

Isolamento via PCR heterólogo de alelos de genes codificadores de enzimas da via biossintética de carotenóides em melancia.

Maria Esther de Noronha Fonseca^{1,2}; Leonardo S. Boiteux^{1,2}

¹Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970, Brasília-DF, Brasil; ²Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq/MCT.

RESUMO

Os genes da via biossintética de carotenóides apresentam seqüência conservada, o que permite a amplificação direta via PCR heterólogo com “primers” degenerados. Neste trabalho, foram avaliadas amostras de DNA genômico de dois acessos de melancia contrastantes para teores e tipos de carotenóides (a cultivar ‘Crimson Sweet’ com a típica polpa vermelha e linhagem ‘CNPq 133’ de polpa branca). O objetivo foi identificar a presença de polimorfismos entre este dois acessos em dois genes estruturais da via biossintética dos carotenóides. Foram isolados, seqüenciados e identificados nestes acessos amplicons correspondendo a genes/alelos análogos aos codificadores das enzimas licopeno beta-ciclase e licopeno epsilon-ciclase. A seqüência do gene da licopeno beta-ciclase de ‘Crimson Sweet’ é idêntica (na região estudada) à seqüência disponível no GenBank e que corresponde ao alelo encontrado em materiais de polpa de coloração vermelha. A seqüência obtida para o acesso de polpa branca é distinta tanto do alelo de ‘Crimson Sweet’ quanto à seqüência acessos de polpa amarela disponíveis no GenBank. Foram encontrados cinco polimorfismos de base (SNP) que poderão ser explorados no desenho de marcadores para cor de polpa em melancia. Os fragmentos amplificados do gene codificador da enzima licopeno epsilon-ciclase foram comparados com o gene/alelo de tomateiro

uma vez que não existem, até o presente momento, seqüências disponíveis para este gene em melancia no GenBank. O fragmento do gene codificador da enzima licopeno epsilon-ciclase possui regiões de similaridade com o gene de tomate, mas é um alelo distinto. Vários polimorfismos de base foram encontrados que diferem os alelos encontrados no material de polpa branca quando comparado com ‘Crimson Sweet’. Estes potenciais marcadores deverão ser validados em sistemas de seleção assistida visando desenvolver cultivares de melancia com maiores teores e diferentes tipos de carotenóides. Estes amplicons estão sendo mapeados em populações segregantes que foram desenvolvidas visando investigar co-segregação de marcadores com macromutações observadas em melancia (gene *W* controlando polpa de cor vermelha / branca).

Palavras-chave: melancia, marcadores moleculares, seleção assistida, carotenóides.

ABSTRACT

Amplification via heterologous PCR of alleles from genes coding for enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway in watermelon.

Genes coding for enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway are extremely conserved across distinct plant taxa. This characteristic allows the direct amplification of alleles from these genes via

heterologous PCR with degenerate primers. In the present work, two watermelon accessions with contrasting flesh colors ('Crimson Sweet' a typical red-fleshed cultivar and the line 'CNPH 133' with whitish flesh) were used as genomic DNA sources aiming to identify polymorphisms in alleles of structural carotenoid pathway genes. Analogous watermelon carotenoid amplicons were amplified, sequenced and characterized for the enzyme-coding genes of the lycopene beta-cyclase and lycopene epsilon-cyclase. The sequence of the 'Crimson Sweet' lycopene beta-cyclase was identical to that deposited in the GenBank as the red-flesh allele. Five single base polymorphisms were found in the corresponding sequence of the line 'CNPH 133', which might be used for primer design and marker development for red/white flesh color in watermelon. The

segment of the lycopene epsilon-cyclase gene was compared with that of tomato, since there is so far no report in the GenBank of this gene in watermelon. The analysis showed that tomato and watermelon alleles are distinct, but they still have some regions of identity. Several polymorphisms were found in the segments of epsilon-cyclase gene in 'Crimson Sweet' and 'CNPH 133'. These potential molecular markers can be validated for their usefulness in marker-assisted selection systems aiming to develop watermelon cultivars with distinct amounts and types of carotenoid pigments. These amplicons are currently being evaluated in populations segregating for the macromutation/gene *W*, which controls red flesh color phenotype in watermelon.

