



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

**LILIANA ROCIVALDA GOMES LEITÃO**

**HERANÇA GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES  
À RESISTÊNCIA À *Liriomyza sativae* EM MELOEIRO**

**FORTALEZA**

**2018**

LILIANA ROCIVALDA GOMES LEITÃO

HERANÇA GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES À  
RESISTÊNCIA À *Liriomyza sativae* EM MELOEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de plantas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L548h    Leitão, Liliana Rocivalda Gomes.  
Herança genética e associação de marcadores microssatélites à resistência à *Liriomyza sativae* em meloeiro / Liliana Rocivalda Gomes Leitão. – 2018.  
52 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão.
1. Cucumis melo. 2. Mosca-minadora. 3. Antibiose. 4. SSR. 5. Seleção assistida. I. Título.
- CDD 630
-

LILIANA ROCIVALDA GOMES LEITÃO

HERANÇA GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES À  
RESISTÊNCIA À *Liriomyza sativae* EM MELOEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de plantas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão (Orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical/ UFC

---

Dra. Patricia do Nascimento Bordallo  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA

A todos que me ajudaram nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pelas bênçãos recebidas.

À minha família por sempre estar ao meu lado, incentivando-me nos momentos de desânimo e comemorando nos momentos de vitória. Sou grata por todo amor recebido.

À Universidade Federal do Ceará, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, à Capes e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária agradeço pela oportunidade de realização do meu mestrado e parceria no desenvolvimento dos experimentos.

Ao grupo de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais, Ariana, Caíque, Clea, Edilson, Elaine, Frederico, Gérffeson, Letícia e Renata, agradeço por toda ajuda, risadas e trocas de experiências durante todo esse período. Sem vocês eu não teria conseguido. Também agradeço a cada um da Embrapa Agroindústria Tropical por ter estado comigo, por todas as risadas e brincadeiras, pelas confraternizações e carinho recebido de vocês.

Ao grupo de Genética Vegetal, André, Lorena, Lucas, Mara, Nayara, Wellington e Zilneide, agradeço por todo carinho e paciência que tiveram comigo ao longo do experimento da molecular. Foram dias difíceis no qual tive vontade de desistir por diversas vezes. Também agradeço a cada um da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por nunca me deixarem desanimar e acreditarem que tudo daria certo. Vocês estavam certos.

Ao grupo de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, em especial a Ingrid, Fernanda, Jéssica, Marcelo, Tamiris e Leane, agradeço pela convivência, cumplicidade, risadas e lágrimas trocadas, por todo carinho e, principalmente, pela amizade verdadeira de cada um. Sem vocês a Fitotecnia não seria a mesma.

Ao Professor Glauber Nunes agradeço por toda ajuda, atenção, pelas contribuições para melhoria do trabalho na qualificação e por ter aceito fazer parte da minha banca examinadora. Muito obrigada.

À Dra. Gláucia Buso agradeço pela parceria, colaboração, incentivo e por ter acreditado que o experimento da molecular daria certo. Foram dias de muito aprendizado e paciência. Muito obrigada.

À Dra. Patrícia Bordallo agradeço pelo carinho, generosidade e atenção que recebi desde o primeiro dia que a conheci, sempre disponível em ajudar mesmo não me conhecendo. Também agradeço pelas contribuições valiosas para melhoria do trabalho e por ter aceito fazer parte da minha banca examinadora. Muito obrigada.

Ao Professor e Dr. Fernando Aragão agradeço profundamente por toda ajuda,

paciência, atenção e carinho que recebi durante esses dois anos. Foram dias difíceis, cheios de obstáculos, mas, sobretudo, uma jornada de muito aprendizado e experiência. Sei que, por muitas vezes, fui uma aluna complicada, desobediente e testando sempre sua paciência. Obrigada pela compreensão. Esse período contribuiu imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional. Fico muito feliz por ter participado do seu grupo de estudantes. No final, cada dia valeu muito a pena. Muito obrigada.

“Todas as conquistas começam pelo simples ato de acreditar que elas são possíveis”



## RESUMO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça com destaque mundial. No Brasil, tem relevante importância socioeconômica na região Nordeste. A mosca-minadora, *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae), é a principal praga da cultura, ocasionando sérios danos à planta e, conseqüentemente, reduzindo a produção e a qualidade dos frutos. O uso de genótipos resistentes constitui o método mais eficiente e sustentável de controle, entretanto, poucas fontes de resistência a esse inseto já foram identificadas em germoplasma de meloeiro. A elucidação da herança genética e o uso de marcadores moleculares são ferramentas que auxiliam na introgressão da resistência à mosca-minadora em híbridos comerciais de meloeiro. Considerando duas fontes de resistência à mosca-minadora em meloeiro, objetivou-se elucidar o controle genético na linhagem A915.34.01.08 e identificar marcadores microsatélites (*Simple Sequence Repeats* - *SSR*) associados à resistência na linhagem A56.10.04. Para o estudo de herança, cada linhagem ( $P_1$ ), resistente por antibiose, foi cruzada com uma linhagem suscetível ( $P_2$ ), formando suas respectivas primeiras gerações filiais ( $F_1$ ), as quais foram autofecundadas e retrocruzadas com ambos os genitores obtendo as segundas gerações filiais ( $F_2$ ) e retrocruzamentos ( $RC_1$  e  $RC_2$ ), respectivamente. As populações foram submetidas a ensaios em gaiola e em campo, sob infestação de *L. sativae*, utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$ ,  $RC_2$ ), distinto número de plantas por repetição, totalizando 300 plantas por experimento. Foram quantificados o número de minas nas folhas e o desenvolvimento larval, no qual as plantas foram classificadas em resistentes (sem desenvolvimento pupal) ou susceptíveis (pelo menos um desenvolvimento pupal). Com relação à associação de marcadores *SSR* à resistência, um total de 328 *primers* foram avaliados quanto ao polimorfismo nas gerações  $P_1$ ,  $P_2$  e  $F_1$  e, posteriormente, a geração  $F_2$  foi genotipada com os marcadores identificados como polimórficos. A análise de gerações demonstrou que quatro genes controlam a resistência à mosca-minadora na linhagem A915.34.01.08. Dois marcadores *SSR*, CM321 e CM333, estão associados ao gene de resistência à *L. sativae* na linhagem A56.10.04. Portanto, a linhagem A915.34.01.08 apresenta herança oligogênica, podendo ser utilizada na introgressão da resistência em linhagens-élite de meloeiro e, os marcadores CM321 e CM333 estão ligados ao gene *Ls*, estando aptos a serem utilizados na seleção assistida à mosca-minadora no programa de melhoramento genético do meloeiro.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*. Mosca-minadora. Antibiose. *SSR*. Seleção assistida.

## ABSTRACT

The melon (*Cucumis melo* L.) is a cucurbit crop with worldwide prominence. In Brazil, it has relevant socioeconomic importance in the Northeast region. The leafminer, *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae), is the main pest of the crop, causing serious damages to the plant and, consequently, reducing the production and the quality of the fruits. The use of resistant genotypes is the most efficient and sustainable method of insect control, however, few sources of resistance to this insect have been identified in melon germplasm. The elucidation of genetic inheritance and the use of molecular markers are tools that aid in the introgression of leafminer resistance in melon hybrids. Considering two new sources of resistance to leafminer in melon, the objective was to elucidate the genetic control in line A915.34.01.08 and to identify microsatellite markers (SSR) associated with resistance in line A56.10.04. For the study of inheritance, each lineage (P<sub>1</sub>), resistant by antibiosis, was crossed with a susceptible lineage (P<sub>2</sub>), forming their respective hybrid (F<sub>1</sub>), which were self-pollinated and backcrossed with both parents obtaining the progeny (F<sub>2</sub>) and backcrosses (RC<sub>1</sub> and RC<sub>2</sub>), respectively. The trials were conducted in a greenhouse and under field conditions, using natural populations of *L. sativae*, using a completely randomized design, with six treatments (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub>, RC<sub>2</sub>), different number of plants per replications, totaling 300 plants each experiment. The number of mines in leaves was counted and larval development were quantified, in which the plants were classified as resistant (without pupal development) or susceptible (at least one pupal development). Regarding the association of SSR markers with the resistance, a total of 328 primers were evaluated for the polymorphism in the P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and F<sub>1</sub> generations and, later, the F<sub>2</sub> generation was genotyped with the markers identified as polymorphic. Generation analysis demonstrated that four genes control leafminer resistance in line A915.34.01.08. Two SSR markers, CM321 and CM333, are associated with the *L. sativae* resistance gene in line A56.10.04. Therefore, the A915.34.01.08 lineage has an oligogenic inheritance, and can be used for the introgression of resistance in elite lines of melon, and the markers CM321 and CM333 are linked to the *Ls* gene, being able to be used in the selection assisted to the leafminer in the melon breeding program.

**Keywords:** *Cucumis melo*. Leafminer. Antibiosis. SSR. Marker-assisted selection.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Genotipagem da população de meloeiro com os microssatélites polimórficos: A. *primer* CM321; B. *primer* CM333; C. *primer* CM12B; D. *primer* M191 ..... 75
- Figura 2 – Mapa de ligação genética indicando as distâncias dos microssatélites CM321 e CM333 ao gene de resistência (*Ls*) à *Liriomyza sativae* em meloeiro ..... 77

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição da geração F<sub>2</sub> em classes fenotípicas à reação à *L. sativae*

..... 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliações de populações de meloeiro quanto à resistência à mosca-minadora em ensaios em gaiola e teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) nas segundas gerações filiais à herança genética da resistência .....	54
Tabela 2 – Avaliações de populações de meloeiro quanto à resistência à mosca-minadora nas classes de notas subjetivas (valores médios $\pm$ desvio-padrão) e classificação R (resistente) ou S (susceptível) em ensaios em campo .....	55
Tabela 3 – Valores médios $\pm$ desvio-padrão do número de minas de <i>Liriomyza sativae</i> em folhas diagnósticas <sup>1</sup> de meloeiro .....	56
Tabela 4 – Estimativas, variâncias e testes de significância dos efeitos genéticos da resistência à <i>L. sativae</i> , no modelo completo, avaliados em população de meloeiro .....	57
Tabela 5 – Decomposição não ortogonal da soma de quadrados de parâmetros ajustados para resistência à <i>L. sativae</i> , avaliado em população de meloeiro .....	58
Tabela 6 – Médias observadas e esperadas para as gerações no modelo completo quanto à resistência à <i>L. sativae</i> .....	59
Tabela 7 – Estimativas dos parâmetros genéticos de resistência à <i>L. sativae</i> , avaliados em população de meloeiro .....	59
Tabela 8 – Avaliação fenotípica da população de meloeiro quanto à resistência à <i>L. sativae</i> .....	73
Tabela 9 – Estimativas dos parâmetros genéticos de resistência à <i>L. sativae</i> na população de meloeiro .....	73
Tabela 10 – Características do quatro marcadores microssatélites ( <i>SSR</i> ) polimórficos entre os genitores contrastantes e primeira geração filial para a resistência à <i>L. sativae</i> em meloeiro .....	74
Tabela 11 – Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para frequências genotípicas e probabilidade FRD (%) da segunda geração filial de população de meloeiro A56 .....	76

Tabela 12 – Grupos de ligação e estimativa dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos marcadores microssatélites associados à resistência à *L. sativae* em meloeiro ..... 77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
LBMOL	Laboratório de Biologia Molecular
LGV	Laboratório de Genética Vegetal
LMRGV	Laboratório de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SAM	Seleção Assistida por Marcadores
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
STS	<i>Sequence Tagged Sites</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
sec.	Século

## LISTA DE SÍMBOLOS

US\$	Dólar
R\$	Real
°C	grau Celsius
%	Porcentagem
$\lambda$	Lambda
$\chi^2$	Qui-quadrado
cm	Centímetro
cM	Centimorgan
m	Metro
L	Litro
$\mu$ L	Microlitro
mL	Mililitro
$\mu$ M	Milimolar
ng	Nanograma



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>Meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L.)</b> .....	21
<b>2.1.1</b>	<i>Importância econômica</i> .....	21
<b>2.1.2</b>	<i>Aspectos gerais da cultura</i> .....	22
<b>2.1.3</b>	<i>Problemas fitossanitários</i> .....	24
<b>2.2</b>	<b>Mosca-minadora (<i>Liriomyza sativae</i>)</b> .....	25
<b>2.2.1</b>	<i>Descrição e ciclo de vida do inseto</i> .....	25
<b>2.2.2</b>	<i>Danos ao meloeiro</i> .....	26
<b>2.2.3</b>	<i>Métodos de controle</i> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Resistência aos insetos</b> .....	28
<b>2.4</b>	<b>Herança genética da resistência</b> .....	31
<b>2.5</b>	<b>Marcadores moleculares associados à resistência</b> .....	33
<b>2.5.1</b>	<i>Marcadores moleculares</i> .....	33
<b>2.5.2</b>	<i>Marcadores microssatélites</i> .....	35
<b>2.5.3</b>	<i>Genotipagem com marcadores moleculares</i> .....	37
<b>3</b>	<b>CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À MOSCA-MINADORA EM LINHAGEM DE MELOEIRO</b> .....	39
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	41
<b>3.2</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	43
<b>3.2.1</b>	<i>Germoplasma</i> .....	43
<b>3.2.2</b>	<i>Obtenção e manutenção de mosca-minadora</i> .....	44
<b>3.2.3</b>	<i>Obtenção das populações</i> .....	44
<b>3.2.3.1</b>	<i>Condução das plantas</i> .....	45
<b>3.2.3.2</b>	<i>Hibridação artificial</i> .....	45
<b>3.2.3.3</b>	<i>Obtenção das sementes</i> .....	45
<b>3.2.4</b>	<i>Local</i> .....	46
<b>3.2.5</b>	<i>Estudo de herança genética</i> .....	46
<b>3.2.5.1</b>	<i>Infestação em gaiola</i> .....	47
<b>3.2.5.2</b>	<i>Infestação em campo</i> .....	48
<b>3.2.6</b>	<i>Análises genético-estatísticas</i> .....	49

3.2.6.1	<i>Estudo genético das médias</i> .....	49
3.2.6.2	<i>Estudo genético das variâncias</i> .....	50
<b>3.3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	52
3.3.1	<i>Infestação em gaiola</i> .....	52
3.3.2	<i>Infestação em campo</i> .....	55
3.3.3	<i>Análise de gerações</i> .....	57
3.3.3.1	<i>Estudo genético das médias</i> .....	57
3.3.3.2	<i>Estudo genético das variâncias</i> .....	59
<b>3.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	62
<b>4</b>	<b>MARCADORES SSR ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA GENÉTICA À MOSCA-MINADORA NA LINHAGEM DE MELOEIRO A56.10.04</b> .....	63
4.1	<b>Introdução</b> .....	65
4.2	<b>Material e Métodos</b> .....	67
4.2.1	<i>Germoplasma</i> .....	67
4.2.2	<i>Local</i> .....	67
4.2.3	<i>Fenotipagem</i> .....	68
4.2.4	<i>Microssatélites associados à resistência genética</i> .....	68
4.2.4.1	<i>Extração de DNA genômico</i> .....	68
4.2.4.2	<i>Genotipagem com marcadores microssatélites</i> .....	69
4.2.4.3	<i>Reação de PCR e eletroforese</i> .....	70
4.2.5	<i>Análises estatísticas e genômicas</i> .....	70
<b>4.3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	72
4.3.1	<i>Avaliações fenotípicas</i> .....	72
4.3.2	<i>Avaliações genotípicas</i> .....	74
4.3.2.1	<i>Segregação dos microssatélites na geração F<sub>2</sub></i> .....	75
4.3.3	<i>Microssatélites associados à resistência</i> .....	76
4.3.3.1	<i>Distância genética e mapa de ligação entre os microssatélites e o gene de resistência</i> .....	76
4.3.3.2	<i>Análise de regressão linear</i> .....	77
<b>4.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	79
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	80
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
	<b>ANEXO A – MICROSSATÉLITES DESENHADOS POR PATRÍCIA RITSCHER E COLABORADORES</b> .....	91

<b>ANEXO B – MICROSSATÉLITES DESENHADOS POR GLÁUCIA</b>	
<b>BUSO .....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO C – MICROSSATÉLITES DESENHADOS POR BRUNA OSHE</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O meloeiro é uma cucurbitácea que possui grande importância econômica mundial por ser comercializado em larga escala produzindo, em 2016, mais de 31 milhões de toneladas (FAO, 2018). O melão foi a fruta fresca mais exportada pelo Brasil em 2017, tendo o Nordeste como maior região produtora, correspondendo a 95% da produção nacional (IBGE, 2018). A intensa produção de melão no semiárido nordestino está relacionada ao processo de adaptação desta hortaliça às condições edafoclimáticas locais, uso de novas tecnologias no sistema de cultivo, ciclo reduzido e colheita de três safras por ano, permitindo boa qualidade dos frutos destinados, principalmente, às crescentes exportações (ARAÚJO; CAMPOS, 2011).

Os problemas fitossanitários ocasionados por ataque de pragas e doenças estão entre os aspectos mais limitantes para produção de melão (LIMA *et al.*, 2012). A mosca-minadora é a principal praga da cultura em virtude da severidade do ataque do inseto, construindo galerias nas folhas e diminuindo a produção e qualidade dos frutos (GUIMARÃES *et al.*, 2009b). Além de reduzir a qualidade dos melões, o controle da mosca-minadora ocasiona prejuízos econômicos aos produtores, com um acréscimo de 13 a 30% dos custos totais de produção (FERNANDES, 2003; BRASIL *et al.*, 2012).

Rio Grande do Norte e Ceará são os maiores produtores do país e o melão é a principal fruta fresca de exportação desses estados (MDIC, 2018). Entretanto, para que a cucurbitácea continue economicamente importante e competitiva no mercado nacional e internacional é necessário buscar alternativas para o controle da mosca-minadora. A associação dos controles cultural, biológico e físico vem sendo adotada a fim de integrar um manejo adequado da praga. Contudo, o uso de genótipos resistentes constitui o método mais eficiente e sustentável de controle, pois interfere no ciclo de vida do inseto, devido à constituição gênica das plantas, sem aumentar os custos totais de controle e degradar o ambiente (MORAIS; CARVALHO, 2012).

No programa de melhoramento de melão da Embrapa foram identificadas fontes de resistência à mosca-minadora. Os acessos – BAGMEL 56(R) e CNPH00-915(R) – apresentam resistência do tipo antibiose por ocasionarem morte das larvas após a alimentação no mesófilo foliar, reduzindo, conseqüentemente, a formação de minas (CELIN *et al.*, 2017a). Ambos acessos estão em heterozigose para a resistência, por isso populações segregantes foram conduzidas pelo método de Melhoramento Genealógico para obtenção de linhagens resistentes. Dessa forma, a partir dos acessos BAGMEL 56(R) e CNPH00-915(R) foram

obtidas as linhagens A56.10.04 e A915.34.01.08, respectivamente (CELIN *et al.*, 2017a). Para as linhagens serem utilizadas como fontes resistentes à mosca-minadora é necessário elucidar a herança genética da resistência, ou seja, conhecer o controle genético do caráter de interesse.

A herança genética da linhagem A56.10.04 foi elucidada e trata-se de um gene (*Ls*) com dominância completa (CELIN *et al.*, 2017b), porém, o controle genético da linhagem A915.34.01.08 não foi elucidado. A partir do estudo de herança genética da resistência será possível escolher o método de melhoramento mais adequado à introgressão desses alelos em linhagens-elite de meloeiro.

Uma forma de reduzir o tempo de avaliação durante a introgressão consiste na identificação de marcadores moleculares associados aos genes de interesse. Dentre os marcadores moleculares existentes os microssatélites (*Simple Sequence Repeats - SSR*) vem sendo usados em maior frequência em estudos de associação ao caráter de interesse, uma vez que além de serem específicos, permitem ampla cobertura do genoma e possuem elevadas informações de polimorfismo, sendo possível diferenciar indivíduos homozigotos e heterozigotos (BORÉM; CAIXETE, 2006).

Não há estudos envolvendo o uso de marcadores moleculares associados à resistência à mosca-minadora. A associação de microssatélites ao(s) gene(s) de resistência permitirá a seleção direta do caráter de interesse com base no genótipo do indivíduo, sem necessitar de avaliação fenotípica, possibilitando maior eficiência na estratégia de seleção de plantas resistentes, sobretudo, na seleção assistida por marcadores (SAM). Desse modo, objetivou-se elucidar o controle genético da resistência à mosca-minadora na linhagem A915.34.01.08 e identificar marcadores microssatélites associados à resistência na linhagem A56.10.04.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Meloeiro (*Cucumis melo* L.)

#### 2.1.1 Importância econômica

O meloeiro é uma hortaliça de grande importância econômica mundial cujo fruto é comercializado na forma de fruta fresca. Em 2016, o melão foi considerado a nona fruta mais produzida mundialmente, correspondendo a uma produção superior a 31 milhões de toneladas em uma área colhida cerca de 1,25 milhões de hectares (FAO, 2018). China, Turquia e Irã são os maiores produtores e o Brasil alcança a décima segunda posição com produção aproximada de 600 mil toneladas, para o mesmo ano (FAO, 2018).

No Brasil, a produção além de atender a demanda do consumo interno é destinada, sobretudo, às crescentes exportações (NASCIMENTO NETO *et al.*, 2012). Em 2017, o melão foi a primeira fruta mais exportada pelo país em volume e a segunda em valor monetário, correspondendo a uma exportação cerca de 234 mil toneladas e US\$ 162,916 milhões em divisas (MDIC, 2018), tendo a Europa (Reino Unido, Holanda e Espanha) como principal importador. Além da comunidade europeia, a abertura de novos mercados para melões brasileiros (Argentina, Chile, Japão e Vietnã) também contribuirá para o constante crescimento das exportações nacionais, permitindo o avanço da atividade produtiva (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017).

O melão é produzido em todas regiões brasileiras, sendo o Nordeste a maior região produtora, concentrando 95% (570.838 t) da produção nacional, seguido da região Sul (4,6%) e Centro-Oeste (0,4%) em 2016 (IBGE, 2018). A crescente produção de melão no semiárido nordestino está relacionada, principalmente, ao processo de adaptação da cultura às condições edafoclimáticas locais e ciclo reduzido, favorecendo o desenvolvimento da espécie e possibilitando maior produção quando comparada com as demais regiões do país (ANGELLOTI; COSTA, 2010).

O Polo Jaguaribe-Açu, formado pelos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte, é o principal polo de produção de melão do Brasil, responsável por mais de 97% das exportações nacionais (CELIN *et al.*, 2014). Rio Grande do Norte é o maior estado exportador, com aproximadamente 164 mil toneladas exportadas, gerando US\$ FOB 108,192 milhões em divisas, seguido do Ceará com exportação de 68 mil toneladas e US\$ FOB 53,383 milhões (MDIC, 2018).

A localização geográfica favorável de ambos estados ao mercado externo, a produção de melão durante as entressafas de países europeus e o sistema logístico de distribuição e comercialização da hortaliça no polo agrícola favorecem rotas estratégicas de escoamento da produção, sobretudo à exportação à comunidade europeia (ARAÚJO; CAMPOS, 2011). Além disso, a presença de Área Livre de Pragas (APL) de *Anastrepha grandis* (única praga quarentenária da cultura) nas áreas produtoras de melão no Ceará e Rio Grande do Norte (MAPA, 2018) também contribui com a competitividade dos melões brasileiros no mercado internacional, mantendo o melão como a principal fruta fresca de exportação nordestina.

### **2.1.2 Aspectos gerais da cultura**

O meloeiro ( $2n = 2x = 24$ ) é uma olerícola com centro de origem na Ásia e numerosos parentes em nível de espécie na Austrália e ao redor do Oceano Índico (SEBASTIAN *et al.*, 2010). A partir de sequências de DNA de plastídios e combinações de marcadores nucleares usados em acessos de meloeiro provenientes da África, Ásia e Austrália, as evidências mostraram que *Cucumis callosus*, originário da Índia, e *Cucumis picrocarpus*, oriundo da Austrália, são o progenitor silvestre e espécie irmã de *Cucumis melo*, respectivamente, fundamentando a origem do meloeiro na Índia (SEBASTIAN *et al.*, 2010). Com relação aos centros de diversidade os mesmos compreendem a região do Mar Mediterrâneo, Ásia Central (Irã, Iraque, Turquia), Ásia oriental (China, Japão) e Índia (WHITAKER; DAVIS, 1962).

A cultura apresenta ampla distribuição geográfica. Nas Américas, o meloeiro foi introduzido por Cristóvão Colombo durante expedições marítimas, século XV, e distribuído pelos índios (MCCREIGHT *et al.*, 1993 *apud* CRISÓSTOMO; ARAGÃO, 2013). No século seguinte, a olerícola foi introduzida no Brasil por escravos africanos durante o Período Colonial e reintroduzido pelos imigrantes europeus (sec. XIX) após a abolição da escravatura (MOREIRA *et al.*, 2009). Essa reintrodução ocorreu nas regiões Sul e Sudeste do país (MOURA, OLIVEIRA; SILVA, 2011), no entanto, predominou-se a disseminação no semiárido nordestino (PAIVA, 1999) em virtude das características climáticas locais (alta intensidade e duração da luminosidade, altas temperaturas e precipitação pluviométrica concentrada nos primeiros três-quatro meses do ano) (ANGELLOTI; COSTA, 2010).

Pertencente à família *Cucurbitaceae*, gênero *Cucumis* e espécie *Cucumis melo*, o meloeiro é uma herbácea, com sistema radicular pivotante e caule constituído de vários nós,

no qual, cada nó possui gemas que se desdiferenciam em folhas, gavinhas (órgãos de sustentação) ou ramificações (LORENZI *et al.*, 2006). A inflorescência é do tipo cacho, com flores formadas por cinco pétalas amarelas. As masculinas crescem nas axilas dos ramos principal e laterais, e as femininas ou hermafroditas nos ramos secundários (CRISÓSTOMO; ARAGÃO, 2013).

A reprodução sexuada é do tipo mista, predominando alogamia em decorrência das diferentes formas de expressões sexuais (monoica, hermafrodita, andromonoica e ginomonoica) (SERRA; CAMPOS, 2010). O fruto é uma baga carnuda com tamanho, forma, cor e aspectos variados, no qual, cada fruto produz, em média, de 200 a 600 sementes presentes na cavidade interna da polpa (MCCREIGHT *et al.*, 1993 *apud* CRISÓSTOMO; ARAGÃO, 2013).

O meloeiro possui grande diversidade morfológica, principalmente nas características do fruto (cores, formatos e aromas). Esse polimorfismo possibilitou diferentes classificações botânicas, incluindo a divisão de *C. melo* em *C. melo* subespécie *melo* (ovário com pelos curtos) e *C. melo* subespécie *agrestis* (ovário com pelos longos) (MUNGER; ROBINSON, 1991). Com relação ao aspecto comercial, os melões são divididos em “tipos” e os principais produzidos no Brasil pertencem aos grupos botânicos *cantalupensis*, *inodorus* e *reticulatus* (PITRAT, 2008):

- Grupo *cantalupensis*: são melões aromáticos originários da França. Os frutos são globulares e possuem cascas lisas ou rendilhadas de coloração verde clara com suturas longitudinais verdes escuras. A polpa é firme e de cor salmão. São climatéricos, necessitando maior cuidado no pós-colheita. O tipo comercial desse grupo é o Charentais (FONTES; PUIATTI, 2005).
- Grupo *inodorus*: são frutos não aromáticos, com forma ovalada, casca lisa e coloração branca, amarela ou esverdeada. A polpa é espessa e varia na mesma cor da casca. Não são climatéricos e possuem uma melhor conservação no pós-colheita (MENEZES *et al.*, 2000; SENAR, 2007). São exemplos comercializados desse grupo: Amarelo (origem espanhola), Pele de Sapo (origem espanhola) e Honeydew (origem americana) (ARAGÃO, 2010).
- Grupo *reticulatus*: são melões aromáticos, caracterizados pela forma arredondada. A casca é verde clara com presença de rendilhamento. Possuem polpa esbranquiçada a salmão, tornando-se amarelada durante a maturação. São climatéricos e necessitam de maior cuidado no pós-colheita. Os tipos



comerciais são o Cantaloupe (origem americana) e Gália (origem israelense) (MENEZES *et al.*, 2000; FONTES; PUIATTI, 2005).

