretanto, muitos estudos foram realizados em melão, os quais pertencem a mesma família botânica.

Atualmente um dos agentes fúngicos responsáveis por esta síndrome em melão e melancia é *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker (MARTYN; MILLER, 1996), descrito em melancia na Tunísia (MARTYN et al., 1994), Estados Unidos - Califórnia (BRUTON; DAVIS; GORDON, 1995), México (MARTYN et al., 1996), Itália (GENNARI et al., 1999) e mais recentemente no

Egito (EL-DESOUKY e EL-WAKIL, 2003). No Brasil, o fungo foi relatado na cultura da melancia pela primeira vez em 2008 e 2009, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, entretanto, já havia relato do mesmo em melão (SALES JUNIOR et al., 2010).

Inúmeros programas de controle têm sido elaborados para reduzir os danos ocasionados por essa enfermidade em meloeiro, já que o controle químico desse patógeno tem sido pouco efetivo no campo (COHEN et al., 1999). A fumigação do solo utilizando-se brometo de metila antes do plantio tem se mostrado a técnica mais efetiva na desinfestação (MARTYN, 2002). Entretanto, tal prática tem impacto ambiental negativo, e o uso do produto já não é mais permitido no Brasil (GUIMARÃES et al., 2008).

Segundo Martyn (2002) embora várias pesquisas venham sendo realizadas utilizando diferentes estratégias para redução dos danos causados por *M. cannonballus*, vários são os fatores que contribuem para dificultar seu controle, entre eles pode-se citar o cultivo intensivo e sucessivo de culturas, presença de ascósporos no solo remanescente de cultivos anteriores, dificuldade na aplicação e incorporação de defensivos no solo, ampla gama de plantas hospedeiras, utilização de *mulching* plástico e a falta de genótipos resistentes ou altamente tolerantes à doença.

Ultimamente tem se buscado alternativas para controle de *M. cannonballus*, entre estas pode-se citar a utilização de plantas resistentes. Segundo Wolff e Miller (1998); Sales Junior et al. (2002) e Dias et al. (2004) a resistência genética seria uma excelente alternativa, embora se desconheça cultivares ou porta-enxerto de cucurbitáceas com níveis aceitáveis de tolerância ou resistência. Alguns trabalhos têm sido realizado visando a obtenção de plantas resistentes a patógenos, merecendo destaque o estudo realizado por Sales Junior et al. (2002) que, avaliando o comportamento de melão e melancia em solo inoculado com *M. cannonballus*, concluíram que as duas cultivares de melancia estudadas apresentaram um bom comportamento em relação ao fungo, sendo classificada como resistente. No entanto, trabalhos realizados por diversos autores têm relatado a suscetibilidade da melancia a outros patógenos, tais como *Phytophthora capsici*

(HENZ; LIMA, 1994) *Didymella bryoniae* (DIAS; QUEIRÓZ; MENEZES, 1996) e *Fusarium oxysporum* (HUH et al., 2002).

Segundo Café Filho, Duniway e Davis (1995) a caracterização do nível de resistência das cultivares é muito importante, na medida em que é possível, com o plantio de genótipos resistentes, evitar a doença ou mesmo reduzir sua incidência em áreas onde o patógeno está presente ou em épocas em que as condições climáticas são favoráveis a sua ocorrência e ao seu desenvolvimento.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a reação de 29 genótipos de melancia à *Monosporascus cannonballus* em solo naturalmente infestado, visando a obtenção de informações sobre os materiais vegetais com níveis de resistência ao patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no campus da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, localizada no município de Mossoró, situado a 5°11'15" de latitude Sul e 37°20'39" de longitude Oeste, com uma altitude de 16 metros. O clima, segundo a classificação de Köppen é 'BSWh' (muito seco, com estação de chuva no verão atrasando-se para o outono) (CARMO FILHO; OLIVEIRA, 1989). O solo utilizado foi coletado em área comercial naturalmente infestada com *M. cannonballus* localizada no município de Quixeré/CE, com as seguintes características químicas e físicas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Característica física e química do solo coletado em área comercial naturalmente infestada com *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| Características Físicas | | | | | | |
|---|---------|-------------------------------|-----------------------------|---|------------------------|---------|
| Frações Granulométricas (kg/kg) | | | | | Umidade (kg/kg) | |
| A. Grossa | A. Fina | A. Total | Silte | Argila | 0,01 MPa | 1,5 Mpa |
| 0,4 | 0,23 | 0,63 | 0,13 | 0,24 | 0,3 | 0,1 |
| Densidade (kg/dm³) | | | Porosidade Total (%) | | Água disponível | |
| Aparente | Real | | | | (mm) | (mm/m) |
| 1,13 | 2,67 | 57,47 | | | 46,25 | 231,27 |
| Características Químicas | | | | | | |
| K ⁺ = 230,4 mg.dm ⁻³ | | Mat.Org = 0,77% | | Mg ²⁺ = 3 cmol _c .dm ⁻³ | | |
| Na ⁺ = 124,7 mg.dm ⁻³ | | pH (H ₂ O) = 7,10 | | Ca ²⁺ = 8,50 cmol _c .dm ⁻³ | | |
| Al ³⁺ = 0,00 cmol _c .dm ⁻³ | | P = 209,2 mg.dm ⁻³ | | | | |

Foram utilizados 29 genótipos de melancia (Tabela 2). Vinte sementes de cada genótipo foram inicialmente desinfestadas superficialmente com hipoclorito sódico e em seguida, semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial. Quinze dias após semeio, dez plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 2 kg contendo uma mistura de solo naturalmente infestado com o patógeno e substrato comercial na proporção 3:1.

Tabela 2- Relação dos 29 genótipos de melancia e suas respectivas empresas. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| Tratamentos | Genótipo de melancia | Especificações | Empresa |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------|
| T1 | Crimson Sweet | - | Isla Pak |
| T2 | Quetzali | - | - |
| T3 | ML-SF-44 | - | Fitó |
| T4 | ML-SF-43 | - | Fitó |
| T5 | ML-SF-45 | - | Fitó |
| T6 | ML-SF-41 | - | Fitó |
| T7 | Melancia 40 | - | Fitó |
| T8 | Nr 06 | Híbrido triplóide | Sakata |
| T9 | Nr 02 | Híbrido | Sakata |
| T10 | Nr 03 | Híbrido | Sakata |
| T11 | Kudam | - | Nunhems |
| T12 | Premium | - | Nunhems |
| T13 | Boston | - | Nunhems |
| T14 | Pixie | Triplóide | Nunhems |
| T15 | Ivona | Triplóide | Nunhems |
| T16 | Style | Triplóide | Nunhems |
| T17 | Fashion | - | Nunhems |
| T18 | Bobbie | Triplóide | Nunhems |
| T19 | TPC-00247 | Híbrido | AgriStar |
| T20 | TPX-03521 | Híbrido | AgriStar |
| T21 | TPX-03522 | Híbrido | AgriStar |
| T22 | TPX-06637 | Híbrido | AgriStar |
| T23 | TPC-31181 | - | AgriStar |
| T24 | Jenny | - | Nunhems |
| T25 | Vanessa | - | Nunhems |
| T26 | Nun 6034 | - | Nunhems |
| T27 | Tiger Baby | - | Seminis |
| T28 | Sy 3151 | - | Rogers |
| T29 | Sy 7780 | - | Rogers |

Os tratos culturais realizados foram capinas manuais e aplicação de inseticidas, de acordo com as necessidades impostas pela cultura, utilizando produtos fitossanitários registrados para a mesma. As plantas foram irrigadas duas vezes ao dia e a temperatura e umidade do ar monitorada mediante “*datalogger*”.

Sessenta dias após transplante as seguintes variáveis foram analisadas: altura da planta (AP), medida com auxílio de uma régua; massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea e massa fresca (MFRAIZ) e seca (MSRAIZ) das raízes, utilizando balança de precisão de 0,1 g; volume de raiz (VOL), obtido pela medição do volume de água deslocado em proveta; danos às raízes; frequência de isolamento de *M. cannonballus* e população inicial e final de ascósporos do patógeno.

A severidade da doença causada por *M. cannonballus* foi avaliada retirando-se cuidadosamente as raízes dos vasos e lavando-as em água corrente para retirada do excesso de solo. Em seguida, foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia para avaliação dos danos causados pelo patógeno ao sistema radicular. Para isso utilizou-se uma escala diagramática adaptada do meloeiro, atribuindo-se notas (AEGERTER; GORDON; DAVIS, 2000) que variaram de 0 a 4, onde 0 (raiz sem sintomas), 1 (menos de 10% das raízes com fraca descoloração ou lesões), 2 (moderada descoloração ou podridão, com lesões atingindo 25 até 35% das raízes), 3 (lesões convergindo a 50% das raízes e morte das raízes secundárias) e 4 (necrose generalizada das raízes ou planta morta). Também foi calculado o índice geral de doença (IGD) através dos valores de danos às raízes, classificando os genótipos de melancia nas seguintes categorias: 1-1,9 = resistente; 2-2,9 = medianamente resistente; 3-3,9 = suscetível; 4-5 = muito suscetível (ARMENGOL et al., 1998; ARMENGOL; SALES JUNIOR; GARCÍA-JIMÉNEZ, 1999).

Para constatação do agente etiológico causador da doença, procedeu-se o isolamento de todas as raízes. Para isso, as raízes foram colocadas em etanol 70% e em seguida, em hipoclorito sódico 30% durante 1 minuto cada, lavadas duas vezes em água destilada autoclavada e colocadas sob papel filtro autoclavado para secagem das raízes. Sete fragmentos de raízes foram transferidos para placas de

Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de estreptomicina e incubados durante 7 dias à temperatura de 25 ± 2 °C, sob luminosidade contínua. Posteriormente, realizou-se a identificação do patógeno, mediante observação visual da formação de micélio característico do patógeno e a quantificação dos pontos com presença de *M. cannonballus* na placa, obtendo assim, a frequência de isolamento do fungo.

A população inicial de ascósporos de *M. cannonballus* foi mensurada retirando-se cinco amostras do solo naturalmente infestado logo após a coleta em área comercial. Ao final do experimento, o solo de cada tratamento foi homogeneizado, retirando-se uma amostra para obtenção da população final de ascósporos de *M. cannonballus*. As amostras de solo coletadas no início e final do experimento foram secas à sombra, peneiradas em malha de 1 mm para retirada dos resíduos e, em seguida, em malha de 250 μm , onde as partículas retidas na mesma eram eliminadas. O solo peneirado anteriormente foi dividido em seis sub-amostras contendo 20 g cada e colocadas em recipientes apropriados. A extração de ascósporos foi realizada mediante o método de flotação em açúcar, conforme Sales Junior et al. (2006), onde cada sub-amostra foi diluída em 500 mL de água e agitadas por 1 minuto. Em seguida, passaram por peneiras com malhas de 75 e 32 μm . As partículas retidas na malha de 32 μm foram novamente colocadas nos recipientes e, posteriormente centrifugadas à 900 x g, durante 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionou-se 40 mL de solução de açúcar a 50%, e centrifugou-se à 900 x g por 3 minutos. Esta última etapa foi repetida mais uma vez. O sobrenadante obtido através da centrifugação foi passado em malha de 32 μm e transferido para placas de Petri para contagem da população de ascósporos (UFC g^{-1} de solo) com o auxílio de microscópio estereoscópio de 60x. Através dos valores de população inicial e final de ascósporos calculou-se o incremento populacional de *M. cannonballus* (%).

