

**Boletim de Pesquisa 79**

---

**e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 1340

Outubro, 2004

**ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE LINHAGENS DE  
MELÃO UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*

Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimárzio*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Dietrich Gerhard Quast*

*Sérgio Fausto*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*

Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Chefe-Geral

*Maurício Antônio Lopes*

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

*Maria do Rosário de Moraes*

Chefe-Adjunto de Administração

ISSN 1676 - 1340  
Outubro, 2004

# *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79*

## **ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE LINHAGENS DE MELÃO UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

Allen Araújo Cerqueira  
Waldelice Oliveira de Paiva  
Martinho Rabelo Paiva  
Jaqueline Ceolin de Amorim  
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral  
Jairo V. Vieira  
José Amauri Buso  
Gláucia Salles Cortopassi Buso

Brasília, DF  
2004

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4700 Fax: (61) 340-3666  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

**Presidente:** *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

A 532 Análise da divergência genética entre linhagens de melão utilizando marcadores RAPD / Allen Araújo Cerqueira ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

18 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 79)

1. Cucumis melo. 2. Melão – marcadores moleculares. 3. Melão – germoplasma. 4. Melão – variabilidade genética. I. Cerqueira, Allen Araújo. II. Série.

635.61 – CDD 21

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
<b>3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	12
<b>4 - CONCLUSÕES</b> .....	15
<b>5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	15

# ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE LINHAGENS DE MELÃO UTILIZANDO MARCADORES RAPD

---

Allen Araújo Cerqueira<sup>2</sup>  
Waldelice Oliveira de Paiva<sup>3</sup>  
Martinho Rabelo Paiva<sup>2</sup>  
Jaqueline Ceolin de Amorim<sup>2</sup>  
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral<sup>1</sup>  
Jairo V. Vieira<sup>4</sup>  
José Amauri Buso<sup>4</sup>  
Gláucia Salles Cortopassi Buso<sup>1</sup>

## RESUMO

A produção mundial de melão vem apresentando uma tendência ao crescimento nos últimos anos. Estima-se que a produção no Brasil, tenha aumentado cerca de 67%, no período compreendido entre 1999 e 2000. Existe a preocupação entre os exportadores com possíveis perdas de mercado devido não só ao tamanho e forma, mas com a baixa qualidade dos frutos, principalmente ao insatisfatório teor de açúcares, expresso como teor de sólidos solúveis (medidos em graus-brix) presente no fruto no momento da comercialização. Uma das formas de se melhorar estas características é através do melhoramento genético. Para a obtenção de híbridos simples com boa capacidade produtiva, há necessidade de se contar com linhagens geneticamente divergentes. Portanto, faz-se necessário conhecer a variabilidade genética existente entre linhagens parcialmente endogâmicas obtidas em programa de melhoramento. Uma forma eficiente de se estudar a variabilidade genética é através da utilização de marcadores moleculares. Com esse objetivo, 34 linhagens do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças e outras 54 linhagens da Embrapa Agroindústria Tropical foram analisadas utilizando-se RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”). Foram identificados 76 marcadores moleculares polimórficos, viabilizando a construção de um dendrograma, que mostra graficamente a variabilidade entre as linhagens em estudo. A análise mostrou a formação de cinco grandes grupos, contendo 6,11,10,30 e 29 linhagens cada um, sendo que os três primeiros formaram um agrupamento, pois são melões do tipo Amarelo originados da cultivar Eldorado 300 enquanto os dois últimos grupos, são linhagens de melão do tipo Amarelo (Gold Mine, ML e L50), do tipo Cantaloupe (MR) e do tipo Tupã (MT) que tem polpa salmão, peculiaridade dos melões do tipo Cantaloupe. Entre as linhagens de melão do tipo Amarelo, derivadas de Eldorado 300 encontrou-se similaridade de 0,57 a 0,98. Entre as linhagens MT, tipo Tupã, a similaridade foi de 0,54 a 1,00 e entre as ML, com contribuição da cultivar Gold Mine, foi de no mínimo 0,56 e máximo de 0,74. Ao comparar as linhagens MT com as ML observamos uma similaridade que varia de 0,36 a 0,96 e entre as MT e as MR de 0,44 a 0,92, enquanto que entre as linhagens amarelas da Embrapa Hortaliças e da Embrapa