Embora o meloeiro apresente ciclo curto (em torno de 60 dias), com características adaptadas a clima quente e baixa disponibilidade hídrica, a planta tem desenvolvimento prejudicado em detrimento do ataque de pragas e doenças (MAIA, LIMA; LIMA, 2013). Para que não haja redução na produção e qualidade dos frutos é necessário identificar os principais problemas fitossanitários que afetam a cultura, uma vez que constituem grandes entraves nas lavouras meloeiras (CÂMARA *et al.*, 2007).

### 2.1.3 Problemas fitossanitários

Problemas fitossanitários são considerados aspectos limitantes para o crescimento e a produção de melão (LIMA *et al.*, 2012). Dentre as doenças, o oídio do meloeiro, causado pelas espécies fúngicas *Erysiphe cichoracearum* e *Podosphaera xanthii* (*Sphaerotheca fuliginea*), destaca-se como a principal doença por reduzir a área fotossintética da cultura devido ao aparecimento de manchas brancas pulverulentas na superfície das folhas (REIS, 2007). Em ataque severo ocorre redução dos frutos em tamanho e número (diminuição das reservas metabólicas), acarretando em baixo rendimento e depreciação durante a comercialização (PEREIRA, PINHEIRO; CARVALHO, 2012).

Quanto às pragas, a principal é a mosca-minadora, *Liriomyza* spp., caracterizada por formar galerias nas folhas a partir da alimentação das larvas no tecido foliar (ARAÚJO *et al.*, 2007). O inseto se tornou a praga-chave no meloeiro em decorrência do cultivo intenso de melão durante o ano inteiro, dos danos severos ocasionados pelo ataque da praga e pela diminuição de populações de inimigos naturais, em decorrência ao uso indiscriminado de defensivos, sobretudo, para o controle da mosca branca (*Bemisia tabaci*) (GUIMARÃES *et al.*, 2009b).

Além disso, o uso contínuo de inseticidas para o manejo da mosca-minadora também contribuiu para surtos populacionais da praga, implicando em aumento nos custos de controle que, além de ocasionar perdas econômicas aos produtores, também acresce os custos de produção (BRASIL *et al.*, 2012). Araújo *et al.* (2007) avaliando as espécies de mosca-minadora na região da Chapada do Apodi-RN, relataram perdas referentes ao ataque do inseto em áreas produtoras de melão. De acordo com esses autores, houve redução de 10 a 15% da produção em virtude da perda da qualidade dos frutos (baixo teor de sólidos solúveis totais)

para exportação e acréscimo de R\$ 900,00/hectare para o controle químico do inseto.

Outro estudo de caso em uma área produtora de melão no Rio Grande do Norte também foi realizado com relação aos prejuízos do ataque da mosca-minadora. Nessa avaliação, os custos de controle atingiram 13,20% dos custos totais de insumos, equivalendo a R\$ 1.642,90/ hectare (BRASIL *et al.*, 2012). Esses autores observaram que 80% dos custos com inseticidas foram utilizados, apenas, para o controle do inseto, ocasionando perdas significativas na produção. Portanto, conhecer o ciclo de vida do inseto, bem como os danos causados à cultura são aspectos cruciais no controle da mosca-minadora.

## **2.2 Mosca-minadora (*Liriomyza sativae*)**

### **2.2.1 Descrição e ciclo de vida do inseto**

A mosca-minadora é um inseto pertencente à ordem Diptera, família *Agromyzidae* e gênero *Liriomyza*. Este é formado por centenas de espécies das quais, somente três – *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, *L. sativae* Blanchard e *L. trifolii* Burgess – apresentam ampla disseminação nas Américas, incluindo o Brasil (GUIMARÃES *et al.*, 2009c). *L. sativae* se destaca como praga de importância econômica por estar presente e causar sérios danos ao meloeiro em áreas produtoras no nordeste brasileiro (COSTA-LIMA, SILVA; PARRA, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2009b).

Mosca-minadora é um fitófago que possui metamorfose completa durante seu desenvolvimento (PARRELLA, 1987). Os adultos, de forma geral, apresentam um comprimento variando de um a três milímetros e possuem corpo de coloração preta com manchas amareladas na região do tórax e da cabeça (GUIMARÃES *et al.*, 2009c). As fêmeas, além de serem maiores, se diferenciam dos machos pela presença do aparelho ovipositor usado para depositar ovos no tecido foliar (face abaxial e adaxial) e fazer puncturas para alimentação (COSTA-LIMA; SILVA, PARRA, 2015).

O acasalamento ocorre a partir das 24 horas da emergência do adulto e a postura é do tipo endofítica. Os ovos são esbranquiçados, pouco translúcidos e normalmente o tempo de incubação dura três dias, em que, após esse período, as larvas eclodem (GUIMARÃES *et al.*, 2005). As larvas são vermiformes, medindo três milímetros de comprimento e possuem coloração amarelo-alaranjadas no fim do estágio. A alimentação é iniciada logo depois da eclosão e, à medida que se alimentam do mesófilo, originam-se as minas ou galerias (GUIMARÃES *et al.*, 2009b).

Terminado essa fase, as larvas deixam as minas e empupam no solo ou na superfície das próprias folhas. Finalmente, os adultos de vida livre emergem e passam por um momento de pré-oviposição até que seus órgãos reprodutivos estejam maduros para iniciar o acasalamento (GUIMARÃES *et al.*, 2009b). Quanto à duração do ciclo, o período oval dura três dias, o larval de quatro a seis dias, o pupal em torno de nove dias e os adultos variam de sete a trinta dias (ARAÚJO *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2005). A variação do ciclo também depende das condições ambientais em que o inseto está exposto incluindo temperatura e umidade do ar (COSTA-LIMA, GEREMIAS; PARRA, 2009).

### **2.2.2 Danos ao meloeiro**

Os danos causados por *L. sativae* envolvem degradação da planta e do fruto (ARAÚJO *et al.*, 2013). Na planta, o consumo direto das larvas no mesófilo foliar reduz a área verde e diminui a capacidade fotossintética, acarretando a morte das plantas, sobretudo, se elas estiverem nos estádios iniciais de desenvolvimento (ARAÚJO *et al.*, 2007). Em condições de altas infestações, as folhas ressecam e se tornam quebradiças sendo facilmente perdidas durante o manuseio da cultura ou pela ação dos ventos. Além disso, a formação das minas também pode facilitar a entrada de fitopatógenos, contribuindo para aumento na intensidade de doenças e perdas na produtividade dos meloeiros (GUIMARÃES *et al.*, 2009b).

Com relação ao fruto, devido à queda das folhas, o mesmo se torna diretamente exposto a luz solar, ocasionando queimaduras na casca e depreciação do produto (GUIMARÃES *et al.*, 2005). Essa queimadura interfere na fisiologia do fruto, diminuindo a produção e qualidade em virtude da redução na concentração de sólidos solúveis totais, tornando-o, em alguns casos, impróprio à comercialização (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Métodos de controle da mosca-minadora são adotados a fim de minimizar os danos ao meloeiro. Os mesmos devem integrar um programa de manejo adequado para o controle da praga, uma vez que visam manter populações do inseto abaixo do nível de dano econômico por meio do uso de diferentes medidas de controle (GALLO *et al.*, 2002).

### **2.2.3 Métodos de controle**

O uso de inseticidas constitui o principal método de controle da mosca-minadora. Esses inseticidas compõem diferentes formulações, no entanto, somente dois ingredientes

ativos (ciantraniliprole e fenpropratrina) e dois grupos químicos (antranilamida e piretróide) estão registrados para o controle da *L. sativae* em meloeiro no Brasil (AGROFIT, 2018).

Devido ao uso indiscriminado dos defensivos químicos e poucos produtos registrados, populações de mosca-minadora estão se tornando resistentes aos inseticidas utilizados (GUIMARÃES *et al.*, 2005), ocasionando ineficiência no controle (HIDRAYANI *et al.*, 2005). Como alternativa, inseticidas naturais a base de outras plantas, como Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) (HERNANDEZ, HARRIS; TONG-XIAN, 2011) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (DEQUECH *et al.*, 2010) vêm sendo utilizados no combate à praga.

O controle cultural consiste em uma medida no qual o ambiente é alterado para reduzir a população do inseto e dificultar sua dispersão e reprodução (GUIMARÃES *et al.*, 2005). Esses autores listam como principais práticas culturais a eliminação de restos culturais, eliminação de plantas daninhas (hospedeiras), rotação de culturas, uso de cercas vivas e manejo nutricional da planta, permitindo maior eficiência no controle do inseto.

O controle físico corresponde ao uso da ação física e mecânica como mecanismos para impedir o ciclo de vida do inseto (GALLO *et al.*, 2002). O tecido-não-tecido (TNT) é utilizado no meloeiro, a priori, no controle do amarelão (*Melon Yellowing-associated Virus*-MYaV) visando retardar a transmissão do vírus pela mosca branca durante o primeiro estágio fenológico da cultura (35 dias após o plantio) (LIMA *et al.*, 2008). Com o benefício dessa medida, o TNT também passou a ser utilizado no controle da mosca-minadora evitando o contato do inseto no período mais susceptível da planta (três primeiras semanas) sendo retirado aos 21-23 dias após o transplântio, correspondente ao início da floração (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A instalação de armadilhas adesivas de cor amarela nas bordaduras da área também pode ser usada como método de controle físico, pois essa tática parte do princípio que os adultos são atraídos pela cor amarela e facilmente retidos nos adesivos, evitando concentrações do inseto no centro da área (GUIMARÃES *et al.*, 2005). A catação e esmagamento das pupas de *L. sativae* também é outro método físico adotado para evitar o desenvolvimento do inseto (MORAIS; CARVALHO, 2012). Contudo, a adoção dessa medida torna o controle da mosca-minadora mais prolongado e dispendioso em virtude da necessidade de mão-de-obra excedente.

No controle biológico, diferentes inimigos naturais – parasitoides, predadores, nematoides e fungos entomopatogênicos – são utilizados para o controle das larvas e adultos da mosca-minadora (LIU *et al.*, 2009). Conforme os autores, essa prática vem alcançando resultados satisfatórios em ambientes protegidos e em campo. Porém, o uso de biocontrole se

torna limitante por depender da densidade dos inimigos naturais para efetividade no controle (YANO, 2004), necessitar de registro e importação dos organismos (SALVO, FENOGLIO; VIDELA, 2005).

A utilização das medidas de controle compõe um manejo eficiente no controle da mosca-minadora, entretanto, esses métodos apresentam limitações, sejam por aumentarem os custos de implantação e/ou controle, sejam por necessitarem de maior mão-de-obra. O uso de cultivares resistentes constitui um método de controle alternativo e promissor para o controle da *L. sativae*, uma vez que interfere no ciclo do inseto, desfavorecendo o desenvolvimento e reprodução da praga, devido à constituição genotípica das plantas resistentes (MORAIS; CARVALHO, 2012).

As principais contribuições da utilização de genótipos resistentes estão relacionadas à facilidade de aquisição pelos produtores, compatibilidade com outras práticas (NUNES *et al.*, 2013), estabilidade na produção, não necessitando de transferência de tecnologia, eficiência a longo prazo e sem degradação do ambiente (GALLO *et al.*, 2002; MORAIS; PINHEIRO, 2012). Além desses benefícios, a resistência genética das plantas aos insetos pode ser desencadeada em três tipos: antibiose, antixenose e tolerância (PAINTER, 1951), dificultando a ação do inseto e tornando o método mais eficiente.

### **2.3 Resistência aos insetos**

Planta resistente é aquela que, quando submetida às mesmas condições, sofre um menor dano que outra em virtude de sua constituição genotípica, isto é, o comportamento de determinada espécie varia diante do ataque do inseto, sendo possível distinguir as plantas em resistentes ou susceptíveis (ROSSETTO, 1973). A condição de resistência é conferida devido à presença de gene(s) responsável(is) pela expressão do caráter selecionado naturalmente ou por ação antrópica, via melhoramento genético (BOIÇA JÚNIOR *et al.*, 2015).

Painter (1951) classificou as plantas conforme sua resistência aos insetos em três tipos: 1. Não preferência; 2. Antibiose e 3. Tolerância. No entanto, Kogan e Ortman (1978) propuseram alteração do termo não preferência por antixenose, uma vez que a não preferência se associa exclusivamente ao comportamento do inseto.

Antixenose é a resistência na qual a planta possui um efeito adverso em relação ao comportamento do inseto, ou seja, ela é menos preferida pela praga para alimentação, oviposição ou abrigo se comparada a outra submetida em condições de igualdade (PAINTER, 1951; KOGAN; ORTMAN, 1978). Essa resistência está atribuída às características

morfológicas, químicas e/ou físicas da planta que modificam, de forma isolada ou conjunta, o comportamento da praga resultando na escolha de outro hospedeiro (MORAIS; PINHEIRO, 2012).

A presença de tricomas glandulares, dureza de camadas epidérmicas e quantidade e espessura de serosidade nas folhas são exemplos de barreiras morfológicas ao artrópode (HALDHAR *et al.*, 2013). Quanto às características químicas, estão impropriedades nutricionais (toxinas que afetam a digestibilidade da praga), fitoquímicos exclusivos (repelentes a alimentação e oviposição dos insetos) e grupos químicos compostos por flavonoides, alcaloides, fenóis, glicosinolatos e inibidores de protease (HALDHAR *et al.*, 2013; MORAIS; PINHEIRO, 2012). Inerente à barreira física estão a cor e a radiação luminosa emitida pelos órgãos vegetais (BERNAYS; CHAPMAN, 1994).

Oliveira *et al.* (2016) ao avaliar acessos de meloeiro quanto à resistência à *L. sativae*, identificaram um acesso (CNP 06-1047) com resistência do tipo antixenose devido a menor oviposição pelo inseto. Conforme os autores, uma provável explicação para essa resistência está relacionada com a liberação de substâncias químicas repelentes, uma vez que se observou diferença na movimentação da mosca-minadora desse acesso em direção aos demais. Celin *et al.* (2017a), ao selecionar fontes de resistência à mosca-minadora em germoplasma de meloeiro, também identificaram acessos (CNP 11-1072 e CNP 11-1077) resistentes por antixenose visto que eles foram os genótipos menos atacados.

Ao contrário da resistência do tipo antixenose, a antibiose é caracterizada por exercer um efeito adverso na biologia do fitófago através da liberação de componentes secundários pelas plantas (PAINTER, 1951). Esses metabólitos responsáveis pela defesa das plantas são produzidos em situações de estresses bióticos e constituem os alcaloides, flavonóides, compostos fenólicos, proteínas inativadoras de ribossomos, quitinases, glucanases, inibidores de proteases, aminoácidos não proteicos, saponinas e lectinas (BOWLES, 1990).

Os efeitos deletérios (toxinas, inibidores de crescimento/reprodução, propriedades que interferem na nutrição) afetam o ciclo de vida do inseto, reduzindo o tamanho e peso dos indivíduos; diminuindo o potencial reprodutivo e causando morte nos estágios larval, ninfal ou pupal (CHRISPIM; RAMOS, 2007). A antibiose também pode ser manifestada quando as plantas não dispõem dos nutrientes essenciais aos insetos, causando deficiência nutricional para a biologia do fitófago (BOIÇA JÚNIOR *et al.*, 2015).

Genótipos de meloeiro obtidos da Embrapa Hortaliças foram submetidos a teste com e sem chance de escolha visando à resistência à *L. sativae*. Dos 27 genótipos utilizados,

quatro (G76, NO23, NO24 e NO26) foram caracterizados como resistentes por antibiose, uma vez que ocasionaram 100% de mortalidade larval em um período de 24h após a eclosão (NOGUEIRA, 2016). Para o autor, outras pesquisas com esses genótipos devem ser realizadas visando identificar quais substâncias são letais ao inseto. Celin *et al.* (2017a), ao selecionar fontes de resistência à mosca-minadora, também identificaram acessos (BAGMEL 56(R) e CNPH 00-915(R) com resistência por antibiose. Conforme os autores, esses acessos devem ser utilizados em programas de melhoramento visando a introgressão dos alelos de resistência em linhagens-elite de meloeiro.

Na tolerância, a planta consegue suportar o ataque do inseto na mesma intensidade de infestação que outra sem interferir ou causar sérios prejuízos na sua produção (PAINTER, 1951). Essa resistência depende da própria planta em vez da relação praga-hospedeiro como ocorre nos outros tipos (CHRISPIM; RAMOS, 2007). Desse modo, não há mudança no comportamento ou biologia do inseto, caracterizando a tolerância como a capacidade da planta em conseguir crescer e regenerar os tecidos atacados sem afetar a produção (GALLO *et al.*, 2002).

Acessos de meloeiro provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Semi-Árido (Petrolina-PE) foram avaliados quanto à resistência à mosca-minadora. Dentre os genótipos utilizados, um acesso – A44 (*Cantalupensis*) – apresentou resistência do tipo tolerância, pois o teor de clorofila nas folhas não foi reduzido, ou seja, a planta utilizou mecanismos (aumento na fotossíntese) para tolerar o ataque da praga (LIMA, 2012). Para o autor, além da tolerância, esse acesso também foi caracterizado como resistente por antixenose (menor oviposição) e antibiose (mortalidade larval), demonstrando a ação concomitantemente dos demais tipos.

Em todos os tipos, a resistência será manifestada a partir da associação entre fatores inerentes à planta, ao inseto e ao ambiente (ROSSETTO, 1973). Para a planta, as variáveis idade e região infestada pelo inseto influenciam na manifestação da resistência, pois desencadeiam reações diferentes na planta e, conforme o órgão atacado, os danos podem ser maximizados ou minimizados (BUENO; MENDES, CARVALHO, 2006). O tipo de tecido foliar e fenologia da planta também interferem na resistência, uma vez que a praga prefere se alimentar de tecidos jovens (não lignificados) aos mais velhos. (MORAIS; PINHEIRO, 2012).

Com relação à praga, os principais fatores são: sexo (o comportamento de fêmeas e machos difere na expressão da resistência), idade (influencia na oviposição e taxa de sobrevivência), condicionamento pré-imaginal (preferência dos adultos ao se alimentarem ou

ovipositarem nas mesmas plantas hospedeiras que se alimentaram antes) e biótipos do inseto (influência da biologia do inseto em resposta a resistência) (MORAIS; PINHEIRO, 2012). Esses autores ainda relatam que as variáveis relacionadas ao ambiente são as climáticas (umidade relativa do ar e temperatura) e edáficas (disponibilidade de nutrientes no solo), pois o ataque pode ser acentuado em decorrência de condições adversas na qual a planta está submetida. Além dessas variáveis, infestação por outros insetos ocasionados pelas condições ambientais também contribuem com a associação entre praga e hospedeiro, pois uma planta já infestada tem sua fisiologia alterada e, por conseguinte, seu comportamento para com a praga-chave é modificado (MORAIS; PINHEIRO, 2012).

Por se tratar de uma expressão gênica, a resistência em plantas é relativa (diferentes graus de resistência), hereditária (transmitida a descendência) e específica ao inseto-praga (ROSSETTO, 1973). Pesquisas nessa área apresentam duas principais finalidades: selecionar genótipos comerciais resistentes e disponibilizar essa informação aos produtores ou identificar alelos de resistência em bancos de germoplasma visando introgressão em cultivares comerciais (LARA, 1991). Desse modo, para introgridir os alelos de resistência em linhagens-elite é necessário elucidar a herança da resistência.

## **2.4 Herança genética da resistência**

Herança genética se refere ao controle genético que governa determinado caráter, podendo ser classificada em simples ou poligênica. Conhecer o modo como a resistência genética é herdada auxilia na escolha do método de melhoramento a ser adotado para incorporação dessa resistência em cultivares comerciais (MORAIS; PINHEIRO, 2012). O controle genético do caráter de interesse pode ser elucidado por meio de testes estatísticos envolvendo o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou análise de gerações (progenitores, gerações filiais e retrocruzamentos) (RAMALHO *et al.*, 2012).

Para caracteres qualitativos, utiliza-se o teste do qui-quadrado para testar a hipótese de herança monogênica na segregação das gerações por meio da associação existente entre variáveis (RAMALHO *et al.*, 2012). É um teste não paramétrico (independe da média e variância) que tem como princípio comparar as divergências entre as frequências observadas e esperadas. No estudo de herança, os indivíduos são separados em classes e as proporções dos resultados dos cruzamentos são avaliadas a partir da análise da distribuição fenotípica (CRUZ, 2012).

Em caracteres quantitativos, o estudo de herança é baseado na análise de médias e



variâncias, ou seja, são avaliadas quais frações da média e da variância são de causas genéticas, pois nas características quantitativas há o efeito do ambiente que pode aumentar ou diminuir a manifestação fenotípica do caráter (CRUZ, 2012). Na análise de médias e variâncias, busca-se quantificar a natureza e magnitude da variação genética presente na população segregante; e avaliar a importância dos efeitos gênicos que compõem as médias das populações avaliadas (CRUZ, REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

A partir dos valores das médias e dos componentes das variâncias é possível identificar qual proporção da estimativa obtida é herdável e qual não herdável, ou seja, estimar o valor genético aditivo e atribuído aos desvios da dominância, bem como o valor atribuído ao meio (CRUZ, REGAZZI; CARNEIRO, 2004). Esse conhecimento auxiliará o melhorista na escolha das estratégias de seleção para fins de melhoramento (RAMALHO *et al.*, 2012).

No estudo genético das médias são estimados os parâmetros genéticos como média dos possíveis homozigotos ( $m$ ), efeito aditivo ( $a$ ), desvio de dominância ( $d$ ) e interações interalélicas (epistáticas) de natureza aditiva x aditiva ( $aa$ ), aditiva x dominante ( $ad$ ) e dominante x dominante ( $dd$ ) (CRUZ, REGAZZI; CARNEIRO, 2004). No estudo genético das variâncias, estima-se os parâmetros genéticos como herdabilidade, variâncias fenotípica, genotípica e ambiental. Além desses parâmetros, também é possível estimar o número mínimo de genes envolvidos na determinação do caráter, compondo outro parâmetro útil na avaliação das potencialidades de uma população (CRUZ, REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

Na análise de gerações estão envolvidos os genitores puros contrastantes ( $P_1$  e  $P_2$ ) para a referida característica, bem como as gerações filiais  $F_1$  ( $P_1 \times P_2$ ) e  $F_2$  ( $F_1 \times F_1$ ) e os retrocruzamentos  $RC_1$  ( $P_1 \times F_1$ ) e  $RC_2$  ( $P_2 \times F_1$ ). Dessa forma, toda a população é avaliada simultaneamente a fim de obter informações sobre o número de genes e qual a interação alélica envolvida na herança do caráter (RAMALHO *et al.*, 2012).

No meloeiro, poucas fontes resistentes são relatadas quanto ao estudo de herança genética da resistência à mosca-minadora. Dogimont *et al.* (1999) identificaram uma linhagem, Nantais Oblong, resistente do tipo antibiose à *Liriomyza trifolii*. Essa linhagem é um melão Charentais cuja resistência é controlada por um gene com dominância completa, chamado de *Lt*. Com relação à *L. sativae*, acessos provenientes da África (PI 282448) e Índia (PI 313970) tiveram o controle genético elucidado para a resistência, sendo monogênica recessiva para o acesso africano e de dominância incompleta para o indiano (KENNEDY *et al.*, 1978).

Acessos pertencentes à coleção de germoplasma da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) foram avaliados no intuito de identificar fontes de resistência ao inseto. Dentre os genótipos, o acesso indiano AM 55 (*C. melo* variedade *acidulus*) e o híbrido Rutênio (tipo Amarelo) foram classificados como resistentes à mosca-minadora, no entanto, o controle genético que governa a característica-chave não foi elucidado (COSTA, 2017). Recentemente, Celin *et al.* (2017b) elucidaram a herança de resistência à *L. sativae* na linhagem A56.10.04 (tipo Charentais) e um gene com dominância completa (denominado de *Ls*) é responsável por condicionar essa resistência.

A partir do estudo de herança genética será possível desenvolver outras pesquisas a fim de buscar alternativas promissoras para a resistência à mosca-minadora. Dentre essas alternativas, a identificação de marcadores moleculares associados aos genes da resistência contribuirá como uma ferramenta útil em programas de melhoramento visando, em um menor intervalo de tempo, a introgressão dos alelos de resistência em linhagens-elite de meloeiro.

## **2.5 Marcadores moleculares associados à resistência**

### **2.5.1 Marcadores moleculares**

Marcadores moleculares são fenótipos moleculares originários de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) associados a locos de uma determinada característica de interesse. Os marcadores moleculares permitem diferenciar dois ou mais indivíduos a partir de características polimórficas e herdáveis geneticamente entre eles. São evidenciados através de hibridização ou amplificação de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MILACH, 1999).

Na identificação por hibridização, enzimas de restrição são utilizadas na fragmentação do DNA e o polimorfismo é confirmado por hibridização de uma sequência clonada de DNA com sequências complementares de DNA obtidas pela ação das enzimas endonucleases (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entre os marcadores moleculares revelados por hibridização estão os Isoenzimáticos, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (CAIXETA *et al.*, 2016).

Na PCR ocorre a amplificação de uma região específica do DNA, milhares de vezes, no intuito de se obter cópias desse fragmento para analisar a sequência que é alvo do estudo (TOPPA; JADOSKI, 2013). O processo envolve diferentes ciclos de temperatura e cada ciclo é constituído de três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação

a dupla fita é separada, tornando-se fita única, a uma temperatura de 92-95°C (CAIXETA *et al.*, 2016). Na fase seguinte, um ou um par de *primer(s)* anela(m) nas fitas opostas iniciando a duplicação das fitas. A temperatura de anelamento é específica de acordo com o *primer* a ser utilizado (CAMARGO; SILVA, 2011). Por fim, tem-se a ação da enzima Taq DNA Polimerase adicionando as bases complementares na extensão das novas fitas usando o DNA-alvo como molde a partir da extremidade 3' do *primer* (CAIXETA *et al.*, 2016).

O principal objetivo da PCR é a amplificação de uma sequência específica (região de interesse) do DNA a partir de uma fita-molde, ou seja, produção de DNA *in vitro* (CAMARGO; SILVA, 2011). Os marcadores moleculares baseados em PCR são RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), STS (*Sequence Tagged Sites*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), dentre outros (CAIXETA *et al.*, 2016).

Os descritores moleculares conceberam um grande avanço para a ciência, uma vez que as diferenças genéticas passaram a ser detectadas e identificadas diretamente no DNA do indivíduo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). No melhoramento genético, os marcadores moleculares permitem prever as estimativas de distâncias genéticas entre genótipos (TOPPA; JADOSKI, 2013) por meio da análise genotípica de cada indivíduo sem necessitar da avaliação fenotípica (CARNEIRO, 2009). A seleção é feita de modo direto, apenas pela presença ou ausência de uma sequência de DNA extraído de material vegetal (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Além de estudos de variabilidade genética, os marcadores moleculares também são utilizados em avaliação da pureza de sementes, caracterização de cultivares, mapeamento de genes e SAM (GUIMARÃES, 2009a). Na SAM a característica de interesse é selecionada indiretamente por meio da associação dos marcadores moleculares ao caráter-chave (CAIXETA *et al.*, 2016). Essa associação ocorre, sobretudo, em situações específicas envolvendo a baixa eficiência na seleção fenotípica do indivíduo devido à baixa hereditariedade do caráter, em condições que a seleção fenotípica é mais demorada ou quando a seleção é feita concomitantemente para várias características ou um caráter governado por vários genes (SAKIYAMA *et al.*, 2014).

A escolha do marcador molecular é outro fator importante em programas de melhoramento, pois a genotipagem da população segregante e a informação gerada são influenciadas pelo tipo de marcador (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Na resistência genética às pragas e doenças, recomenda-se o uso de marcadores específicos e codominantes,

uma vez que é possível visualizar e distinguir indivíduos heterozigotos e homozigotos, diferentemente dos marcadores não específicos e dominantes que não possibilitam essa distinção (SOUZA *et al.*, 2001). Além disso, os marcadores moleculares também podem identificar os genes de interesse, seja de herança qualitativa ou quantitativa-QTL (*Quantitative Trait Loci*) (SOUZA *et al.*, 2001).