O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, com 29 tratamentos (genótipos) e 5 repetições, sendo a parcela experimental constituída de uma planta por vaso. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis à 5% de probabilidade, fazendo-se testes de comparações múltiplas com o *software* SAEG. Além disso,

visando comparar os danos às raízes de melancia sobre a AP, MFPA, MSPA, VR, MFRAIZ, MSRAIZ, FI e PF, os dados médios foram submetidos à análise de correlação de Spearman, aos níveis de 1 e 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que houve grande variabilidade entre os genótipos, onde as variáveis AP, MFPA, MSPA, VOL, MFRAIZ, MSRAIZ e FI foram significativas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade (Tabelas 3, 4 e 5).

Segundo Box (1996) os patógenos radiculares, além de incitarem danos diretos em raízes, modificam características e padrões de crescimento, desenvolvimento e reprodução de cucurbitáceas, por isso, a utilização de características de crescimento de plantas, tais como, biomassa, altura da planta e volume da planta, pode auxiliar na quantificação de doenças causadas por patógenos radiculares.

Para AP, observou-se as maiores médias nos genótipos Quetzali e ML-SF-45, obtendo 121,6 e 112,0 cm respectivamente, e a menor, foi de Sy 3151, com 15,8 cm. Os genótipos Bobbie e Style tiveram as maiores médias de MFPA, já Boston apresentou-se com a menor, com 31,6; 31,2 e 1,1 g, respectivamente (Tabela 3).

Ainda na Tabela 3, observa-se que os genótipos Melancia 40 e ML-SF-45 tiveram médias de 5,0 e 4,7 g de MSPA, consecutivamente, diferindo estatisticamente de Sy 3151, Sy 7780, Ivona, Boston, Nr 03 e Nr 06. Boston teve a menor média (0,4 g).

No que diz respeito à VOL, o genótipo Style ($12,4 \text{ cm}^3$) e ML-SF-41 ($10,0 \text{ cm}^3$) apresentaram os maiores valores. No entanto, diferiram apenas de Boston ($1,2 \text{ cm}^3$) e Nr 02 ($1,0 \text{ cm}^3$), os quais tiveram os menores volumes de raiz. Os genótipos Style e TPX-03522 apresentaram os maiores valores de MFRAIZ. Já Boston, mostrou-se com a menor média, obtendo-se consecutivamente, 3,0; 2,6 e 0,2 g. A maior MSRAIZ foi observada em Melancia 40 e ML-SF-45 e a menor em Nr 03 (Tabela 4).

Tabela 3- Rank médio e médias de altura de plantas (AP) e massa fresca (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA) avaliadas em 29 genótipos de melancia cultivados em solo naturalmente infestado com *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| Genótipos | AP (cm) | | MFPA (g) | | MSPA (g) | |
|---------------|------------|---------|-----------|--------|------------|-------|
| Crimson Sweet | 85,4 abcd | (82,4) | 107,2 abc | (24,6) | 76,9 abcd | (2,6) |
| Quetzali | 137,9 a | (121,6) | 117,6 ab | (27,9) | 100,6 abcd | (3,5) |
| ML-SF-44 | 43,6 abcd | (52,0) | 105,4 abc | (25,0) | 79,4 abcd | (2,8) |
| ML-SF-43 | 52,4 abcd | (57,8) | 113,5 ab | (28,3) | 96,4 abcd | (3,4) |
| ML-SF-45 | 131,4 a | (112,0) | 115,4 ab | (27,4) | 131,7 ab | (4,7) |
| ML-SF-41 | 94,8 abcd | (87,2) | 89,7 abcd | (20,8) | 98,0 abcd | (3,3) |
| Melancia 40 | 117,2 ab | (118,4) | 119,9 ab | (29,1) | 135,0 a | (5,0) |
| Nr 06 | 32,1 bcd | (42,2) | 43,0 abcd | (8,4) | 31,4 cd | (1,2) |
| Nr 02 | 20,0 bcd | (30,0) | 24,0 bcd | (3,9) | 46,0 abcd | (1,7) |
| Nr 03 | 16,4 cd | (24,2) | 13,6 cd | (2,3) | 16,1 cd | (0,7) |
| Kudam | 110,6 abc | (96,4) | 95,4 abcd | (21,9) | 97,3 abcd | (3,3) |
| Premium | 73,9 abcd | (76,0) | 118,8 ab | (29,9) | 83,9 abcd | (2,9) |
| Boston | 16,4 cd | (25,6) | 5,6 d | (1,1) | 8,8 d | (0,4) |
| Pixie | 94,9 abcd | (87,0) | 68,8 abcd | (15,9) | 56,4 abcd | (2,1) |
| Ivona | 44,3 abcd | (56,0) | 28,2 abcd | (4,3) | 34,3 bcd | (1,3) |
| Style | 104,0 abcd | (95,8) | 123,2 a | (31,2) | 114,6 abc | (4,1) |
| Fashion | 66,5 ab | (72,2) | 65,4 abcd | (15,0) | 94,7 abcd | (3,2) |
| Bobbie | 102,2 abcd | (90,2) | 124,2 a | (31,6) | 103,1 abcd | (3,3) |
| TPC-00247 | 77,5 abcd | (74,4) | 96,5 abcd | (22,9) | 69,7 abcd | (2,4) |
| TPX-03521 | 84,3 abcd | (81,2) | 95,2 abcd | (22,7) | 86,6 abcd | (2,9) |
| TPX-03522 | 108,1 abc | (93,4) | 85,2 abcd | (19,4) | 99,3 abcd | (3,3) |
| TPX-06637 | 73,3 abcd | (67,6) | 54,4 abcd | (11,9) | 44,3 abcd | (1,5) |
| TPC-31181 | 80,4 abcd | (79,0) | 57,0 abcd | (13,0) | 68,6 abcd | (2,4) |
| Jenny | 93,4 abcd | (87,0) | 67,0 abcd | (14,7) | 102,3 abcd | (3,6) |
| Vanessa | 80,3 abcd | (76,6) | 65,5 abcd | (15,0) | 93,9 abcd | (3,1) |
| Nun 6034 | 46,9 abcd | (56,2) | 41,0 abcd | (8,4) | 65,2 abcd | (2,3) |
| Tiger Baby | 56,8 abcd | (61,4) | 33,2 abcd | (6,1) | 37,2 abcd | (1,4) |
| Sy 3151 | 7,8 d | (15,8) | 10,6 cd | (1,8) | 25,2 cd | (1,0) |
| Sy 7780 | 64,2 abcd | (68,8) | 32,5 abcd | (6,2) | 20,1 cd | (0,8) |
| χ^2 | 96,76** | | 117,20** | | 96,77** | |

*Valores seguidos de letras correspondem ao Rank médio e valores entre parênteses, às médias das variáveis avaliadas no experimento.

**Os valores de χ^2 na linha indica que houve diferença significativa a 5% de probabilidade para a variável analisada..

***Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Tabela 4- Rank médio e médias de volume de raiz (VOL) e massa fresca (MFRAIZ) e seca de raiz (MSRAIZ) avaliadas em 29 genótipos de melancia cultivados em solo naturalmente infestado com *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| Genótipos | VOL (cm ³) | | MFRAIZ (g) | | MSRAIZ (g) | |
|---------------|------------------------|--------|------------|-------|-------------|-------|
| Crimson Sweet | 102,9 abc | (8,6) | 121,5 ab | (2,3) | 118,7 abc | (0,3) |
| Quetzali | 56,5 abc | (4,8) | 94,7 abcd | (1,6) | 97,4 abcde | (0,2) |
| ML-SF-44 | 65,8 abc | (5,8) | 74,2 abcd | (1,2) | 74,1 abcde | (0,1) |
| ML-SF-43 | 93,3 abc | (8,0) | 67,1 abcd | (1,1) | 86,9 abcde | (0,2) |
| ML-SF-45 | 114,9 ab | (9,6) | 107,6 abcd | (2,0) | 127,6 ab | (0,4) |
| ML-SF-41 | 118,9 a | (10,0) | 123,2 ab | (2,5) | 108,7 abcde | (0,3) |
| Melancia 40 | 114,9 ab | (9,6) | 106,4 abcd | (1,8) | 136,0 a | (0,4) |
| Nr 06 | 46,5 abc | (4,0) | 42,4 abcd | (0,7) | 34,5 bcde | (0,1) |
| Nr 02 | 6,0 c | (1,0) | 17,0 cd | (0,3) | 26,0 cde | (0,0) |
| Nr 03 | 16,4 bc | (1,8) | 10,9 cd | (0,2) | 13,8 e | (0,0) |
| Kudam | 99,9 abc | (8,4) | 108,9 abcd | (1,9) | 111,6 abcde | (0,3) |
| Premium | 80,8 abc | (7,0) | 85,3 abcd | (1,4) | 76,7 abcde | (0,2) |
| Boston | 11,9 c | (1,2) | 9,4 d | (0,2) | 17,7 de | (0,0) |
| Pixie | 55,2 abc | (4,6) | 53,6 abcd | (0,9) | 39,7 abcde | (0,1) |
| Ivona | 35,8 abc | (3,0) | 27,0 bcd | (0,4) | 33,5 bcde | (0,0) |
| Style | 130,0 a | (12,4) | 134,4 a | (3,0) | 120,2 abc | (0,3) |
| Fashion | 86,0 abc | (7,6) | 80,1 abcd | (1,3) | 66,6 abcde | (0,1) |
| Bobbie | 82,5 abc | (7,2) | 98,7 abcd | (1,7) | 113,4 abcde | (0,3) |
| TPC-00247 | 111,1 ab | (12,4) | 89,7 abcd | (1,5) | 89,5 abcde | (0,2) |
| TPX-03521 | 82,7 abc | (6,8) | 74,9 abcd | (1,2) | 86,4 abcde | (0,2) |
| TPX-03522 | 101,7 abc | (8,8) | 130,9 a | (2,6) | 117,5 abcd | (0,3) |
| TPX-06637 | 79,5 abc | (6,6) | 109,9 abc | (2,2) | 94,5 abcde | (0,2) |
| TPC-31181 | 88,5 abc | (8,0) | 60,1 abcd | (1,0) | 58,4 abcde | (0,1) |
| Jenny | 41,7 abc | (4,0) | 42,7 abcd | (0,7) | 63,6 abcde | (0,8) |
| Vanessa | 50,5 abc | (4,4) | 60,3 abcd | (1,0) | 53,5 abcde | (0,1) |
| Nun 6034 | 40,4 abc | (3,6) | 39,1 abcd | (0,7) | 41,6 abcde | (0,1) |
| Tiger Baby | 54,9 abc | (4,8) | 59,1 abcd | (1,0) | 34,5 bcde | (0,1) |
| Sy 3151 | 46,1 abc | (4,0) | 20,6 cd | (0,4) | 24,9 cde | (0,0) |
| Sy 7780 | 101,7 abc | (8,8) | 67,3 abcd | (1,1) | 49,5 abcde | (0,1) |
| χ^2 | 94,76** | | 108,97** | | 108,83** | |

*Valores seguidos de letras correspondem ao Rank médio e valores entre parênteses, às médias das variáveis avaliadas no experimento.