---

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Estudante de graduação

<sup>3</sup> Embrapa Agroindústria Tropical

<sup>4</sup> Embrapa Hortaliças

Agroindústria Tropical o coeficiente de similaridade variou entre 0,37 a 0,92. Estes resultados sugerem alguns direcionamentos para os programas de melhoramento. Primeiramente, indicam que existe variabilidade entre as linhagens MT e ML. Por outro lado, pode-se prever a obtenção de híbridos heteróticos mesmo de cruzamentos entre linhagens S<sub>8</sub> originadas de uma cultivar de polinização aberta (Eldorado 300). Pode-se prever também a obtenção de híbridos potencialmente heteróticos pela combinação de linhagens do tipo Amarelo ou do tipo Tupã dos dois diferentes programas de melhoramento.

Termos para indexação:

Marcadores moleculares, germoplasma, *Cucumis melo* L., variabilidade genética

## ANALYSIS OF GENETIC DIVERGENCE WITHIN MELON LINES USING RAPD MARKERS

---

### ABSTRACT

The world production of melon has increased in the last years. Brazilian production has increased around 67% in the period within 1999 e 2000. The exporters are concerned about possible market losses due not only to unacceptable fruit size and form, but also with the low fruit quality, mainly with unsatisfactory sugar content, expressed as soluble solids content (measured as brix-degrees) present in the fruit at the commercialization moment. One way to improve these characteristics is through the genetic breeding. To obtain simple hybrids with good productive capacity, genetically divergent lines are required. Therefore, it is necessary to know the genetic variability within partially endogamic lines obtained in the genetic breeding programs. An efficient way to study genetic variability is through the utilization of molecular markers. In this study, 34 lines from the Embrapa Hortaliças breeding program and 54 lines from Embrapa Agroindústria Tropical were analyzed using RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”). Seventy six polymorphic markers were identified and used to construct a dendrogram that shows graphically, the relationships among the lines from both sources. The similarity analysis identified five main groups, containing 6, 11, 10, 30 e 29 lines each, and the first three groups formed a cluster, probably because the lines are from the Yellow type of melon originated from the Eldorado 300 cultivar, while the other two groups are lines of Yellow (Gold Mine, ML e L50), Cantaloupe (MR) and Tupã types (MT) which has salmon pulp, peculiar from Cantaloupe type. Within the lines of the Yellow type, derived from Eldorado 300 the similarity indexes ranged from 0.57 to 0.98. Within lines MT (Tupã type), the similarities ranged from 0.54 to 1.00 and within ML lines, with contribution of Gold Mine cultivar, it ranged from 0.56 to 0.74. When MT and ML lines were compared, similarities varied from 0.36 to 0.96 and among MT and MR from 0.44 to 0.92, while among Embrapa Hortaliças yellow lines and Embrapa Agroindústria Tropical lines the similarity coefficient varied between 0.37 and 0.92. The results indicate that there is variability within MT and ML lines. Additionally, it is possible to expect the development of heterotic hybrids, even from crossings among S<sub>8</sub> lines from an open crossed cultivar (Eldorado 300). It is also possible to expect the development of potentially heterotic hybrids from the combination of Amarelo type lines or Tupã type from the two breeding programs.