Em meloeiro do tipo Amarelo, marcadores AFLP foram associados à resistência ao vírus do mosaico (PRSV-W) em duas linhagens quase-isogênicas (LQI-R e LQI-S). Três fragmentos (EA270, HF155 e EK190) foram ligados ao gene *Prv*<sup>1</sup> de resistência, sendo o marcador EK190 indicado em programas de SAM devido à sua grande proximidade para com o gene *Prv*<sup>1</sup> (distância 0,0526 cM) (TEIXEIRA; CAMARGO, 2006).

Diante de marcadores moleculares existentes e de suas funções, os marcadores microssatélites estão sendo utilizados em maior frequência no melhoramento de plantas, pois auxiliam os melhoristas na seleção de genótipos superiores, uma vez que são específicos, codominantes, possuem alto grau de polimorfismo e permitem uma ampla cobertura do genoma (BORÉM; CAIXETA, 2006).

### 2.5.2. Marcadores microssatélites

Microssatélites correspondem a regiões no genoma constituídas de sequências de repetições de um a seis nucleotídeos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Essas repetições são divididas em: repetições perfeitas (repetições sem nenhuma interrupção), imperfeitas (repetições com interrupção de bases não repetidas), simples (região formada por uma repetição) e compostas (duas ou mais repetições estão dispostas adjacentes) (CAIXETA *et al.*, 2016).

Marcadores moleculares baseados em microssatélites são específicos para determinada espécie, pois foram desenhados a partir de regiões repetidas dessa espécie. Além disso, as sequências de DNA flanqueadas nessas regiões são conservadas dentro da espécie, permitindo o desenvolvimento de vários microssatélites (CAIXETA *et al.*, 2016). Esses marcadores permitem desenhar pares de *primers* entre 20 e 30 bases nas regiões de sequências repetidas (GUIMARÃES *et al.*, 2009a) e as características polimórficas são identificadas em um loco devido a diferença no número de nucleotídeos repetidos naquele loco (BUSO, 2003).

Os *SSR* são codominantes e altamente polimórficos, apresentam fácil reprodutibilidade e baixo custo, pois requerem menor quantidade de DNA para análise, além de facilidade na interpretação dos resultados (SCHLOTTERER, 2000). Podem ser usados

para diversos fins, incluindo discriminação de genótipos, estudos de genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) e monitoramento do nível de endogamia em linhagens-elite em programas de melhoramento (PADILHA, 2002).

Os microssatélites também podem ser utilizados durante a introgressão de alelos desejáveis em cultivares comerciais, reduzindo o tempo de avaliação nas gerações de retrocruzamentos (GUPTA *et al.*, 1996), e em mapeamento de genes para determinados caracteres, abrangendo a identificação de QTLs envolvidos em herança complexa como a resistência genética às pragas (YUAN *et al.*, 2002).

No entanto, a maior limitação dos microssatélites consiste na necessidade de obter *primers* específicos, não sendo possível usar *primers* universais (não-específicos) (BORÉM; CAIXETA, 2006). Logo, esses marcadores moleculares requerem a construção de bibliotecas genômicas, incluindo o sequenciamento e o desenho dos *primers* (GUIMARÃES *et al.*, 2009a). Contudo, de acordo esses autores, essa desvantagem tem sido sanada pela quantidade de *primers SSR* já desenhados e publicados na comunidade científica para diversas espécies vegetais.

Ritschel *et al.* (2004) desenvolveram marcadores microssatélites de uma biblioteca genômica enriquecida para análise genética de meloeiro. Centenas de pares de *primers* foram desenhados e sintetizados, e diversos marcadores microssatélites foram eficientes na predição de distância genética de diferentes acessos, gerando banco de dados de frequência alélica para a cucurbitácea. Além de estudos de variabilidade genética, diferentes *SSR* desenvolvidos mostraram-se segregação mendeliana na análise de mapeamento, indicando ampla cobertura no genoma e eficiência na análise genética de meloeiro (RITSCHHEL *et al.*, 2004).

Marcadores *SSR* foram utilizados como ferramenta para análises de divergência genética em cultivares comerciais e linhagens de meloeiro do tipo Pele de Sapo, Amarelo e Cantaloupe (CARVALHO *et al.*, 2017). Conforme os autores, esses marcadores possibilitam identificar melhores cruzamentos visando híbridos superiores e, dos 44 *primers SSR* selecionados, 25 foram úteis na variabilidade dos genótipos, indicando que esses *primers* são eficientes na distinção dos genótipos e podem ser usados em programas de proteção e registro de cultivares para o meloeiro.

Com relação à resistência de pragas, o principal objetivo do melhoramento consiste em introgridir o(s) alelo(s) resistente(s) em cultivares comerciais (MORAIS; PINHEIRO, 2012). Contudo, antes de iniciar o processo de introgressão, é necessário associar o marcador molecular ao loco de resistência a partir da otimização de *primers* via *screening*

entre os parentais e primeira geração filial e, posteriormente, teste na geração segregante.

### 2.5.3 Genotipagem com marcadores moleculares

Dentre os métodos de incorporação da característica desejável, o dos retrocruzamentos é o mais utilizado no melhoramento clássico. Nesse método, são necessários ciclos de retrocruzamentos para a obtenção de uma geração com características do genitor recorrente mais o caráter introduzido pelo genitor doador (YOUSEF; JUVIK, 2002). Uma forma de reduzir o número de ciclos e maximizar a eficiência na introgressão consiste na associação de marcadores moleculares aos genes de interesse, pois permite a seleção direta da característica com base no genótipo do indivíduo, reduzindo o tempo de avaliação nas gerações de retrocruzamentos (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

O processo de identificação dos marcadores moleculares ligados aos genes desejáveis envolve cinco etapas (SERAFINI; BARROS, AZEVEDO, 2001): 1. Escolha das linhagens progenitoras contrastantes para o caráter; 2. Obtenção de uma população segregante (F<sub>2</sub> ou retrocruzamentos) a fim de calcular a frequência de recombinação do loco do caráter e os locos do marcador molecular; 3. Identificação de polimorfismo na população segregante; 4. Análise fenotípica dos indivíduos para a característica; e 5. Estimativa da frequência de recombinação entre o loco do caráter e cada loco do marcador molecular.

A associação de microssatélites ao(s) gene(s) de interesse pode ser obtida a partir a seleção de *primers* polimórficos obtidos de *screening* entre os genitores e a primeira geração filial, por exemplo. Nessa seleção, identificados os marcadores polimórficos, os mesmos são utilizados na genotipagem da geração segregante e se for identificado a presença de polimorfismo na geração segregante, tem-se alta probabilidade de o marcador molecular estar correlacionado aos genes do caráter-chave (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005). O *screening* promove eficiência em detectar marcadores moleculares associados aos genes de interesse, seja na região específica do gene ou próxima a ela.

Acessos de meloeiro – AM55-1A (*C. melo* variedade *acidulus*) e C-AC-15 (*C. melo* variedade *momordica*) – foram avaliados visando estudar a herança genética da resistência à *Podosphaera xanthii* e associar marcadores SNPs a esses genes (NUNES, 2014). A herança é monogênica e dominante no acesso AM55 e em AC15 o controle genético é governado por dois genes independentes com interação epistática duplo recessiva (NUNES *et al.*, 2017). Quanto aos SNPs, populações de retrocruzamento (AM55-1A x ‘Védrantais’) e F<sub>2</sub> (C-AC-15 x ‘Védrantais’) foram utilizadas, por meio de análise de segregantes agrupados,

na identificação de QTLs associados à resistência ao fungo. Dois QTLs (*Pm-AM55-1A\_1* e *Pm-AM55-1A\_2*) foram identificados no grupo de ligação V no cruzamento entre AM55-1A x ‘Védrantais’ e dois QTLs (*Pm-C-AC-15\_5*) e (*Pm-C-AC-15\_9*) foram identificados nos grupos de ligação V e IX, respectivamente, no cruzamento C-AC-15 x ‘Védrantais’ (NUNES, 2014).

Com relação à resistência genética à mosca-minadora, não há relatos de associação de marcadores moleculares ao(s) gene(s) de resistência.

### 3 CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À MOSCA-MINADORA EM LINHAGEM DE MELOEIRO

#### RESUMO

A mosca-minadora, *Liriomyza sativae*, é a principal praga do meloeiro na região nordestina, ocasionando prejuízos agrônômicos e econômicos aos produtores. A resistência genética constitui o método mais eficiente de controle, pois os genótipos resistentes mantêm os prejuízos causados pela praga inferiores aos custos de seu controle, sem prejudicar o ambiente. Considerando duas linhagens de meloeiro resistentes à mosca-minadora, objetivou-se estudar a herança genética da resistência na linhagem A915.34.01.08 e avaliar fenotipicamente indivíduos segregantes obtidos da linhagem A56.10.04. Populações de cada linhagem, genitores ( $P_1$  e  $P_2$ ), primeira e segunda gerações filias ( $F_1$  e  $F_2$ ) e retrocruzamentos ( $RC_1$  e  $RC_2$ ), foram submetidas em experimentos em gaiola e em campo, na presença da praga, e as plantas foram classificadas em resistentes (letalidade larval) ou susceptíveis (sem letalidade larval) à *L. sativae*. No estudo de herança da linhagem A915.34.01.08 foram avaliados os parâmetros genéticos: variâncias fenotípica, genotípica e ambiental; herdabilidade ampla e restrita; grau médio de dominância; segregação transgressiva e número de genes. A variância genotípica da resistência foi atribuída, sobretudo, aos desvios de dominância e variância aditiva. Na herdabilidade, 98,74% da variação fenotípica observada foi de natureza genética e 32,83% decorrente de causas genéticas aditiva. O grau médio de dominância indicou interação intra-alélica de sobredominância e houve presença de indivíduos transgressivos na geração  $F_2$  para o caráter de susceptibilidade. Quatro genes estão envolvidos no controle da resistência à mosca-minadora. Quanto à fenotipagem da população obtida da linhagem A56.10.04, um total de 328 indivíduos foram avaliados e classificados em resistentes ou susceptíveis. A linhagem A915.34.01.08 apresenta herança oligogênica à resistência à *L. sativae*, podendo ser usada na introgressão dos alelos de resistência em linhagens-elite de meloeiro e os indivíduos avaliados fenotipicamente à resistência à *L. sativae*, a partir da linhagem A56.10.04, podem ser utilizados em estudos envolvendo associação de marcadores moleculares ao gene de resistência.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*. *Liriomyza sativae*. Estudo de herança. Introgressão.



## ABSTRACT

The leafminer, *Liriomyza sativae*, is the main pest of the melon in the Northeastern region, causing agronomic and economic losses to the producers. Genetic resistance is the most efficient method of control, since resistant genotypes keep the damage caused by the pest inferior to the costs of its control, without harming the environment. Considering two lines of melon resistant to the leafminer, the objective was to study the genetic inheritance of the resistance in line A915.34.01.08 and to measure phenotypically segregating individuals obtained from line A56.10.04. Populations of each lineage, parents ( $P_1$  and  $P_2$ ), first and second progeny ( $F_1$  and  $F_2$ ) and backcrosses ( $RC_1$  and  $RC_2$ ) were submitted to greenhouse and field conditions experiments in the presence of the pest, and the plants were classified in resistant (larval lethality) or susceptible (without larval lethality) to *L. sativae*. In the study of inheritance of lineage A915.34.01.08 the genetic parameters were evaluated: phenotypic, genotypic and environmental variances; broad and restricted heritability; average degree of dominance; transgressive segregation and number of genes. The genotypic variance of the resistance was attributed, above all, to deviations of dominance and additive variance. In heritability, 98.74% of the observed phenotypic variation was of genetic nature and 32.83% due to additive genetic causes. The mean degree of dominance indicated intra-allelic interaction of over-dominance and there were presence of transgressive individuals in the  $F_2$  generation for the susceptibility character. Four genes are involved in flywheel resistance control. As for the phenotyping of the population obtained from line A56.10.04, a total of 328 individuals were evaluated and classified as resistant or susceptible. The A915.34.01.08 lineage has oligogenic inheritance to resistance to *L. sativae* and can be used for the introgression of resistance alleles in elite melon lineages, and phenotypically evaluated individuals to resistance to *L. sativae*, from line A56.10.04, can be used in studies involving the association of molecular markers with the gene resistance.

**Keywords:** *Cucumis melo*. *Liriomyza sativae*. Inheritance study. Introgression.

### 3.1 Introdução

O meloeiro cultivado é a segunda hortaliça cujo fruto, comercializado na forma de fruta fresca, é mais produzido mundialmente (FAO, 2018). A produção mundial, em 2016, superou 31 milhões de toneladas, tendo a China como principal país produtor, correspondendo um pouco mais da metade da produção mundial (FAO, 2018). No Brasil, o agronegócio do melão se concentra na região nordestina devido ao processo de adaptação da cucurbitácea às condições edafoclimáticas semiáridas associado ao sistema logístico de produção e rotas estratégicas de exportação.

Embora os melões nacionais possuam frutos de qualidade, com boa conservação no pós-colheita, sendo economicamente competitivos no mercado internacional, a maioria dos melões comercializados (híbridos simples) não é de origem brasileira, apresentando problemas de adaptação que ainda não foram completamente contornados, como a resistência às pragas e doenças (ARAGÃO, 2011). A mosca-minadora, *Liriomyza* spp., tornou-se a principal praga da cultura em virtude de fatores relacionados à intensa produção de melão durante o ano inteiro, o rápido ciclo da cultura e uso indiscriminado de defensivos (GUIMARÃES *et al.*, 2009b). Esses fatores contribuíram para aumentar a severidade do ataque do inseto atingindo um determinado nível de dano econômico.

Devido ao Nordeste ser a maior região produtora de melão no país e a mosca-minadora a praga-chave da cultura, torna-se necessário buscar métodos promissores para o controle do inseto. Alternativas de controle no manejo integrado vêm sendo utilizadas nas áreas produtoras de melão a fim de aumentar a mortalidade da praga e minimizar os prejuízos econômicos aos produtores. Dentre as estratégias de controle, a resistências de plantas é considerada a mais promissora e sustentável, uma vez o caráter genético de resistência mantém os danos causados pela praga inferiores aos custos de seu controle, sem prejudicar o ambiente (PICANÇO, 2007).

Para que o uso de genótipos resistentes seja eficiente no controle da mosca-minadora é necessário dispor de cultivares resistentes no mercado interno. A caracterização e avaliação de germoplasma visando identificação de fontes resistentes à *Liriomyza* spp. consiste nas etapas iniciais para introgressão da resistência nessas cultivares. Entretanto, poucos genótipos resistentes foram identificados, seja pela baixa disponibilidade de fontes resistentes, seja pela dificuldade de avaliação diante do grande número de acessos conservados em diferentes germoplasma.

Dentre os genótipos de meloeiro resistentes à mosca-minadora, a linhagem

Nantais Oblong (Charentais) foi identificada com resistência por antibiose à *Liriomyza trifolii*, cuja resistência é controlada por um gene com dominância completa (*Lt*) (DOGIMONT *et al.*, 1999). Com relação à *L. sativae*, acessos provenientes da África (PI 282448) e Índia (PI 313970) também foram identificados como resistentes, sendo a resistência monogênica recessiva para o acesso africano e de dominância incompleta para o indiano (KENNEDY *et al.*, 1978).

No Brasil, o programa de melhoramento da Embrapa vem desenvolvendo estudos relacionados à resistência genética de meloeiro à *L. sativae*. Em avaliações de germoplasma, dois acessos, CNPH00-915(R) e BAGMEL 56(R), foram identificados como resistentes ao inseto, pois ocasionam letalidade larval após alimentação no mesófilo foliar, reduzindo, conseqüentemente, populações da praga. Cada genótipo originou uma linhagem resistente à mosca-minadora por meio do método de melhoramento genealógico (CELIN *et al.*, 2017a), contudo, para utilização dessas linhagens como genótipos resistentes em programas de melhoramento do meloeiro o controle genético do caráter de interesse deve ser elucidado.

A partir da fenotipagem de indivíduos segregantes obtidos das linhagens resistentes e do estudo de herança genético será possível a realização de outras pesquisas envolvendo, por exemplo, associação de marcadores moleculares aos genes de resistência e introgressão desses alelos de resistência em linhagens-elite de meloeiro. Portanto, objetivou-se estudar a herança genética da resistência à *L. sativae* na linhagem A915.34.01.08, oriunda do acesso CNPH00-915(R) e caracterizar fenotipicamente indivíduos obtidos da linhagem A56.10.04, proveniente do acesso BAGMEL 56-R.

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1 Germoplasma

O programa de melhoramento de melão da Embrapa selecionou novas fontes resistentes à *L. sativae* em 2014. Dentre essas fontes, dois acessos – BAGMEL 56(R) e CNPH00-915(R) – foram identificados com resistência do tipo antibiose, pois interferiam na biologia do inseto (CELIN *et al.*, 2017a). O acesso BAGMEL 56(R) (Charentais, variedade botânica *cantalupensis*) foi proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro (BAGMEL), Embrapa Semiárido, e o acesso CNPH00-915(R) (Gália, variedade botânica *reticulatus*) oriundo do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Melão da Embrapa Hortaliças.

Essas fontes ocasionam morte das larvas logo após o início da alimentação no mesófilo foliar e, conseqüentemente, apresentam minas menores que um centímetro de comprimento, sendo caracterizadas fenotipicamente como resistentes. Entretanto, os acessos encontram-se em heretozigose para a resistência, por isso, populações segregantes de cada acesso foram submetidas a ensaios realizados sob infestação em gaiola para seleção de indivíduos resistentes (não permitiram o desenvolvimento das larvas até a pupação) e susceptíveis (permitiram o desenvolvimento de pelo menos uma larva até a pupação) à mosca-minadora (CELIN *et al.*, 2017a).

Após o avanço das gerações e sucessivas seleções de indivíduos entre e dentro das famílias, obtiveram-se uma família homozigota resistente e uma família homozigota susceptível de ambos acessos, isto é, com indivíduos de mesmo padrão fenotípico para o caráter de resistência e susceptibilidade, respectivamente. No acesso BAGMEL 56(R) foram autofecundadas três gerações para obtenção de cada família e no acesso CNPH00-915(R) foram avançadas cinco gerações também por autofecundação para a formação de suas famílias. Com o intuito de validar a seleção, a segunda e terceira gerações do acesso BAGMEL 56(R) e a terceira e quarta gerações do acesso CNPH00-915(R) foram avaliadas em campo, sob infestação natural, utilizando a mesma classificação de plantas resistentes e susceptíveis, citada anteriormente.

Como resultado do processo de Melhoramento Genealógico, o acesso BAGMEL 56(R) originou a linhagem resistente A56.10.04 e a linhagem susceptível A56.17; e o acesso CNPH00-915(R) originou as linhagens resistente A915.34.01.08 e susceptível A915.22.26 (CELIN *et al.*, 2017a). Desse modo, foram utilizadas nos experimentos duas linhagens de

meloeiro resistentes – A56.10.04 e A915.34.01.08 – por antibiose à *Liriomyza sativae* e duas linhagens susceptíveis – A56.17 e A915.22.26 – ao inseto.

### **3.2.2 Obtenção e manutenção de mosca-minadora**

Populações de mosca-minadora foram obtidas a partir de coletas de folhas infestadas e de pupas em áreas produtoras de melão (Polo Jaguaribe-Açu) que continham a presença da praga. As mesmas foram criadas em quatro gaiolas individuais (60 cm x 60 cm x 50 cm), aclimatadas em ambiente com fotofase de 12 horas, temperatura (27°C) e umidade relativa (60-70%) controladas.

O feijão de porco (*Canavalia ensiformis* L.) foi utilizado como hospedeiro alternativo para multiplicação e oviposição da mosca-minadora, no intuito de evitar o condicionamento pré-imaginal do inseto. *C. ensiformis* foi multiplicado via propagação de sementes com semeadura em bandejas de poliestireno (72 células) preenchidas pela mistura de arisco e húmus na proporção de 2:1, respectivamente. Ao atingirem o desenvolvimento de duas folhas verdadeiras, os feijões de porco foram transplantados e distribuídos nas gaiolas (contendo adultos de *L. sativae*) para infestação artificial durante o período de 24 horas.

Após as infestações, as plantas foram retiradas das gaiolas e acondicionadas em prateleiras, em torno de cinco dias, para a formação das minas. Depois desse período, as plantas foram suspensas em recipientes plásticos até o desenvolvimento das pupas. A coleta foi feita diariamente com um pincel fino, durante três-quatro dias, e as pupas foram armazenadas em tubos de ensaio. Estes foram vedados com plástico filme e perfurados (micro furos) para entrada de ar e fornecimento de mel durante a emergência dos adultos. Ao emergirem, os adultos foram liberados nas gaiolas permitindo a manutenção de populações de mosca-minadora. Os manejos do feijão de porco e *L. sativae* foram realizados três vezes por semana.

### **3.2.3 Obtenção das populações**

Foram obtidas duas populações (A56 e A915), conduzidas paralelamente, a partir das linhagens descritas no item 2.1. As linhagens A56.10.04 (P<sub>1</sub>) e A56.17 (P<sub>2</sub>), bem como A915.34.01.08 (P<sub>1</sub>) e A915.22.26 (P<sub>2</sub>), usadas como genitores, foram cruzadas formando suas respectivas gerações F<sub>1</sub>. A partir das primeiras gerações filiais, parte das plantas foram

autofecundadas e as demais retrocruzadas com ambos progenitores obtendo as gerações F<sub>2</sub> (F<sub>1</sub> x F<sub>1</sub>) e retrocruzamentos RC<sub>1</sub> (P<sub>1</sub> x F<sub>1</sub>) e RC<sub>2</sub> (P<sub>2</sub> x F<sub>1</sub>), respectivamente.

### 3.2.3.1 *Condução das plantas*

Sementes de cada linhagem foram semeadas em bandejas de polietileno (200 células) preenchidas pela mistura de fibra de coco e substrato comercial na proporção de 1:1, no qual uma semente foi semeada a 1,0 cm de profundidade em cada célula. O transplântio ocorreu no décimo dia após a semeadura com as plântulas transferidas para vasos de polietileno com capacidade de 5,0 litros contendo substrato formado por arisco, esterco bovino curtido e húmus na proporção 8:1:1, respectivamente.

As plantas foram tutoradas utilizando fitilho plástico e a irrigação (automática) foi realizada duas vezes ao dia com fertirrigação três vezes por semana usando solução nutritiva de: 10,0 ml de nitrato de cálcio [Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O] + 10,0 ml de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) + 10,0 ml de fosfato monoamônico purificado [(NH<sub>4</sub>) H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] + 10,0 ml de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) + 10,0 ml de cloreto de potássio (KCl) e 1,0 ml de ferro-EDTA [sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) + Na<sub>2</sub>-EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) + hidróxido de sódio (NaOH)]. A solução foi diluída em uma calda de 10,0 L de água.

### 3.2.3.2 *Hibridação artificial*

Durante a floração foram realizadas polinizações manuais entre os genitores e as gerações de cada população. Para tal, as flores foram protegidas no dia anterior a antese, sendo identificadas pela coloração amarelada das pétalas. Nas flores femininas foram retiradas as pétalas, expondo os aparelhos reprodutores, no quais foram protegidos utilizando cápsulas de gelatina. As hermafroditas foram emasculadas e protegidas do mesmo modo das femininas, enquanto nas masculinas a proteção foi feita (evitar contaminação de pólen) sem retirada das pétalas. O preparo das flores foi realizado no fim da tarde e a polinização feita na manhã do dia seguinte. Após a polinização, as flores foram devidamente identificadas e as cápsulas mantidas por 24 horas a fim de evitar misturas de pólen de outras flores.

### 3.2.3.3 *Obtenção das sementes*

Os frutos foram colhidos em torno de 30 dias após as hibridações e foram identificados com as informações referentes às respectivas etiquetas de cruzamentos. Os mesmos ficaram em repouso à sombra durante 24 horas (aumentar potencial fisiológico/germinação) e, em seguida, foram cortados. As sementes foram retiradas com placenta e mucilagem e armazenadas em copos descartáveis, identificados com as informações dos frutos, por 24 horas, a fim de permitir a fermentação e facilitar o desprendimento das membranas que as envolvem. Após a fermentação, as sementes foram lavadas em peneira de malha fina, em água corrente, para retirada de toda placenta e mucilagem.

Posteriormente, as mesmas foram secadas em papel-toalha durante 24 horas e foram transferidas para sacos de papel, conforme identificação anterior, e foram levadas à estufa com ventilação forçada, a 40°C por mais 24 horas. Retiradas da estufa, foram quantificadas e transferidas para embalagens adequadas, devidamente identificadas. No final do processo, as sementes foram armazenadas em câmara fria a 10°C e 40% de umidade relativa do ar até posterior uso.

### **3.2.4 Local**

O experimento em gaiola foi realizado no Laboratório de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais (LMRGV) da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE.

O ensaio em campo foi conduzido no Campo Experimental de Pacajus-CE, pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical, situado nas coordenadas geográficas: latitude 4°10'S, longitude 38° 27'W e altitude 60 m. O Campo Experimental apresenta clima Tropical Quente Úmido (Aw) segundo a classificação de Köppen e Geiger, com temperatura média anual de 26°C e pluviosidade média anual de 1020 mm (AGUIAR; BARRETO JÚNIO, LIMA, 2004; IPECE, 2016). Possui solo do tipo Argissolo Vermelho-Amarelo (LIMA; OLIVEIRA, AQUINO, 2002).

### **3.2.5 Estudo de herança genética**

Para elucidar a herança genética da resistência da população A915 e validar o controle genético da população A56 à *L. sativae*, a população A915 foi submetida à infestação em gaiola e em campo, e a população A56 apenas submetida à infestação em gaiola, pois o estudo de herança genética foi elucidado.

### 3.2.5.1 Infestação em gaiola

A infestação foi feita em uma gaiola de dimensões 380 cm x 115 cm x 90 cm, revestida com tecido *voil*. As condições de temperatura e luminosidade foram controladas a 27°C durante 24 horas de exposição a luz. Para obtenção das plantas, os genitores e cada geração foram semeados em bandejas de polietileno (200 células) preenchidas pela mistura de fibra de coco e substrato comercial na proporção de 1:1, em que uma semente foi semeada a 1,0 cm de profundidade em cada célula.

O transplântio ocorreu no décimo dia após a semeadura com as plântulas transferidas para vasos de polietileno com capacidade de 0,3 litros contendo substrato formado por areia, substrato comercial e húmus na proporção 3:3:1, respectivamente. As plantas foram transportadas à gaiola aos 23 dias após o plantio, com três folhas totalmente expandidas e distribuídas ao acaso na mesma. Foram utilizadas 25 plantas P<sub>1</sub>; 25 plantas P<sub>2</sub>; 25 plantas F<sub>1</sub>; 163 plantas F<sub>2</sub>; 45 plantas RC<sub>1</sub> e 45 plantas RC<sub>2</sub> da população A56; e 20 plantas P<sub>1</sub>; 21 plantas P<sub>2</sub>; 19 plantas F<sub>1</sub>; 158 plantas F<sub>2</sub>; 45 plantas RC<sub>1</sub> e 39 plantas RC<sub>2</sub> da população A915. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado com seis tratamentos, quatro repetições e tamanho amostral de 328 e 302 plantas, respectivamente.

Foram liberados na gaiola para infestação uma média de oito insetos por planta, com 72 horas de fase adulta, obtidas da criação de populações de mosca-minadora do laboratório LMRGV. Após 24 horas de infestação, as plantas foram retiradas e levadas à casa de vegetação para avaliação. No quarto dia depois da infestação, foi quantificado o número de minas por folha por planta, e nas folhas minadas foram colocados copos plásticos (300 ml) para coleta larval. Do quinto ao décimo dia após a infestação foi acompanhado o desenvolvimento das larvas e um pincel fino foi utilizado na coleta das mesmas, nas quais foram transferidas para tubos de ensaio devidamente identificados e revestidos de plástico filme.

Após o desenvolvimento das larvas, foi quantificado a viabilidade larval (VL) de cada planta:

$$VL (\%) = \frac{\text{Número de pupas}}{\text{Número de minas}} \times 100 \quad (1)$$

As plantas foram classificadas em (CELIN *et al.*, 2017a):

- Resistentes: 0% de viabilidade larval;
- Moderadamente resistentes: 1-25% de viabilidade larval;
- Intermediárias: 26-50% de viabilidade larval;



- Moderadamente susceptíveis: 51-75% de viabilidade larval; e,
- Susceptíveis: 76-100% de viabilidade larval.