**Os valores de χ^2 na linha indica que houve diferença significativa para a variável analisada, a 5% de probabilidade.

***Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

De acordo com os valores de IGD, os genótipos foram classificados como medianamente resistentes, suscetíveis e altamente suscetíveis. Os genótipos ML-SF-44, ML-SF-45, Melancia 40, Nr 06, Kudam, Premium, Style, Bobbie, TPC-00247, TPX-03521, TPX-03522 e TPX-06637 foram classificados como medianamente resistentes. Os genótipos Crimson Sweet, Quetzali, ML-SF-43, ML-SF-41, Nr 03, Boston, Pixie, Ivona, Fashion, TPC-31181, Jenny, Vanessa, Nun 6034, Tiger Baby, Sy 7780 como suscetíveis e, os genótipos Nr 02 e Sy 3151 classificados como muito suscetíveis (Tabela 5). Segundo Bruton et al. (1999) e Pivonia et al. (2002) a severidade ou danos causados pelo patógeno radicular depende do nível de resistência das cultivares e da temperatura.

Sales Junior et al. (2002) em estudo realizado na Espanha, avaliando-se o comportamento de cultivares de melão e melancia em solo inoculado com 20 UFC g⁻¹ de solo, observaram que a cultivar Crimson Sweet se mostrou resistente, com IGD de 1,1. Diversos fatores podem ter contribuído para que a planta se mostrasse resistente ao patógeno, entre esses, a patogenicidade do isolado fúngico utilizado. No entanto, no presente trabalho, essa mesma cultivar foi classificada como suscetível com população de 3 ascósporos.g⁻¹ de solo ao final do ciclo da cultura. Isso pode ser explicado pelo fato de que no nosso experimento foi utilizado solo naturalmente infestado com o patógeno, e possivelmente, este estava adaptado às condições de clima e solo. Pivonia et al. (1997); Schroth e Hildebrand (1964) dizem que a qualidade e quantidade de componentes dos exsudados radiculares de culturas hospedeiras ou não hospedeiras do patógeno, bem como o nível de predisposição à infecção e ao estresse hídrico podem influenciar a germinação de estruturas de sobrevivência de fitopatógenos habitantes de solo.

Contudo, devemos lembrar que o ambiente do solo é muito complexo e diferentes áreas geográficas têm diferentes ambientes de solo (ABAWI; WIDMER, 2000), além disso, a intensidade de doenças radiculares é resultante do potencial de inóculo, do qual sua densidade é apenas um dos componentes envolvidos e por isso, a quantificação dessa variável não garante o estabelecimento de relações seguras com a intensidade de doença (MICHEREFF et al., 2005). Segundo Lockwood (1988), o potencial de inóculo é a energia de crescimento do organismo

patogênico que está disponível para a infecção do hospedeiro, resultante da densidade de inóculo, da energia exógena e endógena dos propágulos por unidade, da virulência dos propágulos e dos fatores ambientais, determinantes da atividade do inóculo. Esses fatores podem exercer influência direta sobre o comportamento populacional do patógeno no solo, suprimindo-o ou incrementando-o.

Segundo Bruton (1998) a resposta de plantas de cucurbitácea a doenças incitadas por patógenos radiculares pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta, nível e tipo de resistência envolvida, densidade do inóculo do patógeno no solo, variabilidade do patógeno e condições ambientais. Assim, a avaliação contínua da variabilidade do patógeno, monitorando possíveis mudanças na população, juntamente com a determinação dos níveis de inóculo adequados para causar doença, são necessárias para obtenção de cultivares resistentes.

Pode-se observar que *M. cannonballus* foi isolado das raízes de todos os genótipos. Não houve diferença estatística entre os genótipos Nr 02, Nr 03, Tiger Baby, Sy 3151 para a variável FI, no entanto, estes diferiram dos demais tratamentos, apresentando os menores valores (Tabela 5).

A população inicial de *M. cannonballus* foi de 1,53 ascósporos g^{-1} solo. As maiores médias de ascósporos observadas ao final do experimento foram 4,03 e 3,52 ascósporos g^{-1} solo (Figura 1), correspondendo a um incremento populacional de 263,1% e 229,8% para os genótipos Vanessa e Boston, respectivamente (Tabela 5). Já o ML-SF-45 obteve 2,16 ascósporos g^{-1} solo, com incremento de 141,2%, demonstrando que *M. cannonballus* foi capaz de se desenvolver nas condições edafoclimáticas do Rio Grande do Norte. Estudo sobre comparativo epidemiológico de “calapso” em melão, melancia e melancia enxertada realizado por Beltrán et al. (2008) demonstrou que no primeiro ano de cultivo houve um incremento populacional de 62,66%, com população inicial e final de 2,25 e 3,66 ascósporos g^{-1} solo, respectivamente. Portanto, os resultados obtidos neste experimento são semelhantes aos obtidos por esses autores.

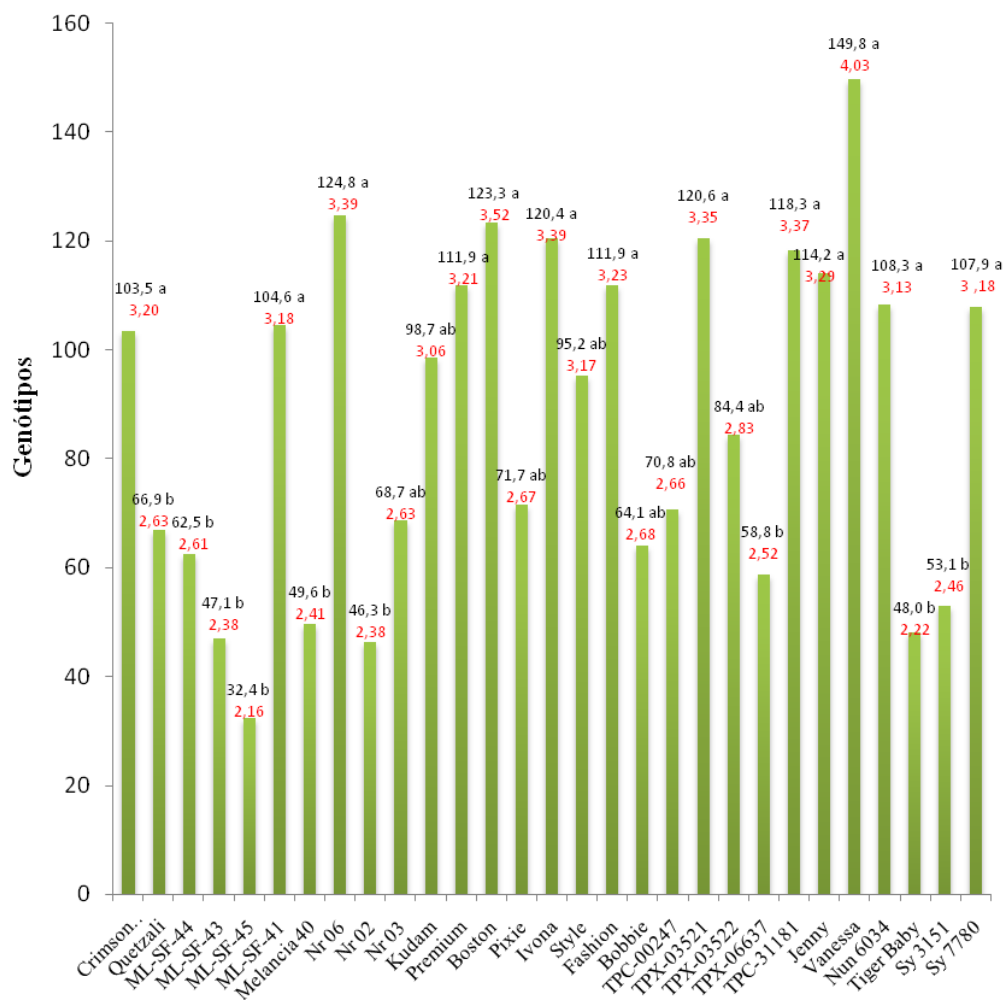
Tabela 5- Rank médio e médias de danos nas raízes (Danos), índice geral de doença (IGD), incremento populacional e frequência de isolamento (FI) de *Monosporascus cannonballus* avaliadas em 29 genótipos de melancia cultivados em solo naturalmente infestado com *M.cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| Genótipos | Danos | IGD | Incremento (%) | FI |
|---------------|-------|-------------------------|----------------|------------------|
| Crimson Sweet | 3,0 | Suscetível | 209,2 | 47,9 abcd (2,6) |
| Quetzali | 3,4 | Suscetível | 171,9 | 58,2 abcd (3,0) |
| ML-SF-44 | 2,6 | Medianamente resistente | 170,6 | 60,5 abcd (3,0) |
| ML-SF-43 | 3,2 | Suscetível | 155,6 | 102,9 abcd (4,6) |
| ML-SF-45 | 2,6 | Medianamente resistente | 141,2 | 75,9 abcd (3,6) |
| ML-SF-41 | 3,0 | Suscetível | 207,8 | 114,9 abc (5,0) |
| Melancia 40 | 2,2 | Medianamente resistente | 157,5 | 85,2 abcd (4,0) |
| Nr 06 | 2,6 | Medianamente resistente | 221,7 | 96,9 abcd (4,2) |
| Nr 02 | 4,0 | Muito suscetível | 155,2 | 28,5 cd (2,0) |
| Nr 03 | 3,2 | Suscetível | 171,6 | 40,5 bcd (2,0) |
| Kudam | 2,0 | Medianamente resistente | 199,9 | 66,2 abcd (3,2) |
| Premium | 2,4 | Medianamente resistente | 209,7 | 87,9 abcd (4,0) |
| Boston | 3,2 | Suscetível | 229,8 | 52,3 abcd (2,8) |
| Pixie | 3,8 | Suscetível | 174,3 | 141,1 a (6,8) |
| Ivona | 3,0 | Suscetível | 221,7 | 114,9 abc (5,0) |
| Style | 2,8 | Medianamente resistente | 207,0 | 60,5 abcd (3,0) |
| Fashion | 3,2 | Suscetível | 211,3 | 48,2 abcd (2,6) |
| Bobbie | 2,0 | Medianamente resistente | 175,4 | 41,5 abcd (2,2) |
| TPC-00247 | 2,0 | Medianamente resistente | 173,7 | 57,6 abcd (3,0) |
| TPX-03521 | 2,4 | Medianamente resistente | 219,0 | 82,2 abcd (3,8) |
| TPX-03522 | 2,8 | Medianamente resistente | 185,2 | 45,6 abcd (2,6) |
| TPX-06637 | 2,8 | Medianamente resistente | 164,5 | 85,2 abcd (4,0) |
| TPC-31181 | 3,2 | Suscetível | 220,0 | 75,4 abcd (3,8) |
| Jenny | 3,2 | Suscetível | 215,1 | 94,5 abcd (4,4) |
| Vanessa | 3,8 | Suscetível | 263,1 | 103,5 abcd (4,6) |
| Nun 6034 | 3,2 | Suscetível | 204,8 | 128,5 ab (5,8) |
| Tiger Baby | 3,0 | Suscetível | 144,9 | 39,4 bcd (2,2) |
| Sy 3151 | 4,0 | Muito suscetível | 160,7 | 11,3 d (0,8) |
| Sy 7780 | 3,0 | Suscetível | 207,5 | 69,8 abcd (3,4) |
| χ^2 | - | - | - | 78,23** |

*Valores seguidos de letras correspondem ao rank médio e valores entre parênteses, às médias das variáveis avaliadas no experimento.

