

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Cucumis melo* PARA *Luffa cylindrica*

Alceu Alves Pereira Peixoto¹, Juliano Leles Villela², Maria Aldete Justiniano Fonseca Ferreira³, Marco Antonio Ferreira⁴, Zilneide Pedrosa de Souza Amaral⁵, Rherman Radicchi Teixeira Vieira⁶, Mariana Teixeira Rodrigues Lira⁷, Gláucia Salles Cortopassi Buso⁸

Resumo

A família Cucurbitaceae, grupo vegetal que ocorre nas regiões tropicais do mundo, é formada por cerca de 118 gêneros que contém em torno de 825 espécies. Essa família possui grande importância para agricultura familiar brasileira, sendo a bucha vegetal (*Luffa cilíndrica*) o foco do presente estudo. Programas de melhoramento genético vêm sendo desenvolvidos para aumentar a eficiência do sistema produtivo, sendo uma de suas etapas a análise da variabilidade genética entre as variedades cultivadas. Considerando o alto custo para o desenvolvimento de primers microssatélites, a análise de transferibilidade entre espécies aparentadas é bastante oportuna. O objetivo desse trabalho foi analisar a transferibilidade de primers microssatélites de melão (*Cucumis melo*) para bucha (*L. cilíndrica*), fornecendo ferramenta biotecnológica de ponta para estas espécies. Para isso 30 primers avaliados em 20 acessos de bucha e 18 foram otimizados.

Introdução

A família *Cucurbitaceae*, grupo vegetal que ocorre nas regiões tropicais do mundo, é formada por cerca de 118 gêneros que contém em torno de 825 espécies. Essa família possui grande importância para agricultura familiar brasileira, sendo que a bucha vegetal (*Luffa cilíndrica*) tem se mostrado bastante viável em solos brasileiros, sendo cultivada em quase todas as regiões. Apesar de não possuir a mesma importância comercial de outras representantes da família, a bucha vegetal tem sido muito considerada na substituição de buchas produzidas com matéria não biodegradável e derivados do petróleo, também estão em estudo as possíveis utilizações na indústria alimentícia, uso medicinal e biocatalizadores na fabricação de biodiesel. Devido a sua importância econômica, programas de melhoramento genético vêm sendo desenvolvidos para aumentar a eficiência do sistema produtivo. Uma forma eficiente de auxiliar os programas de melhoramento é a análise da variabilidade genética por meio de marcadores moleculares, pois detectam dissimilaridades entre diferentes acessos em nível de DNA. Dentre eles, destacam-se os marcadores microssatélites ou SingleSequence Repeat (SSR) por serem altamente polimórficos, mostram herança co-dominante, possuem fácil interpretação e são amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR). Microssatélites são elementos polimórficos abundantes em genomas nucleares e consistem de seqüências curtas de DNA, usualmente menores que quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em seqüência (WANG et al., 1994). Essas regiões estão uniformemente distribuídas por todo o genoma eucariótico, geralmente inseridas em seqüências de cópia única (TAUTZ, 1989). Fragmentos contendo microssatélites podem ser amplificados via PCR usando *primers* complementares às regiões conservadas que flanqueiam essas repetições, e o polimorfismo entre os indivíduos surge de diferenças no número de repetições. Em contraste com marcadores Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), os microssatélites requerem o conhecimento prévio da seqüência de DNA. Logo, é necessário, primeiro, desenvolver os *primers* específicos para cada loco de cada espécie o que demanda alto custo e grande quantidade de trabalho

¹ Alceu Alves Pereira Peixoto, estudante de Agronomia, Universidade de Brasília, email: alceueduca@gmail.com

² Juliano Leles Villela, estudante de Agronomia, Universidade de Brasília, email: julianovillela@agronomo.eng.br

³ Maria Aldete Justiniano Fonseca Ferreira, pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e.mail: aldete@cenargen.embrapa.br

⁴ Marco Antonio Ferreira, pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e.mail: mantonio@cenargen.embrapa.br

⁵ Zilneide Pedrosa de Souza Amaral, assistente de pesquisa Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e.mail: zilneide@cenargen.embrapa.br

⁶ Rherman Radicchi Teixeira Vieira é Aluno de Agronomia, Universidade de Brasília, email: rrtv_@hotmail.com

⁷ Mariana Teixeira Rodrigues Lira é Aluna de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, email: mari_trl@hotmail.com

⁸ Gláucia Salles Cortopassi Buso, pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e.mail: buso@cenargen.embrapa.br

envolvida (FERREIRA;GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, muitos estudos têm mostrado a possibilidade de usar pares de *primers* desenvolvidos para uma espécie em outra espécie do mesmo gênero ou de gêneros diferentes (ROA et al., 2000). Considerando o alto custo para o desenvolvimento de marcadores microssatélites, a estratégia de análise de transferibilidade desses marcadores de uma espécie para outra é bastante oportuna.