O número de pupas e de adultos também foram quantificados e com esses dados foi possível estimar a viabilidade pupal (VP) de cada planta, obtendo informações sobre o ciclo completo de *L. sativae*:

$$VP (\%) = \frac{\text{Número de adultos}}{\text{Número de pupas}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.2.5.2 Infestação em campo

O experimento foi instalado na área experimental com a população A915 e os genitores da população A56, pois a herança genética da mesma já foi elucidada. As linhas de plantio foram cobertas com filme *mulching* no intuito de reduzir competição com plantas daninhas ao redor dos meloeiros e diminuir a evaporação da água do solo. Desse modo, foram transplantadas aos dez dias após a semeadura, 278 plantas (20 plantas P<sub>1</sub>; 20 plantas P<sub>2</sub>; 20 plantas F<sub>1</sub>; 138 plantas F<sub>2</sub>; 40 plantas RC<sub>1</sub> e 40 plantas RC<sub>2</sub>) da população A915 e 40 plantas (20 plantas P<sub>1</sub>; 20 plantas P<sub>2</sub>) da população A56, obtidas conforme descrito o item 2.3.1. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro plantas por repetição, sendo parcelas de tamanhos diferentes.

Adotou-se o espaçamento de 2,0 m entre linhas e 0,4 m entre plantas, totalizando 55 plantas/linha. A irrigação usada foi por gotejamento com adubação (nitrogenada e potássica) semanal via fertirrigação. A fim de avaliar a resistência dos meloeiros ao ataque da mosca-minadora, uma avaliação foi feita durante o estágio de frutificação (41 dias após o transplantio- DAT). Notas subjetivas foram atribuídas a partir da presença de minas nas folhas, adotando-se uma escala de notas de 1 a 5 (OLIVEIRA *et al.*, 2016):

- Nota 1: ausência de minas nas folhas;
- Nota 2: 1-25% de folhas com minas;
- Nota 3: 26-50% de folhas com minas;
- Nota 4: 51-75% de folhas com minas; e,
- Nota 5: 76-100% de folhas com minas.

Além das notas subjetivas, as plantas também foram classificadas como resistentes ou susceptíveis à *L. sativae*. Após a última avaliação, o número de minas nas folhas foi quantificado por meio da coleta da décima folha (do ápice para a base) de três

ramos secundários de cada planta (BRAGA SOBRINHO *et al.*, 2003). A partir dos dados foi estimada a média do número de minas nas folhas em planta adulta.

### 3.2.6 Análises genético-estatísticas

O controle genético da resistência de meloeiro à *L. sativae* foi elucidado por meio da análise de gerações, baseada em estudo genético das médias e das variâncias.

#### 3.2.6.1 Estudo genético das médias

No sistema de análise de gerações, os progenitores ( $P_1$  e  $P_2$ ) e suas gerações derivadas ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$  e  $RC_2$ ) tiveram suas médias expressas por meio dos seguintes componentes genéticos para  $\eta$  locos (MATHER; JINKS, 1974):

$$P_1 = m + a + aa$$

$$P_2 = m - a + aa$$

$$F_1 = m + d + dd$$

$$F_2 = m + \frac{1}{2} d + \frac{1}{4} dd$$

$$RC_1 = m + \frac{1}{2} a + \frac{1}{2} d + \frac{1}{4} aa + \frac{1}{4} ad + \frac{1}{4} dd$$

$$RC_2 = m - \frac{1}{2} a + \frac{1}{2} d + \frac{1}{4} aa - \frac{1}{4} ad + \frac{1}{4} dd$$

Em que,

$m$  = média de todos os possíveis homozigotos dos genes que controlam o caráter;

$a$  = medida dos efeitos aditivos dos genes que controlam o caráter;

$d$  = medida dos desvios de dominância dos genes que controlam o caráter;

$aa$  = medida das interações epistáticas aditiva x aditiva entre dois genes, considerando todos os genes que controlam o caráter;

$ad$  = medida das interações epistáticas aditiva x dominante entre dois genes, considerando todos os genes que controlam o caráter;

$dd$  = medida das interações epistáticas dominante x dominante entre dois genes, considerando todos os genes que controlam o caráter.

Os efeitos foram submetidos ao teste de significância  $t$  em nível de 1% de probabilidade, por meio do programa computacional GENES (CRUZ, 2013).

### 3.2.6.2 Estudo genético das variâncias

A partir da análise das variâncias das gerações foram estimados os seguintes componentes:

a) Variância fenotípica

$$\hat{\sigma}_{f(F2)}^2 = \hat{\sigma}_{F2}^2$$

b) Variância genotípica

$$\hat{\sigma}_{g(F2)}^2 = \hat{\sigma}_{f(F2)}^2 - \hat{\sigma}_{m(F2)}^2$$

c) Variância ambiental (F<sub>2</sub>)

$$\hat{\sigma}_{m(F2)}^2 = \frac{2\hat{\sigma}_{F1}^2 + \hat{\sigma}_{P1}^2 + \hat{\sigma}_{P2}^2}{4}, \hat{\sigma}_{m(RC1)}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{F1}^2 + \hat{\sigma}_{P1}^2}{2} \text{ e } \hat{\sigma}_{m(RC2)}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{F1}^2 + \hat{\sigma}_{P2}^2}{2}$$

d) Variância aditiva:

$$\hat{\sigma}_a^2 = 2\hat{\sigma}_{g(F2)}^2 - [\hat{\sigma}_{g(RC1)}^2 + \hat{\sigma}_{g(RC2)}^2]$$

Onde:

$$\hat{\sigma}_{g(RC1)}^2 = \hat{\sigma}_{f(RC1)}^2 - \hat{\sigma}_{m(RC1)}^2 \text{ e } \hat{\sigma}_{g(RC2)}^2 = \hat{\sigma}_{f(RC2)}^2 - \hat{\sigma}_{m(RC2)}^2$$

e) Variância devido aos desvios de dominância:

$$\hat{\sigma}_d^2 = \hat{\sigma}_{g(F2)}^2 - \hat{\sigma}_a^2$$

Também foram estimados a herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) e restrito ( $h_r^2$ ), grau médio de dominância (GMD), segregação transgressiva e número mínimo de genes envolvido na determinação do caráter ( $\eta$ ):

f) Herdabilidade no sentido amplo

$$h_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_{g(F2)}^2}{\hat{\sigma}_{f(F2)}^2}$$

g) Herdabilidade no sentido restrito

$$h_r^2 = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_{f(F2)}^2}$$

h) Grau médio de dominância (GMD)

$$\text{GMD} = k = \sqrt{\frac{2\hat{\sigma}_d^2}{\hat{\sigma}_a^2}}$$

Para estimar o número de genes que controlam o caráter, considerou-se os pressupostos: a diferença entre dois homozigotos contrastantes para um loco é igual a 2a;

existem  $\eta$  locos contribuindo para a manifestação fenotípica da característica; e  $R$  é a amplitude total (BURTON, 1951).

Logo:

i) Número mínimo de genes envolvido na determinação do caráter ( $\eta$ )

$$\eta = R^2(1 + 0,5k^2) / 8\hat{\sigma}_g^2$$

Em que,

$$R = 2\eta a$$

$a$  = diferença entre os homozigotos

$k$  = grau médio de dominância

$$\hat{\sigma}_g^2 = \hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_d^2 = 1/2\eta a^2 + 1/4\eta d^2$$

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Infestação em gaiola

Analisando os sintomas do ataque da mosca-minadora em ambas populações de meloeiro, identificaram-se diferenças nas médias entre as gerações com relação ao número de minas (Tabela 1). Embora a amplitude tenha sido maior na população A915, os genitores resistentes de ambas as populações se caracterizaram por apresentarem minas pequenas, com menos de um centímetro, não permitindo o desenvolvimento larval (antibiose); e os susceptíveis com maior número e minas maiores, que permitiram o desenvolvimento de pelo menos uma larva até a pupação. Nas demais gerações de ambas as populações os valores do número de minas ficaram entre os valores obtidos pelos genitores contrastantes (Tabela 1).

Quanto à viabilidade larval, observou-se 100% de antibiose letal às larvas em ambos progenitores resistentes (VL = 0%) e esse caráter de resistência foi observado nas gerações F<sub>1</sub>, demonstrando a obtenção de híbridos resistentes (Tabela 1). Na geração F<sub>2</sub>, constatou-se segregação mendeliana na proporção de 3 resistentes:1 susceptível na população A56 ( $\chi^2 = 0,0187$  ns, aceita Ho), validando que o controle genético da resistência à *L. sativae* é governado por um gene com dominância completa (*Ls/lS*) (CELIN *et al.*, 2017b).

Na população A915 se observou segregação diferente das Leis Mendelianas na geração F<sub>2</sub> ( $\chi^2 = 220,94^*$ , rejeita Ho) e nos retrocruzamentos houve maior distribuição das plantas nas demais classes de resistência e susceptibilidade, com amplitude de 0 a 100% de viabilidade larval (Tabela 1). Celin *et al.* (2018) descreveram o processo de obtenção da linhagem A915.34.01.08 e as principais características dessa nova fonte de resistência à *L. sativae*. De acordo com esses autores, em experimentos testando a resistência foi observado que o controle genético da antibiose parece ser dominante e controlado por mais de um gene a partir da segregação da população A915. Por isso, recomendou-se em futuros estudos que uma análise de gerações fosse realizada a fim de elucidar a herança genética da resistência dessa linhagem.

Acessos de meloeiro resistentes por antibiose à *L. sativae* já foram relatados em experimentos realizados em casa de vegetação e campo. Os acessos PI 282448 (África) e PI 313970 (Índia) apresentaram menor número de minas por folha e maior mortalidade larval à mosca-minadora. A partir dos resultados das gerações F<sub>1</sub>, identificou-se resistência

monogênica recessiva para o acesso africano e de dominância incompleta para o indiano à *L. sativae* (KENNEEDY *et al.*, 1978).

Para a variável viabilidade pupal, observou-se que nas gerações relacionadas à resistência (P<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> e RC<sub>1</sub>), a emergência dos adultos foi nula ou mínima, ou seja, além do caráter de resistência ser genético, a antibiose contribui para redução de populações do inseto (Tabela 1), uma vez que não permite o ciclo completo da praga, ocasionando letalidade as larvas (devido a liberação de metabólitos secundários pelas plantas) e, conseqüentemente, a não emergência dos adultos. Além do mais, a introdução dos genótipos resistentes também permitirá a diminuição no uso de inseticidas nas áreas meloeiras, favorecendo um sistema sustentável de produção, maximizando produtividade e qualidade dos frutos em um menor custo de produção.

Nesse contexto, a resistência genética surge como estratégia promissora no controle da mosca-minadora, pois diminui a densidade populacional da praga mantendo os prejuízos econômicos e agrônômicos inferiores aos custos de controle, sendo motivo de buscá-la neste trabalho. Desse modo, torna-se importante a elucidação do controle genético em linhagens resistentes de *C. melo* à *L. sativae* visando a introgressão desses alelos de resistência em linhagens-elite de meloeiro e, subseqüente, em híbridos simples comerciais para que os mesmos possam ser utilizados em programas de manejo integrado da mosca-minadora.

Tabela 1 – Avaliações de populações de meloeiro quanto à resistência à mosca-minadora em ensaios em gaiola e teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) nas segundas gerações filiais à herança genética da resistência

População A56	N° plantas	N° minas	Viabilidade Larval					VL (%)	VP (%)
			R (0%)	MR (1-25%)	I (26-50%)	MS (51-75%)	S (76-100%)		
<b>P1</b>	25	36,2 ± 12,2 a	25	0	0	0	0	0	0
<b>P2</b>	25	68,4 ± 16,6 c	0	0	2	15	7	69,00 ± 12,74	83,26 ± 6,44
<b>F1</b>	25	56,8 ± 18,5 bc	25	0	0	0	0	0	0
<b>F2</b>	163	59,7 ± 25,9 bc	123	0	11	20	9	14,80 ± 27,13	21,65 ± 37,60
<b>RC1</b>	45	45,7 ± 15,9 ab	45	0	0	0	0	0	0
<b>RC2</b>	45	53,1 ± 23,7 bc	24	0	1	12	8	33,19 ± 37,05	40,35 ± 43,87

$\chi^2_{(F2)} = 0,0187^{ns}$ , P = 89,12%

População A915	N° plantas	N° minas	Viabilidade Larval					VL (%)	VP (%)
			R (0%)	MR (1-25%)	I (26-50%)	MS (51-75%)	S (76-100%)		
<b>P1</b>	20	29,8 ± 19,6 a	20	0	0	0	0	0	0
<b>P2</b>	21	92,0 ± 18,7 c	0	0	0	3	18	82,58 ± 7,50	90,48 ± 7,85
<b>F1</b>	19	62,9 ± 20,1 b	19	0	0	0	0	0	0
<b>F2</b>	158	67,8 ± 28,2 b	40	23	18	50	27	41,48 ± 33,43	56,78 ± 38,56
<b>RC1</b>	45	35,0 ± 33,0 a	34	2	6	2	1	10,28 ± 20,98	15,37 ± 29,77
<b>RC2</b>	39	62,9 ± 18,2 b	6	5	1	5	22	61,15 ± 37,78	65,02 ± 37,21

$\chi^2_{(F2)} = 220,94^*$ , P = 0%

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. P1 = genitor resistente; P2 = genitor susceptível; F1 = primeira geração filial; F2 = segunda geração filial; RC1 = retrocruzamento entre P1 e F1; RC2 = retrocruzamento entre P2 e F1; R = resistente; MR = moderadamente resistentes; I = intermediária; MS = moderadamente susceptível; S = susceptível; VL = viabilidade larval; e, VP = viabilidade pupal.

### 3.3.2 Infestação em campo

Avaliando a resistência dos meloeiros na presença natural de populações de *L. sativae*, observou-se diferenças quanto à presença de galerias nas folhas de acordo com a escala de notas subjetivas (Tabela 2). Na população A56 o genitor resistente apresentou ausência ou baixo percentual de folhas minadas, enquanto o susceptível obteve de 1-25% de folhas com minas. Na classificação R/S, de acordo com o Teste exato de Fisher, existiu uma relação significativa entre os genitores e o caráter de resistência, de modo que os indivíduos P<sub>1</sub> tiveram uma prevalência máxima de resistência (100%) em relação aos P<sub>2</sub>, de susceptibilidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliações de populações de meloeiro quanto à resistência à mosca-minadora nas classes de notas subjetivas (valores médios  $\pm$  desvio-padrão) e classificação R (resistente) ou S (susceptível) em ensaios em campo

População A56	N° plantas	Folhas minadas			Valor p
		Notas subjetivas	R n (%)	S n (%)	
<b>P1</b>	20	1,15 $\pm$ 0,37	20 (100,0)	-	<b>&lt;0,001</b>
<b>P2</b>	20	2,1 $\pm$ 0,31	-	20 (100,0)	
População A915	N° plantas	Folhas minadas			Valor p
		Notas subjetivas	R n (%)	S n (%)	
<b>P1</b>	20	1 $\pm$ 0 a	20 (100,0)	0	<b>&lt;0,001</b>
<b>P2</b>	20	2 $\pm$ 0 c	0	20 (100,0)	
<b>F1</b>	20	2 $\pm$ 0,2 c	1 (5,0)	19 (95,0)	
<b>F2</b>	138	1,8 $\pm$ 0,5 bc	35 (25,4)	103 (74,6)	
<b>RC1</b>	40	1,6 $\pm$ 0,5 b	19 (47,5)	21 (52,5)	
<b>RC2</b>	40	2 $\pm$ 0 c	0	40 (100,0)	

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. P1 = genitor resistente; P2 = genitor susceptível; F1 = primeira geração filial; F2 = segunda geração filial; RC1 = retrocruzamento entre P1 e F1; RC2 = retrocruzamento entre P2 e F1.

Para a população A915 houve diferença do percentual de folhas minadas entre as gerações, sendo o progenitor susceptível o que obteve maior número de galerias nas folhas (Tabela 2). A nota 2 atribuída aos indivíduos da F<sub>1</sub> pode estar relacionada ao controle genético da resistência ser quantitativo, pois há a probabilidade de que nem todos os genes que governam o caráter estejam em homozigose (Tabela 2). Contudo, esses genes de resistência podem ser usados na perspectiva de introgressão e de estratégias para aumentar a resistência de cultivares de meloeiro por meio de piramidação de genes (incorporação de vários genes de



resistência no mesmo genótipo) e uso de multilinhas (mistura de linhas puras que diferenciam entre si por terem diferentes genes de resistência a determinada praga) (BESPALHOK; GUERRA, OLIVEIRA, 2016). Na classificação R/S também existiu uma relação de dependência entre as gerações e a resistência e susceptibilidade, de modo que houve predominância de plantas susceptíveis na população A915, com exceção do genitor P<sub>1</sub> que obteve 100% de resistência à *L. sativae*. Esses resultados corroboram para a presença de herança complexa de resistência na linhagem A915.34.01.08, uma vez que foi observado um maior número de plantas susceptíveis nas gerações segregantes. Além do mais, esses resultados também podem ter sido afetados por variações ambientais (climáticas e desequilíbrio nutricional) no qual a população foi exposta, ocasionando um aumento na incidência de plantas expressando sintomas de susceptibilidade.

A média do número de minas nas folhas diagnósticas também foi estimada a fim de associar o caráter de resistência a partir da quantificação de galerias em folhas de plantas adultas. Os genitores da população A56 foram contrastantes para a resistência à *L. sativae*, apresentando diferenças para o número de minas e na população A915 se observou que o número de minas foi próximo entre as gerações, apresentando menor número de minas no genitor resistente e maior número na segunda geração filial, com 1,1 e 3,5 minas/folha, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios  $\pm$  desvio-padrão do número de minas de *Liriomyza sativae* em folhas diagnósticas<sup>1</sup> de meloeiro

População A56	N° plantas	Folhas diagnósticas		
		N° minas		
P1	14	0,24 $\pm$ 0,44		
P2	20	8,35 $\pm$ 4,2		
População A915	N° plantas	Folhas diagnósticas		
		N° minas		
		P1	20	1,1 $\pm$ 1,0 a
		P2	19	3,5 $\pm$ 2,8 bc
		F1	20	2,8 $\pm$ 1,7 abc
		F2	132	3,5 $\pm$ 3,0 c
		RC1	38	1,6 $\pm$ 1,5 ab
RC2	40	2,6 $\pm$ 1,8 abc		

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. P1 = genitor resistente; P2 = genitor susceptível; F1 = primeira geração filial; F2 = segunda geração filial; RC1 = retrocruzamento entre P1 e F1; RC2 = retrocruzamento entre P2 e F1.

<sup>1</sup> Minas de *L. sativae* obtidas da 10ª folha (do ápice para base) de três ramos secundários.

Embrapa Hortaliças foram avaliados quanto aos danos à mosca-minadora. Dos dez híbridos avaliados, dois foram resistentes à *L. huidobrensis* por apresentarem menor número de minas nas folhas amostrais coletadas, 1,0 e 1,8 minas/folha, respectivamente (GUIMARÃES *et al.*, 2009b). Para esses autores, além dos genótipos resistentes, dois híbridos no grupo dos susceptíveis também demonstraram algum mecanismo de resistência ao inseto, pois possuíram diferenças consideráveis quanto ao número de minas, cerca de 8,8 minas/folha (GUIMARÃES *et al.*, 2009b).

### 3.3.3 Análise de gerações

A viabilidade larval foi utilizada para o estudo de herança genética da resistência à *L. sativae* por ser a variável mais relacionada à antibiose da linhagem A915.34.01.08.

#### 3.3.3.1 Estudo genético das médias

A partir do estudo genético das médias foram estimados os parâmetros genéticos no modelo completo. O parâmetro que expressa a média (m) possuiu a maior estimativa e, apenas, os parâmetros média e efeito gênico aditivo (a) foram significativos pelo teste t, ou seja, cada alelo contribui com um pequeno efeito fenotípico, criando efeito cumulativo no caráter da resistência (Tabela 4). O sinal negativo do componente de efeito aditivo demonstrou que o genitor P<sub>1</sub> não foi o genótipo com maior expressão do caráter, para este caso, pois o genitor resistente teve o menor valor no cálculo da viabilidade larval e, consequentemente, menor média, resultando o sinal negativo.

Tabela 4 – Estimativas, variâncias e testes de significância dos efeitos genéticos da resistência à *L. sativae*, no modelo completo, avaliados em população de meloeiro

	PARÂMETROS	ESTIMATIVA	VARIÂNCIA	t
	<b>m</b>	64,37	299,42	3,72**
	<b>a</b>	-41,29	0,67	-50,43**
	<b>d</b>	-27,18	2128,97	-0,58 <sup>ns</sup>
n	<b>aa</b>	-23,08	298,75	-1,33 <sup>ns</sup>
t	<b>ad</b>	-19,2	188,19	-1,40 <sup>ns</sup>
e	<b>dd</b>	-37,2	858,19	-1,27 <sup>ns</sup>

\*\*significativo a 1% de probabilidade; ns – não significativo pelo teste t.

m = média dos possíveis homocigotos; a = efeito aditivo; d = desvio de dominância; aa = epistasia aditiva x aditiva; ad = epistasia aditiva x dominante; e, dd = epistasia dominante x dominante.

Embora os desvios de dominância não tenham sido significativos, o sinal negativo também sugeriu que a dominância ocorreu em direção ao fenótipo da resistência, isto é, ao fenótipo de menor grandeza do caráter (Tabela 4). Para os componentes epistáticos (aa, ad, dd), os mesmos não foram importantes na determinação do caráter de resistência genética à *L. sativae* (Tabela 4).

Pela decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros ajustada se identificou que o efeito gênico aditivo explicou cerca de 99% da variabilidade do caráter-chave, indicando o parâmetro mais importante na determinação da resistência (Tabela 5). Esse efeito genético corrobora para satisfatórios ganhos nos ciclos de seleção e possibilidades de obtenção de homozigotos superiores na geração F<sub>2</sub> (CRUZ; REGAZZI, CARNEIRO, 2004). As interações epistáticas representaram menos que 1% da variabilidade total, ratificando que os componentes epistáticos não estão envolvidos no caráter de resistência à mosca-minadora (Tabela 5).

Tabela 5 – Decomposição não ortogonal da soma de quadrados de parâmetros ajustados para resistência à *L. sativae*, avaliado em população de meloeiro

<b>FV</b>	<b>SQ</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>EFEITO AJUSTADO</b>
<b>m</b>	13,83	0,53	64,37
<b>a</b>	2544,03	99,23	-41,29
<b>d</b>	0,34	0,01	-27,18
<b>aa</b>	1,78	0,06	-23,07
<b>ad</b>	1,95	0,07	-19,16
<b>dd</b>	1,61	0,06	-37,18

m = média dos possíveis homozigotos; a = efeito aditivo; d = desvio de dominância; aa = epistasia aditiva x aditiva; ad = epistasia aditiva x dominante; e, dd = epistasia dominante x dominante.

Identificaram-se que as médias observadas se correlacionaram com as médias esperadas em magnitude ( $r$ ) e determinação ( $R^2$ ) máximas, indicando adequação do modelo completo ao estudo genético das médias, permitindo identificar as causas e magnitudes dos efeitos gênicos que governam o caráter de interesse (Tabela 6). Estes se tornam importantes para direcionar pesquisas envolvendo introdução de alelos favoráveis em híbridos comerciais.

Tabela 6 – Médias observadas e esperadas para as gerações no modelo completo quanto à resistência à *L. sativae*

GERAÇÃO	MÉDIA OBSERVADA	MÉDIA ESPERADA	DESVIO
P1	0,003	0,003	0
P2	82,58	82,58	0
F1	0,003	0,003	0
F2	41,48	41,48	0
RC1	10,27	10,27	0
RC2	61,15	61,15	0

$r$  (média observada, média esperada) = 1,0

$R^2 = 1,0$

P1 = genitor resistente; P2 = genitor susceptível; F1 = primeira geração filial; F2 = segunda geração filial; RC1 = retrocruzamento entre P1 e F1; RC2 = retrocruzamento entre P2 e F1.

### 3.3.3.2 Estudo genético das variâncias

Por meio das análises das variâncias foram estimados os principais parâmetros genéticos: variâncias fenotípica, genotípica e ambiental, herdabilidade, grau médio de dominância, segregação transgressiva e número de genes (Tabela 7). A variância genotípica na geração F<sub>2</sub> foi atribuída, principalmente, aos desvios de dominância (66,75%), fração não herdável do valor genotípico, e variância aditiva, fração herdável (Tabela 7).

Tabela 7 – Estimativas dos parâmetros genéticos de resistência à *L. sativae* avaliados em população de meloeiro

PARÂMETROS	ESTIMATIVA
VARIÂNCIA FENOTÍPICA	1117,52
VARIÂNCIA GENOTÍPICA	1103,45
VARIÂNCIA ADITIVA	366,87
VARIÂNCIA DOMINÂNCIA	736,58
VARIÂNCIA AMBIENTAL (F <sub>2</sub> )	14,07
HERDABILIDADE AMPLA (%)	98,74
HERDABILIDADE RESTRITA (%)	32,83
GMD (Baseado em variâncias)	2,0
GMD (Baseado em médias)	0,99
VALOR MÁXIMO NOS PAIS	94,12
VALOR MÍNIMO NOS PAIS	0
VALOR MÁXIMO NA F <sub>2</sub>	100
VALOR MÍNIMO NA F <sub>2</sub>	0
NÚMERO DE GENES	3,41

As análises das variâncias divergiram dos resultados obtidos pelas análises das médias, em que o efeito aditivo mais contribuiu no caráter da resistência. Essa discordância dos estudos genéticos sugere a existência de desvios de dominância em direções contrárias, pois o sinal positivo indica que a dominância ocorreu em direção ao fenótipo de maior grandeza, o da susceptibilidade. De acordo com Cruz, Regazzi e Carneiro (2004) as estimativas fornecidas pelos estudos genéticos das variâncias devem ser preferidas quanto aos estudos genético das médias, uma vez que nem sempre as médias representam o que realmente está ocorrendo no estudo de herança devido à nulidade dos desvios de sinais opostos.

Observou-se que a variância ambiental em F<sub>2</sub> pouco influenciou na manifestação fenotípica dos indivíduos, uma vez que a variância genotípica predominou nos fenótipos da geração segregante (Tabela 7). Quanto ao parâmetro herdabilidade, 98,74% da variação fenotípica observada foi de natureza genética e 32,83% decorrente de causas genéticas de natureza aditiva (Tabela 7). A herdabilidade permite prever o sucesso com a seleção, pois reflete qual a proporção da variação fenotípica é herdada (RAMALHO *et al.*, 2012). A ocorrência de herdabilidade restrita no caráter de resistência infere boa resposta à seleção nas gerações segregantes, pois quantifica a proporção de natureza aditiva que pode ser herdada na geração seguinte (obtenção de genótipos resistentes), resultando em maior facilidade aos programas de melhoramento.

O grau médio de dominância (GMD) representa a posição relativa do heterozigoto em relação à média dos homozigotos. O GMD baseado em variância indicou interação alélica de sobredominância, no qual o fenótipo do heterozigótico foi superior ao fenótipo dos parentais, para a resistência; e baseado em médias, de dominância parcial, quando o valor fenotípico do heterozigoto se encontra intermediário aos valores fenotípicos dos homozigotos (Tabela 7).

Segregação transgressiva se refere aos indivíduos em gerações segregantes que estão fora do intervalo dos progenitores para o caráter de interesse (WESP *et al.*, 2008). Na resistência ou susceptibilidade, a segregação transgressiva pode indicar presença de herança complexa no qual o caráter é controlado por vários genes de pequeno efeito (HAUTEA *et al.*, 1987). Na variável viabilidade larval, houve presença de indivíduos transgressivos na geração F<sub>2</sub> para valor máximo, ou seja, indivíduos com viabilidade larval maior que o genitor susceptível, sendo inapropriada a seleção desses indivíduos (Tabela 7).