**Os valores de χ^2 na linha indica que houve diferença significativa para a variável analisada, a 5% de probabilidade.

***Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.



*Valores seguido de letra (cor preta) e valores em vermelho correspondem ao Rank médio e média de população final de ascósporos de *M. cannonballus*, respectivamente.

Figura 1- População final de ascósporos de *M. cannonballus* em solo naturalmente infestado, cultivado com 29 genótipos de melancia. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

A tabela 6 mostra que os danos às raízes foram significativamente correlacionados com MFPA, VR, MFRAIZ e MSRAIZ, o que não ocorreu com AP, MSPA, FI e população final de ascósporos (PF). Esses resultados não corroboram com Box (1996), que diz que as variáveis de biomassa e volume de raízes ou plantas são facilmente obtidas, mas não refletem diferenças significativas entre tratamentos quando se consideram doenças radiculares, devido à emissão pela planta infectada de novas raízes e brotos, que acabam influenciando as medidas obtidas por essas variáveis. Andrade (2004) estudando a frequência de fungos associados ao “colapso” do meloeiro e influência da densidade de inóculo e isolados de *M. cannonballus* na severidade da doença, não constatou correlações significativas da severidade da doença com volume de raiz, biomassa fresca de parte aérea e raiz e biomassa seca de raiz, encontrando correlação apenas com o comprimento da planta, encontrando resultados diferentes dos observados.

A maior temperatura do ar observada durante o ciclo da cultura foi entre os horários de 9 à 13 h, com cerca de 40 °C. Após esse horário, a temperatura reduziu até ficar em torno de 30 °C (Figura 2). No presente trabalho não foram avaliadas a temperatura do solo, no entanto, pode-se ter uma idéia, quando observada a temperatura do ar.

Tabela 6- Coeficientes de correlação de Spearman entre danos às raízes (DANOS) e altura de plantas (AP), massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, volume de raiz (VR), massa fresca (MFRAIZ) e seca (MSRAIZ) de raiz, frequência de isolamento (FI) e população final de ascósporos (PF), avaliadas em reação de 29 genótipos de melancia à *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| | MFPA | MSPA | VR | MFRAIZ | MSRAIZ | DANOS | FI | PF |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|
| AP | 0,72** | 0,81** | 0,66** | 0,75** | 0,83** | -0,36ns | 0,17ns | -0,06ns |
| MFPA | | 0,82** | 0,67** | 0,75** | 0,77** | -0,54** | 0,13ns | -0,22ns |
| MSPA | | | 0,58** | 0,67** | 0,86** | -0,30ns | 0,18ns | 0,21ns |
| VR | | | | 0,86** | 0,73** | -0,57** | 0,03ns | -0,20ns |
| MFRAIZ | | | | | 0,83** | -0,57** | 0,01ns | -0,21ns |
| MSRAIZ | | | | | | -0,51** | 0,12ns | -0,19ns |
| DANOS | | | | | | | 0,01ns | -0,13ns |
| FI | | | | | | | | 0,38* |

**,: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste de permutação de Mantel.

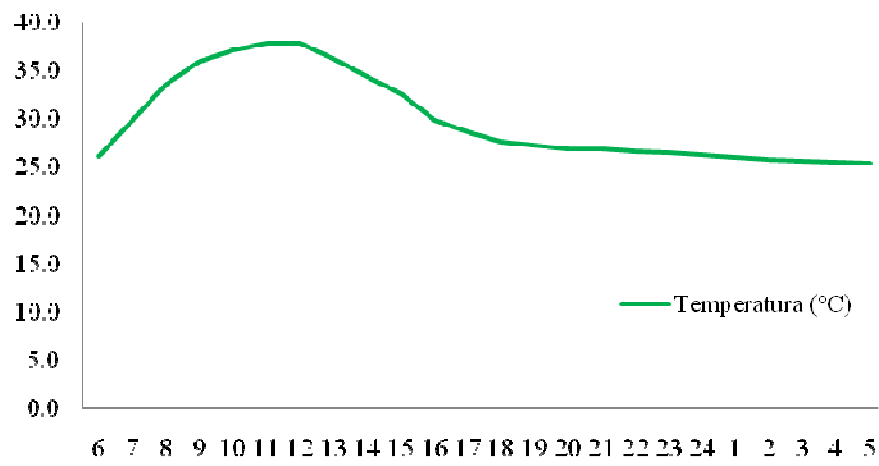


Figura 2- Médias de temperatura (°C) registrada durante o experimento de reação dos 29 genótipos de melancia à *M. cannonballus*. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

4 CONCLUSÃO

Os genótipos ML-SF-44, ML-SF-45, Melancia 40, Nr 06, Kudam, Premium, Style, Bobbie, TPC-00247, TPX-03521, TPX-03522 e TPX-06637 foram medianamente resistentes à *Monosporascus cannonballus*;

Todos os tratamentos foram de certa forma, afetados pela presença do patógeno no solo.

REFERÊNCIAS

ABAWI, G. S.; THURSTON, H. D. Effects of organic mulches, soil amendments, and cover crops on soilborne plant pathogens and their root diseases. **Chartered Institute of Architectural Technologists**, v. 1, n. 1, p.144, 2000.

AEGERTER, B. J.; GORDON, T. R.; DAVIS, R. M. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. **Plant Disease**, v.84, n.3, p.224-230, 2000.

AGRIANUAL. **Anuário de Agricultura Brasileira**. p.306-309. 2008.

ANDRADE, D. E. G. T. **Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e influência da densidade de inóculo e isolados de *Monosporascus cannonballus* na severidade da doença**. Recife: UFRPE. 48p. 2004. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ARMENGOL, J.; SALES JUNIOR, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Evolución de los daños causados por *Acremonium cucurbitacearum* em raíz de melón es sus primeros estados de desarrollo. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, n.25, p.265-277, 1999.

ARMENGOL, J.; SANZ, E.; MARTÍNEZ-FERRER, G.; SALES JUNIOR, R.; BRUTON, B. D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Host range of *Acremonium cucurbitacearum*, cause of *Acremonium* collapse of muskmelon. **Plant Pathology**, v.47, p.29-35, 1998.

BELTRÁN, R.; VICENT, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Comparative epidemiology of *Monosporascus* root rot and vine decline in muskmelon, watermelon, and grafted watermelon crops. **Plant Disease**. v.92, p.158-163, 2008.

BOUGHALLEB, N. Sudden decay of watermelon in Tunisia: Identification of fungi and biology of *Fusarium* spp. Post-graduate certificate in Protection of Plants and Environment. **High Horticultural School of Chott-Mariem**, Sousse-Tunisie, n.4042, p. 83. 2001.

BOX, J. Modern methods for root investigations. In: Waisel, Y.; Eshel, A.; Kafkafi, U. (Eds.) **Plant roots**. New York: Marcel Dekker, p.193-237, 1996.

BRUTON, B.D.; GÁRCIA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Analysis of the relationship between temperature and vine declines caused by *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on muskmelon. **Subtropical Plant Science**, v.51, p.23-28, 1999.

BRUTON, B. D. **Soilborne diseases in Cucurbitaceae**: Pathogen virulence and host resistance. In: McCreight, J. (Ed.) CUCURBITACEAE 98. American Society for Horticultural Science. Press. p.143-166. 1998.

BRUTON, B. D.; DAVIS, R. M.; GORDON, T. R. Occurrence of *Acremonium* sp. and *Monosporascus cannonballus* in the major cantaloupe and watermelon growing areas of California. **Plant Disease**, v.79, p.754, 1995.

CAFÉ FILHO, A. C.; DUNIWAY, J. M.; DAVIS, R. M. Effects of the frequency of furrow irrigation on root and fruit rots of squash caused by *Phytophthora capsici*. **Plant Disease**, v.79, p.44-48, 1995.

CARMO FILHO, F.; OLIVEIRA, O. F. **Mossoró**: um município do semi-árido nordestino – características e aspectos florísticos. Mossoró: ESAM/FGD, 1989. 62p. (Coleção Mossoroense, Série B, n. 672).

COHEN, R.; PIVONIA, S.; SHTIENBERG, D.EDELSTEIN, M.; RAZ, D.; GERSTIL, Z.; KATAN, J. Efficacy of Fluazinam in suppression of *Monosporascus cannonballus*, the causal agent of sudden wilt of melons. **Plant Disease**. v 83, p.1137-1141, 1999.

DIAS, R. C. S.; PICÓ, B.; ESPINOS, A.; NUEZ, F. Resistance to melon vine decline derived from *Cucumis melo* ssp. Agrestis: Genetic analysis of root structure and root response. **Plant Breeding**, v. 123, n. 1, p. 66-72. 2004.

DIAS, R. C. S.; QUEIRÓZ, M. A. MENEZES, M. Identificação de fontes de resistência em melancia a *Didymella bryonae*. **Horticultura Brasileira**, v.14, p.15-17, 1996.

EL-DESOUKY S. M.; EL-WAKIL A. A. Occurrence of *Monosporascus* root rot and vine decline of cantaloupe and watermelon in Egypt. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v.31, p.141–150, 2003.

GENNARI, S.; MIROTTI, A.; SPORTELLI, M. *Monosporascus cannonballus* on watermelon. **Informatore Fitopatologico**, n. 1/2, p. 38-40. 1999.

GUIMARÃES, I. M.; SALES JUNIOR, R.; SILVA, K. J. P.; MICHEREFF, S. J.; NOGUEIRA, D. R. S. Efeito de Fluazinam no controle *Monosporascus cannonballus*, agente causal do declínio de ramas em meloeiro. **Revista Caatinga**. v. 21, n. 4, 147-153. Out./Dez. 2008.

HENZ, G. P.; LIMA, M. F. Avaliação de fatores que afetam a reação de *Cucurbita* spp. a *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, p. 560-565, 1994.

HUH, Y. C.; OM, Y. H.; LEE, J. M. Utilization of *Citrullus* germplasm with resistance to fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. Sp. *Niveum*) for watermelon rootstocks. **Acta Hortiscience**. (International Society for Horticultural Science), v.588, p.127-132. 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. IBRAF. Disponível em <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em 15 de setembro de 2009.

LOCKWOOD, J. L. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 93-121, 1988.

MARTYN, R. D. *Monosporascus* root rot and vine decline of melons. The Plant Health Instructor, 2002. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/education/lessonsplantpath/Monosporascus/top.htm>> Acesso em: 25 Out. 2009.

MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. **Plant Disease**. v. 80, p.716-725. 1996.

MARTYN, R. D.; BATTEN, J. S.; PARK, Y. J.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Mexico. **Plant Disease**, v.80, p.1430, 1996.