Index terms:

Molecular markers, germplasm, *Cucumis melo* L., genetic variability



## 1- INTRODUÇÃO

A produção mundial de melão vem apresentando uma tendência de crescimento, nos últimos anos. Em 2002, foram produzidas cerca de 21,7 milhões de toneladas de melão em nível mundial, sendo os maiores produtores a China, a Turquia, os Estados Unidos, o Irã e a Espanha (MELÃO, 2003). No Brasil, o cultivo do melão (Figura 1), principalmente do tipo amarelo, vem crescendo nos últimos anos, especialmente no semi-árido nordestino (DIAS, 1997). Estima-se que a produção de melão tenha aumentado cerca de 116% nos últimos cinco anos (MELÃO, 2003), devido tanto ao crescimento da área cultivada, quanto da produtividade. Entretanto, a participação brasileira como produtor e exportador de frutos de melão no mercado internacional é incompatível com o potencial do país, representando 7% da produção mundial (MELÃO, 2003). Existe, portanto, a preocupação dentre os exportadores com possíveis perdas de mercado devido não só ao tamanho e forma, mas com a baixa qualidade dos frutos, principalmente com o insatisfatório teor de açúcares, expresso como teor de sólidos solúveis (medidos em graus-brix) presente no fruto no momento da comercialização, nestes países. Uma das formas de se melhorar a qualidade, aumentar a competitividade do produto brasileiro no mercado internacional e incrementar o consumo interno desta fruta é através do melhoramento genético. Para se ter ganho genético é preciso conhecer a distribuição da variabilidade genética, entre as linhagens dos programas de melhoramento. O primeiro passo para o estabelecimento ou o enriquecimento da variabilidade genética disponível de populações de um programa de melhoramento populacional é a realização de um estudo detalhado da variabilidade genética disponível em linhagens e outros acessos, visando um planejamento de cruzamentos divergentes e, conseqüentemente, o estabelecimento de populações segregantes com variabilidade genética suficiente, bem como a produção de híbridos experimentais.

Uma forma ágil e eficiente de analisar a variabilidade genética é através da utilização de marcadores moleculares, pois detectam dissimilaridades entre diferentes acessos em nível de DNA. Existem trabalhos envolvendo vários tipos de marcadores em melão, como RFLP, AFLP e RAPD (BAUDRACCO-ARNAS e PITRAT, 1996, p. 57; WANG et al., 1997, p. 791; GARCIA et al., 1998, p. 878; RITSCHHEL et al., 2004, p. 9).

O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de linhagens de melões desenvolvidas na Embrapa Agroindústria Tropical e na Embrapa Hortaliças, através de marcadores do tipo RAPD (“Random Amplified Polimorphic DNA”) que são marcadores do tipo dominante, de menores custos e extremamente eficientes na análise de coleções de germoplasma muito extensas, sendo muito útil na análise de diversidade genética de melão (WILLIAMS, et al., 1990, p. 6531).

A partir de estudos deste tipo, espera-se auxiliar os programas de melhoramento desta espécie indicando linhagens que possuem maior divergência, sugerindo a possibilidade de cruzamentos visando o aumento da variabilidade genética das populações dos dois programas de melhoramento e até mesmo a melhoria de linhagens, importante no processo de obtenção de frutos com características mais adequadas.



**Figura 1.** Representação de alguns tipos de melões cultivados no Brasil

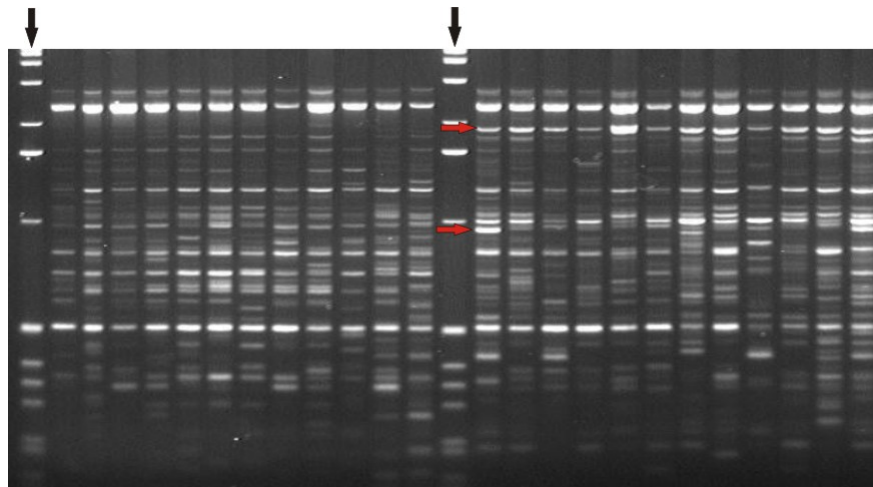
## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

