

## **Seleção de primers RAPD em germoplasma de abóbora e bucha.**

**Haony Alves da Silva<sup>1</sup>; Gláucia Salles Cortopassi Buso<sup>1</sup>; Maria Aldete Justiniano da Fonseca Ferreira<sup>1</sup>; Patrícia Alves Gomes<sup>1</sup>; Larissa Veras Barrozo<sup>1</sup>; Warley Marcos Nascimento<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 2372, 70770-900; Brasília, DF; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, C.P. 218, 70359-970; Brasília, DF. E-mail: aldete@cenargen.embrapa.br

### **RESUMO**

As espécies cultivadas da família *Cucurbitaceae* são importantes para o agronegócio familiar e empresarial brasileiro, gerando emprego e renda. No Brasil há uma grande variabilidade genética para algumas destas espécies, como a bucha e a abóbora. Para acessar e usar os recursos genéticos disponíveis no país há a necessidade de conhecer como se encontra distribuída a variabilidade genética. Uma ferramenta útil para se obter esta informação é o uso de marcadores moleculares para caracterizar o germoplasma. Este trabalho teve como objetivo realizar a seleção de primers RAPD para a caracterização molecular de 55 acessos de abóbora e 44 de bucha. Os protocolos de extração de DNA e de reações RAPD, foram otimizados para estas espécies, não havendo necessidades de ajustes adicionais. Dos 47 primers testados, 87% foram polimórficos para as abóboras e 55% para as buchas. Nas abóboras, o número de locos polimórficos por primer variou de um (primers OPX-05 e OPX-08) a nove (OPG-09). Nas buchas o número de locos polimórficos por primer variou de um (OPB-18, OPK-14, OPV-01, OPW-08, OPX-05, OPX-07 e OPY-01) a oito (OPH-04). Cerca de 15% dos primers apresentaram apenas um loco polimórfico nas buchas. No geral, constatou-se que é preciso testar outros primers especialmente para a bucha, de modo que sejam selecionados aqueles com um maior número de locos polimórficos, o que resultará em economia de tempo e de custos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Luffa cylindrica*, marcadores moleculares, caracterização molecular.

### **ABSTRACT**

### **ABSTRACT**

#### **Selection of RAPD primers in squash and sponge gourd germplasm**

Cultivated species of the *Cucurbitaceae* are important in Brazilian agribusiness generating jobs and revenue. Brazil has a high genetic variability for some of these species such as squash and sponge gourd. To access the genetic resources available in the country, it is necessary to know how genetic variability is distributed. The use of molecular markers has proven to be a useful tool to characterize germplasm. This purpose of this research

was to select RADP primers to characterize 55 accessions of squash and 44 of sponge gourd. The extraction protocols for DNA and RADP reactions were optimized for these species without the need of additional adjustments. Of the 47 primers, 87% were polymorphic for squash e 55% for sponge gourd. In squash the number of polymorphic loci per primer varied from one (OPX-05 and OPX-08) to nine (OPG-09). In sponge gourds the number of polymorphic loci per primer varied from one (OPB-18, OPK-14, OPV-01, OPW-08, OPX-05, OPX-07 e OPY-01) to eight (OPH-04). About 15% of the primers only had one polymorphic locus in sponge gourds. In general it was shown that it is necessary to test other primers, especially for sponge gourd, so as to select those with a higher number of polymorphic loci, which will same time and money.

**KEYWORDS:** *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Luffa cylindrica*, molecular markers, molecular characterization

## **INTRODUÇÃO**

As espécies cultivadas da família *Cucurbitaceae* apresentam papel fundamental no agronegócio familiar e empresarial brasileiro, gerando emprego e renda. A bucha apresenta grande potencial, pois seu cultivo e consumo têm aumentado nos últimos anos. No município mineiro de Bonfim, são cultivados 70 ha de bucha por 120 famílias, gerando 800 empregos diretos e indiretos, sendo que em 2006, este município exportou 250 dúzias de bucha para a Espanha (Zepper & Franco, 2006). A bucha além de ser utilizada como esponja vegetal, tem potencial de uso em indústrias de cosméticos e de papel, assim como substituir a espuma em derramamento de óleo, no estofamento de automóveis, como adubo e como matéria-prima para o biodiesel.