MARTYN, R. D.; LOVIC, B. R.; MADDOX, D. A.; GERMASH, A.; MILLER, M. E. First report of *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Tunisia. **Plant Disease**, v.78, n.12, p 1220. 1994.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M. **Inóculo de patógenos radiculares**. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. Ecologia manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE – Imprensa Universitária, 2005. p.93-124.

PIVONIA, S.; COHEN, R.; RIGEL, J.; KATAN, J. Effect of soil temperature on disease development in melon plants infected by *Monosporascus cannonballus*. **Plant Pathology**, London, v.51, p.472-479, 2002.

PIVONIA, S.; COHEN, R.; KAFKAFI, U.; BEM ZE'EV, I. S.; KATAN, J. Sudden wilt of melons in Southern Israel: fungal agents and relationship with plant development. **Plant Disease**, v. 81, n. 11, 1997.

SALES JUNIOR, R.; SANTANA, C. V. S.; NOGUEIRA, D. R. S.; SILVA, K. J. P.; GUIMARÃES, I. M.; MICHEREFF, S. J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. First Report of *Monosporascus cannonballus* on Watermelon in Brazil. **Plant Disease**, v.94, p. 278, 2010.

SALES JUNIOR, R.; BELTRÁN, R.; MICHEREFF, S.J.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; MEDEIROS, E. V. Análisis de distintos tipos de azúcares en el método de extracción de ascosporas de *Monosporascus cannonballus* en suelo. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.185-187, 2006.

SALES JUNIOR, R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; KOBORI, R. F. Comportamento de cultivares de meloeiro e melancia inoculados com *Acremonium cucurbitacearum* e *Monosporascus cannonballus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 206-210, 2002.

SCHROTH, M. N.; HILDEBRAND, D. C. Influence of plant root exudates on root infecting fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 101-132, 1964.

WOLFF, D.W.; MILLER, M. E. Tolerance to *Monosporascus* root rot and vine decline in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. **HortScience**, v.33, p.287-290, 1998.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE MELANCIA POR MEIO DE MARCADORES RAPD

RESUMO

Objetivou-se no presente trabalho avaliar molecularmente 29 genótipos de melancia utilizando marcadores RAPD. Inicialmente, realizou-se a extração e quantificação dos DNAs dos genótipos e posteriormente, a amplificação com 20 *primers* RAPD, dos quais, 6 geraram produto de amplificação e os 14 restantes não amplificaram ou geraram produto de amplificação em poucos DNAs, sendo desse modo, excluídos das análises. A análise de dissimilaridade genética foi realizada utilizando-se o *software* Genes e o polimorfismo revelado por estes marcadores utilizado para estimar os coeficientes de similaridade de Jaccard médios para cada genótipo e realizar a análise de agrupamento pelo método de UPGMA, permitindo a formação de 6 grupos distintos. O grupo I foi formado pelo genótipo Crimson Sweet. O grupo II foi constituído pelos genótipos ML-SF-44 e ML-SF-41, os quais são oriundos da mesma empresa, indicando estreita base genética no seu programa de melhoramento. O grupo III foi formado pela maioria dos genótipos (ML-SF-45, Nr 06, Ivona, TPX-03521, TPC-31181, TPX-06637, Melancia 40, TPC-00247, Kudam, TPX-03522, Fashion, Nr 03, Bobbie, Sy 7780, Jenny, Nun 6034, Premium, Boston, Pixie, Tiger Baby e Sy 3151), os quais são provenientes de empresas diferentes. Os grupos IV, V e VI, constituídos por apenas um genótipo cada, ML-SF-43, Vanessa e Nr 02, respectivamente. Os marcadores mais polimórficos foram OPF-02 e OPO-15, com formação de 11 e 10 bandas, consecutivamente. Os genótipos ML-SF-43 e Nr 02 foram os mais divergentes. Ademais, a detecção de variabilidade genética entre os acessos estudados revela que eles poderão ser utilizados em futuros cruzamentos em busca de variabilidade para os caracteres de interesse agrônomo.

Palavras-chave: Molecular. RAPD. Dissimilaridade. *Primer*.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF WATERMELON GENOTYPES THROUGH RAPD MARKERS

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate molecularly 29 watermelon genotypes using RAPD markers. First, the extraction and quantification of DNA from the genotypes was carried out and then the amplification with 20 RAPD primers, six of which generated an amplification product, whereas the remaining 14 were not amplified or generated an amplification product in only a few DNAs, and thus were excluded from the analysis. The analysis of genetic dissimilarity was performed using the Genes software and the polymorphism revealed by the markers was used to estimate the average Jaccard's similarity coefficients for each genotype and perform a UPGMA cluster analysis, allowing the formation of 6 groups. Group I was formed by the genotype Crimson Sweet. Group II was composed of the genotypes ML-SF-44 and ML-SF-41, which come from the same company, indicating a narrow genetic base in their breeding program. Group III was formed by most of the genotypes (ML-SF-45, Nr 06, Ivona, TPX-03521, TPC-31181, TPX-06637, Watermelon 40, TPC-00247, Kudam, TPX-03522, Fashion, Nr 03, Bobbie, Sy 7780, Jenny, Nun 6034, Premium, Boston, Pixie, Tiger Baby and Sy 3151), which come from different companies. Groups IV, V and VI were composed of just one genotype each: ML-SF-43, Vanessa and Nr 02, respectively. The most polymorphic markers were OPF-02 and OPO-15, with formation of 11 and 10 bands, consecutively. The Genotypes ML-SF-43 and Nr 02 were the most divergent. Furthermore, the detection of genetic variability among the studied accessions shows that they can be used in future crosses in search of variability for agronomically important trait.

Keywords: molecular markers; RAPD, dissimilarity; *primer*.

1 INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus* L.) é uma cucurbitácea de grande importância agrícola, estando atualmente entre as principais em volume de produção mundial. Essa cultura têm enfrentado muitos problemas fitossanitários com consideráveis perdas devidas, principalmente, a ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus (LOPES; REIS; LIMA, 2008), ocasionando danos e redução na produtividade e na qualidade dos frutos. Dentre as doenças causadas por patógenos radiculares que acometem à cultura pode-se citar o “colapso” da melancia ou “declínio” de ramos, onde um dos principais agentes etiológico envolvido é o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker.

O controle químico do patógeno tem sido pouco efetivo em condições de campo, por isso tem-se lançado mão de algumas alternativas de controle, como por exemplo, a resistência de cultivares à *M. cannonballus*.

Segundo Cohen et al., 2000, a resistência de cultivares têm sido incluída recentemente como alternativa de controle. No entanto, não se conhece cultivares comerciais com níveis aceitáveis de resistência ao patógeno (WOLFF; MILLER, 1998; SALES JUNIOR et al., 2002; DIAS et al., 2004). Nesse sentido, alguns trabalhos têm sido realizados, merecendo destaque a avaliação do comportamento de melão e melancia em solo inoculado com *M. cannonballus*, realizado por Sales et al. (2002). Neste trabalho concluiu-se que as duas cultivares de melancia estudadas foram resistentes ao fungo, sendo necessário a avaliação de mais genótipos da referida cucurbitácea para obtenção de resultados mais consistentes.

No entanto, diversos trabalhos têm relatado a suscetibilidade da cultura a outros patógenos, tais como *Fusarium oxysporum* [Schlechtend : Fr f.sp. *niveum* (EFSm) W.C Snyder Hans] (HUH et al., 2002), *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm (DIAS; QUEIRÓZ; MENEZES, 1996) e *Phytophthora capsici* Leonian (HENZ; LIMA, 1994). Essa suscetibilidade pode está ligada a fatores genéticos, pois segundo Queiróz (1993) a melancia apresenta base genética muito estreita. Por

isso, é importante que o estudo de reação de genótipos à fitopatógenos seja realizado conjuntamente com a caracterização molecular das espécies vegetais em questão, tornando os resultados mais consistentes, pois serão analisados a nível de DNA, ou seja, sem influência de fatores ambientais.

Os marcadores de DNA geram uma grande quantidade de caracteres adicionais que, quando combinados com características fenotípicas, fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Sua utilização têm sido empregada com sucesso na análise genética de plantas, na caracterização da variabilidade existente entre os indivíduos para avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e seus híbridos intra e interespecíficos, na verificação da pureza genética, no mapeamento genético, na seleção de caracteres específicos e de interesse (BECKMANN-CAVALCANTI et al., 2007) e em incorporação de genes de resistência em cultivares comerciais, principalmente a fitopatógenos (RESENDE; SILVA, 2001).

Atualmente existem diversas classes de marcadores moleculares, dentre eles, pode-se citar o RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), técnica que utiliza a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para detectar fragmentos específicos de DNA (WILLIAMS et al., 1990). A técnica RAPD tem se mostrado extremamente útil para caracterizar a variabilidade genética de muitas espécies, inclusive em espécies de melancia, devido a sua facilidade de execução (LEVI et al., 2002; FERREIRA, 2000; CAPELITO; UNEDA; MAURO, 2004).

O polimorfismo evidenciado pelo RAPD é detectado em função de mutações no(s) sítio(s) de ligação do *primer*, que impedem o seu pareamento e a consequente amplificação, ou devido à ocorrência de deleções ou inserções na região compreendida entre os dois sítios, que alteram o segmento amplificado. Como na maioria das vezes essas mutações impedem a amplificação do segmento de interesse, diz-se que a herança do RAPD é dominante, pois apenas duas classes fenotípicas são detectadas, presença ou ausência da banda de DNA (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Apesar da importância do conhecimento da diversidade genética existente entre materiais genéticos de melancia poucos trabalhos têm sido realizados nesse

sentido. Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar molecularmente 29 genótipos de melancia utilizando-se marcadores RAPD, o que poderá facilitar futuros programas de melhoramento da melancia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, localizada no município de Mossoró/RN. Vinte e nove genótipos de melancia (Tabela 1) foram utilizados.