Keywords: watermelon, molecular markers, assisted selection, carotenoid.

Muitos dos genes da via biossintética de carotenóides apresentam seqüência extremamente conservada, o que tem permitido a amplificação direta de tais genes em diferentes espécies vegetais via PCR heterólogo com "primers" degenerados (Fonseca, 2000; Thorup et al., 2000). As informações de seqüência de genes codificadores de enzimas da via de carotenóides têm sido utilizadas no estabelecimento de sistemas de seleção assistida e poderão também ser utilizados em estratégias de transformação genética visando obter cultivares com melhores combinações e teores de carotenóides nutracêuticos (Araújo et al., 2007). No presente trabalho, dois acessos de melancia contrastantes para coloração de polpa foram avaliados em busca de polimorfismos em dois dos genes que codificam enzimas estruturais da via metabólica dos carotenóides. Estas enzimas (licopeno- α -ciclase e licopeno- ϵ -ciclase) atuam na conversão de licopeno em alfa-caroteno e beta-caroteno, respectivamente. Foram gerados iniciadores de síntese e otimizados os protocolos de PCR. Esta metodologia foi empregada na amplificação de fragmentos destes dois genes em dois acessos de melancia. Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foi identificado um alelo de licopeno beta-ciclase específico de variedades com polpa amarela e outro alelo específico de variedades com polpa vermelha (Bang et al., 2007). A seqüência deste alelo, disponível no GenBank, também foi utilizada para comparação com as seqüências obtidas nos dois acessos estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação do DNA genômico: A purificação de DNA de folhas de melancia utilizados neste estudo foi feita usando o método padrão de CTAB seguindo com algumas adaptações

implementadas por Boiteux et al. (1999). **Amplificação de genes da via biossintética de carotenóides:** Foram sintetizados (de acordo com a análise de seqüências conservadas) os oligonucleotídeos **BCFor** e **BCRev** para a amplificação de um segmento do gene codificador da enzima licopeno beta-ciclase e os oligonucleotídeos **ECFor** e **ECRev** para amplificação de um segmento do gene codificador da enzima licopeno epsilon-ciclase. A mistura da reação foi composta por 10.32 mL de água milliQ, 2.5 mL of 10 X DNA tampão da polimerase, 2.3 mL de MgCl₂ (25mM), 5.7 mL de DNTs (0.5mM de cada), 1mL de cada 'primer' (10mM), e 0.18 mL (5_u/mL) da enzima DNA polymerase termoestável. A reação de PCR foi conduzida em um termociclador Perkin Elmer Cetus 9700. A mistura foi aquecida a 94°C por 2 min e submetida a um programa de 40 ciclos (30s a 94°C / 1 min a 40°C com 70 % ramp, 1.5 min a 72°C e uma etapa final a 68°C for 10 min. **Clonagem e seqüenciamento:** Após amplificação os fragmentos de DNA foram clonados e seqüenciados. Alguns dos fragmentos, após serem seqüenciados, foram identificados como ampliações não-específicas, isto é, não correspondendo aos genes alvo. Os clones correspondentes aos genes codificadores das enzimas licopeno beta-ciclase e licopeno epsilon-ciclase de melancia 'Crimson Sweet' (típica polpa vermelha) e 'CNPH 133' (linhagem com polpa branca) foram seqüenciados. As seqüências de cada um dos genes em estudo foram comparadas através do alinhamento utilizando o programa Megalign (Lasergene, Madison, WI). Foram observados polimorfismos do tipo inserção/deleção (InDels) e também de uma ou poucas bases (SNPs = "Single Nucleotide Polymorphisms").

