

GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microsatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085

Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores SSR

Renata Natália Cândido de Souza Gama¹; Carlos Antônio Fernandes Santos²; Rita de Cássia Souza Dias²; Flávio de França Souza³.

¹UEFS - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Avenida Transnordestina, SN, Novo Horizonte, 44.036-900, Feira de Santana-BA; Embrapa Semiárido. BR 428, KM 152, zona rural, caixa postal 23, 56.302-970, Petrolina-PE; Embrapa Rondônia. BR 364, km 5,5, CEP 789000-970, Porto Velho-RO. renata.natalia@hotmail.com; casantos@cpatsa.embrapa.br; ritadias@cpatsa.embrapa.br; flaviofs@cpafro.embrapa.br

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos o estabelecimento de padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas para 17 cultivares de melancia e um acesso de *Citrullus colocinthis*, baseados em marcadores microsatélites, de forma a gerar um banco de dados de referência e apoio à proteção de cultivares e eventuais disputas comerciais, bem como orientar programas de melhoramento e recursos genéticos da espécie. Para visualização da similaridade genética, utilizou-se o dendrograma UPGMA gerado da matriz de distâncias do coeficiente de Jaccard, com base em 32 alelos de dez locos microsatélites. O DNA total foi extraído pelo método CTAB 2x e os

produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida desnaturante 6% e corados com nitrato de prata. O número de pares de bases foi estimado pelo método da mobilidade inversa, com base em regressão de produtos de tamanho conhecido. Dos 36 pares de 'primers' microsatélites utilizados apenas dez apresentaram ampliações polimórficas de fácil interpretação. Os genótipos apresentaram coeficiente de similaridade entre 34 e 100%, o que reflete a alta variabilidade genética das cultivares analisadas. Os 30 alelos não foram suficientes para distinguir as cultivares de melancia, "Sugar Baby" e "Omaru Yamato", "Charleston Gray" e "Sunshade", "Crimson Sweet" e "Nova Crimson" que apresentaram 100% de similaridade. Dois grupos foram observados entre as cultivares de

GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085

melancia, no ponto de corte de 0,42 de similaridade, com *Citrullus colocynthis*, posicionando-se fora desses grupos. Um dos grupos foi formado predominantemente por cultivares derivadas de “Crimson Sweet” e outro grupo com cultivares de diferentes tipos, como “Sugar Baby”, “Charleston Gray” e “Pérola”.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, microssatélites, divergência, dendrograma.

ABSTRACT

Molecular characterization and similarity among watermelon cultivars using SSR markers

The objective of this work was to establish allelic patterns and to estimate genetic distances based on the SSR marker in 17 watermelon cultivars, based on microsatellite, in order to generate a reference database of support for the protection of cultivars, as well as to guide improvement programs and genetic resources of this species. For visualization of the genetic similarity, the dendrogram UPGMA generated by the matrix of distances of the coefficient of Jacquard was used, based on 32 alleles of nine microsatellite loci. The total DNA

INTRODUÇÃO

was extracted by the CTAB 2x method, and PCR products were analyzed in denaturing polyacrylamide 6% gels, stained with silver nitrate. The number of base pairs was estimated by the method of inverse mobility, based on regression of products of known size. Among the 36 tested microsatellites primers only ten presented polymorphic amplification of easy interpretation. The cultivars presented a similarity coefficient between 34 and 100%, which reflected the high genetic variability. The 32 alleles were not enough to distinguish all 17 watermelon cultivars, with “Sugar Baby” and “Omaro Yamato”; “Charleston Gray” and “Sunshade”, “Crimson Sweet” and “Nova Crimson” presenting a 100% of similarity. Two groups were observed at the cut point of 0.42 of similarity, with *Citrullus colocynthis*, positioned as an out group. One watermelon group was formed predominately by cultivars derived from Crimson and another group formed by cultivars of different types as “Sugar Baby”, “Charleston Gray” and “Pérola”.

Keywords: *Citrullus lanatus*, microsatellite, divergence, dendrogram.

GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085

Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado descritores morfológicos para registro e lançamento de novas variedades. Ainda que a caracterização de cultivares feita desta forma continue sendo predominante, as limitações deste tipo de descritor tem gerado a necessidade de se buscar alternativas. Uma delas, os descritores de DNA, baseados no genótipo do indivíduo, tem se destacado, especialmente pelo seu potencial de distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados (Millach, 1999). Marcadores microssatélites, também denominados SSR (“Simple Sequence Repeats”), têm sido o melhor marcador para estudos de “fingerprinting” devido ao seu alto polimorfismo, co-dominância, confiabilidade e reprodutibilidade (Varshney, 2005). No entanto, apesar da disponibilidade de marcadores microssatélites para melancia, ainda não foi proposto um número mínimo desse tipo de marcador para auxiliar na proteção de cultivares e dirimir disputas comerciais. Trabalhos com aplicação de marcadores SSR em melancia têm sido reportados por Jarrete *et al.* (1996), Guerra-Sanz (2002), Joobeur *et al.* (2006) e Yong-Sham *et al.* (2010).

O presente trabalho teve como objetivos o estabelecimento de padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas para 17 cultivares comerciais de melancia, baseadas em marcadores microssatélites, de forma a gerar um banco de dados de referência e apoio à proteção de cultivares e eventuais disputas comerciais, bem como orientar programas de melhoramento e recursos genéticos da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal: foram analisadas 17 cultivares comerciais de melancia: Polinizador mini, Peróla, Smile, BRS Solei, BRS Kuarah, BRS Opara, Crimson Sweet, Crimson Select, Nova Crimson, Top Gun, Omaru Yamato, Sugar Baby, Fairfax, Emperor, Charleston Gray, Peacock, Sunshade e um acesso de *Citrullus colocynthis*, como ‘fora do grupo’. Para extração do DNA total, foram coletadas, após o aparecimento da terceira folha definitiva, amostras foliares de cinco plantas para representar cada cultivar. Essas foram armazenadas em freezer a -80°C, até o momento da extração.

Extração e Quantificação do DNA: O DNA foi extraído segundo Doyle & Doyle (1990), modificado para 7.500 e 10.000 rpm, na primeira e na segunda centrifugação,

GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085 respectivamente; beta-mercaptoetanol a 2% e incubação a 60°C, durante 30 min, para todas as amostras. Após a adição do tampão Tris-EDTA, a solução de DNA foi tratada com RNase para remover RNAs co-isolados. A quantidade e a integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose a 0,8%, seguido da diluição do DNA genômico para 50 ng μL^{-1} e armazenadas a -20°C.

Reação de PCR e resolução em géis de poliacrilamida: foram utilizados 36 pares de ‘primers’ microssatélites (Joobeur *et al.*, 2006). Inicialmente foi feita uma avaliação dos pares de ‘primers’ utilizando quatro cultivares para seleção daqueles de melhor resolução polimórfica em géis de poliacrilamida. As reações de amplificação de PCR foram realizadas conforme metodologia de Joobeur (2004), com algumas modificações, para um volume final de 12 μL , contendo 50 ng de DNA, 5 μM de cada ‘primer’, 0,1 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 , 1x tampão de PCR e 0,75 unidades da enzima Taq DNA polimerase.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6%, pré-aquecidos durante 30 min a 40 W, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente 3h, com potência constante de 40 W. Marcador de peso molecular Ladder 50pb (Fermentas) foi carregado nas extremidades lateral de cada gel. Os géis foram corados com nitrato de prata, conforme Creste *et al.* (2001). Todas as reações foram conduzidas no laboratório de genética da Embrapa Semiárido.

Anotação e análise dos dados de microssatélites: os locos que apresentaram polimorfismo de fácil interpretação foram selecionados para genotipagem das 17 cultivares de melancia. A estimativa do tamanho em pares de base (pb) para cada alelo, para a construção do padrão alélico de cada acesso, foi obtida pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50bp da Fermentas (EUA).