Tabela 1- Relação dos 29 genótipos de melancia e suas respectivas empresas. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| Tratamentos | Genótipo de melancia | Especificações | Empresa |
|-------------|----------------------|-------------------|----------|
| T1 | Crimson Sweet | - | Isla Pak |
| T2 | Quetzali | - | - |
| T3 | ML-SF-44 | - | Fitó |
| T4 | ML-SF-43 | - | Fitó |
| T5 | ML-SF-45 | - | Fitó |
| T6 | ML-SF-41 | - | Fitó |
| T7 | Melancia 40 | - | Fitó |
| T8 | Nr 06 | Híbrido triplóide | Sakata |
| T9 | Nr 02 | Híbrido | Sakata |
| T10 | Nr 03 | Híbrido | Sakata |
| T11 | Kudam | - | Nunhems |
| T12 | Premium | - | Nunhems |
| T13 | Boston | - | Nunhems |
| T14 | Pixie | Triplóide | Nunhems |
| T15 | Ivona | Triplóide | Nunhems |
| T16 | Style | Triplóide | Nunhems |
| T17 | Fashion | - | Nunhems |
| T18 | Bobbie | Triplóide | Nunhems |
| T19 | TPC-00247 | Híbrido | AgriStar |
| T20 | TPX-03521 | Híbrido | AgriStar |
| T21 | TPX-03522 | Híbrido | AgriStar |
| T22 | TPX-06637 | Híbrido | AgriStar |
| T23 | TPC-31181 | - | AgriStar |
| T24 | Jenny | - | Nunhems |
| T25 | Vanessa | - | Nunhems |
| T26 | Nun 6034 | - | Nunhems |
| T27 | Tiger Baby | - | Seminis |
| T28 | Sy 3151 | - | Rogers |
| T29 | Sy 7780 | - | Rogers |

Para amplificação dos DNAs dos genótipos foram utilizados 20 *primers* RAPD (Tabela 2). Para a extração do DNA foi empregado o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1995). As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos estéreis de 2 μ L. O tampão de extração foi preparado contendo 100 μ L de Tris-HCl (100 μ M), 280 μ L de NaCl (1,4M), 400 μ L de EDTA (20mM), 300 μ L de CTAB (2,0%), 0,01 g de PVP40 (1,0%), 278 μ L água Miliq e 2 μ L de β -mercaptoetanol (0,2%), e logo após pipetou-se 700 μ L desse tampão de extração, os quais foram colocados nos microtubos. Os microtubos foram vertidos e colocados em banho-maria à temperatura de 65 °C durante 40 minutos, sendo estes, agitados a cada 10 minutos. Logo após, foram adicionados 800 μ L de álcool-isoamílico (24:1) nos microtubos, os quais foram vertidos e centrifugados à 14.000 x g, durante 7 minutos e, em seguida, transferiu-se a fase superior (aquosa) para novo microtubo, sendo esta etapa, repetida mais uma vez. Logo após, adicionou-se à fase aquosa 400 μ L de isopropanol gelado, homogeneizando a solução até a formação do *pellet*. As amostras foram colocadas em congelador por 2 horas e posteriormente centrifugadas à 14.000 x g durante 10 minutos. Para limpeza do *pellet*, adicionou-se 1 mL de etanol 70% no microtubo, sendo os mesmos centrifugados à 14.000 x g durante 5 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 1 mL de etanol 90% aos microtubos, os quais foram centrifugados novamente à 14.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente, deixando apenas o *pellet* no microtubo. As amostras foram colocadas em estufa à 70 °C durante 20 minutos, e logo após, adicionou-se 50 μ L de RNase nos microtubos, os quais foram incubados à 37 °C em banho-maria.

A quantificação de DNA foi realizada em géis de agarose a 1% (p/v), comparando-se visualmente a intensidade das bandas do DNA dos genótipos extraído, com bandas de peso molecular conhecido de 1 kb. Após a quantificação, o DNA foi diluído em uma concentração de 3 ng para serem utilizados nas reações de amplificação com os *primers* RAPD.

Tabela 2- Relação dos *primers* RAPD e respectivas sequências de bases utilizados na amplificação de fragmentos de DNA de 29 genótipos de melancia. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| <i>Primers</i> | Sequência | <i>Primers</i> | Sequência |
|----------------|------------------|----------------|------------------|
| OPA-03 | 5' AGTCAGCCAC 3' | OPE-15 | 5' ACGCACAACC 3' |
| OPA-04 | 5' AATCGGGCTG 3' | OPF-02 | 5' GAGGATCCCT 3' |
| OPA-07 | 5' GAAACGGGTG 3' | OPF-16 | 5' GGAGTACTGG 3' |
| OPA-13 | 5' CAGCACCCAC 3' | OPO-02 | 5' ACGTAGCGTC 3' |
| OPB-14 | 5' TCCGCTCTGG 3' | OPO-03 | 5' CTGTTGCTAC 3' |
| OPC-05 | 5' GATGACCGCC 3' | OPO-04 | 5' AAGTCCGCTC 3' |
| OPC-13 | 5' AAGCCTCGTC 3' | OPO-06 | 5' CCACGGGAAG 3' |
| OPD-08 | 5' GTGTGCCCA 3' | OPO-07 | 5' CAGCACTGAC 3' |
| OPE-05 | 5' TCAGGGAGGT 3' | OPO-10 | 5' TCAGAGCGCC 3' |
| OPE-14 | 5' TGCGGCTGAG 3' | OPO-15 | 5' TGGCGTCCTT 3' |

Para a realização da reação de PCR foi utilizado um coquetel preparado para um volume final de 13 µL, contendo 4,2 µL de água ultrapura, 1,3 µL de Taq Buffer (10x), 2,0 µL de MgCl₂ (25mM), 1,3 µL de dNTP (2,5mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) (Kit da Fermentas Life Sciences/USA), 1,0 µL de *primer* (5 mM), e 3,0 µL de DNA (3ng). As reações foram conduzidas em termociclador Axygen Axygene, com a seguinte programação: pré-desnaturação à 96 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos à 92 °C por 1 minuto, 35 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com extensão final de 5 minutos à 72 °C (SILVA et al., 2006), com posterior manutenção da temperatura à 4 °C, até que fossem submetidas a eletroforese horizontal.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v), usando tampão TBE (Tris - Ácido Bórico - EDTA) pH 8,0 1x. Os géis foram corados com 4 µL de brometo de etídeo (10 mg mL⁻¹) e documentados em transluminador, através de luz ultravioleta. O padrão de peso molecular de 1 kb (New England Biolabs/USA) foi utilizado para identificar os fragmentos amplificados.

Uma matriz binária baseada na presença (1) ou ausência (0) de marcadores RAPD foi gerada e utilizada para estimar a similaridade genética entre os genótipos, empregando-se o coeficiente de Jaccard, sendo construído um dendograma pelo critério de agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), empregando o programa GENES (CRUZ, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os DNAs extraídos apresentaram quantidades e qualidades satisfatórias (Figura 1), exceto para os DNAs dos genótipos Quetzali e Style os quais foram retirados da avaliação molecular por não terem amplificado com nenhum *primer*. Dos 20 *primers* utilizados, 6 (OPA-03, OPA-04, OPF-02, OPO-02, OPO-06 e OPO15) geraram produto de amplificação e os 14 *primers* restantes (OPA-07, OPA-13, OPB-14, OPC-05, OPC-13, OPD-08, OPE-05, OPE-14, OPE-15, OPO-03, OPO-04, OPO-07, OPO-10 e OPO-15) ou não amplificaram ou geraram produto de amplificação em poucos DNAs, sendo desse modo, retirados das análises. Para incluí-los, novos testes deverão ser realizados futuramente para maior uniformidade na amplificação de todos os DNAs.

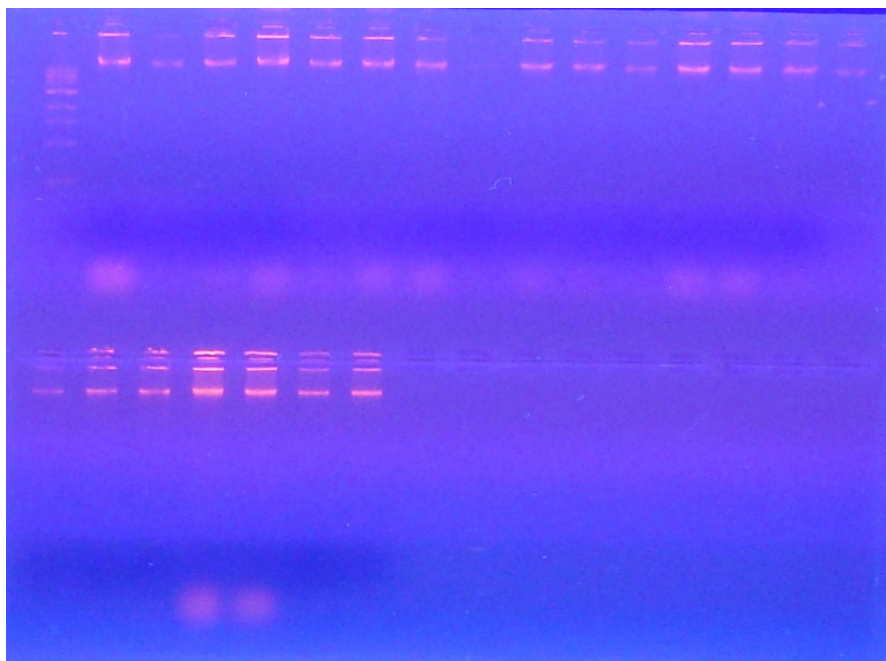


Figura 1- Quantificação de 22 DNAs em gel de agarose a 1%. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

De acordo com os dados gerados pela amplificação, o maior e o menor número de bandas foi gerado pelos *primers* OPF-02 e OPO-06, respectivamente. O OPO-06 amplificou 5 bandas polimórficas (Figura 2), enquanto que com OPF-02 e OPO-15 foram amplificadas 11 e 10 bandas polimórficas, respectivamente. Foram identificados 51 marcadores RAPD, destes, 49 foram polimórficos e apenas dois monomórficos. Silva et al. (2006) realizou um estudo de caracterização morfológica e molecular de 42 acessos de melancia coletados em três regiões distintas do estado da Bahia utilizando seis *primers* RAPD. No que tange à caracterização molecular foram formados 28 grupos, que em alguns casos coincidiram com o agrupamento a partir dos dados morfológicos. Foram identificaram 64 marcadores RAPD, sendo que 31 foram polimórficos. Observou-se variabilidade genética de 46,3% dentro de acessos, 29% entre os acessos dentro da mesma região e 24,6% entre acessos coletados em diferentes regiões. Mostrou ainda que os marcadores RAPD revelaram polimorfismo, variando de 11% a 61%, concluindo que estes marcadores podem ser utilizados na caracterização de acessos de melancia.

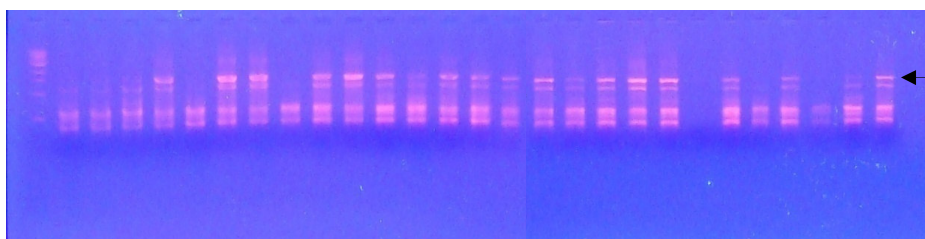


Figura 2- Eletroforese de fragmentos RAPD (*primer* OPO-06) em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. A seta mostra o marcador RAPD polimórfico. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

A análise das distâncias genéticas entre os genótipos resultou em uma dissimilaridade média de 0,3761. A menor variação encontrada foi de 0,0370 entre os genótipos TPX-03522 e Kudam e a maior foi de 0,8148 entre os genótipos ML-SF-43 e Nr 02 (Anexo I).

O agrupamento pelo método de UPGMA com base nesses marcadores (Figura 3), distribuiu os genótipos em 6 grupos, considerando um limite de dissimilaridade de 50%. O grupo I foi formado pelo genótipo Crimson Sweet. O grupo II constituiu-se dos genótipos ML-SF-44 e ML-SF-41, os quais são oriundos da mesma empresa. O grupo III foi formado pela maioria dos genótipos (ML-SF-45, Nr 06, Ivona, TPX-03521, TPC-31181, TPX-06637, Melancia 40, TPC-00247, Kudam, TPX-03522, Fashion, Nr 03, Bobbie, Sy 7780, Jenny, Nun 6034, Premium, Boston, Pixie, Tiger Baby e Sy 3151), os quais são provenientes de empresas diferentes. Os grupos IV, V e VI foram constituídos por apenas um genótipo cada, ML-SF-43, Vanessa e Nr 02, respectivamente.

