

Detecção de polimorfismo em melancia com primers microssatélites de melão.

Natalia da Silva e Lamas¹; Marco Antônio Ferreira¹; Zilneide Pedrosa de Souza Amaral¹; Jairo Vidal Vieira²; Maria Aldete Justiniano da Fonseca Ferreira¹; Gláucia Salles Cortopassi Buso¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia C.P. 02372, 70.770-900, Brasília, DF; ²Embrapa Hortaliças C.P. 218, 70.359-970, Brasília, DF.

email: buso@cenargen.embrapa.br

RESUMO

A melancia, no mercado nacional, é produzida com as cultivares que foram introduzidas dos Estados Unidos e Japão, que apesar de apresentarem boa qualidade de frutos em termos de cor e teor de açúcar, não são adaptadas às condições brasileiras, pois apresentam baixa produtividade e são suscetíveis a várias doenças. Para se desenvolver cultivares adaptadas, deve-se incorporar genes de acessos promissores, o que implicará no manejo de caracteres de herança quantitativa. Marcadores microssatélites (SSR) constituem uma classe de marcadores que detectam polimorfismo em regiões hipervariáveis do DNA e são ideais para este tipo de estudo, pela riqueza de informação genética que oferecem e pela facilidade de obtenção de dados genéticos. É possível que a transferibilidade ocorra entre algumas espécies de cucurbitáceas, como o melão e a melancia, uma vez que para algumas espécies dentro do mesmo gênero a taxa de transferência de marcadores tem sido elevada. Considerando o alto custo para o desenvolvimento destes marcadores, a estratégia de análise de transferibilidade de microssatélites de *Cucumis melo* para *Citrullus lanatus* é bastante oportuna. Um efeito significativo seria a redução no custo de desenvolvimento da tecnologia. Portanto, uma bateria de 133 primers microssatélites que foram desenvolvidos para melão na EMBRAPA CENARGEN tiveram sua transferibilidade testada para melancia. Os 60 marcadores microssatélites que foram transferíveis para melancia foram testados em acrilamida para detecção de polimorfismo, sendo que estes serão utilizados na construção de um mapa genético para melancia com base em população segregante para resistência a doenças e outras características de interesse.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, *Cucumis melo*, SSR, marcadores moleculares, melhoramento genético, transferibilidade.

ABSTRACT – Polymorphism detection in watermelon using melon microsatellite markers.

The watermelon cultivars, produced for the national market, were introduced from USA and Japan, which besides to produce good quality products in terms of color and sugar content are not adapted to the Brazilian conditions, because they present low productivity and are susceptible to many diseases. To develop adapted cultivars, the incorporation of genes from prominent accessions is necessary. This implies in breeding for quantitative heritable characters. Microsatellite markers constitute a marker class that can detect polymorphism in DNA hypervariable regions and are ideal for this kind of study, for the information richness, as for the facility to obtain genetic data. For some species in the same genus the transferability rate has been high. It is possible that this is also true for cucurbitaceae species, as melon and watermelon. Considering the elevated costs for development of these markers the microsatellite transferability analysis from *Cucumis melo* to *Citrullus lanatus* is a very interesting approach. A significant effect would be cost reduction in the development technology. Therefore, a set of 133 microsatellite primers developed for melon in Embrapa Genetic Resources and Biotechnology were tested for their transferability to watermelon. The 60 markers that were transferable had their polymorphism tested in polyacrylamide gel, and will be used in the construction of a genetic map based on a segregant population for disease resistance and other important characteristics.

Keywords: *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*, molecular markers, genetic breeding, transferability.

INTRODUÇÃO

A melancia destaca-se entre as principais cucurbitáceas cultivadas no Brasil, sendo que apresenta grande variabilidade genética na agricultura tradicional do Nordeste, que está sendo resgatada para a formação de um Banco de Germoplasma, tendo-se até o momento mais de 500 acessos coletados (Queiroz, 1998). No entanto, os acessos coletados apresentam, via de regra, polpa de cor branca e baixo teor de açúcar, além de resistência a doenças, prolificidade e outros caracteres de importância para o melhoramento (Dias et al., 1999). Assim, para se desenvolver cultivares adaptadas, torna-se necessária a incorporação de genes dos acessos promissores.