Com relação aos genes que governam a resistência genética à *L. sativae*, quatro genes estão envolvidos no controle, indicando herança oligogênica (Tabela 7). Em meloeiro,

caráter quantitativo de resistência à mosca-minadora não foi relatado anteriormente. Os genótipos resistentes já identificados, por meio de caracterização e avaliação de germoplasma, tratam de herança controlada por um ou dois genes. A exemplo disso, Dogimont *et al.* (1999) elucidaram o controle genético da linhagem Nantais Oblong em que a resistência à *Liriomyza trifolii* é governada por um gene com dominância completa (*Lt*). Para *L. sativae*, a resistência é monogênica recessiva e dominância incompleta nos acessos PI282448 e PI313970, respectivamente (KENNEDY *et al.*, 1978).

Heranças genéticas de resistência a outras pragas e fitopatógenos também foram elucidadas em meloeiro. Um alelo dominante *Vat* (*Virus aphid transmission*) e seis QTLs governam a resistência ao pulgão (*Aphis gossypii*) e outros dois QTLs condicionam resistência à mosca branca (*Bemisia tabaci*) em linhas endogâmicas oriundas do cruzamento entre Védraçais (Charentais) e PI 161375 (acesso coreano resistente à ambos insetos) (BOISSOT *et al.*, 2010). Quanto aos fitopatógenos, Zhang *et al.* (2013) elucidaram a herança da resistência ao oídio (raça 2F) controlada por um gene dominante (Pm-2F). Esses autores associaram marcadores microssatélites a esse gene e identificaram que dois *SSR* (*SSR02734* e *CMBR8*) estão ligados ao loco Pm-2F. Esses microssatélites podem ser utilizados como marcadores universais para a seleção assistida da resistência de meloeiro ao oídio (ZHANG *et al.*, 2013).

A elucidação e compreensão do controle genético de resistência às pragas devem ser conduzidos em programas de melhoramento sob perspectiva de introgressão dos alelos de resistência em híbridos comerciais. Dessa forma, a partir do estudo de herança da resistência da linhagem A915.34.01.08 será possível a transferência desses genes em cultivares que sejam produtivas e com boa qualidade de fruto, uma vez que a linhagem de estudo não apresenta características agronômicas de interesse, como baixas concentrações de sólidos solúveis totais e rachadura dos frutos (*cracking*) durante a maturação (CELIN *et al.*, 2018).

Portanto, a introgressão desses alelos de resistência à *L. sativae* permitirá aos produtores obtenção de cultivares com boas características agronômicas associadas ao caráter de resistência; e ao mercado, melões brasileiros mais competitivos no âmbito nacional e internacional.

### 3.4 Conclusão

A linhagem A915.34.01.08 apresenta herança oligogênica à resistência à *L. sativae*. Os indivíduos caracterizados fenotipicamente à resistência à *L. sativae*, obtidos da linhagem A56.10.04, podem ser utilizados em estudos envolvendo associação de marcadores moleculares ao gene de resistência.

#### 4 MARCADORES SSR ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA GENÉTICA À MOSCA-MINADORA NA LINHAGEM DE MELOEIRO A56.10.04

##### RESUMO

O agronegócio dos melões brasileiros se concentra no semiárido nordestino, proporcionando ao país centenas de toneladas exportadas e gerando milhões em divisas. Problemas fitossanitários são os principais entraves para a produção, sobretudo o ataque da mosca-minadora, *Liriomyza sativae*, principal praga da cultura. O uso de marcadores moleculares associados aos genes de resistência constitui ferramenta eficiente capaz de identificar genótipos resistentes à praga por meio da seleção indireta do caráter-chave, possibilitando, em um menor tempo de avaliação, a introgressão desses alelos em cultivares. Considerando um genótipo de melão Charentais resistente à mosca-minadora, objetivou-se identificar marcadores microssatélites associados à resistência à *L. sativae* na linhagem A56.10.04. Foram avaliados 328 *primers* microssatélites, desenvolvidos para *Cucumis melo* (tipo Amarelo), dos quais 161 foram monomórficos, 163 não amplificaram e quatro apresentaram polimorfismo. Os *primers* polimórficos foram utilizados para genotipar 110 indivíduos na geração segregante F<sub>2</sub>. Dois marcadores SSR (CM321 e CM333) estão associados ao caráter-chave, com nível de significância de 0,1% e 0,01%, respectivamente. Portanto, os microssatélites CM321 e CM333 estão ligados ao gene *Ls* e podem ser utilizados na seleção assistida da resistência do meloeiro tipo Charentais à *Liriomyza sativae*.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*. *Liriomyza sativae*. Microssatélites. Seleção assistida.



## ABSTRACT

The agribusiness of the Brazilian melons is concentrated in the semi-arid Northeast, providing the country with hundreds of tons exported and generating millions in foreign exchange. Phytosanitary problems are the main obstacles to production, especially the attack of the leafminer, *Liriomyza sativae*, the main pest of the melon crop. The use of molecular markers associated with resistance genes is an efficient tool capable of identifying pest-resistant genotypes by means of indirect selection of the important character, allowing, in a shorter evaluation time, the introgression of these alleles in cultivars. Considering a genotype of Charentais melon-resistant, the objective this study was to identify microsatellite markers associated with resistance to *L. sativae* in line A56.10.04. 328 microsatellite primers developed for *Cucumis melo* (Yellow), of which 161 were monomorphic, 163 did not amplify and four presented polymorphism. Polymorphic primers were used to genotype 110 individuals in the F2 segregating generation. Two SSR markers (CM321 and CM333) are associated with the key character, with a significance level of 0,1% and 0,01%, respectively. Therefore, the microsatellites CM321 and CM333 are linked to the Ls gene and can be used in the assisted selection of resistance of the Charentais melon to *Liriomyza sativae*.

**Keywords:** *Cucumis melo*. *Liriomyza sativae*. Microsatellites. Marker-assisted selection.

## 4.1 Introdução

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça que vem se destacando mundialmente por ser economicamente importante e agronomicamente produtiva. No Brasil, o agronegócio do melão se concentra no Nordeste do país proporcionando a exportação de 234 mil toneladas e gerando US\$ 163 milhões em divisas, em 2017 (MDIC, 2018). O desenvolvimento de cultivares mais adaptadas em diferentes ambiente, com frutos de boa qualidade e conservação pós-colheita, e resistentes às principais pragas e doenças são características cada vez mais demandadas nos programas de melhoramento da cucurbitácea visando aumentar a competitividade dos melões brasileiros no cenário internacional.

Problemas fitossanitários estão entre os principais entraves limitantes para a produção de melão, sobretudo o ataque da mosca-minadora, *Liriomyza* spp., principal praga da cultura (GUIMARÃES *et al.*, 2009a). A mosca-minadora apresenta distribuição cosmopolita, cujas as espécies *L. huidobrensis*, *L. sativae* e *L. trifolii* têm ampla disseminação no Brasil e foram relatadas em áreas produtoras meloeiras (GUIMARÃES *et al.*, 2009b). O consumo das larvas no mesófilo foliar ocasiona a formação de minas, reduzindo a área verde e diminuindo a capacidade fotossintética da planta. Conseqüentemente, ocorre perdas na produtividade e qualidade dos frutos devido à redução na concentração de sólidos solúveis totais, tornando os frutos impróprio à comercialização (ARAÚJO *et al.*, 2007).

A fim de minimizar os danos causados pela praga, alternativas promissoras estão cada vez mais sendo buscadas para o controle da mosca-minadora em virtude da diminuição da eficiência dos defensivos químicos (resistência aos inseticidas/poucos princípios ativos registrados) e dos custos de suas aplicações. Dentre essas medidas, o uso de genótipos resistentes constitui a estratégia mais eficiente e sustentável de controle do inseto, no entanto poucas fontes resistentes foram identificadas, como os acessos PI 282448 e PI 313970 resistente à *L. sativae* (KENNEDY *et al.*, 1978), a linhagem Natais Oblong resistente à *L. trifolii* (DOGIMONT *et al.*, 1999) e a linhagem A56.10.04 também resistente à *L. sativae* (CELIN *et al.*, 2017b).

Nos programas de melhoramento vegetal, os genótipos resistentes são geralmente identificados e avaliados com base no fenótipo da planta. Esse processo pode ter eficiência maximizada com o advento de técnicas da biologia molecular, como o uso de marcadores moleculares, constituindo ferramentas eficientes capazes de identificar as fontes resistentes a partir da seleção direta no genótipo do indivíduo, sem necessitar da presença da praga ou sofrer influência do ambiente. Dentre os marcadores moleculares existentes, os

microsatélites ou *SSR* (*Simple Sequence Repeats*) destacam-se pela ampla utilização no melhoramento de meloeiro, em estudos de variabilidade genética (RAGHAMI *et al.*, 2014), avaliação de pureza de sementes (JU-FEN, GUO-BIN; LING, 2009), mapeamento de genes (GONZALO *et al.*, 2005) e resistência às pragas e doenças (BOISSONT *et al.*, 2010; YUSTE-LISBONA *et al.*, 2011).

A amplitude desses marcadores moleculares ao longo de toda cobertura do genoma vegetal, a especificidade para cada cultura, sua natureza polimórfica e codominante, e por apresentarem fácil reprodutibilidade os fazem bastante úteis e desejáveis em estudos envolvendo associação entre marcadores moleculares ao caráter de interesse (BORÉM; CAIXETA, 2006). Além disso, há grande quantidade de microsatélites já desenhados e publicados na comunidade científica para o meloeiro, possibilitando sua maior utilização em diferentes pesquisas da espécie.

Com relação à resistência genética à mosca-minadora, não há relatos de associação de marcadores moleculares ao(s) gene(s) de resistência em meloeiro. A partir dessa associação os marcadores moleculares poderão ser utilizados no processo de introgressão de alelos ou transferência dos genes de resistência em diferentes cultivares, permitindo a seleção indireta do caráter-chave em gerações segregantes (CAIXETA *et al.*, 2016). O intuito é eliminar as limitações da seleção fenotípica, reduzir o tempo de avaliação nas gerações de retrocruzamentos e tornar a seleção mais eficiente se comparada com avaliações via descritores morfológicos.

A identificação de microsatélites associados à resistência à *L. sativae* torna uma etapa fundamental para a seleção assistida por marcadores (SAM). Dessa forma, a SAM possibilita, durante as etapas de seleção, a escolha dos indivíduos que tenham o(s) gene(s) de resistência, diminuindo o tempo de avaliação e os custos relacionados à ensaios em casa de vegetação e campo. Outra vantagem do uso de microsatélites na seleção assistida é a possibilidade de piramidação de alelos de resistência em uma única cultivar ou linhagem-elite, permitindo o desenvolvimento de genótipos com resistência duradoura e de amplo espectro.

Desse modo, a utilização de linhagens resistentes à mosca-minadora bem como a associação de microsatélites ao(s) gene(s) de resistência constituem desafios aos programas de melhoramento de meloeiro visando introgressão da resistência em híbridos comerciais, melhorando a sanidade e qualidade dos frutos. Portanto, objetivou-se identificar marcadores microsatélites associados à resistência genética à *L. sativae* na linhagem A56.10.04, melão tipo Charentais proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro da Embrapa Semiárido.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Germoplasma

A população A56 (genitores, primeira e segunda gerações filiais) foi utilizada na busca por marcadores microssatélites associados à resistência genética à *L. sativae*. As linhagens A56.10.04 (resistente) e A56.17 (susceptível) foram usadas como parentais contrastantes para o caráter de resistência. A linhagem A56.10.04 se caracteriza por apresentar antibiose à mosca-minadora, ocasionando letalidade as larvas e, por conseguinte, formação de minas pequenas, menores que um centímetro de comprimento. Em contraste, a linhagem A56.17 permite o desenvolvimento normal das larvas, possibilitando o ciclo completo do inseto (CELIN *et al.*, 2017a).

Ambas linhagens foram obtidas pelo método de melhoramento genealógico do acesso BAGMEL 56(R), melão tipo Charentais, variedade botânica *cantalupensis*, oriundo do Banco de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Semiárido. Nesse método, plantas resistentes oriundas do acesso foram selecionadas, autofecundadas e colhidas para obtenção da primeira geração. Nessa geração, foram selecionados indivíduos resistentes entre e dentro de famílias, autofecundados e colhidos, formando a segunda geração. O processo foi repetido até a terceira geração obtendo uma família homozigota resistente, ou seja, com indivíduos apresentando o mesmo padrão fenotípico para a resistência.

Em paralelo, também foi conduzido, a partir do acesso BAGMEL 56(R), a seleção de plantas susceptíveis. Foram avançadas três gerações de autofecundação até a obtenção da linhagem susceptível à *L. sativae*. Para validar as seleções, as segundas e terceiras gerações de cada família resistente e susceptível foram avaliadas em campo, sob infestação natural do inseto, no qual as plantas também foram classificadas em resistentes (letalidade larval) ou susceptíveis (sem letalidade larval).

### 4.2.2 Local

A fenotipagem da população A56 foi realizado no Laboratório de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais (LMRGV) da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE.

A extração de DNA, reação de PCR, eletroforese e genotipagem foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical e no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### **4.2.3 Fenotipagem**

As linhagens A56.10.04 (P<sub>1</sub>) e A56.17 (P<sub>2</sub>) descritas no item 2.1 foram utilizadas como genitores contrastantes para resistência. Ambas linhagens foram cruzadas originando a primeira geração filial (F<sub>1</sub>), no qual foi autofecunda para obtenção da segunda geração filial (F<sub>2</sub>). As plantas foram obtidas por hibridação artificial e as sementes de cada geração foram semeadas em bandejas de polietileno (200 células) preenchidas pela mistura de fibra de coco e substrato comercial na proporção de 1:1, em que uma semente de melão foi semeada a 1,0 cm de profundidade. O transplântio ocorreu no décimo dia após a semeadura com as plântulas transferidas para vasos de polietileno (0,3 litros) contendo substrato formado por areia, substrato comercial e húmus na proporção 3:3:1, respectivamente.

A população A56 foi avaliada fenotipicamente à resistência à *L. sativae* a partir do experimento “infestação em gaiola”, no qual as plantas aos 23 dias após o plantio, com três folhas totalmente expandidas, foram infestadas em uma gaiola de dimensões 380 cm x 115 cm x 90 cm, revestida com tecido *voil*. Foram utilizadas 25 plantas P<sub>1</sub>; 25 plantas P<sub>2</sub>; 25 plantas F<sub>1</sub>; 163 plantas F<sub>2</sub>; 45 plantas RC<sub>1</sub> e 45 plantas RC<sub>2</sub> da população A56 sob delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos, quatro repetições e tamanho amostral de 328 plantas. A infestação ocorreu durante um período de 24 horas com liberação de oito insetos adultos de *L. sativae* por planta, obtidos da criação de mosca-minadora do laboratório LMRGV. No quarto dia após a infestação as gerações foram avaliadas fenotipicamente por meio da quantificação do número de minas por folha por planta e da quantificação a viabilidade larval (VL) de cada planta calculada pela razão do número de pupas sobre o número de minas.

A partir do número de minas e do desenvolvimento larval, as plantas de cada geração foram classificadas em resistentes (sem desenvolvimento das larvas até a pupação) ou susceptíveis (com desenvolvimento de pelo menos uma larva até a pupação) à mosca-minadora. Quanto ao cálculo da viabilidade larval, as plantas também foram classificadas em (CELIN *et al.*, 2017a): 1. Resistentes (0% de VL); 2. Moderadamente resistentes (1-25% de VL); 3. Intermediárias (26-50% de VL); 4. Moderadamente susceptíveis (51-75% de VL); e, 5. Susceptíveis (76-100% de VL).

### **4.2.4 Microssatélites associados à resistência genética**

#### **4.2.4.1 Extração de DNA genômico**

A coleta de folhas para extração de DNA foi feita após as avaliações fenotípicas do experimento “infestação em gaiola”. Coletaram-se a quarta, quinta e sexta folhas de cada planta da população A56. Após coletadas, as folhas foram depositadas em envelopes de papel laminado identificados e mantidas em nitrogênio líquido até serem armazenadas em freezer a uma temperatura de -80° C.

O DNA total foi extraído conforme o protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações. As folhas (150 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e foram transferidas para microtubos de 1,5 mL de volume. Aos microtubos, foram adicionados 700 µL de tampão de extração CTAB (2%), PVP (1%) e β-mercaptoetanol (1%). Os mesmos foram homogeneizados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, sendo homogeneizados por inversão dos microtubos a cada 10 minutos. Após esse processo, adicionou-se 600 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1 (v/v), seguido de homogeneização por 5 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes formados foram transferidos para outros microtubos, com adição de 400 µL de isopropanol gelado para precipitação do DNA (formação de pellet). Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 6.000 rpm por 5 min e os sobrenadantes foram descartados, deixando apenas o DNA. Adicionou-se 1 ml de etanol gelado (70%) deixando imerso por 10 minutos para a limpeza dos pellets. O processo foi repetido e, em seguida, o pellet foi novamente lavado com adição de 1 ml de etanol absoluto gelado com imersão de 5 minutos. Em seguir, o etanol foi removido cuidadosamente e os pellets foram secados em capela.

Os DNA extraídos foram quantificados por meio de espectrofotômetro NanoDrop® 2000 e a qualidade do DNA avaliada pela razão A260/A280 nm. Posteriormente, os DNA das amostras foram diluídos para concentração de 3 ng/µL para serem utilizadas em reações de PCR e as quantificações foram feitas em gel de agarose a 1% (coradas com brometo de etídio) para verificação visual dos DNA, usando Lambda DNA (Invitrogen) de concentrações de 3 e 6 ng como comparativo.

#### 4.2.4.2 Genotipagem com marcadores microssatélites

Para a genotipagem da população A56 foi realizado um *screening* entre os parentais (P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>) e a primeira geração filial visando identificação de polimorfismo de DNA entre eles. Para tal, 328 *primers SSR* foram testados, sendo 54 microssatélites desenhados pela Dra. Gláucia Buso (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) a partir de sequências de

DNA de *Cucumis melo* depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e os demais descritos por Ritschel *et al.* (2004) e Ohse (2005) (Anexos A, B e C). Identificados os *primers* polimórficos, os mesmos foram selecionados para genotipagem da segunda geração filial, constituída de 110 indivíduos.

A partir da segregação da geração F<sub>2</sub> foi possível identificar marcadores microssatélites associados ao gene de resistência.

#### 4.2.4.3 Reação de PCR e eletroforese

As reações de amplificação dos DNA vegetais foram feitas via PCR, preparadas em um volume de 13 µL contendo: 9ng de DNA, 0,2 µM de primers (forward e reverse) e mix [2,65 µL de água ultrapura + 0,25 µM de dNTPs + 0,25 ng/mL de BSA + tampão 1x (100 µM Tris-HCl pH 8,3; 500 µM KCl; 0,25 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 µM) + 1,0 U/µL de Taq DNA polimerase]. As amplificações foram realizadas em termociclador com o programa de ciclagem padronizado para: 1. Desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos; 2. 30 ciclos de amplificação formado por (a) Desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto; (b) Anelamento dos *primers* a 56°C por 1 minuto; (c) Amplificação do DNA a 72°C durante 1 min; 3. Extensão final do DNA a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram desnaturados a 94°C por 5 minutos em termociclador. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese vertical (90 W de potência) em gel de poliacrilamida (5%) e APS (10%), e o padrão de peso molecular 10 bp DNA *ladder* (Invitrogen) de foi usado para comparação dos tamanhos dos fragmentos amplificados. Os géis foram corados com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) (CRESTE *et al.*, 2001) e os fragmentos revelados em solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e formaldeído.

#### 4.2.5 Análises estatísticas e genômicas

Os dados fenotípicos da geração F<sub>2</sub>, referente ao ataque da mosca-minadora, foram agrupados nas cinco classes com suas respectivas frequências de acordo com a atribuição de notas de resistência e susceptibilidade à *L. sativae*. Os valores da viabilidade larval (antibiose) de cada geração da população A56 foram submetidas a análise de variância e teste F a 5% de probabilidade. A partir da significância do teste, os tratamentos (gerações) foram agrupados pelo teste de Tukey a fim de separar as gerações quanto à reação ao inseto. Além disso, também se estimou os parâmetros genéticos (variância fenotípica, variância

genotípica, variância ambiental e herdabilidade) visando conhecer a estrutura genética da população. As análises estatísticas foram realizadas no programa computacional GENES (CRUZ, 2013).

A partir dos valores obtidos na genotipagem da geração  $F_2$  o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para testar a segregação dos microssatélites, de acordo com as frequências observadas da classe do marcador para cada loco do marcador, na hipótese nula de segregação 1:2:1 (codominância) para todos marcadores polimórficos. A correção do erro tipo I (rejeitar a hipótese nula quando verdadeira) foi realizada por meio do teste de FDR (*False Discovery Rate*) a um nível de significância de 5%. Os microssatélites que não segregaram conforme as proporções esperadas foram analisados quanto à natureza da distorção (zigótica ou gamética) por meio de dois testes de  $\chi^2$  testando as hipóteses de igualdade das frequências alélicas entre indivíduos homocigotos resistentes e susceptíveis, e de igualdade entre as frequências alélicas observadas e frequências alélicas esperadas sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg, respectivamente (LORIEUX *et al.*, 1995).

As análises de ligação foram estabelecidas usando um LOD score (teste de hipótese de ligação de dois locos) mínimo de 2 e uma fração de recombinação máxima ( $\theta$ ) de 0,35 como parâmetros. As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa por meio da função de Kosambi (1944), na qual converte frequências de recombinação (assumindo a interferência de permutas gênicas em segmentos adjacentes), em unidades de mapa, cM: centiMorgan, em medidas de distâncias para o ordenamento dos *loci*. Conhecidas as frações de recombinação entre cada par de microssatélites, os grupos de ligação foram identificados.

A distâncias genéticas entre cada microssatélite e o gene *Ls* foi então calculada com base na unidade de distância de Kosambi, convertida em cM e para a detecção desse gene, testou-se o método Mapeamento por Marca Simples. As análises genômicas foram realizadas no programa GENES (CRUZ, 2013).

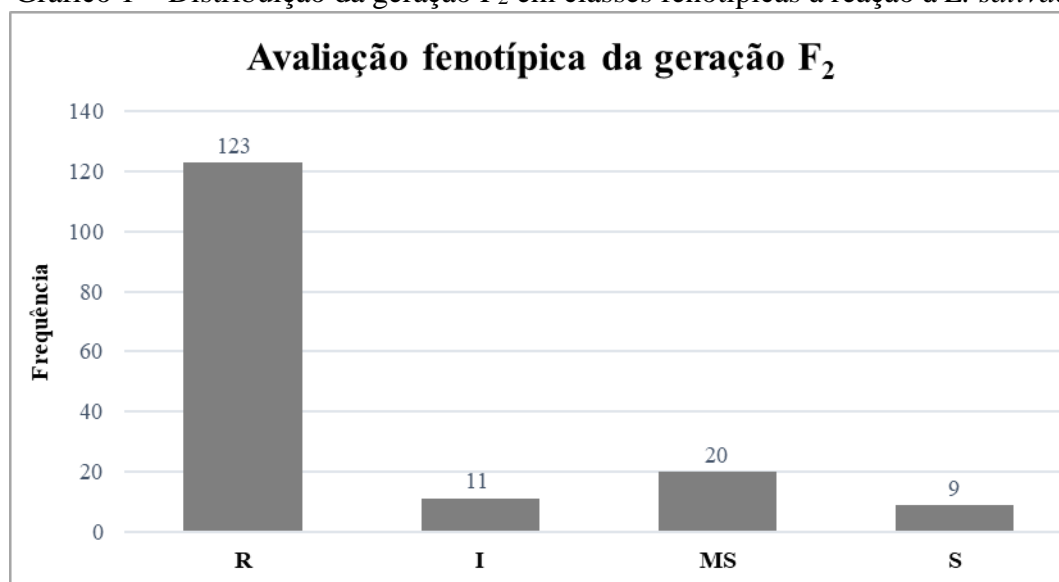


## 4.3 Resultados e Discussão

### 4.3.1 Avaliações fenotípicas

A partir da classificação das plantas no cálculo da viabilidade larval, os indivíduos da geração F<sub>2</sub> foram distribuídos em quatro das cinco categorias (Gráfico 1) de acordo com a escala de nota de resistência e susceptibilidade à *L. sativae* (CELIN *et al.*, 2017a). Observou-se maior número de plantas na classe de resistência ao inseto com 100% de antibiose letal às larvas (R = 0% de VL) e, por conseguinte, ausência de plantas na categoria de moderadamente resistente (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição da geração F<sub>2</sub> em classes fenotípicas à reação à *L. sativae*



% de VL); MS = moderadamente resistente (1-25% de VL); I = intermediário (26-50% de VL); MS = moderadamente susceptível (51-75% de VL); S = susceptível (76-100% de VL).

Em contraste, 12,3 e 5,5% dos indivíduos foram fenotipados como moderadamente susceptíveis e susceptíveis ao inseto, respectivamente, ou seja, com desenvolvimento das larvas a pupação (Gráfico 1). Como esperado, foi possível observar de acordo com os resultados que a distribuição das classes fenotípicas na geração segregante apesar de ser contínua não é simétrica, mostrando uma inclinação para o lado do fenótipo conferido pelo alelo dominante, uma vez que, conforme CELIN *et al.* (2017b), o controle da resistência à *L. sativae* na linhagem A56.10.04 apresenta herança simples.

De acordo com os valores da viabilidade larval, observaram-se diferenças significativas entre as gerações da população A56 à resistência à mosca-minadora obtidos pelo teste F ( $F = 35,2$ ,  $p < 0,01$ ), indicando variabilidade genética na população para o estudo

de identificação de microssatélites associados ao gene de resistência. Os genitores demonstraram perfil contrastante quanto à viabilidade larval, com todas as plantas apresentando antibiose letal às larvas no parental resistente e média de 69% de desenvolvimento larval a pupação no genitor susceptível (Tabela 8). O caráter de resistência também foi observado nas gerações F<sub>1</sub> e RC<sub>1</sub>, demonstrando a obtenção de híbridos e retrocruzamentos resistentes (Tabela 8).

Tabela 8 – Avaliação fenotípica da população de meloeiro quanto à resistência à *L. sativae*

População A56	Nº plantas	VL (%)
<b>P1</b>	25	0 b
<b>P2</b>	25	69,00 ± 12,74 a
<b>F1</b>	25	0 b
<b>F2</b>	163	14,80 ± 27,13 b
<b>RC1</b>	45	0 b
<b>RC2</b>	45	33,19 ± 37,05 ab

Na estimativa dos parâmetros genéticos, a variância fenotípica na geração F<sub>2</sub> foi atribuída principalmente a variação genotípica referente à fração herdável do caráter de interesse (Tabela 9). A variância ambiental pouco influenciou na manifestação fenotípica dos indivíduos da geração segregante devido à resistência apresentar herança simples.

Tabela 9 – Estimativas dos parâmetros genéticos de resistência à *L. sativae* na população de meloeiro

PARÂMETROS GENÉTICOS	ESTIMATIVA
VARIÂNCIA FENOTÍPICA	444,84
VARIÂNCIA AMBIENTAL	12,65
VARIÂNCIA GENOTÍPICA	432,19
HERDABILIDADE (%)	97,15

Quanto ao parâmetro de herdabilidade (sentido amplo), 97,15% da variação fenotípica observada foi de natureza genética, demonstrando um alto grau de herdabilidade no caráter de resistência (Tabela 9). A ocorrência da herdabilidade permite estimar o ganho com a seleção antes mesmo que ela seja realizada, pois quantifica a proporção de natureza genética que pode ser herdada na geração seguinte, possibilitando escolher o método de seleção mais eficiente para o caráter-chave (RAMALHO *et al.*, 2012).

A partir das avaliações fenotípicas e da estimativa dos principais parâmetros genéticos da população A56 foi possível observar que a linhagem A56.10.04 pode ser usada como fonte promissora de resistência à mosca-minadora em programas de meloeiro, pois a resistência por antibiose ocasiona letalidade larval sendo transmitida nas gerações relacionadas à resistência e, conseqüentemente, reduzindo populações do inseto em áreas produtoras de melão. O caráter de resistência controlado por um gene com dominância completa (herança simples) também contribuirá para essa linhagem ser utilizada como genótipo doador de alelos de resistência em sistemas de retrocruzamentos, facilitando a introgressão em linhagens-elite de meloeiro.

Deste modo, com a fenotipagem da população A56 será possível identificar marcadores microsatélites associados ao gene de resistência à *L. sativae* em linhagem de meloeiro.