Os microssatélites foram anotados para a presença (1) versus ausência (0) de alelos, para construir uma matriz de similaridade do índice de Jaccard. O dendrograma com as distâncias das cultivares foi gerado pelo método de agrupamento UPGMA (Método de Agrupamento não Ponderado com base na Média Aritmética). A avaliação do ajuste do

GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085
fenograma foi realizada pela correlação co-fenética. Utilizou-se o aplicativo computacional NTSYSpc versão: 2.1 (Rohlf, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 36 pares de ‘primers’ utilizados, apenas dez apresentaram ampliações polimórficas de fácil interpretação (Tabela 1). Joobeur *et al.* (2006), ao avaliar a capacidade de detectar polimorfismo, desses 36 ‘primers’, reportaram que todos detectaram polimorfismo em oito acessos de melancia, incluindo cinco acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* e três de *C. lanatus* var. *citroides*. Essa diminuição no número de SSR em detectar polimorfismo, pode ser devido ao fato de que, no presente trabalho, esses microssatélites foram avaliados quanto à capacidade de detectar polimorfismo em cultivares comerciais de melancia, todas pertencentes à espécie *C. lanatus* var. *lanatus*.

Foram detectados 32 alelos nos dez microssatélites analisados, onde o número de alelos por loco variou de dois a cinco, com média de 3,2 alelos por microssatélite nas 17 cultivares de melancia e um acesso de *C. colocynthis* genotipadas. A média descrita é comparável com resultados reportados por Guerra-Sanz (2002), Joobeur *et al.* (2006) e Young-Sham *et al.* (2010). O tamanho dos alelos variou de 462 pb no MCPI-05 a 1064 pb no MCPI-39 (Tabela 1), diferente dos comprimentos encontrados por Youg-Shan *et al.* (2010), que utilizou os mesmos marcadores microssatélites e reportaram tamanho de alelos de 135 pb no MCPI-42 a 298 pb no MCPI-39.

A correlação entre a matriz de valores co-fenéticos e a matriz das distâncias de similaridade foi 0,86, o que indica que o dendograma apresentado (Figura 1) apresenta um bom ajuste nos agrupamentos das cultivares de melancia com os 30 alelos dez locos microssatélites. Três grupos foram observados, no ponto de corte de 0,42 de similaridade: grupo I – Polinizador mini, BRS Kuarah, Omaru Yamato, Sugar Baby, Pérola, Peacock, Emperor, Charleston Gray e Sunshade; grupo II – Smile, BRS Solei, Top Gun, BRS Opara, Crimson Sweet, Crimson Select, Nova Crimson e Fairfax, e grupo III - *C. colocynthis* (Figura 1).

Os 30 alelos dos nove locos SSR, não foram suficientes para separar todas as 17 cultivares de melancia, sugerindo que as variedades “Sugar Baby” e “Omaru Yamato”,

GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085 “Charleston Gray” e “Sunshade”, “Crimson Sweet” e “Nova Crimson”, são geneticamente iguais para os locos analisados”. Em algumas situações, marcadores moleculares tipo SSR podem apresentar informações adicionais quando descritores morfológicos são insuficientes para distinguir cultivares de uma espécie que apresenta base genética estreita (Priolli *et al.*, 2002). Nas situações em que não for possível distinguir acessos de uma dada espécie com um conjunto de marcadores preestabelecidos, Jakse *et al.* (2005) sugerem que marcadores adicionais sejam utilizados para revelar polimorfismos. ‘Primers’ adicionais, além dos testados neste trabalho, podem ser obtidos em Young-sham *et al.* (2010), ou até mesmo ajustes na temperatura de anelamento do protocolo PCR de alguns dos microssatélites testados no presente trabalho.

Marcadores moleculares do tipo SSR não tem sido muito utilizado na caracterização de variedades comerciais de melancia, porque existe um número limitado desses marcadores desenvolvidos para esta espécie. Além disso, a mesma mostra um baixo nível de polimorfismo molecular (Young-Shan *et al.*, 2010).