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados, seqüenciados e identificados segmentos análogos aos dos genes codificadores das enzimas licopeno beta-ciclase e licopeno epsilon-ciclase da melancia 'Crimson Sweet' (típica polpa vermelha) e do acesso 'CNPH 133' (polpa branca). A seqüência do gene codificador da enzima licopeno beta-ciclase de 'Crimson Sweet' idêntica à seqüência disponível no GenBank (alelo encontrado em materiais de cor vermelha) na região amplificada. Já a seqüência obtida para materiais de cor branca é distinta tanto do alelo de 'Crimson Sweet' quanto à seqüência de materiais amarelos disponíveis no GenBank. Foram encontrados cinco polimorfismos de base (Figura 1) que poderão ser explorados no desenho de marcadores para cor de polpa em melancia. Os fragmentos amplificados do gene codificador da enzima licopeno epsilon-ciclase foram comparados com o gene de tomate. Não existem seqüências disponíveis para este gene em melancia publicados no GenBank. O fragmento possui regiões de similaridade com o gene de tomate. Vários polimorfismos de base foram encontrados que diferem os alelos encontrados no material de polpa branca quando comparado com 'Crimson Sweet'. Estes genes e potenciais marcadores foram depositados no banco de seqüências do Laboratório de Melhoramento Genético e Análise Genômica. Estes potenciais marcadores deverão ser validados em sistemas de seleção assistida visando desenvolver cultivares de melancia com maiores teores e diferentes tipos de carotenóides.

Estes amplicons estão sendo mapeados em populações segregantes desenvolvidas a partir do cruzamento 'Crimson Sweet' x 'CNPH 133', visando investigar co-segregação destes marcadores com macromutações observadas em melancia (incluindo o gene *W* que controla o fenótipo polpa de cor vermelha).

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO AH; FONSECA MEN; BOITEUX LS. 2007. Diversidade de seqüência de um gene componente da via biossintética de carotenóides em espécies selvagens e cultivadas de *Solanum* (Seção *Lycopersicon*). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 233-237.
- BANG H; KIM S; LESKOVAR D; KING S. 2007. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene b-ciclase (*LCYB*) gene. *Molecular Breeding* 20: 63-72.
- BOITEUX LS; FONSECA MEN; SIMON PW. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32-38.
- FONSECA MEN. 2000. *Isolation of cDNA clones coding for enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway in carrot (Daucus Carota L.): Allelic diversity and patterns of expression*. Ph.D. Dissertation, University of Wisconsin, Madison, EUA, 251 pp.
- RAMALHO RA; FLORES H; SAUNDERS C. 2002. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Revista Panamericana Salud Publica* 12: 117-122.
- RODRIGUEZ-AMAYA DA. 2001. *Guide to Carotenoids Analysis in Food*. Washington: International Life Sciences Institute Press, 64p.
- SANTOS LMP; FILHO MB; SILVA-DINIZ A. 1996. Epidemiologia da carência de vitamina A no nordeste do Brasil. *Boletim de la Oficina Sanitária Panamericana* 120: 523-537,
- SMIDT CR; BURKE DS. 2004. Nutritional significance and measurement of carotenoids. *Current Topics on Nutraceutical Research*, 2: 79-91.
- THORUP TA; **TANYOLAC B; LIVINGSTONE KD; POPOVSKY S; PARAN I; JAHN M.** 2000. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 11192-11197.

Cinquenta anos contribuindo para
a saúde da população brasileira
Guarapari - ES

Isolamento via PCR heterólogo de alelos de genes codificadores de enzimas da via biossintética de carotenóides em melancia.