O material selecionado para a análise da variabilidade genética incluiu trinta e quatro linhagens de melão do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças e 54 linhagens da

Embrapa Agroindústria Tropical. As linhagens da Embrapa Hortaliças (8278, 9080, 9274, 9276, 9278, 9280, 9282) são melões do tipo Amarelo, estão em S8 e são originadas da cultivar Eldorado 300. As linhagens da Embrapa Agroindústria Tropical são linhagens de melão do tipo Amarelo (todas as ML e L 50), Cantaloupe (todas as MR e L02, L05, L06, L27 e L31) e Tupã (todas as MT) que têm polpa salmão característica do Cantaloupe. Para a realização deste estudo utilizaram-se folhas jovens das linhagens, conforme descrito em Ferreira e Grattapaglia (1998).

As reações de amplificação do DNA foram feitas por PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Cada 13 µl de reação continha: 3,0 µl de DNA genômico a 2,5 ng/µl; 4,92 µl de água milli-Q autoclavada; 1,30 µl Tampão 10X para Taq DNA Polimerase; 1,04 µl de dNTP 2,5 mM; 1,04 µl de BSA 2,5 mM; 1,5 µl de Primer (Operon Technologies, USA) 10ng/µl e 0,2 µl de enzima Taq DNA Polimerase. Foi utilizado um conjunto de primers randômicos previamente selecionados com base no nível e qualidade de polimorfismo (OPA02, OPF13, OPG06, OPG09, OPI20, OPJ01, OPO04, OPR02, OPR08, OPX13, OPX14, OPX19, OPY06, OPY07, OPY15, OPD16). Cada reação foi realizada em um termociclador MJ, programado para 40 ciclos de: 1 min a 92°C, 1 min a 35°C, 2 min a 75°C. Aos produtos das reações foram adicionados 2 µl de tampão de carregamento. Os fragmentos foram visualizados, após eletroforese, em géis de agarose a 1,5% com marcadores 1 Kb nos poços adjacentes às amostras já carregadas (Figura 2).

O "fingerprint" de DNA obtido a partir desta técnica permitiu gerar uma matriz binária baseada na presença ou ausência de marcadores RAPD, utilizada para estimar a similaridade genética entre os acessos, empregando-se o coeficiente de Jaccard. Os acessos foram agrupados segundo sua similaridade pelo método de agrupamento UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average") utilizando o software NTSYS versão 2.02pc (ROHLF, 1992) e os agrupamentos resultantes foram observados através de dendrograma, que mostra graficamente a variabilidade entre as linhagens avaliadas.