Apesar de não serem nativas do Brasil, algumas espécies desta família ocorrem em abundância, apresentando grande variabilidade genética. Para acessar e usar os recursos genéticos disponíveis no país é necessário conhecer a distribuição da variabilidade genética. Saber se esta é maior ou menor dentro ou entre estados, por exemplo, e quão distante geneticamente é um acesso de germoplasma do outro. Uma ferramenta útil para se obter tais tipos de informações é o uso de marcadores moleculares. Este trabalho teve como objetivo realizar a seleção de primers RAPD para que, posteriormente, os mesmos sejam usados na caracterização molecular de acessos de abóbora e bucha conservados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os acessos de germoplasma de abóbora e bucha foram cultivados na Embrapa Hortaliças e as etapas de laboratório foram conduzidas no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estão sendo caracterizados 55 acessos de

abóbora e 44 de bucha oriundas dos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso e Tocantins. Tais acessos além da caracterização molecular estão sendo caracterizados também para descritores morfológicos e agrônômicos e no caso das abóboras também para teor de beta-caroteno.

Foi realizada a extração de DNA de amostras de quatro plantas por acesso conforme protocolo CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1996). A reação de amplificação do DNA teve um volume total de 13  $\mu$ l e os reagentes foram misturados na forma de coquetel, separadamente do DNA genômico. Cada reação continha 1,3  $\mu$ L de tampão PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl); 0,6  $\mu$ L de  $MgCl_2$  a 50 mM; 1,3  $\mu$ L de dNTPs a 2,5 mM; 4,0  $\mu$ L de primer a 10 ng/ $\mu$ L; 1,3  $\mu$ L de BSA a 2,5 mM; 0,2  $\mu$ L (1 unidade) de Taq DNA polimerase; 3  $\mu$ L de DNA genômico a 3ng/ $\mu$ L e 1,3  $\mu$ L de água milliQ estéril. O programa utilizado no termociclador, consistiu de 1 minuto a 96°C para desnaturação inicial do DNA, seguido por 40 ciclos de amplificação, sendo que cada ciclo foi composto por 1 minuto a 92°C (desnaturação do DNA), 1 minuto a 35°C (anelamento do *primer*) e 2 minutos a 72°C (amplificação do DNA). Por fim teve um ciclo final de extensão com duração de 5 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v), usando tampão TEB pH 8,0 (0,09M de Tris; 0,09M de Ácido Bórico e 2 mM de EDTA), a uma tensão constante de 3 V/cm. Os géis foram corados com 10  $\mu$ l de Brometo de Etídio (10mg/ml) diluídos em 100 ml de TEB e foram documentados sob luz ultravioleta. Para a triagem de primers informativos foram efetuadas reações de amplificação em quatro plantas de cada gênero e foram testados 47 primers (Operon Technologies) de 10 pares de base.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 47 primers testados, 87% foram polimórficos para as abóboras e 55% para as buchas. Os primers que não detectaram polimorfismo nas abóboras foram: OPJ-12, OPL-04, OPL-17, OPN-04, OPX-04 e OPX-14. Já nas buchas os primers monomórficos foram: OPD-05, OPE-16, OPE-18, OPG-04, OPH-03, OPJ-09, OPJ-11, OPK-04, OPL-05, OPL-11, OPL-14, OPL-15, OPL-19, OPN-04, OPU-13, OPV-16, OPV-20, OPW-18, OPX-04, OPX-08, OPX-14.

Nas abóboras, o número de locos polimórficos por primer variou de um (OPX-05 e OPX-08) a nove (OPG-09). Nas buchas o número de locos polimórficos por primer variou de um (OPB-18, OPK-14, OPV-01, OPW-08, OPX-05, OPX-07 e OPY-01) a oito (OPH-04). Cerca de 15% dos primers apresentaram apenas um loco polimórfico nas buchas.

De um modo geral, observa-se que o grupo de primers testados apresentou maior polimorfismo nas abóboras do que nas buchas, inclusive com maior frequência de locos polimórficos por primer. Isso demonstra a necessidade de testar outros primers nos acessos de germoplasma de abóbora e bucha, principalmente para esta última. É fundamental que seja identificado um maior número de primers com um maior número de locos polimórficos, a fim de que seja de fato otimizada a técnica, de modo que sejam reduzidos custos e tempo. Por outro lado, os protocolos de extração de DNA e de reações RAPD, foram otimizados para estas espécies, não havendo necessidades de ajustes adicionais.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, Embrapa e Programa Biodiversidade Brasil-Itália pelo apoio financeiro à realização das atividades e pelo pagamento de bolsas aos estagiários.

### **LITERATURA CITADA**

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. 2. ed. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 220 p.

ZEPPEL, P.; FRANCO, H. 2006. Vivendo de Bucha. *Revista Dinheiro Rural* 22: 60-61.