Como pôde-se observar, genótipos oriundos de diversas empresas foram agrupados no grupo III, isso possivelmente pode ser explicado pelo fato de que possivelmente, as empresas fazem cruzamentos de genitores que apresentam características agronômicas desejáveis em comum, tais como maior produção, alto teor de °Brix, tamanho de frutos, entre outros.

O grupo III pode ainda ser dividido em 4 subgrupos, estando agrupados no III-A, os genótipos ML-SF-45, Nr 06, Ivona, TPX-03521, TPC-31181 e TPX-06637. No subgrupo III-B, os genótipos Melancia 40, TPC-00247, Kudam, TPX-03522 e Fashion. No III-C agrupados o Nr 03, Bobbie, Sy 7780, Jenny e Nun 6034. O III-D, formado por Pixie, Tiger Baby e Sy 3151 (Figura 3). Segundo Buso; Tavares; Buso (2002) a análise de similaridade genética pode auxiliar na escolha de genitores para se estabelecer populações base para se iniciar ciclos de seleção recorrente. Pode também, enriquecer populações em processo de seleção aumentando-se a variabilidade das mesmas pela introdução de acessos geneticamente divergentes.

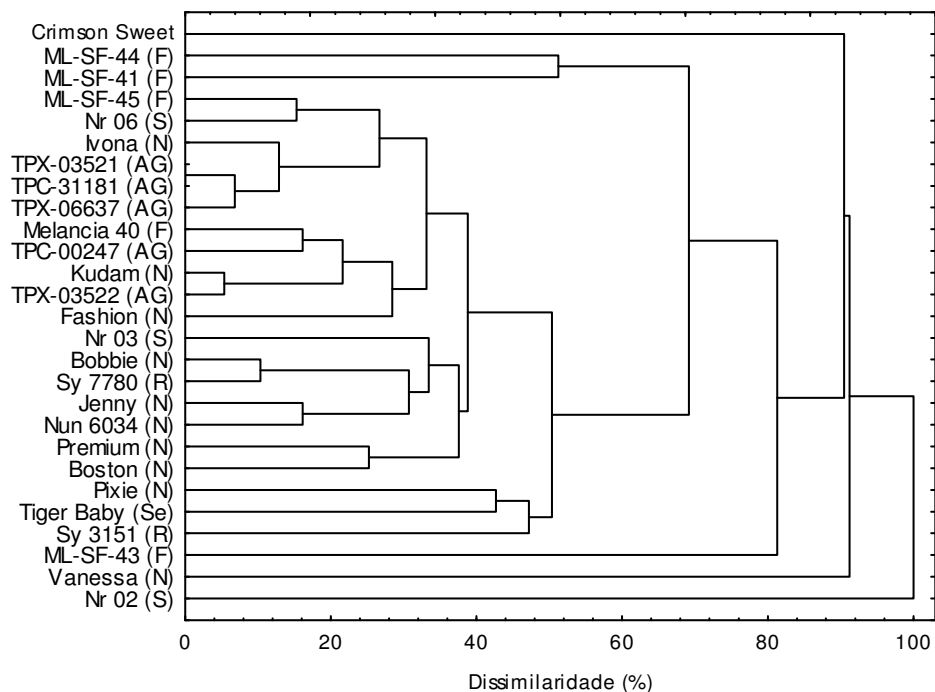


Figura 3- Padrão de dissimilaridade genética obtido entre 27 genótipos de melancia definido pelo método de UPGMA. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

Os resultados demonstram que os genótipos apresentaram considerável divergência. O RAPD é um marcador que tem sido amplamente utilizado em pesquisa de genética de plantas, inclusive de melancia, devido a sua facilidade de execução (LEVI et al., 2002; FERREIRA, 2000; CAPELOTO; UNEDA; MAURO, 2004). Embora tenha sido relatada que a falta de reprodutibilidade é um dos seus pontos negativos (JONES et al., 1997), os *primers* OPA-03, OPA-04, OPF-02, OPO02, OPO-06 e OPO-15 empregados nesse trabalho, apresentaram boa reprodutibilidade, permitindo a identificação de bandas consistentemente polimórficas. No entanto, é interessante notar que em alguns outros estudos, também utilizando marcadores RAPD em melancia, não foram detectadas bandas polimórficas (HASHIZUME et al., 1996; LEE et al., 1996; ZHANG et al., 1993).

4 CONCLUSÃO

Os marcadores RAPD foram eficientes na caracterização da divergência genética existente entre os genótipos avaliados;

Os marcadores mais polimórficos foram OPF-02 e OPO-15, com formação de 11 e 10 bandas, respectivamente;

Os genótipos ML-SF-43 e Nr 02 foram os mais divergentes e os genótipos TPX-03522 e Kudam foram os menos divergentes;

A detecção de variabilidade genética entre os genótipos estudados revela que estas informações podem ser úteis, principalmente, na execução de futuros cruzamentos em busca de variabilidade para os caracteres de interesse agrônomico.

REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando o desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.333-342, 2005.

BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; LUZ, F. J. F.; CHAGAS, E. A.; PIVETTA, F. L. Diversidade genética de porta-enxertos de roseiras por meio do marcador molecular *f*AFLP. **Revista Biologia e Ciências da Terra**. v.7, n.1, p.92-98, 2007.

BUSO, G. S. C.; TAVARES, H. M. F.; BUSO, J. A. Avaliação da variabilidade genética de acessos de melão tipo Cantaloupe utilizando marcadores moleculares RAPD. Brasília : **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 19 p., 2002. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento)

COHEN, R.; PIVONIA, S.; BURGER, J.; EDELSTEIN, M.; GAMLIEL, A.; KATAN, J. Toward integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. **Plant Disease**. v.84, p.496-505, 2000.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV, 285p. 2006.

DIAS, R. C. S.; PICÓ, B.; ESPINOS, A.; NUEZ, F. Resistance to melon vine decline derived from *Cucumis melo* ssp. *Agrestis*: Genetic analysis of root structure and root response. **Plant Breeding**, Berlin, v. 123, n. 1, p. 66-72. 2004.

DIAS, R. C. S.; QUEIRÓZ, M. A.; MENEZES, M. Identificação de fontes de resistência em melancia a *Didymella bryonae*. **Horticultura Brasileira**. v.14, p.15-17, 1996.

FERREIRA M. A. J. F. **Sistema reprodutivo e potencial para o melhoramento genético de uma população de melancia** [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai]. Piracicaba: USP-ESALQ. 105p. 2000. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. p.220. 1998. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. p.220. 1995. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

HASHIZUME T.; SHIMAMOTO I.; HARUSHIMAY Y.; SATO T.; IMAI T.; HIRAI M. Construction of a linkage map for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Euphytica**. v.9, p. 265-273, 1996.

HENZ, G. P.; LIMA, M. F. Avaliação de fatores que afetam a reação de *Cucurbita* spp. a *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 560-565, 1994.

HUH, Y. C.; OM, Y. H.; LEE, J. M. Utilization of *Citrullus* germplasm with resistance to *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. Sp. *Niveum*) for watermelon rootstocks. **Acta Horticulturae**. v.588, p.127-132, 2002.

LEE, S. J.; SHIN J. S.; PARK, K. W.; HONG, Y. P. Detection of genetic diversity using RAPDPCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**. v.9, p.719-725, 1996.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; WEHNER, T. C.; ZHANG X. Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. **Hortscience**, v.36, p.1096-1101, 2002.

LOPES, C. A.; REIS, A.; LIMA, M. F. **Principais doenças da cultura da melancia no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 10 p. (Circular Técnica nº61).

QUEIRÓZ, M. A. Potencial do germoplasma de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v.11, n. 1, p.7-9, 1993.

RESENDE, L. V.; SILVA, M. M. **Biotecnologia e proteção de plantas**. In: In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. 1 ed. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, v. 1, 368 p.2001.

SALES JUNIOR, R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; KOBORI, R. F. Comportamento de cultivares de meloeiro e melancia inoculados com *Acremonium cucurbitacearum* e *Monosporascus cannonballus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 206-210, 2002.

SILVA, M. L.; QUEIRÓZ, M. A.; FERREIRA, M. A. J.; BUSO, G. S. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.4, p.405-409, out./dez. 2006.

WOLFF, D. W.; MILLER, M. E. Tolerance to *Monosporascus* root rot and vine decline in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. **HortScience**, v.33, p. 287-290, 1998.

WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

ZHANG X. P.; RHODES, B. B.; KORUPSKA, H. S. RAPD molecular markers in watermelon. **Cucurbit Genetic Cooperation Report**, v.17, p.116-119, 1993.

ANEXO

Anexo 1- Matriz de distância genética entre 27 genótipos de melancia. Mossoró-RN, UFERSA, 2009.