O objetivo desse trabalho foi testar uma bateria de 30 primers SSRs desenvolvidos para melão (*Cucumis. melo*) em acessos de bucha. Após um teste de amplificação, a temperatura de anelamento de 18 primers foi otimizada para bucha e a transferibilidade desses 18 foi analisada, fornecendo ferramenta biotecnológica de ponta para estas espécies.

Material e Métodos

Uma bateria de primers SSR desenvolvidos para melão foram testados em 2 indivíduos de bucha vegetal. Vinte acessos de bucha, de origem diversa, foram plantados em casa de vegetação e suas folhas foram colhidas para a extração de DNA um mês após germinação das sementes, conforme Ferreira e Grattapaglia (1998). Os primers que amplificaram, inicialmente, foram otimizados e testados nesses acessos.

Trinta primers de melão foram testados na amplificação de DNA de bucha, em reações de PCR. Os primers que mostraram amplificação positiva tiveram sua temperatura de anelamento otimizada para bucha. Para as reações de PCR foi feito um mix contendo: 1,92 de água MilliQ; 1,52 µl de tampão 10X; 0,29µl de MgCl₂ 50 mM; 1,52 µl de dNTPs 25 mM cada; 1,52µl de BSA 10 µg/µl, 3µl de primer a 1µM; 0,23µl de *Taq* e mais 3 µl de DNA genômico a 3ng/µl. As reações de amplificação dos primers SSR ocorreram da seguinte forma: 95 °C por 5 min para desnaturação, 1 min a 94°, 1 min à temperatura de anelamento, 1 min a 72° C durante 30 ciclos, e mais uma extensão de 72° C por 7 min. As temperaturas de anelamento variaram entre 48 e 60°C. Para a visualização dos resultados das reações de PCR foi utilizado gel de poliacrilamida a 5% de concentração, submetido a uma corrente de 90 watts por aproximadamente 45 minutos, corado com nitrato de prata para a verificação do perfil eletroforético obtido.

Resultados e Discussão

Dos 30 primers de melão testados, muitos amplificaram DNA de bucha e 18 primers foram otimizados até o momento para 19 indivíduos de bucha (*L. cylindrica*), esse resultado demonstra que existe potencial para utilização desses primers em programas de melhoramento e estudos de variabilidade genética. Desses 18 primers, até o presente momento, dois apresentaram polimorfismo com bandas bem definidas em gel de poliacrilamida. Outros quatro mostram ser monomórficos com bandas também bem definidas. Os outros doze primers testados serão novamente utilizados para a confirmação de monomorfismo, já constatada em corrida anterior feita também em gel de poliacrilamida, mas sem bandas bem nítidas. Essa mesma bateria de primers SSR foi testada para melancia (*Citrullus lanatus*) e a transferibilidade foi de aproximadamente 50% (LAMAS et al., 2007). Já em Ritschel et al, (2004), o resultado foi diferente, onde 67 primers de melão foram testados e apenas 16 produziram produtos de PCR em *C. lanatus*, representando apenas 23,88% dos primers. O tamanho dos alelos variou de 80 pares de base (pb) a 100pb. Atualmente outros 60 primers desenvolvidos para melão (*C. melo*) estão sendo testados em bucha e suas temperaturas de anelamento otimizadas.

Os resultados obtidos neste estudo são promissores e de grande valia para utilização dos primers transferíveis em estudos de variabilidade e programas de melhoramento de espécies da família Cucurbitaceae, reduzindo os custos e tempo na elaboração deste tipo de trabalho, por não ser necessário o desenvolvimento de outros marcadores específicos para essas espécies.

Referências

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

LAMAS, N.S.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. de S.; VIEIRA, J. V.; FERREIRA, M. A. J. da F.; BUSO, G. S. C. Detecção de polimorfismo em melancia com primers microssatélites de melão. In: 47 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2007, Porto Seguro. Revista da Associação Brasileira de Horticultura. Brasília: Associação Brasileira de Horticultura, 2007. v. 25, p. 94-94.

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. BMC Plant Biology 2004, 4:9

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D. Survey of plant short tandem repeats. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 88, n. 1, p. 1-6, 1994.