#### 4.3.2 Avaliações genotípicas

De um total de 328 *primers* microsatélites testados, 161 foram monomórficos (sem alelos diferentes entre os genitores e a primeira geração filial), 163 não amplificaram e quatro foram polimórficos (Tabela 10). O alto número de *primers* não amplificados pode estar associado aos microsatélites terem sido desenvolvidos a partir de melão do tipo Amarelo e de os mesmos terem sido testados apenas para uma temperatura de anelamento (56°C), não havendo tempo para otimização.

Tabela 10 – Características dos quatro marcadores microsatélites (*SSR*) polimórficos entre os genitores contrastantes e primeira geração filial para a resistência à *L. sativae* em meloeiro

<i>SSR</i>	REFERÊNCIA	SEQUÊNCIAS	TA (°C)
<b>CM321</b>	G. Buso	F-5' GCGTTTTCTCTCTGGTTTCA 3' R-5' CTAAGCCTCGGACTCCTCAA 3'	56°C
<b>CM333</b>	G. Buso	F-5' AGCCTTTATCGGCAAGTCAA 3' R-5' AAACCTCTGATTACCCAAATTCAAAAA 3'	56°C
<b>CM125B</b>	Ritschel <i>et al.</i> , (2004)	F-5' AATCCCCACTTGTTGGTTTG 3' R-5' GCATGTTTTNCAAATATTGTGTGG 3'	56°C
<b>M191</b>	Ohse (2005)	F-5' AACTATCCAAGAAATCCCCACTT 3' R-5' TAATATGTGGAAAGGGAAATGC 3'	56°C

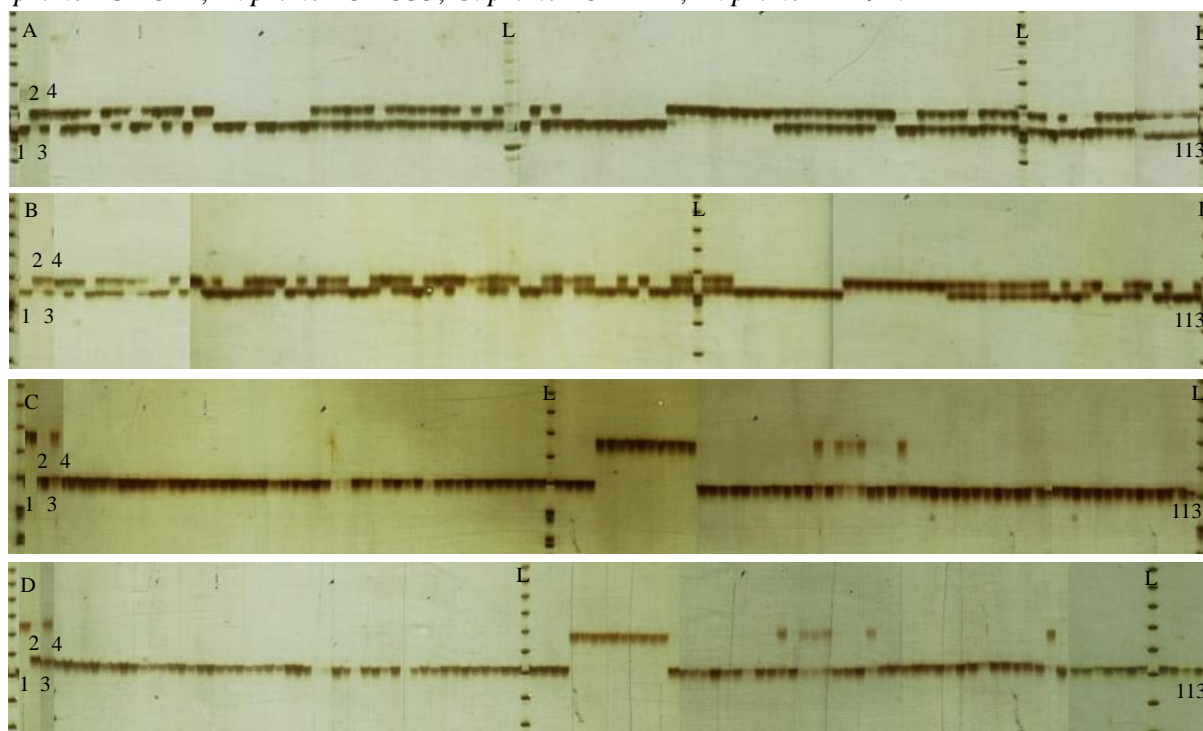
TA = temperatura de anelamento; F = sequência *forward*; R = sequência *reverse*.

O baixo número de microsatélites polimórficos encontrados pode estar relacionado à similaridade genética entre as linhagens usadas como parentais contrastantes,

uma vez que ambas foram provenientes do mesmo acesso, BAGMEL 56(R). Embora a quantidade de polimorfismos tenha sido baixa, o meloeiro apresenta grande diversidade genética sendo considerado a espécie mais polimórfica do gênero *Cucumis*. Essa variabilidade decorrente de caracteres morfológicos e fisiológicos, sobretudo nos frutos, foi estudada a nível molecular por vários pesquisadores que utilizaram diferentes marcadores dominantes e codominantes, resultando na identificação de uma ampla base genética nos germoplasma (STAUB *et al.*, 2000; LUAN, DELANNAY; STAUB *et al.*, 2008; NIMMAKAYALA *et al.*, 2016).

A partir dos *primers* polimórficos foram analisados todos os locos dos indivíduos da geração F<sub>2</sub> (por meio da visualização das bandas) para o teste de segregação dos marcadores microssatélites e associação à resistência genética (Figura 1).

Figura 1 – Genotipagem da população de meloeiro com os microssatélites polimórficos: A. *primer* CM321; B. *primer* CM333; C. *primer* CM12B; D. *primer* M191.



L = marcador de peso molecular Ladder 10pb; 1 = genitor resistente; 2 = genitor susceptível; 3 = primeira geração filial; 4 = primeiro indivíduo da segunda geração filial; e, 113 = centésimo décimo indivíduo da segunda geração filial.

#### 4.3.2.1 Segregação dos microssatélites na geração F<sub>2</sub>

As frequências genotípicas da geração F<sub>2</sub> foram submetidas ao teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade a fim de testar a hipótese nula de que as segregações dos marcadores estavam de acordo com as esperadas. Dentre os quatro marcadores codominantes testados, dois

segregaram na proporção 1:2:1 e dois apresentaram distorções dessa segregação, isto é, com distorções a favor dos indivíduos homozigotos (Tabela 11).

Tabela 11 – Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para frequências genotípicas e probabilidade FRD (%) da segunda geração filial da população de meloeiro A56

SSR	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS			$\chi^2$	FRD (%)	P (%)
	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>			
CM321	35	54	21	3,68 <sup>ns</sup>	16,53 <sup>ns</sup>	15,89
CM333	36	48	26	5,27 <sup>ns</sup>	16,53 <sup>ns</sup>	7,17
CM125B	10	5	95	225,34*	0,0*	0
M191	11	5	94	219,17*	0,0*	0

$\chi^2$ : \*, significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo; Critério FDR: \*valor abaixo do nível crítico especificado a 5%, para segregação esperada de 1:2:1; ns= não significativo (marcadores sem distorções). A<sup>1</sup>A<sup>1</sup> homozigoto resistente; A<sup>1</sup>A<sup>2</sup> heterozigoto; A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> homozigoto susceptível.

Uma explicação para a ocorrência dessas distorções nos microsatélites CM125B e M191 pode estar relacionada a uma distorção dos *loci* de natureza zigótica, uma vez que as frequências alélicas de A<sup>1</sup>A<sup>1</sup> diferiram das frequências alélicas de A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> e a frequência da geração F<sub>2</sub> não foi distribuída de acordo com o esperado sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para ambos marcadores (LORIEUX *et al.*, 1995). Distorções de segregações de marcadores codominantes já foram relatadas para alfafa (DIWAN *et al.*, 2000), melão (RITSCHER *et al.*, 2004), videira (MORA, 2014). Independentemente da natureza, a distorção dos *loci* acarreta em limitações para o uso dos marcadores moleculares em programas de melhoramento.

### 4.3.3 Microsatélites associados à resistência

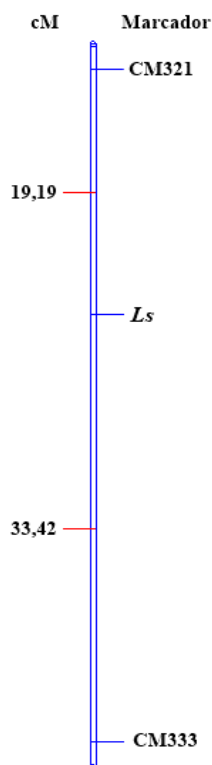
#### 4.3.3.1 Distância genética e mapa de ligação entre os microsatélites e o gene de resistência

Os marcadores microsatélites CM321 e CM333 foram utilizados na análise de ligação ao gene de resistência *Ls*, uma vez que não apresentaram distorções na segregação de codominância. O teste qui-quadrado também foi usado para testar a hipótese de segregação independente de cada marcador molecular ao gene *Ls*. Os valores de  $\chi^2$  para os microsatélites foram: CM321, 3,6 (p>0,05); CM333, 3,6 (p>0,05); e, para o gene, 2,1 (p>0,05). Esses resultados indicaram que a hipótese nula de segregação foi aceita, havendo ligação entre os marcadores *SSR* ao loco de resistência.

Posteriormente, as distâncias entre cada microsatélite e o gene *Ls* foram estimadas pela distância de Kosambi, nos quais os marcadores CM321 e CM333 estão distantes do gene *Ls* a 19,19 e 33,42 cM, respectivamente, e os microsatélites distam entre si

52,61 cM (Figura 2).

Figura 2 – Mapa de ligação genética indicando as distâncias dos microssatélites CM321 e CM333 ao gene de resistência (*Ls*) à *Liriomyza sativae* em meloeiro.



#### 4.3.3.2 Análise de regressão linear

A regressão linear múltipla foi utilizada visando testar se o marcador molecular está vinculado ao gene de resistência à *L. sativae*. Os dados de frequências genotípicas dos microssatélites e as frequências fenotípicas da geração F<sub>2</sub> foram utilizadas nos cálculos de associação. A identificação foi realizada a partir dos marcadores *SSR* que obtiveram valores significativos de F, aceitando a hipótese alternativa de associação do microssatélite ao gene de resistência *Ls* (Tabela 12).

Tabela 12 – Grupos de ligação e estimativa dos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) dos marcadores microssatélites associados à resistência à *L. sativae* em meloeiro

<i>SSR</i>	GRUPOS DE LIGAÇÃO	Prob (F)	R <sup>2</sup> (%)
<b>CM321</b>	1	0,002**	29,27
<b>CM333</b>	1	0,005**	14,68
<b>CM125B</b>	2	0,131 <sup>ns</sup>	3,77
<b>M191</b>	2	0,112 <sup>ns</sup>	4,02

\*\* significativo a 1%; ns = não significativo.

Os microssatélites foram localizados em dois grupos de ligação, cada um com dois marcadores, sendo os marcadores CM321 e CM333 os que mais explicaram a resistência à *L. sativae*, com coeficientes de determinação aproximado de 30 e 15%, respectivamente (tabela 12). Por outro lado, os marcadores CM125B e M191 demonstraram estarem distantes do gene *Ls*. Mesmo os valores dos coeficientes de determinação não serem tão altos, eles estão próximos aos encontrados por outros autores ao associarem microssatélites à resistência de meloeiro à determinadas doenças.

O acesso de meloeiro, PI 414723, única fonte de resistência comercial relatada ao vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) foi avaliado a fim de identificar a localização do gene de resistência (*Zym-2*) por meio da análise de ligação entre o gene e os microssatélites. A regressão linear simples indicou a ligação de dois SSR (MU6549 e CMBR55) ao gene *Zym-2*, no qual 16 e 19% da variação observada entre as classes genotípicas foi explicada por essas ligações (BIBIANO, 2016). Albuquerque (2014) também identificou dois microssatélites (CMBR139 e CMMS 22-2) com coeficientes de determinação explicando 16,40 e 10,18%, respectivamente, da variação fenotípica à resistência ao oídio (*Pseudoperonospora cubensis*) na população F<sub>2:3</sub> oriunda do acesso de meloeiro resistente MR-1 e a cultivar susceptível Védraçais (ALBUQUERQUE, 2014).

A partir desse estudo foram identificados marcadores microssatélites associados ao gene de resistência à *L. sativae* em meloeiro. Essas associações são fundamentais para subsidiar programas de melhoramento da espécie, uma vez que a presença da mosca-minadora em áreas meloeiras é um dos principais fatores bióticos responsáveis pelas perdas na produtividade e qualidade dos frutos. Além disso, a associação dos microssatélites ao gene que controla o caráter-chave poderá auxiliar o processo de seleção de plantas resistentes em avaliações de populações segregantes em um menor intervalo de tempo, sem necessitar da presença da praga ou sofrer influência do ambiente, tornando os marcadores moleculares mais vantajosos quando comparados com as avaliações via descritores morfológicos.

A identificação dos marcadores CM321 e CM333 associados à resistência à *L. sativae* também possibilitará o uso desses microssatélites na seleção assistida por marcadores, constituindo como ferramenta útil aos programas de melhoramento visando introgressão de alelos resistentes em híbridos de meloeiro. Dessa forma, o processo de introgressão do gene *Ls* poderá ser monitorado de forma mais rápida e eficiente, reduzindo o tempo de avaliação nas gerações de retrocruzamentos e diminuindo os custos dos ensaios.

Portanto, a partir das avaliações fenotípicas e genotípicas desse estudo foi possível identificar os primeiros marcadores moleculares associados ao gene de resistência à *L. sativae*

na linhagem de meloeiro A56.10.04. Esses resultados auxiliarão outras pesquisas relacionadas ao melhoramento da espécie visando a escolha do método mais vantajoso e eficiente para introgressão do gene *Ls* em linhagens-elite de meloeiro.

#### **4.4 Conclusão**

Os microssatélites CM321 e CM333 estão ligados ao gene *Ls* e estão a uma distância genética de 19,19 e 33,42 cM, respectivamente.



## 5 CONCLUSÃO GERAL

A linhagem A915.34.01.08 apresenta herança oligogênica à resistência à *L. sativae*, podendo ser utilizada na introgressão dos alelos de resistência em linhagens-elite de meloeiro.

Os microssatélites CM321 e CM333 estão ligados ao gene *Ls* e podem ser usados na seleção assistida à mosca-minadora no programa de melhoramento genético de meloeiro.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Maria de Jesus Nogueira; BARRETO JÚNIO, José Hugo Cavalcante; LIMA, Manoel Wellington. **Dados climatológicos**: estação de Pacajus, 2003. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 16 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, 85).
- ALBUQUERQUE, Leidiane Bezerra. **Reação de acessos e cultivares de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis* e identificação de *Quantitative Trait Loci* de resistência do meloeiro ao míldio**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2014.
- ALZATE-MARIN, A. N. *et al.* Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, 2005.
- ANGELLOTI, Francislene; COSTA, Nivaldo Duarte. **Sistema de Produção de Melão**. Embrapa Semiárido: Sistemas de Produção, 5. Versão Eletrônica, 2010. Disponível em: <[http://www.cpsa.embrapa.br:8080/sistema\\_producao/spmelao/clima.html](http://www.cpsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spmelao/clima.html)>. Acesso em: 27 fev. 2018.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. **Brazilian Fruit Yearbook**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017. 49 p.
- ARAGÃO, Fernando Antonio Souza de. **Divergência genética de acessos e interação genótipo x ambiente de famílias de meloeiro**. 2010. 107 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.
- ARAÚJO, E.L. *et al.* Mosca-minadora associada à cultura do meloeiro no semiárido do Rio Grande do Norte. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n.3, p.210-212, 2007.
- ARAÚJO, Vilma Félix da Silva; CAMPOS, Domingos Fernandes. A Cadeia Logística do Melão Produzido no Agropolo Fruticultor Mossoró/Açu. **Documentos Técnico-Científicos do Banco do Nordeste**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 506-530, 2011.
- ARAÚJO, E.L. *et al.* Biological aspects of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on melon (*Cucumis melo* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, p. 579-582, 2013.
- BERNAYS, Elizabeth; CHAPMAN, Reginald. **Host-plant selection by phytophagous insects**. 1. ed. New York: Chapman & Hall, 1994.
- BESPALHOK João Carlos; GUERRA, Edson Peres; OLIVEIRA, Ricardo. Melhoramento para resistência a doenças. In: BESPALHOK F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. (Org). **Melhoramento de plantas**. 2016. p. 11-18. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%2016.pdf>> Acesso em: 10 jul. 2018.
- BIBIANO, Lílian Beatriz Januário. **Análise de ligação do gene de resistência *Zym-2* com marcadores microssatélites e reação de acessos de meloeiro ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)**. 2016. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Pró-Reitoria de Pesquisa

Pós-Graduação, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

BOIÇA JÚNIOR, A.L. *et al.* A defesa das plantas ao ataque dos insetos. *In: BUSOLI, A.C. et al.* (Ed). **Tópicos em Entomologia Agrícola VIII**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandelme, 2015. p. 162-179.

BOISSOT, N. *et al.* Mapping and validation of QTLs for resistance to aphids and whiteflies in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 121, p. 9-20, 2010.

BORÉM; Aluízio; CAIXETA, Eveline Teixeira. **Marcadores moleculares**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2006.

BOWLES, Dianna. Defense related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.

BRAGA SOBRINHO, R. *et al.* **Monitoramento de pragas na produção integrada de meloeiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 25 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, 69).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Áreas Livres de Pragas: Áreas livres de *Anastrepha grandis***. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/vegetal/Importacao/Requisitos%20Sanit%C3%A1rios/Rela%C3%A7%C3%A3o%20de%20Pragas/pragasvegetaisv1.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Importacao/Requisitos%20Sanit%C3%A1rios/Rela%C3%A7%C3%A3o%20de%20Pragas/pragasvegetaisv1.pdf)>. Acesso em: 10 ago. 2018.

BRASIL, A. M. S. *et al.* Representatividade do custo de controle da mosca minadora na produção de melão: um estudo de caso na empresa Santa Júlia Agro Comercial Exportadora de Frutas Tropicais Ltda. **Custos e agronegócio**, Recife, v. 8, p. 42-58, 2012.

BUENO, Luiz Carlo de Souza; MENDES, Antônio Nascimento Guimarães; CARVALHO, Samul Pereira de. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

BURTON, Glenn; PLAIN, Georgia Coastal. Quantitative inheritance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Agronomy Journal**, Madison, v. 43, p. 409-417, 1951.

BUSO, G. S. C. *et al.* Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais Tropicais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 30, p.46-50, 2003.

CAIXETA, E. T. *et al.* Tipos de Marcadores Moleculares. *In: BORÉM, Aluízio.; CAIXETA, Eveline Teixeira* (Ed.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 9-93.

CÂMARA, M. J. T. *et al.* Produção e qualidade de melão amarelo influenciado por coberturas do solo e lâminas de irrigação no período chuvoso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 58-63, 2007.

CAMARGO, Cleyton Florêncio; SILVA, Paulo Roberto Queiroz. **Aplicação das técnicas de pcr e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular**. 2011. Disponível em: < <http://>

ODE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf> Acesso em: 26 jan. 2018.

CARNEIRO, Flávia Fernandes. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e uso do retrocruzamentos assistido por marcadores microsatélites**. 2009. 85p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARVALHO, N. *et al.* Analysis of genetic variability of commercial melon cultivars using SSR molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v. 16, n. 3, 2017.

CELIN, E.F. *et al.* Agronegócio brasileiro do melão na última década. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53., 2014, Palmas. **Anais...** Palmas: ABH, 2014. p. 246-253.

CELIN, E.F. *et al.* New sources of resistance to leafminers (*Liriomyza sativae*) in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v. 16, n. 2, 2017a.

CELIN, E.F. *et al.* Simple genetic inheritance conditions resistance to *Liriomyza sativae* in melon. **Euphytica**, Wageningen, v. 213, n. 101, 2017b.

CELIN, E.F. *et al.* A915.34.01.08 – melon line resistant to leafminer (*Liriomyza sativae*). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 18, p. 215-220, 2018.

CHRISPIM, Tatiane Parizotto; RAMOS, Juliana Mistrioni. Revisão de literatura: resistência de plantas a insetos. **Revista científica eletrônica de engenharia florestal**, Garça, v. 10, 2007.

COSTA, José Maria da. **Novas fontes de resistência em meloeiro a *Liriomyza sativae*, *Acidovorax avenae* e *Alternaria* spp.** 2017. 80f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

COSTA-LIMA, Tiago Cardoso da.; GEREMIAS, Leandro Delalibera; PARRA, José Roberto Postali. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar no desenvolvimento de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) em *Vigna unguiculata*. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 6, p.727-733, 2009.

COSTA-LIMA, Tiago Cardoso da.; GEREMIAS, Leandro Delalibera; PARRA, José Roberto Postali. Reproductive activity and survivorship of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) at different temperatures and relative humidity levels. **Environmental Entomology**, Anápolis, v. 39, p. 195-201, 2010.

COSTA-LIMA, Tiago Cardoso da.; SILVA, Alessandra de Carvalho; PARRA, José Roberto Postali. **Moscas-minadoras do gênero *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae): aspectos taxonômicos e biologia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015. 36p. (Embrapa Semiárido, Documentos, 268).

CRESTE, S. *et al.* Detection of Single Sequence Repeats Polymorphisms in Denaturing

Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, n. 19, p. 299-306, 2001.

CRISÓSTOMO, José Ribeiro; ARAGÃO, Fernando Antonio Souza. Melhoramento genético do meloeiro. *In*: VIDAL NETO, Francisco das Chagas; CAVALCANTI, José Jaime Vasconcelos (Ed.). **Melhoramento Genético de Plantas para no Nordeste**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 209-246.

CRUZ, Cosme Damião; REGAZZI, Adair José; CARNEIRO, Pedro Crescêncio Souza. **Modelos Biométricos aplicados ao Melhoramento Genético**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2004.

CRUZ, Cosme Damião. **Princípios de Genética Quantitativa**. 1. ed. 2. reimpressão. Viçosa: UFV, 2012.

CRUZ, Cosme Damião. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DEKKERS Jack C.M.; HOSPITAL, Frédéric. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 3, p. 22-32, 2002.

DEQUECH, S.T.B. *et al.* Inseticidas botânicos sobre *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (*Diptera: Agromyzidae*) e seus parasitoides em feijão-de-vagem cultivado em estufa. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 37-43, 2010.

DIWAN, N. *et al.* Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfafa. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 101, p. 165-172, 2000.

DOGIMONT, C. *et al.* One dominant gene conferring the resistance to the leafminer, *Liriomyza trifolii* (Burgess) Diptera: Agromyzidae in melon (*Cucumis melo* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 105, n. 1, p. 63-67, 1999.

DOYLE, Jeff; DOYLE, Jessica Leigh. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Aurora, v.12, p.13-15, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS. **Faostat**. 2016. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/> > Acesso em: 28 jan. 2018.

FERNANDES, Odair Aparecido. Melão: campo minado. **Cultivar: hortaliças e frutas**, Pelotas, v. 4, n. 23, p. 26-27, 2003.

FERREIRA, Márcio Elias; GRATTAPAGLIA, Dario. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998.

FONTES, Paulo Cezar Rezende; PUIATTI, Mário. Cultura do Melão. *In*: FONTES, Paulo Cezar Rezende (Ed). **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 2005. p. 407-428.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia Agrícola**. 10. vol. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GONZALO, M.J. *et al.* Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of

melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 110, p. 802–811, 2005.

GUIMARÃES, J.A. *et al.* **Recomendações Técnicas para o Manejo da Mosca-Minadora no Meloeiro**. Brasília: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 6p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 107).

GUIMARÃES, C.T. *et al.* Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 24-33, 2009a.

GUIMARÃES, J.A. *et al.* **Avaliação da resistência de híbridos de melão tipo amarelo à mosca-minadora *Liriomyza* spp.** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009b. 16p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 54).

GUIMARÃES, J. A. *et al.* **Biologia e Manejo de Mosca Minadora no Meloeiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009c. 9p. (Circular Técnica, 77).

GUPTA, P.K. *et al.* Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, Bengaluru, v. 70, p. 45-54, 1996.

HALDHAR, S.M. *et al.* Allelochemical resistance traits of muskmelon (*Cucumis melo*) against the fruit fly (*Bactrocera cucurbitae*) in a hot arid region of India. **Phytoparasitica**, Jerusalém, v. 41, p.473-481. 2013.

HAUTEA, R.A. *et al.* Inheritance of partial resistance to powdery mildew in spring wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, n. 73, p. 609-615, 1987.

HERNÁNDEZ, Ricardo; HARRIS, Marvin; TONG XIAN, Liu. Impact of insecticides on parasitoids of the leafminer, *Liriomyza trifolii*, in pepper in south Texas. **Journal of Insect Science**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2011.

HIDRAYANI, P. *et al.* Pesticide applications on Java potato fields are ineffective in controlling leafminers, and have antagonistic effects on natural enemies of leafminers. **International Journal of Pest Management**, Londres, v. 51, n.2, p. 181-187, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. 2016. Disponível em:<  
<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612#resultado>> Acesso em: 28 jan. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola- LSPA**. 2017. Disponível em:<  
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>  
> Acesso em: 28 jan. 2018.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ. **Perfil Básico Municipal 2016-Pacaju**. Fortaleza: IPCE, 2016.

JU-FEN, Li; GUO-BIN, Ma; LING, Xu. SSR markers for identification of purity of melon hybrids. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v. 5, p. 223-229, 2009.

- KENNEDY, G.G. *et al.* Leaf resistance in muskmelon. **American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 103, n. 5, p. 571-574, 1978.
- KOGAN, Marcos; ORTMAN, Eldon. Antixenosis – A new term proposed to define Painter’s “non-preference” modality of resistance. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Anápolis, v. 24, p. 175-176, 1978.
- KOSAMBI, Damodar Dharmananda. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugene**, Eugene, v. 12, p. 172-175, 1944.
- LARA, Fernando Mesquita. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991.
- LIMA, Antônio Agostinho Cavalcanti; OLIVEIRA, Francisco Nelsieudes Sombra; AQUINO, Antonio Renes Lins. Classificação e Aptidão Agrícola dos Solos do Campo Experimental de Pacajus, Ceará, **para a Agricultura**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 20 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, 53).
- LIMA, M.F. *et al.* **O ‘Amarelão’ do Melão: incidência e epidemiologia em áreas produtivas da região Nordeste**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 6 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 58).
- LIMA, Marcos Aurélio Araújo. **Resistência de genótipos de meloeiro à mosca-minadora *Liriomyza sativae* (Blanchard, 1938) (Diptera: Agromyzidae)**. 2012. 120p. Tese (Doutorado em Ciência) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- LIMA, A.C.C. *et al.* Diagnóstico sobre o uso do MIP nas principais áreas produtoras de melão dos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Revista Agroambiente**, Boa Vista, v. 6, n. 2, p. 172-178, 2012.
- LORENZI, H. *et al.* **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.
- LORIEUX, M. *et al.* Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 2. F<sub>2</sub> populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 90, p. 81-89, 1995.
- LUAN, Feishi; DELANNAY, Isabelle; STAUB, Jack E. Chinese melon (*Cucumis melo* L.) diversity analyses provide strategies for germplasm curation, genetic improvement, and evidentiary support of domestication patterns. **Euphytica**, Wageningen, v. 164, p. 445–461, 2008.
- MAIA, Lívia Karla Remígio; LIMA, Reivany Eduardo Morais; LIMA, Joilson Silva. Importância do meloeiro e aspectos relacionados à resistência a *Rhizoctonia solani*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânica, v. 9, n. 17, p. 1609–1622, 2013.
- MATHER, R. Kenneth; JINKS, John L. **Biometrical genetics: The study of continuous variation**. 3. ed. New York: Cornell University Press, 1974.
- SISTEMA DE ANÁLISE DAS INFORMAÇÕES DE COMÉRCIO EXTERIOR VIA

INTERNET DO MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **MDIC (Comex Stat)**. 2018. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>> Acesso em: 24 out. 2018.

MENEZES, J.B. *et al.* Características do melão para exportação. *In*: ALVES, Ricardo Elesbão (Org.). **Melão: pós colheita**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 2000. p.13-22. (Frutas do Brasil, 10).