Red allele	T G G A G A A A G C A A A T T G A G C G A G C G A T A T T C A T T C T C A G G T	40
Canary allele	T G G A G A A A G C A A A T T G A G C G A G C G A T A T T C A T T C T C A G G T	40
White allele	T G G A G A A A G C A A A T T G A G C G A G C G A T A T T C A T T C T C A G G T	40
Crimson Sweet	T G G A G A A A G C A A A T T G A G C G A G C G A T A T T C A T T C T C A G G T	40
Red allele	C G C T A T C A G T T A T C T C C A C C A T T A A T T G G C G A G A A T A T G G	80
Canary allele	C G C T A T C A G T T A T C T C C A C C A T T A A T T G G C G A G A A T A T G G	80
White allele	C G C T A T C A G T T A T C T C C A C C A T T A A T T G G C G A G A A T A T G G	80
Crimson Sweet	C G C T A T C A G T T A T C T C C A C C A T T A A T T G G C G A G A A T A T G G	80
Red allele	A G C C A T C T T C C A A C T G T G G A C G C T G A C A A A C T C C C A A T C T	120
Canary allele	A G C C A T C T T C C A A C T G T G G A C G C T G A C A A A C T C C C A A T C T	120
White allele	A G C C A T C T T C C A A C T G T G G A C G C T G A C A A A C T C C C A A T C T	120
Crimson Sweet	A G C C A T C T T C C A A C T G T G G A C G C T G A C A A A C T C C C A A T C T	120
Red allele	T C T T C A A T T C C C C T A A T T C C A T C T C T T G G A G A A C A G T G G C	160
Canary allele	T C T T C A A T T C C C C T A A T T C C A T C T C T T G G A G A A C A G T G G C	160
White allele	T C T T C A A T T C C C C T A A T T C C A T C T A A T G G A G A A C A G T G G C	160
Crimson Sweet	T C T T C A A T T C C C C T A A T T C C A T C T C T T G G A G A A C A G T G G C	160
Red allele	C G G C G A A G T C A C T T C G T C C A A A T T G G G A C T C G T C A T T C G C	200
Canary allele	C G G C G A A G T C A C T T C G T C C A A A T T G G G A C T C G T C A T T C G C	200
White allele	C G G C G A A G T C A C T T C G T G C A A A T T G G G A C T C G T C A T T C G C	200
Crimson Sweet	C G G C G A A G T C A C T T C G T C C A A A T T G G G A C T C G T C A T T C G C	200
Red allele	G C T C C A C A T C C C T C C A A T C C A T A A C A A C C A A A T G G A G C T C	240
Canary allele	G C T C C A C A T C C C T C C A A T C C A T A A C A A C C A A A T G G A G C T C	240
White allele	G C T C C A C A T C C C T C C A A T C C A T A A C A A C C A A A T G G A G C T C	240
Crimson Sweet	G C T C C A C A T C C C T C C A A T C C A T A A C A A C C A A A T G G A G C T C	240
Red allele	C T T C C G T C C T C A G G T T C G C C T C C A A A C A C A C G C C T C T T C	280
Canary allele	C T T C C G T C C T C A G G T T C G C C T C C A A A C A C A C G C C T C T T C	280
White allele	C T T C C G T C C T C A G G T T C G C C T C C A A A C A C A C G C C T C T T C	280
Crimson Sweet	C T T C C G T C C T C A G G T T C G C C T C C A A A C A C A C G C C T C T T C	280
Red allele	A T G T T T T A A T C A C T G A A T T C C A T T G A A G	308
Canary allele	A T G T T T T A A T C A C T G A A T T C C A T T G A A G	308
White allele	A T G T T T T A A T C A C T G A A T T C C T T T G A A C	308
Crimson Sweet	A T G T T T T A A T C A C T G A A T T C C A T T G A A G	308

Figura 1. Alinhamento de amplicons PCR do gene codificador da enzima licopeno beta-ciclase obtidos utilizando DNA genômico dos acessos de melancia ‘Crimson Sweet’ e ‘CNPH 133’ (White allele). Comparações foram feitas com alelos disponíveis no GenBank (NCBI): “Red allele” (EF183521) e “Canary allele” (EF183522). As bases polimórficas estão destacadas em preto. [Figure 1 – Sequence alignment of PCR amplicons of the gene coding for the enzyme lycopene beta-cyclase obtained from genomic DNA of the watermelon accessions ‘Crimson Sweet’ and ‘CNPH 133’ (White allele). Comparisons were carried out with watermelon alleles available in the GenBank (NCBI): “Red allele” (EF183521) and “Canary allele” (EF183522). The polymorphic nucleotides are highlighted in black boxes].