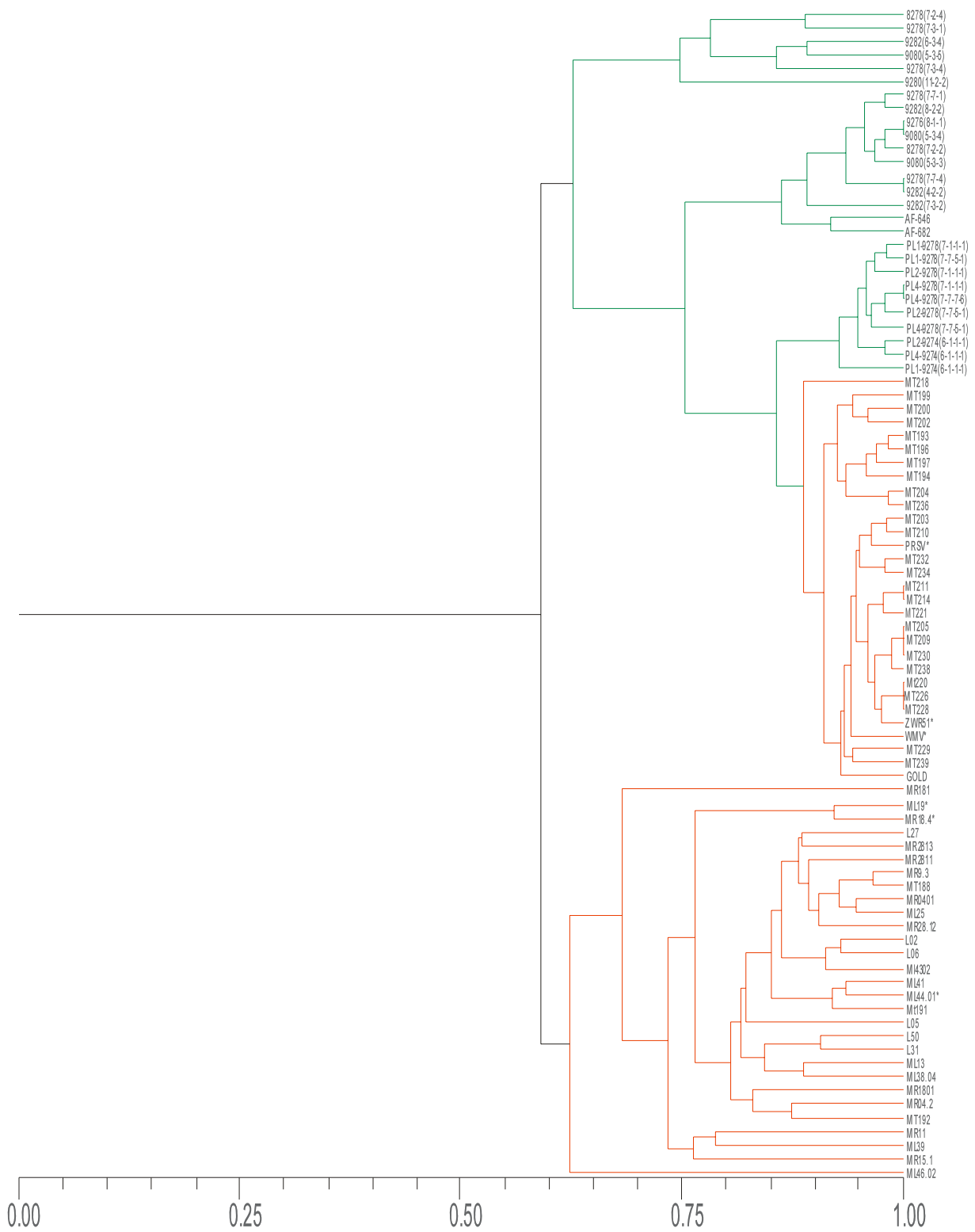
**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose mostrando o “fingerprint” resultante da amplificação com o primer OPD16. As colunas com setas pretas foram carregadas com ladder 1Kb e as setas vermelhas indicam os marcadores polimórficos. Da esquerda para a direita estão as linhagens da Embrapa Hortaliças e linhagens da Embrapa Agroindústria Tropical.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de similaridade genética (Tabela 1) de 34 linhagens do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças e outras 54 linhagens da Embrapa Agroindústria Tropical foi feita utilizando-se um total de 76 marcadores moleculares polimórficos, por meio da amplificação de 15 primers randômicos. Esta análise viabilizou a construção de um dendrograma que mostra graficamente a variabilidade entre as linhagens dos programas de melhoramento (Figura 3). A análise do dendrograma permite visualizar a formação de cinco grandes grupos, contendo 6, 11, 10, 30 e 29 linhagens cada um. Os três primeiros formaram um agrupamento, e são melões do tipo Amarelo originados da cultivar Eldorado 300 enquanto os dois últimos grupos são genótipos de melão amarelo, incluindo o híbrido Gold Mine e todas as ML e L 50, as linhagens Cantaloupe (todas as MR e L02, L05, L06, L27 e L31) e Tupã (todas as MT). Entre as linhagens de melão do tipo Amarelo, derivadas de Eldorado encontrou-se variação de similaridade de 0,57 a 0,98. Entre as linhagens MT, tipo Tupã, a similaridade foi de 0,54 a 1 e entre as ML, tipo Amarelo, com contribuição da cultivar Gold Mine, foi de no mínimo 0,56 e máximo 0,74. Ao comparar as linhagens MT com as ML observamos uma similaridade com maior amplitude (0,36 a 0,96) e entre as MT e as MR de 0,44 a 0,92,