MILACH, Sandra Cristina Kothe. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. *In*: QUEIROZ, Manoel Abílio de; GOEDERT, Clara Oliveira; RAMOS, Semírames Rabelo Ramalho (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/ Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 26-33.

MORA, Fernando David Sánchez. **Seleção assistida por marcadores moleculares na piramidação de genes de resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Erysiphe necator*) em videira**. 2014. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MORAIS, Alexandre Augusto de; PINHEIRO, José Baldin. Melhoramento para Resistência aos Insetos-Praga. *In*: FRITSCHÉ-NETO, Roberto; BORÉM, Aluízio (Org.). **Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. p. 153-199.

MORAIS, Jair Campos; CARVALHO, Geraldo Andrade. **Integração de Estratégias e Táticas de Manejo**. 2012. Disponível em: <<http://www.den.ufla.br/attachments/article/73/Aula1-mip.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2018.

MOREIRA, S.R. *et al.* **Melão (*Cucumis melo* L.)**. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_3/melao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_3/melao/index.htm)>. Acesso em: 26 fev. 2018.

MOURA, Maria da Conceição Freitas; OLIVEIRA, Ludimilla Carvalho Serafim de; SILVA, Shamyra Georgia de Azevedo. A cultura do melão: uma abordagem acerca da cadeia produtiva no agropólo Mossoró - Assú/RN. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, Tupã, v. 07, n. 07, p. 1068-1084, 2011.

MUNGER, H.M.; ROBINSON, Randall W. Nomenclature of *Cucumis melo* L. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Madison, v. 43, p.43-44, 1991.

NASCIMENTO NETO, J. R *et al.* Formas de aplicação e doses de nitrogênio para o meloeiro amarelo no litoral do Ceará. **Irriga**, Botucatu, v.17, p.364-375, 2012.

NIMMAKAYALA, P. *et al.* Genome-Wide Differentiation of Various Melon Horticultural Groups for Use in GWAS for Fruit Firmness and Construction of a High Resolution Genetic Map. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, artigo 1437, 2016.

NOGUEIRA, Carlos Henrique Feitosa. **Seleção de genótipos de meloeiro resistente à mosca-minadora *Liriomyza sativae* Blanchard (diptera: Agromyzidae)**. 2016. 83p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

NUNES, G.H.S. *et al.* Resistance of melon accessions to leafminer *Liriomyza* spp. (Diptera:



Agromyzidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 746–754, 2013.

NUNES, Elaine Welk Lopes Pereira. **Caracterização de germoplasma, herança e identificação de marcadores SNP associados à resistência a *Podosphaera xanthii* em meloeiro**. 2014. 125f. Doutorado (Tese em Agronomia: Fitotecnia) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2014.

NUNES, E.W.L.P. *et al.* Inheritance of resistance to *Podosphaera xanthii* in melon accessions AM-55 and AC-15. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 1, p. 63-68, 2017.

OHSE, Bruna Jaqueline Guedes. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSRs) para análise genética de melão (*Cucumis melo* L.)**. 2005. 33f. Graduação (Biologia) – Pró-Reitoria de Pesquisa, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

OLIVEIRA, F.I.C. *et al.* Screening of melon genotypes for resistance to vegetable leafminer and your phenotypic correlations with colorimetry. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n.2, p. 1155-1166, 2016.

OLIVEIRA, F.I.C. *et al.* Sistema de produção de melão no polo agrícola Jaguaribe-Açu. *In*: FIGUEIRÊDO, Maria Cléa Brito de; GONDIM, Rubens Sonsol; ARAGÃO, Fernando Antônio Souza (Ed.). **Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. Brasília-DF: Embrapa, 2017. p. 45-76.

PADILHA, LÍlian. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

PAINTER, Reginald. **Insect resistance in crop plants**. New York: The Macmillan Company, 1951.

PAIVA, Waldelice Oliveira de. Melhoramento genético do melão. *In*: QUEIROZ, Manoel Abílio de; GOEDERT, Clara Oliveira; RAMOS, Semírames Rabelo Ramalho (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/ Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 26-33.

PARRELLA, Michael. Biology of *Liriomyza*. **Annual Review of Entomology**, Califórnia, v. 32, p. 201-224, 1987.

PEREIRA, Ricardo Borges; PINHEIRO, Jadir Borges; CARVALHO, Agnaldo Donizete Ferreira. **Identificação e manejo das principais doenças fúngicas do meloeiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2012. 8p. (Circular Técnica 112).

PICANÇO, M.C. *et al.* Controle biológico das principais pragas de hortaliças no Brasil. *In*: ZAMBOLIM, L. *et al.* (Org.). **Manejo integrado de doenças e pragas hortaliças**. Viçosa: Suprema, 2007, p. 505-538.

PITRAT, Michel. Melon (*Cucumis melo* L.). *In*: PROHENS, Jaime; NUEZ, Fernando (Ed.) **Handbook of crop breeding: vegetables I**. New York: Springer, 2008. p. 283-315.

- RAGHAMI, M. *et al.* Genetic diversity among melon accessions from Iran and their relationships with melon germplasm of diverse origins using microsatellite markers. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 300, p. 139–151, 2014.
- RAMALHO, M. A. P. *et al.* **Genética na agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, 2012.
- REIS, Ailton. **Oídio das Cucurbitáceas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 5 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 42).
- RITSCHHEL, Patricia Silva. *et al.* Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BioMed Central Plant Biology**, Londres, v. 4, n. 9, p. 235-246, 2004.
- ROSSETTO, Carlos Jorge. **Resistência de plantas a insetos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1973.
- SAKIYAMA, N.S. *et al.* Plant breeding with marker-assisted selection in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 56-60, 2014.
- SALVO, Adriana; FENOGLIO, María; VIDELA, Mantín. Parasitism of a leafminer in managed versus natural habitats. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, Amsterdam, v. 109, p. 213–20, 2005.
- SCHLOTTERER, Christian. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 109, p. 65-71, 2000.
- SEBASTIAN, P. *et al.* Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, n. 32, 2010.
- SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. **Cultivo de melão: manejo, colheita, pós-colheita e comercialização**. Brasília, 2007. (Coleção SENAR, 131).
- SERAFINI, Luciana Atti; BARROS, Neiva Monteiro de; AZEVEDO, João Lúcio de. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001.
- SERRA, Bruna Danielle Vieira; CAMPOS, Lúcio Antônio de Oliveira. Polinização entomófila de abobrinha, *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 153-159, 2010.
- SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Agrotóxicos registrados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 3 jan. 2018.
- SOUZA, Anete Pereira. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. *In*: NASS, L.L. *et al.* (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 940-965.
- STAUB, J.E. *et al.* Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 115, p. 225–241, 2000.

TEIXEIRA, Ana Paula Matoso, CAMARGO, Luis Eduardo Aranha. A molecular marker linked to the Prv1 gene that confers resistance to Papaya ringspot virus-type W in melon. **Plant Breeding**, Berlim, v. 125, p. 187-190, 2006.

TONG-XANG, Liu. *et al.* Biological control of Liriomyza leafminers: progress and perspective. **CAB Reviews**, Wallingford, v. 4, p.1–16, 2009.

TOPPA, Eder Victor Braganti; JADOSKI, Cléber Junior. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 12, n. 1, p.1-5, 2013.

WESP, Caroline de Lima. *et al.* Herança da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia branca. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33 n. 2, p. 138-147, 2008.

WHITAKER, Thomas Wallace; DAVIS, Glen Norton. **Cucurbits, Botany, Cultivation and utilization**. New York: Interscience Publishorts, 1962.

YANO, Eizi. Recent development of biological control and IPM in greenhouses in Japan. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 7, p. 5–11, 2004.

YOUSEF, Gad; JUVIK, John. Enhancement of seedling emergence in sweet corn by marker assisted backcrossing of beneficial QTL. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 1, p. 96-104, 2002.

YUAN, J. *et al.* Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. **Crop Science**, Madison, v.42, p.271-277, 2002.

YUSTE-LISBONA, F.J. *et al.* Genetic linkage map of melon (*Cucumis melo* L.) and localization of a major QTL for powdery mildew resistance. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 27, p. 181–192, 2011.

ZHANG, C. *et al.* Application of comparative genomics in developing markers tightly linked to the Pm-2F gene for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). **Euphytica**, Wageningen, v.19, p.157–168, 2013.

**ANEXO A – MICROSSATÉLITES DESENHADOS POR PATRÍCIA RITSCHER E COLABORADORES**

CM1A	F 5'-AGATGACCAAACCAAACCCA-3' R 5'-CAACGTTATGGGGATGAAGG-3'	MONO	CM14	F 5'-CCATTCTTTACTCTCTCTGAAACCA-3' R 5'-TCACAATCTCTCCCTACCAAGAA-3'	MONO
CM2A	F 5'-TGCAAATATTGTGAAGGCGA-3' R 5'-AATCCCCACTTGTTGGTTTG-3'	NA	CM15	F 5'-TATGAAGCGCGCATAAACAG-3' R 5'-CGAATGTGAAATCTCTTCTCCC-3'	MONO
CM3	F 5'-TGCAACCGTTACAGAACTGC-3' R 5'-CGAGTCTCATTTTAGAATCTTCTGTT-3'	NA	CM17	F 5'-TACATTATGCCCTGATCCGA-3' R 5'-GTGCCGTTGGCAAAGATACT -3	NA
CM4	F 5'-GCAATCAGGAATGAACAACTCA-3' R 5'-TCTTTTCGTGTTTTTGC GG T-3'	NA	CM18	F 5'-AGATGACCAAACCAAACCCA-3' R 5'-CAACGTTATGTGGATGAAGGG-3'	MONO
CM5	F 5'-AAAGAAAGAAACGCAACTTCG-3' R 5'-TGGGAAAGAAAGAGAATCAAAA-3'	NA	CM19	F 5'-CTTTTGTACCGTGCCACGTC-3' R 5'-TCACCAATGCATTAACTCTTTCA-3'	NA
CM6	F 5'-GCATAGGTCACGTGGGAATAA-3' R 5'-GGGCCCTTTAACTTCTATTCT-3'	NA	CM20	F 5'-CTTTTGTACCGTGCCACGTC-3' R 5'-TCACCAATGCATTAACTCTTTCA-3'	NA
CM7	F 5'-AAAATGAATGGGAGTGCGTG-3' R 5'-GCCTTCCTTTTCACCATCAA-3'	MONO	CM21	F 5'-AGATTCTGGTTGTTGGGCAG-3' R 5'-CAGCGATGATCAACAGAAACA-3'	MONO
CM8	F 5'-TTTCACTTTTTCCCGCCG-3' R 5'-AATGGAAAAGGGAAGTGCAA-3'	MONO	CM22	F 5'-CCAAAACGACCAAATGTTCC-3' R 5'-ATACAGACACGCCTTCCACC-3'	NA
CM9	F 5'-CGGGGGAGAGAAAGAGAGA-3' R 5'-TGGTTTTTCGTTAATACCTTTTGG-3'	NA	CM23	F 5'-TTTAACCCCAGCAGATGACC-3' R 5'-CAACGTTATGGGGATGAAGG-3'	MONO
CM10	F 5'-CCGTTTGGATTCAGGCTAGA-3' R 5'-ACCGTTATCAAGGGTCCAT-3'	NA	CM24	F 5'-TGGGGTTGTCAATACAGCAA-3 R 5'-AAAATGAATGGGAGTGTGTGG'-3	NA
CM11	F 5'-CGTCAAAGATGAACATGGGA-3' R 5'-CCGCCAAGTTATTTTAGGTG-3'	NA	CM25	F 5'- TGGGGTTGTCAATACAGCAA-3' R 5'-GGAGTGC GTGGAATGTACG-3'	MONO
CM12	F 5'-AAACAAACATGGAAATAGCTTTCA-3' R 5'-GCCTTTTGTGATGCTCCAAT-3'	NA	CM26	F 5'-CCAAAAGAAAAACCAAACGA-3' R 5'-ATCACAAGCCTTTGCACTCA-3'	NA
CM13	F 5'-AATTTGTGAAGAAATGGAAGTCA-3' R 5'-TTTGTGATGATGGGTTTTGG-3'	MONO	CM27	F 5'-AAACAAACATGGAAATAGCTTTCA-3' R 5'-TAGTTGGGTGGGCTAAAGGA-3'	NA

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

Continua

CM28	F 5'-ACCAAACCAAACCAAACCAA R 5'-TTCCATAGGATGTGAACCCC-3'	NA	CM41	F 5'-GTACCGCCTAGGGTTTCTCC-3' R 5'-CGAGGAAGAGAGAGAAGGGG-3'	NA
CM29	F 5'-CCTAAAGAAAAACATTTTCAAAGAA-3' R 5'-GCTGTCTGACATGAAGGGGT-3'	NA	CM42	F 5'-AACCAACTTCCATTCCCCTC-3' R 5'-GAGGCACTCATTTTCTCTGAATG-3'	NA
CM30	F 5'-CACTGCATACACACATCCA R 5'-AAAAAGAAGGAGGAGGAGGG-3'	NA	CM43	F 5'-AGAGATGCTCCCTACTGC-3' R 5'-TCAAGCAAACCCTAATCGGT-3'	MONO
CM31	F 5'-AAACAAACCAAACCAAACCG-3' R 5'-AAAAAGAAGCGGGAGTAATGA-3'	MONO	CM44	F 5'-AACAAAGTCTGTGTGTGTGAGA-3' R 5'-ACCATTGAAAGAGGCAGGA-3'	MONO
CM32	F 5'-GAGTGCGTGGAATGTACGTG-3' R 5'-GCCTTCCTTTTACCATAAAA-3'	NA	CM45	F 5'-AATCCATTCTGTATGCCACG-3' R 5'-TTAGTTCGTTGATTGGGATGG-3'	NA
CM33	F 5'-TGATCATCTACTTTTACACCATTCTTT-3' R 5'-TCACAATCTCTCCCTACCAAGA-3'	MONO	CM46	F 5'-CATCCCTTTCTTTCAAACCC-3' R 5'-TCATTTTGATAAACGAGCCAAA-3'	NA
CM34	F 5'-TCTCTTTGTTTCCCTCCCCCT-3' R 5'-GTGGGGCTTGGTTCTTTTG-3'	MONO	CM47	F 5'-ATCCCAACCCATCACTCTCA-3' R 5'-TGGGGACAGGTGAGAATATTAGA-3'	NA
CM35	F 5'-GGGTATTATTTGCCCCACCT-3' R 5'-TGAAGAATAGGGATGAGTGTGAGA-3'	NA	CM48	F 5'-GCGGTGAAATGCGTAGAGAT-3' R 5'-ACGGCTAGGACTACTGGGGT-3'	MONO
CM36	F 5'-TGATTGGTGTCATTTAGCTCAT-3' R 5'-GGGAGAGATTAGGCCAAGTAG-3'	NA	CM49	F 5'-TTTACACAAGAGGACACCG-3' R 5'-GTCGGAAACTTGAAGCCTTG-3'	NA
CM37	F 5'-TCAAGCAAACCCTAATCGGT-3' R 5'-CACTGCATACACACATCCA-3'	NA	CM50	F 5'-TTTACACAAGAGGACACCG-3' R 5'-TCCCCCTCTTTATGCTTTTT-3'	NA
CM38	F 5'-TTTGAACCCTTTCGCCCT-3' R 5'-TGTTTTGTAGAACGAGAGAAAGAGA-3'	NA	CM52	F 5'-CAGCGATGATCAACAGAAACA-3' R 5'-GGCTGACACTCCCTGTACCT-3'	MONO
CM39	F 5'-CTGTATTGCCACGTGTCCC-3' R 5'-GGCAAAGAAGAAGGAAGAGTGA-3'	MONO	CM53	F 5'-GCCTTTTGTGATGCTCCAAT-3' R 5'-AAACAAACATGGAAATAGCTTTCA-3'	MONO
CM40	F 5'-CGACAATCACGGGAGAGTTT-3' R 5'-TTGTTGCATCAAACCTAACACAATC-3'	MONO	CM54	F 5'-TCTGAAACCATTGCTTATGGTAA-3' R 5'-TCACAATCTCTCCCTACCCAA-3'	NA

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

Continua

CM55	F 5'-GAGGCCTTTGTGGTTCGTAA-3' R 5'-AAAGAAATGGATAAAGGAAACAGA-3'	NA	CM68	F 5'-CCAAAAGCATCCATAAGGTTTG-3' R 5'-GAACTTTTATGATGAAGGAAGAGGA-3'	NA
CM56	F 5'-ACCCAGCAGATGAACAAAC-3' R 5'-CAACGTTATGGGGATGAAGG-3'	MONO	CM69	F 5'-AGATGACCAAACCAAACCA-3' R 5'-AACGTTATGGGGATGAAGG-3'	MONO
CM57	F 5'-GCTCTGAAGAGTGGAATGAGAGA-3' R 5'-CCATTTGGGAAGTAGGCATC-3'	NA	CM70	F 5'-GGGGAGGCACTCATTTC-3' R 5'-CCTCATTTTCCAAGGATGC-3'	MONO
CM58	F 5'-CAGCGATGATCAACAGAAACA-3' R 5'-TACCATTCAGGGGACACTC-3'	NA	CM71	F 5'-GCATACGACTCTTGAAATCG-3' R 5'-GAATCACGAAGAGAGCTGCAC-3'	MONO
CM59	F 5'-GGGGAGGCACTCATTTC-3' R 5'-AACCAACTTCCATTCCTC-3'	MONO	CM72	F 5'-GGTATTATTGCCCCACCT-3' R 5'-TGAAGAGTAGGGATGAGTGTGAGA-3'	MONO
CM60	F 5'-CATACTACCACGAAACCGTC-3' R 5'-GGGAGAGTGTGAGGTATGTG-3'	NA	CM73	F 5'-TGGCACACTATTTGAGAAGGA-3' R 5'-CCCCTTGCCACTTATCAT-3'	NA
CM61	F 5'-TGACATCCACCCAGACTCAT-3' R 5'-TGTGGTTTTTGTGAGCCAGA-3'	MONO	CM75	F 5'-5'-TCACATGGTGGTGAATGTTTT-3' R 5'-TCCATCTTCTGTTGTGTTAAGATT-3'	NA
CM62	F 5'-GGTATTATTGCCCCACCT-3' R 5'-TGATTAAGAGCAGGGATGTGTG-3'	NA	CM77	F 5'-CGACAATCACGGGAGAGTTT-3' R 5'-TTGTTGCATCAAACAAACAATC-3'	MONO
CM63	F 5'-TAAAAATCGTGGGTTTCAGGG-3' R 5'-CCAAGAGAGTGCGAAGTGAG-3'	NA	CM78	F 5'-AAAATGAATGGGAGTGCGTG-3' R 5'-TTGCCTTCCTGTTCCACATC-3'	MONO
CM64	F 5'-ATACAGCAGATCCACAGGGG-3' R 5'-ATGGGAGTGTGTGGGATGTA-3'	NA	CM79	F 5'-AGTGCGTGGAATGTACGTGA-3' R 5'-TTGCCTTCCTTTTCACCATC-3'	MONO
CM65	F 5'-TTTCCTTATGAGTTAGGGTTTC-3' R 5'-TGAAGAGACTACCATCCCCA-3'	NA	CM81	F 5'-ATTGTGCTACTTTGGGGTGC-3' R 5'-GCCCTGATTCCGGATAGAAT-3'	NA
CM66	F 5'-TCAAGCAAAAACCATAATCAGAA-3' R 5'-TCCCTTTTCATCATTCTCTTCA-3'	NA	CM82	F 5'-ACGACTCTTGAAATCGGTC-3' R 5'-TTTAGAAAAGAATCACGAAGAGAGC-3'	NA
CM67	F 5'-CGACCCCAAAGTGTCAAGAA-3' R 5'-GAGAATCTCCCAAATACACGGA-3'	NA	CM83	F 5'-CGGACAAATCCCTCTCTGAA-3' R 5'-GAACAAGCAGCCAAAGACG-3'	NA

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

Continua

CM84	F 5'-GCGATGATCAACAGAAACAGG-3' R 5'-ACCATTCAGGCTGACACTCC-3'	NA	CM99	F 5'-TGGGTGAGACATCAACATCC-3' R 5'-AGTTTATTTGGCCTCTCCCC-3'	MONO
CM87	F 5'-TCCACCCAGACTCATCTCATC-3' R 5'-TGTGGTTTTTGTGAGCCAGA-3'	NA	CM100	F 5'-GGACCAAACCAAACCCATTA-3' R 5'-ATGGGGATGAAGGGAGAAAG-3'	MONO
CM88	F 5'-CCACTAAAGTTTCCTTATGTTTTGG-3' R 5'-TGGTTGAGGAAGACTACCATCC-3'	NA	CM101	F 5'-GGTATTATTTGCCCCACCT-3' R 5'-CAAAAGGAAAAGATAGGCC-3'	NA
CM89	F 5'-TCATCTCATTCTCATTCTTCTCT-3' R 5'-TGAGGTTTATGAGTGTGTGGTTTT-3'	MONO	CM102	F 5'-GGGAGCCCCTCATTTTCTC-3' R 5'-TTTTCAACCAACATCCACCC-3'	NA
CM90	F 5'-GTACCTCCGCCGTTGATCT-3' R 5'-TGAGATAATAAGAAATCCAACCCA-3'	MONO	CM103	F 5'-TGGTTGAGGAAGACTACCATCC-3' R 5'-TCCACTAAAGTTTCCTTATGTTATGG-3'	NA
CM91	F 5'-AGCGTCATAAGTTGGGCTGT-3' R 5'-TTTTTCACCATTATTATCATCTTCACA-3'	MONO	CM104	F 5'-CAAAAGGAAAAGAAAAAGACCAAA-3' R 5'-GGTATTATTTGCCCCACCT-3'	MONO
CM92	F 5'-CAAACATGGAAATAGCTTTCATT-3' R 5'-GGTGGGCTAAAGGAACTTTC-3'	NA	CM105	F 5'-TGGTAAGCATTTTGAAATCACTTTT-3' R 5'-TTTGTATGGTTGGAGGGGAA-3'	MONO
CM93	F 5'-CCACGTAAAGAACGCTTTGG-3' R 5'-GTCGGAAACTTGAAGCCTTG-3'	MONO	CM106	F 5'-GTACCTCCGCCGTTGATCT-3' R 5'-TGAGATAATAAGAAATCCAACCCA-3'	NA
CM94	F 5'-GGTATTATTTGCCCCACCT-3' R 5'-CCAAAAGGAAAAGAAAAAGCC-3'	NA	CM107	F 5'-TATGAAGCGCGCATAAACAG-3' R 5'-CGAATGTGAAATCTTCTCTCCC-3'	MONO
CM95	F 5'-TTGACCTTTTACGGTGGTCC-3' R 5'-CGGACAAATCCCTCTCTGAA-3'	MONO	CM108	F 5'-TGTATTGCCACCGTGTCC-3' R 5'-GGCAAAGAAGAAGGAAGAGTGA-3'	NA
CM96	F 5'-TCACATGGTGGTGAATGTTTTT-3' R 5'-CAATAAAGGATTTGACAAGATACCC-3'	NA	CM109	F 5'-TGGAATGTACCGTGATGGGT-3' R 5'-ATACAGCAGATCCACAGGGG-3'	MONO
CM97	F 5'-CGACAATCACGGGAGAGTTT-3' R 5'-CATATTAGACCCATATTTGTTGCAT-3'	MONO	CM110	F 5'-GCGTTTATCAACGGAAACTG-3' R 5'-AGATTCTGGTTGTTGGGCAG-3'	NA
CM98	F 5'-ATACAGCAGATCCACAGGGG-3' R 5'-TGAATGGGAGTGTGTGGAAC-3'	NA	CM111	F 5'-TTT TCC TCC ATT TTA NCT TAG CC-3' R 5'-AAG AGA GAAGCCATGGATGAA-3'	MONO

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

Continua

CM112A	F 5'-TGTACT CCACCAGCAAAAACATC-3' R 5'-TGATGCGTGTATGCCTAGAAA-3'	NA	CM119A	F 5'-GGATGAACGTGAAAGGAAAA-3' R 5'-TTGGGTTATCAGCTTGACCC-3'	NA
CM112B	F 5'-ATTGTAGAAACTTCAAAAGCAGCA-3' R 5'-ATCCCAAACAACAACCTTACAGC-3'	NA	CM119B	F 5'-CCTAAAGAAAAACATTTTCAAAGAA-3' R 5'-AAGAAAAAAATGGCAAACACTCC-3'	NA
CM113A	F 5'-TGTTGCTCAGGGCCTCTC-3' R 5'-AGACGTCCGGAGCTAAGTGA-3'	NA	CM120A	F 5'-GGTACAAGGTGACAAGGAAGG-3' R 5'-TGAACCTTGATCTTGGGGTC-3'	MONO
CM113B	F 5'-AGCTTGACCCAACCTGACCC-3' R 5'-TGGATGATTGTGAAGGGAAA-3'	MONO	CM120B	F 5'-CTGGCCCCCTCCTAAACTAA-3' R 5'-CAAAAAGCATCAAATGGTTG-3'	MONO
CM114A	F 5'-CCCTGTACTCCACCAGCAAA-3' R 5'-TGATGCGTGTATGCCTAGAAA-3'	NA	CM121	F 5'-CAGGAAGCAGGATGGGTTTA-3' R 5'-ATGGAGAGCTTTGCCAAAAA-3'	NA
CM114B	F 5'-TGCTTTGCCTTAACCGTCTT-3' R 5'-TGAGTGCCCAAGATGTTGTC-3'	NA	CM122	F 5'-TCA TGGAAACCTGCATCACT-3' R 5'-TGGAGATATAATTTGCTGACACC-3'	NA
CM115A	F 5'-TGTTCTCAGTTGACATATGAAGGG-3' R 5'-GATCATTGTCATCCAGTGGG-3'	MONO	CM123A	F 5'-GGATTGGCTGCTGCTTTTT-3' R 5'-GCTATGCGATGAGATTCCCTATG-3'	MONO
CM115B	F 5'-AGGGTGGAAAGACCCCTATG-3' R 5'-TGTGAATGTATCTTTTCTGATACTGC-3'	MONO	CM123B	F 5'-TCCGAAGTAAACATCAAAGACA-3' R 5'-GGTCAGTCAAGATAGTTACGGTTG-3'	MONO
CM116A	F 5'-ACCTCAAATCTCACCGTTGG-3' R 5'-CTACGGTTCCATTTCCCTGA-3'	MONO	CM124A	F 5'-TTCGCACTCTTTCGAACACTT-3' R 5'-TTTGATGAGCTTGCGTATGA-3'	MONO
CM116B	F 5'-GGGTTTGGGGTTGGTGAC-3' R 5'-CGCACTTTGTTTATTCCCTCAA-3'	MONO	CM124B	F 5'-TCACCCTATTCCAGGCTGTC-3' R 5'-CTTCCCTTCACGTCTGCAA-3'	MONO
CM117A	F 5'-AGAATGGCTATGGGGAGAAG-3' R 5'-TAGATGCAGCAAAAGGATACC-3'	NA	CM125A	F 5'-CTTCTCTTCTCAATGCATAACCA-3' R 5'-AACCCATGAAGGAGAAGTACAA-3'	MONO
CM117B	F 5'-TGGCCGGATATATTTAACCAA-3' R 5'-TGTAGCTGTGTTATGTATTCTTTACC-3'	MONO	CM125B	F 5'-AATCCCCACTTGTGGTTTG-3' R 5'-GCATGTTTTNCAAATATTGTGTGG-3'	POLI
CM118	F 5'-CCCCTCTCCCCTCAAATATC-3' R 5'-GGTGTGCGAGTGGTCTTGGAT-3'	MONO	CM126	F 5'-CCAGCGAACAAACAGGAAGAT-3' R 5'-TGGCTTATGGAAGGTCATGG-3'	MONO

Mono: monomórficos; NA: não amplificado; Poli: polimórfico.