| Crimson Sweet | ML-SF-44 | ML-SF-43 | ML-SF-45 | ML-SF-41 | Melancia 40 | Nr 06 | Nr 02 | Nr 03 | Kudam | Premium | Boston | Pixie | Ivona |
|---------------|----------|----------|----------|----------|-------------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| 0,0000 | 0,6400 | 0,7742 | 0,6000 | 0,8000 | 0,5758 | 0,6087 | 0,7333 | 0,6061 | 0,5588 | 0,6487 | 0,6400 | 0,5882 | 0,6129 |
| 0,6400 | 0,0000 | 0,5263 | 0,4167 | 0,3529 | 0,4167 | 0,4706 | 0,7083 | 0,3636 | 0,3810 | 0,4231 | 0,4546 | 0,4348 | 0,4231 |
| 0,7742 | 0,5263 | 0,0000 | 0,5862 | 0,6818 | 0,6786 | 0,6842 | 0,8148 | 0,5556 | 0,5200 | 0,5517 | 0,3529 | 0,6429 | 0,5833 |
| 0,6000 | 0,4167 | 0,5862 | 0,0000 | 0,5556 | 0,1786 | 0,1053 | 0,7576 | 0,1852 | 0,2222 | 0,2333 | 0,3750 | 0,3000 | 0,1923 |
| 0,8000 | 0,3529 | 0,6818 | 0,5556 | 0,0000 | 0,5556 | 0,5790 | 0,6667 | 0,5000 | 0,5926 | 0,5185 | 0,4211 | 0,5385 | 0,5200 |
| 0,5758 | 0,4167 | 0,6786 | 0,1786 | 0,5556 | 0,0000 | 0,1905 | 0,6667 | 0,2593 | 0,0833 | 0,2069 | 0,3200 | 0,2414 | 0,1200 |
| 0,6087 | 0,4706 | 0,6842 | 0,1053 | 0,5790 | 0,1905 | 0,0000 | 0,7368 | 0,3158 | 0,2353 | 0,2857 | 0,4444 | 0,3182 | 0,2222 |
| 0,7333 | 0,7083 | 0,8148 | 0,7576 | 0,6667 | 0,6667 | 0,7368 | 0,0000 | 0,7333 | 0,7188 | 0,6875 | 0,5455 | 0,7097 | 0,6667 |
| 0,6061 | 0,3636 | 0,5556 | 0,1852 | 0,5000 | 0,2593 | 0,3158 | 0,7333 | 0,0000 | 0,2593 | 0,2759 | 0,2857 | 0,4516 | 0,3333 |
| 0,5588 | 0,3810 | 0,5200 | 0,2222 | 0,5926 | 0,0833 | 0,2353 | 0,7188 | 0,2593 | 0,0000 | 0,3103 | 0,3000 | 0,2500 | 0,2174 |
| 0,6487 | 0,4231 | 0,5517 | 0,2333 | 0,5185 | 0,2069 | 0,2857 | 0,6875 | 0,2759 | 0,3103 | 0,0000 | 0,1739 | 0,3750 | 0,2143 |
| 0,6400 | 0,4546 | 0,3529 | 0,3750 | 0,4211 | 0,3200 | 0,4444 | 0,5455 | 0,2857 | 0,3000 | 0,1739 | 0,0000 | 0,4167 | 0,3462 |
| 0,5882 | 0,4348 | 0,6429 | 0,3000 | 0,5385 | 0,2414 | 0,3182 | 0,7097 | 0,4516 | 0,2500 | 0,3750 | 0,4167 | 0,0000 | 0,2000 |
| 0,6129 | 0,4231 | 0,5833 | 0,1923 | 0,5200 | 0,1200 | 0,2222 | 0,6667 | 0,3333 | 0,2174 | 0,2143 | 0,3462 | 0,2000 | 0,0000 |
| 0,5185 | 0,4167 | 0,5000 | 0,3077 | 0,4546 | 0,2500 | 0,4118 | 0,6296 | 0,2500 | 0,2174 | 0,2593 | 0,2727 | 0,3200 | 0,2593 |
| 0,6364 | 0,4667 | 0,5909 | 0,3000 | 0,4667 | 0,2857 | 0,3077 | 0,6111 | 0,1765 | 0,3333 | 0,2500 | 0,1333 | 0,4000 | 0,1875 |
| 0,5833 | 0,2353 | 0,5294 | 0,2105 | 0,4118 | 0,1111 | 0,2727 | 0,5909 | 0,2105 | 0,1905 | 0,1500 | 0,2222 | 0,2105 | 0,1500 |
| 0,6333 | 0,4737 | 0,5667 | 0,1667 | 0,6087 | 0,2083 | 0,2500 | 0,7500 | 0,3200 | 0,2273 | 0,2000 | 0,2222 | 0,2917 | 0,0556 |
| 0,5429 | 0,4167 | 0,6000 | 0,2581 | 0,5357 | 0,1724 | 0,3182 | 0,6970 | 0,3000 | 0,0370 | 0,3333 | 0,3044 | 0,2903 | 0,2593 |
| 0,6500 | 0,4444 | 0,5807 | 0,2188 | 0,5807 | 0,1613 | 0,2174 | 0,7222 | 0,3636 | 0,1724 | 0,2424 | 0,3077 | 0,3030 | 0,1111 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0,6364 | 0,5000 | 0,5714 | 0,1111 | 0,5790 | 0,1053 | 0,0909 | 0,6818 | 0,2778 | 0,1429 | 0,1579 | 0,3684 | 0,3500 | 0,1000 |
| 0,6487 | 0,4000 | 0,5556 | 0,2903 | 0,5185 | 0,2903 | 0,4167 | 0,7273 | 0,2759 | 0,3548 | 0,2581 | 0,2500 | 0,3750 | 0,1852 |
| 0,6552 | 0,6522 | 0,7308 | 0,6452 | 0,7391 | 0,5862 | 0,7500 | 0,7083 | 0,6071 | 0,6452 | 0,6129 | 0,6087 | 0,7188 | 0,6207 |
| 0,5484 | 0,4583 | 0,5833 | 0,2500 | 0,5769 | 0,2667 | 0,3636 | 0,6897 | 0,2000 | 0,2963 | 0,2759 | 0,2917 | 0,3667 | 0,1600 |
| 0,6500 | 0,4375 | 0,5000 | 0,4444 | 0,4286 | 0,3684 | 0,4167 | 0,6111 | 0,5000 | 0,3684 | 0,4500 | 0,4737 | 0,2941 | 0,3158 |
| 0,6389 | 0,4800 | 0,4800 | 0,4242 | 0,5556 | 0,4242 | 0,4583 | 0,6774 | 0,4688 | 0,3226 | 0,3438 | 0,2609 | 0,3000 | 0,2593 |
| 0,6129 | 0,4815 | 0,4546 | 0,2593 | 0,5200 | 0,2000 | 0,2778 | 0,6667 | 0,2692 | 0,1739 | 0,2759 | 0,2917 | 0,2692 | 0,1482 |

Continuação...

| Fashion | Bobbie | TPC- 00247 | TPX- 03521 | TPX- 03522 | TPX- 06637 | TPC- 31181 | Jenny | Vanessa | Nun 6034 | Tiger Baby | Sy 3151 | Sy 7780 |
|---------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|---------|-------------|---------------|---------|------------|
| 0,5185 | 0,6364 | 0,5833 | 0,6333 | 0,5429 | 0,6500 | 0,6364 | 0,6487 | 0,6552 | 0,5484 | 0,6500 | 0,6389 | 0,6129 |
| 0,4167 | 0,4667 | 0,2353 | 0,4737 | 0,4167 | 0,4444 | 0,5000 | 0,4000 | 0,6522 | 0,4583 | 0,4375 | 0,4800 | 0,4815 |
| 0,5000 | 0,5909 | 0,5294 | 0,5667 | 0,6000 | 0,5807 | 0,5714 | 0,5556 | 0,7308 | 0,5833 | 0,5000 | 0,4800 | 0,4546 |
| 0,3077 | 0,3000 | 0,2105 | 0,1667 | 0,2581 | 0,2188 | 0,1111 | 0,2903 | 0,6452 | 0,2500 | 0,4444 | 0,4242 | 0,2593 |
| 0,4546 | 0,4667 | 0,4118 | 0,6087 | 0,5357 | 0,5807 | 0,5790 | 0,5185 | 0,7391 | 0,5769 | 0,4286 | 0,5556 | 0,5200 |
| 0,2500 | 0,2857 | 0,1111 | 0,2083 | 0,1724 | 0,1613 | 0,1053 | 0,2903 | 0,5862 | 0,2667 | 0,3684 | 0,4242 | 0,2000 |
| 0,4118 | 0,3077 | 0,2727 | 0,2500 | 0,3182 | 0,2174 | 0,0909 | 0,4167 | 0,7500 | 0,3636 | 0,4167 | 0,4583 | 0,2778 |
| 0,6296 | 0,6111 | 0,5909 | 0,7500 | 0,6970 | 0,7222 | 0,6818 | 0,7273 | 0,7083 | 0,6897 | 0,6111 | 0,6774 | 0,6667 |
| 0,2500 | 0,1765 | 0,2105 | 0,3200 | 0,3000 | 0,3636 | 0,2778 | 0,2759 | 0,6071 | 0,2000 | 0,5000 | 0,4688 | 0,2692 |
| 0,2174 | 0,3333 | 0,1905 | 0,2273 | 0,0370 | 0,1724 | 0,1429 | 0,3548 | 0,6452 | 0,2963 | 0,3684 | 0,3226 | 0,1739 |
| 0,2593 | 0,2500 | 0,1500 | 0,2000 | 0,3333 | 0,2424 | 0,1579 | 0,2581 | 0,6129 | 0,2759 | 0,4500 | 0,3438 | 0,2759 |
| 0,2727 | 0,1333 | 0,2222 | 0,2222 | 0,3044 | 0,3077 | 0,3684 | 0,2500 | 0,6087 | 0,2917 | 0,4737 | 0,2609 | 0,2917 |
| 0,3200 | 0,4000 | 0,2105 | 0,2917 | 0,2903 | 0,3030 | 0,3500 | 0,3750 | 0,7188 | 0,3667 | 0,2941 | 0,3000 | 0,2692 |
| 0,2593 | 0,1875 | 0,1500 | 0,0556 | 0,2593 | 0,1111 | 0,1000 | 0,1852 | 0,6207 | 0,1600 | 0,3158 | 0,2593 | 0,1482 |
| 0,0000 | 0,1429 | 0,1500 | 0,3000 | 0,1667 | 0,3448 | 0,3500 | 0,2963 | 0,6296 | 0,2174 | 0,4211 | 0,3077 | 0,2593 |
| 0,1429 | 0,0000 | 0,0909 | 0,3182 | 0,3333 | 0,3478 | 0,2500 | 0,2632 | 0,3750 | 0,1667 | 0,4000 | 0,3158 | 0,0714 |
| 0,1500 | 0,0909 | 0,0000 | 0,0769 | 0,1500 | 0,1905 | 0,2143 | 0,2727 | 0,5238 | 0,2500 | 0,3889 | 0,2727 | 0,2727 |
| 0,3000 | 0,3182 | 0,0769 | 0,0000 | 0,2692 | 0,0417 | 0,0000 | 0,2500 | 0,5600 | 0,2609 | 0,5000 | 0,2917 | 0,2500 |
| 0,1667 | 0,3333 | 0,1500 | 0,2692 | 0,0000 | 0,2121 | 0,2632 | 0,3333 | 0,6667 | 0,3000 | 0,3684 | 0,3125 | 0,2593 |
| 0,3448 | 0,3478 | 0,1905 | 0,0417 | 0,2121 | 0,0000 | 0,0526 | 0,2424 | 0,6571 | 0,2813 | 0,3500 | 0,2727 | 0,2414 |
| 0,3500 | 0,2500 | 0,2143 | 0,0000 | 0,2632 | 0,0526 | 0,0000 | 0,2500 | 0,5500 | 0,1579 | 0,2857 | 0,3500 | 0,2000 |
| 0,2963 | 0,2632 | 0,2727 | 0,2500 | 0,3333 | 0,2424 | 0,2500 | 0,0000 | 0,6563 | 0,1111 | 0,4286 | 0,2333 | 0,2500 |

| | | | | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0,6296 | 0,3750 | 0,5238 | 0,5600 | 0,6667 | 0,6571 | 0,5500 | 0,6563 | 0,0000 | 0,5556 | 0,6111 | 0,6875 | 0,6667 |
| 0,2174 | 0,1667 | 0,2500 | 0,2609 | 0,3000 | 0,2813 | 0,1579 | 0,1111 | 0,5556 | 0,0000 | 0,4000 | 0,2759 | 0,1667 |
| 0,4211 | 0,4000 | 0,3889 | 0,5000 | 0,3684 | 0,3500 | 0,2857 | 0,4286 | 0,6111 | 0,4000 | 0,0000 | 0,3500 | 0,2778 |
| 0,3077 | 0,3158 | 0,2727 | 0,2917 | 0,3125 | 0,2727 | 0,3500 | 0,2333 | 0,6875 | 0,2759 | 0,3500 | 0,0000 | 0,2593 |
| 0,2593 | 0,0714 | 0,2727 | 0,2500 | 0,2593 | 0,2414 | 0,2000 | 0,2500 | 0,6667 | 0,1667 | 0,2778 | 0,2593 | 0,0000 |

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)