O padrão alélico e as estimativas de pares de bases para os 32 alelos nos dez locos microssatélites, revelados neste trabalho, é um primeiro esforço para o emprego de marcadores microssatélites em situações de proteção de cultivares para o agronegócio da melancia no Brasil, podendo também ser utilizado em situações de disputas comerciais referentes à certificação ou não das principais cultivares de melancia usadas no país.

REFERÊNCIAS

- CRESTE S; TULMANN NETO A; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.
- DOYLE JJ. AND DOYLE JL 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- GUERRA-SANZ JM. 2002 *Citrullus* simple sequence repeats markers from sequence databases. *Molecular Ecology Notes* 2: 223–225.

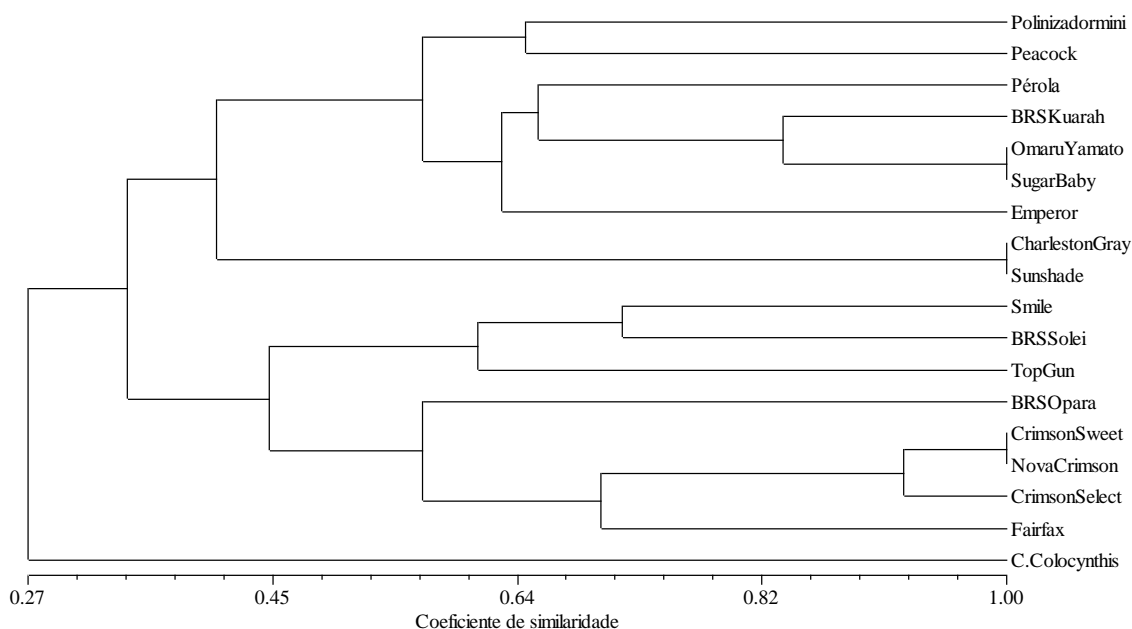
- GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085
- JAKSE J; MARTIN W; MCCALLUM J; HAVEY MJ. 2005. Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 912-917.
- JARRETE RL, MERRICK LC, HOLMS T, EVANS J; ARADHYA MK. 1996. Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai). *Genome* 40: 433-441.
- JOUBEUR T; GUSMINI G; ZHANG A; LEVI A; XU Y; WEHNER TC; OLIVER M; DEAN RA. 2006. Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or Arabidopsis genomes. *Theoretical and Applied Genetics* 112 (8): 1553-562.
- JOUBEUR T; KING JJ; NOLIN SJ; THOMAS CE; DEAN RA. 2004. The fusarium resistance locus From-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *The Plant Journal* 39: 283-297.
- MILLACH, SCK. 1999. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, MA DE; GOEDERT, CO; RAMOS, SRR. (Eds) *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro*. (online). Versão 1.0. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido/Brasília, DF: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, out 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/temas.html>. Acessado em: 04 de abril de 2011.
- PRIOLLI RHG; MENDES-JUNIOR CT; ARANTES NE; CONTEL EPB. 2002. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 25: 185-193.
- ROPHLF FJ. 2000. *NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system*, version 2.10m. Setauket: Exeter Software.
- VARSHNEY RK, GARNER A AND SORELLS ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotech.* 23: 48-63.
- YONG-SHAM KWON; YOU-HWAN OH; SEUNG-IN YI; HEE-YEUL KIM; JONG-MOON AN; SEUNG-GYUN YANG; SUNG-HAN OK; JEONG-SHEOP SHIN. 2010.

GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085
 Informative SSR markers for commercial variety discrimination in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Genes & Genomics* 32: 115-122.

Tabela 1. Padrão alélico, em pares de bases, estimado para 17 cultivares e um acesso de melancia, genotipados com dez marcadores microssatélites [Allelic pattern in base pairs, estimated for 17 cultivars and one accession of watermelon, genotyped with ten microsatellite markers]. Petrolina, 2011.

Cultivares	Locos MCPI									
	4	5	7	11	14	16	21	26	33	39
Polinizador mini	736/774	556/556	742/742	738/738	683/683	810/810	480/480	640/640	870/870	965/965
Pérola	774/779	556/556	742/742	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	856/856	965/965
Smile	774/779	462/462	623/623	738/738	683/683	742/469	475/475	640/640	856/856	965/965
BRS Solei	736/774	462/462	623/623	738/738	683/683	742/469	475/475	640/640	870/870	965/965
BRS Kuarah	736/774	556/556	623/623	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	870/870	965/965
BRS Opara	736/774	462/462	742/742	665/665	683/683	469/742	480/480	577/577	870/870	942/942
Crimson Sweet	736/774	462/462	742/742	831/831	683/683	469/742	480/480	640/640	856/856	942/942
Crimson select	736/774	462/462	742/742	831/831	638/701	469/742	480/480	640/640	856/856	942/942
Nova Crimson	736/774	462/462	742/742	831/831	683/683	469/742	480/480	640/640	856/856	942/942
Top Gun	774/799	462/462	742/742	738/738	683/683	469/742	480/480	640/640	856/856	965/965
Omato Yamato	736/774	556/556	623/623	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	856/856	965/965
Sugar Baby	736/774	556/556	623/623	738/738	683/683	810/810	475/475	640/640	856/856	965/965
Fairfax	736/774	462/462	742/742	728/728	683/683	469/742	475/475	640/640	856/856	942/942
Emperor	736/774	556/507	742/742	738/738	683/683	810/835	475/475	640/640	856/870	942/965
Charleston Gray	774/799	507/507	742/742	738/738	683/683	835/835	475/475	640/640	856/856	942/942
Peacock	736/774	556/556	742/742	738/738	683/683	810/810	480/480	577/577	856/856	942/965
Sunshade	774/799	507/507	742/742	738/738	683/683	835/835	475/475	640/640	856/856	942/942
C. Colocynthis	671/703	579/579	722/742	738/738	683/683	787/787	475/475	640/640	856/856	965/1064

HORTALICAS: DA ORIGEM AOS DESAFIOS DA SAÚDE E SUSTENTABILIDADE



GAMA RNCS; SANTOS CAF; DIAS, RCS; SOUZA, FF. 2011. Caracterização molecular e similaridade entre cultivares de melancia com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH. 3077-3085

Figura 1. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard de 17 cultivares de melancia e um acesso *C. colocynthis* genotipados para 32 alelos de dez locos microssatélites. Correlação cofenética = 0,86 [UPGMA dendrogram of Jaccard similarity coefficient of 17 cultivars of watermelon and one access *C. Colocynthis* genotyped for 32 alleles from ten microsatellite loci. Cophenetic correlation = 0.86]. Petrolina, 2011.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa. À Embrapa Semiárido pelo apoio às atividades de pesquisa.