enquanto que entre as linhagens amarelas da Embrapa Hortaliças e da Embrapa Agroindústria Tropical o coeficiente de similaridade variou entre 0,37 a 0,92.

Estes resultados indicam que há uma razoável variabilidade dentro das populações, mas que aumenta quando a comparação é feita entre populações. Desta forma, fica claro que há grande probabilidade de enriquecimento da variabilidade destas populações nos programas de melhoramento com a troca de linhagens entre eles.



**Figura 3.** Análise gráfica da similaridade genética entre as linhagens da Embrapa Agroindústria (em vermelho) e Embrapa Hortaliça (em verde).







#### 4- CONCLUSÕES

- Existe variabilidade entre as linhagens MT e ML do programa de melhoramento da Embrapa Agroindústria Tropical
- Pode-se prever a obtenção de híbridos heteróticos mesmo de cruzamentos entre linhagens S<sub>8</sub> originadas de uma cultivar de polinização aberta (Eldorado 300) do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças.
- Pode-se prever também a obtenção de híbridos potencialmente heteróticos pela combinação de linhagens do tipo Amarelo ou do tipo Tupã dos dois diferentes programas de melhoramento.

#### 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUDRACCO-ARNAS, S.; PITRAT, M. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 57-64, 1996.

BUSO, G. S. C.; FERREIRA, M. E.; BUSO, A. J.; RITSCHER, P. S.; LINS, T. C.; LOURENÇO, R. T.; TAVARES, H. M. F. **Análise da variabilidade genética de acessos de uma coleção de germoplasma de melão (*Cucumis melo* l.) utilizando marcadores RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. p. 19 (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 5).

DIAS, R. de C. S. (Coord.). **A cadeia produtiva do melão na região Nordeste**. Petrolina: EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 1997. p. 73.

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

GARCIA, E.; JAMILENA, M.; ALVAREZ, J. I.; ARNEDO, T.; OLIVIER, J. L.; LOZANO, R. Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 878-885, 1998.

MELÃO. Brasília: Ministério da Integração Nacional, 2003. 12 p. (FrutiSéries. Ceará, 2). Disponível em: <[www.irrigar.org.br/publicacoes/frutiseries/frutiseries\\_2\\_ce\\_melao.pdf](http://www.irrigar.org.br/publicacoes/frutiseries/frutiseries_2_ce_melao.pdf)> Acesso em: set. 2003.

RITSCHER, P. S.; LINS, T. C. de L.; TRISTAN, R. L.; BUSO, G. S. C.; BUSO, J. A.;

FERREIRA, M. E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **Bmc Plant Biology**, USA, v. 4, p. 9-23, 2004.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York : Applied Biostatistics, 1992. não paginado. Version 1.8.

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

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