Continua

CM127A	F 5'-TCAACAACCTTTCAATAAATCTTAAC-3' R 5'-GGACTAAAGTGGGATTAGGAAAAA-3'	MONO	CM134A	F 5'-TGATCTGGNTACCTTACAACC C-3' R 5'-CTCAGGCNGCCTACCTTCTA-3'	NA
CM127B	F 5'-GTGTCGCCATGTCCGATATT-3' R 5'-CCACTTTTCCAAAAGAGAAACA-3'	NA	CM134B	F 5'-TTTGGAGTNNAGTGGGATTTTG-3' R 5'-GCTCCNGANGCTTGATTCTT-3'	NA
CM128A	F 5'-GTTTGGCCTTGAGAAGGTGA-3' R 5'-AGGCCATAAAAGTTGTGTGT-3'	MONO	CM135	F 5'-TGTTGATTGTTTGTATTGTCTCTT-C-3' R 5'-GCTCCTGCTGGGGATGTAAT-3'	NA
CM128B	F 5'-GCCCTAAAAAGCTTCTTCTTC-C-3' R 5'-AACCCAGAAATAATTGGAGATG-3'	NA	CM136	F 5'-CCTGGACCCCACTTTGAAC-3' R 5'-CAAAGTCCTGTGCCTCCTTC-3'	MONO
CM129A	F 5'-GTCAAGGCACTCTATGACACAC-3' R 5'-TATCAGAAACATTGTATTTTCACAG-3'	MONO	CM137A	F 5'-ANCTGCTAGGTGAGAGCAGC-3' R 5'-TCGCTNCAATGAGGGAGTG-3'	NA
CM129B	F 5'-CAAATCATCGAAAGCAGAACA-3' R 5'-CTGCGAGCGAAANCCAAAT-3'	NA	CM137B	F 5'-TGTAAGTTTGGAGGCCGAGT-3' R 5'-CTGCGAGCGAGTTCCANTTA-3'	NA
CM130A	F 5'-TTTGATCACCTACAAGGAGCC-3' R 5'-TAGAAGCATTTGTCAAGCCA-3'	NA	CM138	F 5'-CTACCAAAGGGNGGGAAAG-3' R 5'-TGGAGGTAGTTGGAGCTTTTTC-3'	NA
CM130B	F 5'-ACACGTGTCACCAACTCAGC-3' R 5'-ACCAAAAGAAACATAGTCAACAATAA-3'	MONO	CM139	F 5'-CTCCCCACCTAAATGGC-3' R 5'-CGAGTAATGAGGGGCAGAAG-3'	MONO
CM131A	F 5'-GCCTTCGACGGTGATAGATA-3' R 5'-GAGTCGGAATTCCACTTTGA-3'	NA	CM140A	F 5'-CCCNGTCAAATCCGCTATT-3' R 5'-TGATGCACATACCAAAAAGCA-3'	NA
CM131B	F 5'-CAGTACCTCGACGTGACATGA-3' R 5'-CCGTATTCGATGAAAGTCGT-3'	MONO	CM140B	F 5'TGGTCATCTGATTGATTGGGTA-3' R 5'-TCACAAGGAAAAGAAAAGACC-3'	MONO
CM132	F 5'-AGAGACCTCTCCCACCCATT-3' R 5'-ATTCGTTTCCGCCGTCAG-3'	MONO	CM141	F 5'-GCATCATTATTGGAATCCTTTTC-3' R 5'-GGTGATGCGTTATAACTGTTTGAT-3'	MONO
CM133A	F 5'-AGTATGATGTAAATGACGGTATGG-3' R 5'-ACATACACATGGCATCAGCA-3'	MONO	CM142	F 5'-TATTGTACCTCTGCAGAGCC-3' R 5'-CTAGACGTGGGTGGTCACG-3'	NA
CM133B	F 5'- TTTGGAGTNNAGTGGGATTTTG-3' R 5'- GCTCCNGANGCTTGATTCTT-3'	NA	CM143A	F 5'-GACGATGCGTACGGGAGG-3' R 5'-CGAACCACCGAGTCTTTGA-3'	MONO

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

Continua

CM143B	F 5'-ACAAACCGCATCTTCCATTC-3' R 5'-TCCAAAAAGGCTAAATCACANA-3'	NA	CM151B	F 5'GTTGTGAGGGGATGAGATGC-3' R 5'CGGACTACGCAGTCATAAGTGA-3'	NA
CM144	F 5'-TCAACGTTCCAGCAA GTGAC-3' R 5'-TTACTTACCCTTGGGCACCTT-3'	MONO	CM152A	F 5'CCCACATTGGTCTCAACAAG-3' R 5'AAAANATTTGGCATTAGCTATAAAAA-3'	NA
CM145A	F 5'-ACGGCTAGGACTACTGGGGT-3' R 5'-GCGGTGAAATGCGTAGAGAT-3'	MONO	CM152B	F 5'TCCCTCCCCTCCTTTGATTC-3' R 5'CACTGTGGCGCTAAACAAAA-3'	NA
CM145B	F 5'-TGTGACAATGTGCAACCAG-3' R 5'-AAAAATGGTGTTAAACGACATGG-3'	MONO	CM153A	F 5'GAGGAGGTTGTTTCTTGGGG-3' R 5'GCATTCATATGAGATAACTACTCTGC-3'	NA
CM146	F 5-TGGTCCCCTTTCTTAAATTT-3' R 5'-GACATGACTAACCGTATAATCACCA-3'	NA	CM153B	F 5'TCAAAGACAAGAAGACCAACCA-3' R 5'TGTGCTAAGAGAGAGAGAAGATC-3'	MONO
CM147A	F 5'-TATATGCCTGACGAAGCCAG-3' R 5'-CAGAATAGAAGAGTAAATGGTACAACA-3'	NA	CM154A	F 5'GATTCTTGCTCCTTCTAANGGATA-3' R 5'AATGTGGTGAGAGGNCATT-3'	MONO
CM147B	F 5'-GCTTCAATGATGCTGATAAAGN-3' R 5'-CGTCACAATGTGCTTNTGAGA-3'	NA	CM154B	F 5'TAGGAAAGCCCATGAGCAAC-3' R 5'CACTAACTCCATCGGCTGAA-3'	MONO
CM148	F 5'-AGG CAAAAAGCATGGATGG-3' R 5'-CATACACATAACACGGTTCTC-3'	NA	CM155A	F 5'GGGTAATCACGTGAATGCTGT-3' R 5'GAAACACAAAATGTCCCGAAA-3'	NA
CM149A	F 5'-TATTGGGTTGGGTTGGGTTA-3' R 5'-CTGCGTCATGCTAATGGATG-3'	MONO	CM155B	F 5'TTCTTTAATCTCATCAACGCCA-3' R 5'CTCGCTGTAAAGTCAACTTGC-3'	MONO
CM149B	F 5'-TGCTCAAAC TTTGGATGCAG-3' R 5'-CTTGTGCGCGCANGTAGAG-3'	NA	CM156	F 5'TCCGGGAGAAATCTTTAGCA-3' R 5'CCACTTTCAAATCACTTCACCA -3'	MONO
CM150A	F 5'TTTTTACTGTGTGTTTTGATTTGTT-3' R 5'TTG GTGACTGGAATCCATA-3'	MONO	CM157	F 5'TGCCGCTCAACTAATGACAA-3' R 5'AAAAATAGAAAAGTAAGAGGAACCTGG-3'	MONO
CM150B	F 5'TACAAGGTGACAAGTGCCCC-3' R 5'TGAACCTTGATCTTGGGGTC-3'	MONO	CM158	F 5'CGGGGGATATGTTTCTCTC-3' R 5'CTCTCCCTAAGAAAGCCGGT-3'	NA
CM151A	F 5'GGCTCAAAGACAATAATGAACTGA-3' R 5'AAAGAAAAGTTGGTGGACTGGA-3'	NA	CM159	F 5'TTNTCGGCAAATCTGATTAAGATAA-3' R 5'TTGTGGGAAACTTCATGGC-3'	NA

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

Continua

CM186	F 5'-TTTTTCTTTATACCTATTTCCACTCAC-3' R 5'-GGAATAAACTTGGTTGAAAAATATAA-3'	MONO	CM235	F 5'-AGACCTGGGCTTTGTAATG-3' R 5'-TGTGTAGACTCGGGTGCTTT-3'	NA
CM222	F 5'-GTGGTGATAGAGCTTGTGGGA-3' R 5'-CCCACATGAGATAATAAGAAATCC-3'	NA	CM236	F 5'-GCCTTATGTCCTCCGCTCTTA-3' R 5'- TGGAAAAAGCTGGTGAAAAGA-3'	NA
CM223	F 5'-CGATTCAATAAAATAACTGCCATT-3' R 5'-GGTGGGGACCTTATTCTCAG-3'	NA	CM237	F 5'- TCCCAATCGAAGAGGCACT-3' R 5'-TCGCGGAAAAGTATCAGAGAA-3'	MONO
CM224	F 5'-AAGAGAGCTTTCGCCTGTTC-3' R 5'-GAGATTTGCAAGTCGGAAAAA-3'	NA	CM240	F 5'-CGGCGATTAAACACTTGGAT-3' R 5'-GCTAGCGAGTCGAAATCC-3'	NA
CM225	F 5'-AATGAGTTTGACTATTTTAGGAGCAAG-3' R 5'-CAACAGATAAAATA TTCCCCCTCA-3'	NA	CM242	F 5'-CCACATCAATCCAAATCCAA-3' R 5'-GGAGGGCAAAGTGACTTGAT-3'	MONO
CM226	F 5'-TTTTAGGAGCAAGAGAGGACTA-3' R 5'-CCCCATGGGAAAAATATTACTA-3'	NA	CM243	F 5'-ATTTCTCATGCCAGATGCT-3' R 5'-AGGTCAAACATCCCTTCCTT-3'	NA
CM227	F 5'-AGAGACCTCTCCCACCCATT-3' R 5'-CGGTCTTCTTTGT TGTAAGTTGT-3'	MONO	CM244	F 5'-CAGCAGATGACCAAACCAA-3' R 5'-CGTTATGAGGATAAGGGAGAAA-3'	MONO
CM228	F 5'-AACAAAGGAACAGTCGGCTTG-3' R 5'-CTCCCATAGACAACCGATTT-3'	MONO	CM245	F 5'-CCAAATACGACCAAAGTTCC-3' R 5'-CACACGTTGTATTCCAGTCA-3'	NA
CM229	F 5'-ACGTCAGAGTCTGGCGATG-3' R 5'-GCTGCTGCGAGTCGAATT-3'	NA	CM246	F 5'-GGTATTATTTGCCCCACCT-3' R 5'-GCGTCGGAATTCCCACCTT-3'	MONO
CM230	F 5'-ACACAAGACGTCTCAGAACTGC-3' R 5'-CAAAAAGCATCAAATGGTTG-3'	MONO	CM247	F 5'-ATGATGTACGTTAGCCTGATCC-3' R 5'-AGTGGGAATCTTCTCAACTTGG-3'	MONO
CM231	F 5'- GTTACCTGGACCCCACTTTA-3' R 5'- TCCTGACCTTCTTTATAATGTGAA-3'	NA	CM248	F 5'-CCACCTCTCTCAATGTAAGCA-3' R 5'-GGTCCAGACCAGAAACAAAA-3'	MONO
CM232	F 5'-AACAGAGTAGGAAGTTGAATGG-3' R 5'-TGGGAGAGGATAGAGAGAGAGA-3'	NA	CM249	F 5'-TTGATTTGCTGCGAGGTC-3' R 5'-GCAACAGCTTAGGTGTGGAA-3'	NA
CM233	F 5'-ACATCCAGAACGGACTCATC-3' R 5'-AAAAAGACACCGAGAGAAAGAGG-3'	NA	CM250	F 5'-TACAATTGACCTCGCCGTTG-3' R 5'-CAAATCCCCCATGAGATAATAA-3'	NA

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

## Continua

CM251	F 5'-TGTGCGAGCGATTCAATAAA-3' R 5'-TTCGGAGAGAGACTGGTGGT-3'	NA
CM252	F 5'-TTCTTGCTTGAGGAATAGCC-3' R 5'-CTTAATGCCGGTGGGTTT-3'	NA
CM253	F 5'-AAGCTTCTCCGCTATGGTCA-3' R 5'-AGTGGAGAACAGAGGCCAGA-3'	MONO
CM254	F 5'-TACAGACACGCCTTCACCTG-3' R 5'-ACCAAATACGCCCAAATGTT-3'	MONO
CM255	F 5'-CTTCAACCCAGCAGATGAC-3' R 5'-AACACCGTTATGAGGAAGAA-3'	NA
CM256	F 5'-GCTTCAATGATGCTGATAAAGG-3' R 5'-TGTGTCTTATGAGAAGAGAGTATTGA-3'	NA
CM257	F 5'-GGTATTATTTGCCCCACCT-3' R 5'-GCACGGGGAAGAAAAAG-3'	NA
CM258	F 5'-TCCACCCAGACTCATCTCATT-3' R 5'-CTGCTGCGAGTCGATTCT-3'	NA
CM259	F 5'-AAGGAAGGAACGTGTTTCAGC-3' R 5'-AGATCATCTAGGAGGCTTCAGTC-3'	MONO

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

**ANEXO B – MICROSSATÉLITES DESENHADOS POR GLÁUCIA BUSO**

CM301	L 5'-GGAGGAGTTGAAGGAGCAGA-3' R 5'-TTCCAGATCTCAAATGTTTTCC-3'	MONO	CM314	L 5'-ATCATTCTCATCCAATCTTCTCC-3' R 5'-GACAGCTTGATGATTAATAATGG-3'	MONO
CM302	L 5'-AACGAATGCTGAAGCTGTTG-3' R 5'-GGATAATGTCACCATAGTAAAACC AA-3'	NA	CM315	L 5'-TTTTGATGAAGCTACCACACTCA-3' R 5'-AAGGAAACCCCAAAAATCTTGT-3'	MONO
CM303	L 5'-CTGCAAGTGCGGTGACAACT-3' R 5'-TCGAACACAATCTCCACTTAAG AA-3'	MONO	CM316	L 5'-TTGCTTTCTACAGCCAATTTTC-3' R 5'-TTCCACTGTCTTCTCAACAAA-3'	MONO
CM304	L 5'-ATGTATAGGGATGAATTTGAAGAACT-3' R 5'-AAAAATAAAAAGACCACAAACCAGA-3'	MONO	CM317	L 5'-CTTAGGGTTTTAGCGCATTC-3' R 5'-TAGTAATG GCGAGGGGACGA-3'	MONO
CM305	L 5'-GCAAACCCACCAAATTTCC-3' R 5'-AGAACATGGAATT GGAATCG-3'	MONO	CM 318	L 5'-TGGACAAAGATGGAAGTGGTG-3' R 5'-CAAATGCTTTGTAAGCTCCTC-3'	MONO
CM306	L 5'-CCGCATATGATGAAGA CGAA-3' R 5'-TTGTTCTTCTGTACCGATTTCAA-3'	MONO	CM319	L 5'-AAGATGGAGATGAGTTGGCAAT-3' R 5'-GAGCTCAATGTTCTTATTGGTTT-3'	MONO
CM307	L 5'-TTGAGTTTGAGATAAGAGTAAGAAAA-3' R 5'-TCTCATCCTCCAAACCTTCTTC-3'	MONO	CM320	L 5'-TGGAGAAAGAAAAACTGAGCTG-3' R 5'-GAACCCCAT AAACACATCCAA-3'	MONO
CM308	L 5'-GGTGGATCTCTAGCTTCGAC-3' R 5'-CAGATCTGCATTGCTTTGCT-3'	NA	CM321	L 5'-GGCGTTTCTCTCTGGTTTCA-3' R 5'-CTAAGCCTC GGACTCCTCAA-3'	POLI
CM309	L 5'-GCGTTCAAACCCTACTACAACC-3' R 5'-GCTTCCGCAGAATACACCTG-3'	MONO	CM322	L 5'-ATCAGGTGGCAGATGTTGC-3' R 5'-TCTGCTAACTTGCAACAATCTCA-3'	NA
CM310	L 5'-CACTGATGTACCACACATGACG-3' R 5'-TCGGTACCAATGGTTAGTCACTC-3'	MONO	CM323	L 5'-CTTCGCTCTTCCCCTTCTCT-3' R 5'-GCCATTGTTGGTTTTTTTACTAAATC-3'	MONO
CM311	L 5'-GACTCAACAAACCCATCAAAA-3' R 5'-AGTTTGTGTCGTCGTCGGGAAT-3'	MONO	CM324	L 5'-CCTTTAAACCGACTCAAAATCC-3' R 5'-ACCAGACAGTCG TTCCGAAG-3'	MONO
CM312	L 5'-TGTTTCGTCATCACCTTCTTCT-3' R 5'-GGTGTGGTATTTGAGTTGAGA-3'	MONO	CM325	L 5'-GAATTCTCGCCGGAGGTC-3' R 5'-GGTTTCGAAAAATTGAAAGCA-3'	MONO
CM313	L 5'-TGGCAATCCACTGTGACTTT-3' R 5'-TTTTCAGGTAGCCAGAAGTAAGC-3'	MONO	CM326	L 5'-CCGGAGGTCAGGTAGTCGTA-3' R 5'-CTAAACGGATTGCGCAACTT-3'	MONO

Mono: monomórficos; NA: não amplificado; Poli: polimórfico.

Continua

CM327	L 5'-ATGCCACCCTGTTACTCTCG-3' R 5'-AATGGCTTGTGTGGGTAAAC-3'	MONO	CM340	L 5'-AATCAATGGGTGGTGAGAGC-3' R 5'-TCAAAAAGAAGAGTGTGTCTAATGA-3'	MONO
CM328	L 5'-TATGGAAGTAATATTTTTGTTTGGAA-3' R 5'-AGCTTTGAGCAGATCGGAAA-3'	MONO	CM341	L 5'-CCATAAATGATGTTCCCATCC-3' R 5'-GCAGCTGCATACAAATTTCC-3'	MONO
CM329	L 5'-AGAGGGAGAGAGGTTCTTTTTATT-3' R 5'-AAGGAAACGGCGAATTGAA-3'	MONO	CM342	F 5'-TTCCATTAATCATCTCTCCAAA-3' R 5'-CTCAGTGTAAGTTGCTGGGAAA-3'	MONO
CM330	L 5'-TTTCCAAGTTTTTGCGCATT-3' R 5'-TAAGAGGATGGTCACAAATCG-3'	MONO	CM343	L 5'-GGAGGATTCCGAAATCTTTGA-3' R 5'-TTCAAAAGCTACAAACCATCG-3'	MONO
CM331	L 5'-CAACATCAAGCATCAGAAGCA-3' R 5'-AAACTTAAGCTTCCAACC TCCT-3'	MONO	CM344	L 5'-CTTCAGCTCGTGCCGATAAG-3' R 5'-TATTGCATCCGTTTGTGAGC-3'	MONO
CM332	L 5'-AGCCTTTATCGGCAAGTCAA-3' R 5'-AAACTCTGATTACCCAAATTCAAAAA-3'	MONO	CM345	L 5'-ACGGCGACTCAGTAACAAC-3' R 5'-TGAGTAGACCCAACTCCTTCG-3'	MONO
CM333	L 5'AGCCTTTATCGGCAAGTCAA-3' R 5'-AAACTCTGATTACCCAAATTCAAAAA-3'	POLI	CM346	L 5'-AATCACTCAAGCGCGATTTT-3' R 5'-AATTCAAGTGCTTGCGACT-3'	MONO
CM334	L 5'-AATTCCGTCATGTTCAACGA-3' R 5'-ATATCGCGGATTTGAACGTC-3'	MONO	CM347	L 5'-CTCCACTTCTAAACTCTAAATGAAAT-3' R 5'-AACCTCTAAACATAAAATGACAATGA-3'	MONO
CM335	L 5'-TCCTGAACAACGACGTCAAA-3' R 5'-CAATGCAAGCAGTTTAAAGAGTAA-3'	MONO	CM348	L 5'-CTTTAAAGTTTGTATCTCTCCTTG-3' R 5'-GATTATGTACACAAAATGGAGGAA-3'	MONO
CM336	L 5'-CCAAATCTCTCCCCACATA-3' R 5'-TGTTTTAAATTTGGGGTTTAACT-3'	MONO	CM349	L 5'-ATTAAAGGGAAAAGGAATTTGGA-3' R 5'-ATCCTCCATCCTCCATCCTC-3'	MONO
CM337	L 5'-ATGGCCATGAGATGGAAAAC-3' R 5'-TGTAGGAGGCCAATTCACA-3'	MONO	CM350	L 5'-GGCTCAGCCAGAGACTCTTC-3' R 5'-GGACAAGTGCTCTTCTTTCTC-3'	MONO
CM338	L 5'-TTGATTTTTATTTTTGTGATGATGC-3' R 5'-AAAATCAAAGTGACCCCTCTACTC-3'	MONO	CM351	L 5'-AACCCACAACAACACCAACA-3' R 5'-TTTTTGTAATGAGTTGATTGATGA-3'	MONO
CM339	L 5'-CTAAAGAAGGTGAACTTCTCCTAAA-3' R 5'-CGCAACACACACATTATCATT-3'	MONO	CM352	L 5'-GAATTCAGTGAACACAGAAGGAGA-3' R 5'-GAGAGAACAGAGGAGGTGTCG-3'	MONO

Mono: monomórficos; NA: não amplificado; Poli: polimórfico.

## Continua

CM353	L 5'-TGTTTATCTTGTTGCCTTCGT-3' R 5'-CGGACGAAATCGACATCC-3'	MONO
CM354	L 5'-TTCCATTAATCATCTCCTCCAAA-3' R 5'-CTCAGTGTAAGTTGCTGGGAAA-3'	MONO
CM355	L 5'-TGATAGGCTTTGGGAGGATT-3' R 5'-CAAACCATCGGTTGTGAGAA-3'	MONO

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.

**ANEXO C – MICROSSATÉLITES DESENHADOS POR BRUNA OSHE**

M156	F 5'AGACTGCCAAGCGTTAGGAC-3' R 5'TCACATGTAAAAGACACATTGTTG-3'	MONO	M173	F 5'AACTAAGAGTTTGCATTGATCCTC-3' R 5'GCTCCATATCCCATTGATTTTC-3'	MONO
M158	F 5'GCAAACCAAAGGGCATTTTT-3' R 5'GGCAATTCTCCATTTGAGTG-3'	MONO	M174	F 5'ATTGGTGGTTTTTGCAGGAG-3' R 5'ACATTTTGAGCGGGGTTTTA-3'	NA
M159	F 5'TTGTGAGAGGAGACCATAACC-3' R 5'TAAAGCAAAGGGGGAGAACC-3'	NA	M175	F 5'CCTTTTCTTTTAACTTTCCTGAAGC-3' R 5'TATGTCTCAAATGGGCATCG-3'	NA
M160	F 5'CCCACCTTTGATTCCGACACT-3' R 5'GTGGAGTTTCGCGTAAATGA-3'	MONO	M176	F 5'-TCACCAAACCCTAACACACAA-3' R 5'-TGGGGATATTCGGATGAAAA-3'	NA
M161	F 5'-GCGCAAACCACAGAGAAGAT-3' R 5'-GCATAGGGAACCTGCCAGAG-3'	MONO	M177	F 5'-TGGAATGAAATGATTGAGAGGTT-3' R 5'-ATCTCCCTATCCCCACCATA-3'	MONO
M162	F 5'CTCTGCTAACGGGGAAAAA-3' R 5'TCACAAAACAAAAGGGGTTT-3'	NA	M178	F 5'-CATAAGACTGCGAGCGAACC-3' R 5'-TAATACCAAATGGGGATGG-3'	NA
M163	F 5'TGGATCTCCATTGAAGTGAGG-3' R 5'CCAGCAAAGAGCTCAAAGG-3'	MONO	M179	F 5'-TCCAATCGAAGAACCACTCG-3' R 5'-CCCGAGAGAACCCAATGTAA-3'	NA
M165	F 5'CATGGAACAATGAGTTCAAAGG-3' R 5'AAGTAATGGGACCCACCTGA-3'	MONO	M180	F 5'-ATTCATCCAACCCCTATCCA-3' R 5'-CAGGGGAGTAGTTATGGATGTGA-3'	MONO
M167	F 5'TGATATGATAAAGGTAAATTGGAAA-3' R 5'ACGGACAATGTGTCTTTTGA-3'	NA	M183	F 5'-TTGGATTATGATTTCTAGTCTGTTTG-3' R 5'-TGCGAGTGGATTTCAATTTT-3'	NA
M168	F 5'-GAGACACGGAGAGAATGAGGTT-3' R 5'-ATCCACCCAGACACATCTCA-3'	MONO	M184	F 5'-CGTAAGGCCGTGTTATGAAA-3' R 5-TGCAGGGGGTCTGTATTGG-3'	NA
M170	F 5'TCCATTGGGATTATTGTTGCT-3' R 5'GCAGTGGGAGATCCATTGTT-3'	MONO	M185	F 5'-GCTTTTGCTCTATTTTCTTCTT-3' R 5'-GGCTTGGTAACCGAAGATCC-3'	MONO
M171	F 5'-CCAAATACGACCAAATGTTCC-3' R 5'-AGTTCTTCCAGTCAACACCCTA-3'	NA	M186	F 5'-TTTTTCTTTATACCTATTTCCACTCAC-3' R 5'-GGAATAAACTTGGTTGAAAAATATAA-3'	MONO
M172	F 5'ATTTGATTTGGGGGCAGGT-3' R 5'GGGAGTGTTGACATGGAGGA-3'	NA	M188	F 5'-GCAGCCATGGAAAGAAGTGT-3' R 5'-GGGGGTAAAAGATCTAAACACA-3'	NA

Mono: monomórficos; NA: não amplificado.



Continua

M190	F 5'-GTACCTCCGCCGTTGATCT-3' R 5'-CCACATGAGATAATAAGAAATCCA-3'	MONO	M205	F 5'-CAACACACCTCATTTTTCAAGG-3' R 5'-GCGCGTATTCTCTCAATGG-3'	NA
M191	F 5'-AACTATCCAAGAAATCCCCACTT-3' R 5'-TAATATGTGGAAAGGGAAATGC-3'	POLI	M206	F 5'-CCGGGAAAAATACCCTAAA-3' R 5'-CCCCCGGGAGAATAAAAAA-3'	NA
M192	F 5'-TGACAACACACATACACCTTACCA-3' R 5'-AGTGGGGTGGCCAAATAAAG-3'	MONO	M207	F 5'-TAAGAAATCCCACCCCAAAA-3' R 5'-GTGGTGATAGAGCTTGTTGGA-3'	NA
M193	F 5'-TCTCCATTGCTGTTACCCAC-3' R 5'-AAAAAGGGGTGCTATATTTGTG-3'	NA	M212	F 5'-GGCTTTCATCCTGTTGTAAAAA-3' R 5'-CCGTTCAAGGCCCTAAAGTT-3'	MONO
M195	F 5'-TGGACTCTGGTTCACCTTGA-3' R 5'-CCCCATGCAAAGAAACATA-3'	NA	M214	F 5'-TCCATTGGGATATTGTTGCTT-3' R 5'-GCAGTGGGAGATCCATTGTT-3'	MONO
M197	F 5'-TGACATTCCCACCCAGACTCAT-3' R 5'-CAGAGACACGAAGAGAAAGAGG-3'	NA	M215	F 5'-CGCAATGGCTTGTAATGTTT-3' R 5'-GAGAGCTCACCAGTGTTTTT-3'	NA
M198	F 5'-CGGTTCCATTTCTGACATT-3' R 5'-GGATCTCCGAAAACCCTCA-3'	MONO	M217	F 5'-AATGGCAGAGGAATAGCTGA-3' R 5'-CTGCTCCGAGCGAAATAC-3'	NA
M200	F 5'-CCCCGTTTACCCATTA ACT-3' R 5'-CGGGTTTCTTGGAACATGA-3'	NA	M218	F 5'-TTGAGTTTTGTCTCACTTTGCAG-3' R 5'-CGGCGATTCTAGTACTAAA ACTTA-3'	MONO
M201	F 5'-AACCCATCGAACAAGAGCAA-3' R 5'-ACAACCCATCGCCCAAC-3'	NA	M219	F 5'-AGAAAGAAGCTTGTTGGGAAT-3' R 5'-CCCCCTGGGATAATTAAGAA-3'	NA
M202	F 5'-GGGGAGGGTGATGAATAGAAA-3' R 5'-CCAGCAAAGAGCTCAA AAGG-3'	MONO	M220	F 5'-CCAAAAGATCATAAGGTTTGGA-3' R 5'-GAGTGGGGTCCACTTGAA-3'	NA

Mono: monomórficos; NA: não amplificado; Poli: polimórfico.