O uso de marcadores moleculares é mais uma ferramenta na tentativa de atingir o objetivo do melhoramento, sendo os marcadores microssatélites indicados para esse fim. Estes se caracterizam por serem co-dominantes, e permitem identificar o genótipo

específico de cada indivíduo de acordo com os alelos presentes na população estudada (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Para algumas espécies dentro do mesmo gênero a taxa de transferência de marcadores tem sido elevada, como observado em algumas mirtáceas e nos gêneros *Capsicum* (SARDAGMA *et al.*, 2001) e *Arachis* (dados não publicados). É possível que isto seja verdadeiro também para algumas espécies de cucurbitáceas, como o melão e a melancia. Essa transferibilidade seria útil, pois apenas sete marcadores microsatélites foram desenvolvidos até o momento para melancia (Jarret *et al.*, 1997).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a verificação da transferibilidade de primers SSRs desenvolvidos para melão em melancia, utilizaram-se quatro indivíduos desta última espécie, sendo um resistente a doenças e o outro susceptível, dois de uma cultivar comercial, e dois indivíduos de melão. Foram testados 133 pares de primers SSRs de melão utilizando-se seis temperaturas de anelamento que variaram entre 48°C e 58°C com intervalos de 02 graus centígrados. As reações de amplificação do DNA genômico foram realizadas via PCR ("Polymerase Chain Reaction"), utilizando-se 5 minutos a 94°C para desnaturação, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 48-58°C, 1 minuto a 72 graus, e uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C. Para cada reação de amplificação, foram utilizados 3,0 µl de DNA a 3,0 ng/µl; 1,9 µl de água milli-Q autoclavada; 1,30 µl Tampão 10X para *Taq* DNA Polimerase adicionados 50mM de MgCl₂; 1,3 µl de dNTP 2,5 mM; 1,3 µl de BSA 2,5 mM; 4,0 µl de primer e 0,2 µl de enzima *Taq* DNA polimerase, totalizando 13µl de reação. Após a amplificação os fragmentos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 3,5%, corado com brometo de etídio.

Após este processo, os primers que apresentaram transferibilidade em agarose foram testados em gel de acrilamida a 4% na temperatura onde foram otimizados na agarose, corados com nitrato de prata, submetidos a uma corrente de 90 Volts por aproximadamente 1,5 horas. Foram testados nos mesmos indivíduos utilizados em gel de agarose. Neste tipo de gel o polimorfismo pode ser melhor visualizado, uma vez que há maior separação dos alelos. Sendo assim, os primers testados em acrilamida foram analisados, observando-se polimorfismo e tamanho das bandas, além da qualidade da amplificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 133 primers testados, 60 pares de primers amplificaram no controle (melão) e nos quatro indivíduos de melancia, ou seja, em aproximadamente 45% dos casos houve transferibilidade, que é resultado da sintonia entre as regiões que flanqueiam

os microssatélites entre espécies aparentadas. Em Danin-Poleg *et al.* (2001), resultado semelhante foi observado, onde 20 de um total de 40 marcadores microssatélites de *Cucumis melo* produziram produtos de PCR em *Citrullus lanatus* (50% de transferibilidade). Já em Ritschel *et al.* (2004), o resultado foi diferente, onde 67 primers foram testados e apenas 16 produziram produtos de PCR em *Citrullus lanatus*, representando apenas 23,88% dos primers.

Em acrilamida, foram testados 41 dos 60 primers amplificados em agarose. No total, 21 primers são monomórficos, ou seja, não mostraram alelos de diferentes tamanhos entre os indivíduos analisados, 12 são polimórficos e 8 primers não amplificaram, ou por problemas na reação, ou pela temperatura de anelamento, que será modificada.

O tamanho dos alelos variou de 90 pares de base (pb) a 330 pb. Em alguns primers, o polimorfismo apareceu apenas entre o primeiro indivíduo (parental resistente a doenças) e os demais; já outros primers demonstraram tamanhos diferentes de alelos tanto para melancia resistente quanto susceptível em relação aos demais indivíduos.

LITERATURA CITADA

DANIN-POLEG, Y.; REIS, N.; TZURI, G.; KATZIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 61-72, 2001

FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3^a ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. Pp 220, 1998

JARRET, R.L.; MERRICK, L.C.; HOLMS, T.; EVANS, J.; ARADHYA, M.K. Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). *Genome*, 40 (4): 433-441, 1997.

QUEIRÓZ, M. A de. Cucurbitáceas no semi-árido do Nordeste brasileiro: resgate, conservação e uso. In: *Encontro Sobre Temas de Genética e Melhoramento*, 15, 1998, Piracicaba, SP. Anais...Piracicaba: USP/ESALQ, 1998, p. 1-12.

RITSCHHEL, 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.

SARDAGMA, A.A.; WELTER, L.; BOITEAUX, L.; BUSO, G.S.C.; FERREIRA, M.E. Conservação de regiões flangeadoras de locos hipervariáveis do gênero *Capsicum* spp em outros gêneros da família Solanaceae. In: *47 Congresso Brasileiro de Genética*, 2001, Congresso Nacional de Genética, 47. Águas de Lindoia: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. v. Anais.