Quarenta e cinco anos contribuindo para a saúde da população brasileira
Guarapari - ES

Isolamento via PCR heterólogo de alelos de genes codificadores de enzimas da via biossintética de carotenóides em melancia.

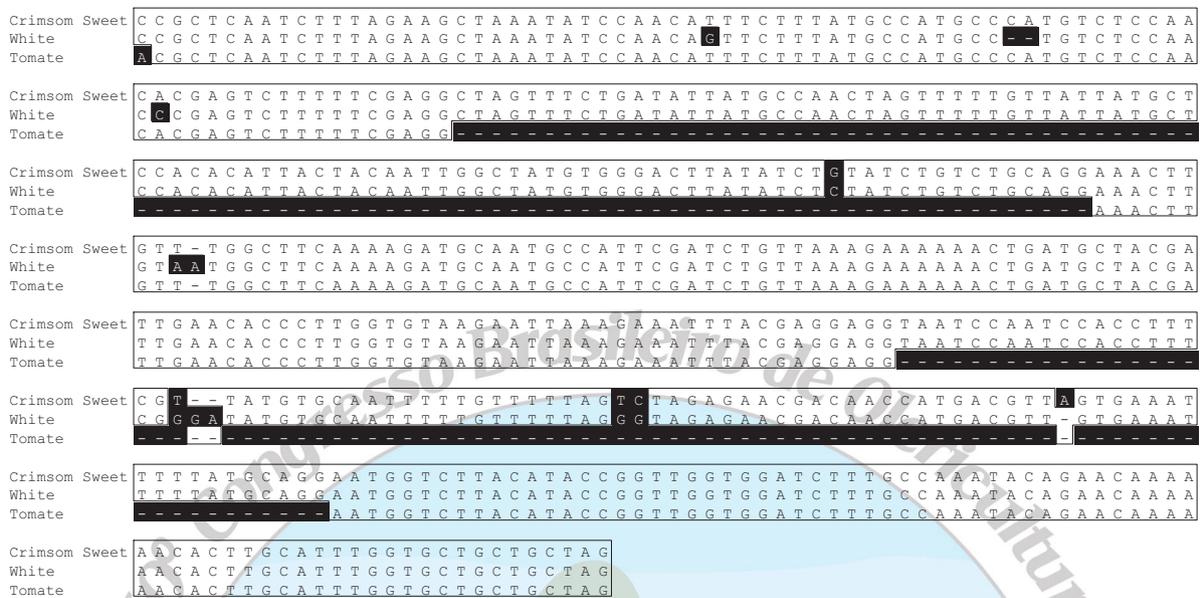


Figura 2. Alinhamento de amplicons de PCR obtidos com DNA genômico dos acessos de melancia ‘Crimson Sweet’ e ‘CNPH 133’ (White) que se mostraram análogos a um alelo do gene codificador da enzima licopeno epsilon-ciclase de tomateiro (EU533951) disponível no GenBank. As regiões polimórficas estão destacadas em preto. [Figure 2 – Sequence alignment of PCR amplicons obtained from genomic DNA of the accessions ‘Crimson Sweet’ and ‘CNPH 133’ (White) that were analogous to the lycopene epsilon-cyclase gene/allele from tomato (EU533951) available in the GenBank (NCBI). The polymorphic regions are highlighted in black boxes].

