

SILVA, M.L.; QUEIROZ, M.A.; FERRERIA, M.A.J.F.; BENKO-ISEPPOM, A.M. 2012. Caracterização molecular por ISSR de acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas. Horticultura Brasileira 30: S4445-S4451.

Caracterização molecular por ISSR de acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas.

¹Maria Luciene da Silva¹; Manoel Abilio de Queiróz²; Maria Aldete J. da F. Ferreira³; Ana Maria Benko-Iseppon⁴

¹Bolsista BFD/FACEPE, Embrapa Semiárido, CP 23 Petrolina, PE, msluciene@yahoo.com.br; ²Professor Titular, Universidade do Estado da Bahia, Av. Chastinet Guimarães, s/n São Geraldo, Juazeiro, BA, manaelabiliomaq@gmail.com; ³Pesquisadora Embrapa Semiárido, CP 23, Petrolina, PE, aldete.fonseca@cpatsa.embrapa.br; ⁴Professora Titular, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, ana.iseppon@gmail.com

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de 20 acessos de melancia e um de melão do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro da Embrapa Semiárido. Para isto foi realizada a extração de DNA de folhas jovens para amplificação de marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*). Onze primers ISSR, previamente selecionados foram aplicados na análise. O coeficiente de similaridade e o dendrograma foram obtidos pelo programa PAST (*Paleontological Statistics Software*), utilizando 1000 réplicas para cálculo dos valores de *bootstrap*. Os marcadores ISSR revelaram 130 bandas com 76,92% de polimorfismo. O dendrograma revelou três grupos principais, sendo o primeiro grupo contendo o acesso de melão, o segundo grupo composto por acessos da espécie *C. colocynthis* e o terceiro grupo comportando todos os acessos de *C. lanatus* var. *lanatus*. Os marcadores ISSR foram eficientes na diferenciação dos acessos de melancia e melão, revelando alto nível de polimorfismo entre os acessos estudados.

PALAVRAS CHAVES: *Citrullus lanatus*, variabilidade genética, marcadores ISSR.

ABSTRACT

ISSR molecular characterization of watermelon accessions from the Active Germplasm Bank of Cucurbitaceae.

This work aimed to develop a molecular characterization of 20 watermelon and melon accessions of the Active Germplasm Bank (AGB) of Cucurbits from EMBRAPA Semi-arid Northeast Brazil. For this purpose we performed a DNA extraction from young leaves for ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) amplification. Eleven ISSR primers previously selected were applied in the analysis. The similarity coefficient and the dendrogram were obtained using the PAST (*Paleontological Statistics Software*) program with *bootstrap* of 1000 replications. The ISSR markers revealed 169 bands with 76.9% of polymorphism. The dendrogram revealed three major groups, the first containing the melon accession, the second the accessions of *C. colocynthis* and the third group comprising all *C. lanatus* var. *lanatus* accessions. ISSR markers were able to differentiate the accessions of watermelon and cantaloupe, revealing high level of polymorphism among the accessions.

KEYWORDS: *Citrullus lanatus*, genetic variability, marker ISSR

O Nordeste brasileiro destaca-se entre as demais regiões quanto à produção de melancia (*Citrullus lanatus* spp.) (IBGE, 2010) e vem sendo apontado como um potencial centro de diversidade secundária da espécie do gênero *Citrullus* (ROMÃO, 2000). Contudo, a seca prolongada e a substituição de cultivos constituem a principal causa de erosão genética na região, principalmente em áreas dependentes de chuva, como o semiárido nordestino.

A coleta e caracterização do germoplasma mantido em áreas de agricultura tradicional constituem atividade necessária e urgente para evitar perdas de genes úteis. No Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro da Embrapa Semiárido, são conservados acessos de melancia coletados em várias regiões do Nordeste, sendo importante e necessária a caracterização do germoplasma para efetivo uso em programas de melhoramento. A caracterização molecular possibilita a avaliação de maior número de acessos em curto período de tempo, além de não sofrer ação do meio ambiente. O presente trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas, com marcadores ISSR para orientar trabalhos de melhoramento genético das espécies do gênero *Citrullus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito acessos de melancia da espécie *C. lanatus* var. *lanatus* (1 a 18), um acesso de *C. lanatus* var. *citroides* (19), um acesso de *C. colocynthis* (20) e um de melão (21), coletados em áreas de agricultura tradicional de Massaroca (Juazeiro - BA) e que se encontram preservados no BAG de Cucurbitáceas da Embrapa Semiárido foram submetidos à análise com o marcador ISSR (Tabela 1). Folhas jovens foram obtidas para extração de DNA, segundo Silva (2010). As reações de amplificação seguiram de acordo com Silva (2010), sendo utilizados onze *primers* previamente selecionados. Os dados foram analisados para determinação do coeficiente de similaridade de Jaccard e construção do Dendrograma no programa PAST (*Paleontological Statistics Software*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os marcadores ISSR produziram 130 bandas com 76,92% de polimorfismo, sendo superior ao polimorfismo detectado por Levi et al. (2005) ao aplicar ISSR e RAPD para avaliação de germoplasma de melancia. As bandas polimórficas para cada espécie estudada, variaram de 53 entre os acessos de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *lanatus* a 28 bandas entre os acessos de melancia da subespécie *C. lanatus* var. *citroides*, correspondendo a um percentual de 47,7% e 21,5% de polimorfismo, respectivamente (Tabela 2). Para os acessos de melancia (*C. colocynthis*) e melão (*Cucumis melo*) o número de bandas amplificadas foi equivalente (32 e 33 bandas polimórficas, respectivamente), com 25,4% de polimorfismo cada. A similaridade genética entre todos os acessos variou de 0,62 (16 x 01) a 0,89 (04 x 06). Os acessos de *C. colocynthis* e *C. melo* apresentaram menor similaridade entre todos os acessos, com amplitude de 0,21 a 0,35 e 0,19 a 0,23, respectivamente (Tabela 3). Os acessos coletados em Massaroca apresentam alta similaridade entre si, sendo uma consequência da seleção promovida pelos agricultores visando atender

SILVA, M.L.; QUEIROZ, M.A.; FERRERIA, M.A.J.F.; BENKO-ISEPPOM, A.M. 2012. Caracterização molecular por ISSR de acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas. *Horticultura Brasileira* 30: S4445-S4451.

demandas comerciais. Os acessos 16 e 18 apresentaram menor similaridade, o que indica fontes de variabilidade genética entre os acessos cultivados naquela região, sendo importante a promoção de expedições de coleta para preservação em longo prazo.

O dendrograma revelou três grupos principais, com ponto de corte de 60%, sendo o grupo I composto pelo acesso de melão, o grupo II formado pelo acesso de *C. colocynthis* e grupo III constituído por acessos das subespécies *Citrullus lanatus*, compondo dois subgrupos, que divide os acessos de *C. lanatus* var. *citroides* (A) dos acessos de *C. lanatus* var. *lanatus* (B). De fato, o agrupamento corrobora com a descrição de Bisognin (2002), quando considera a origem e evolução das cucurbitáceas, pois o melão pertence ao gênero *Cucumis*, formado um grupo isolado dos demais acessos do gênero *Citrullus*. O índice de divergência genética detectado pelo marcador ISSR revela o potencial do germoplasma de melancia, para fins de melhoramento. Levi et al. (2005) aplicando ISSR e RAPD revelaram divergência genética entre *C. lanatus* var. *lanatus* e *C. lanatus* e var. *citroides* de 55%. Segundo Silva (2010) os acessos de melancia conservados no BAG de Cucurbitáceas apresentam ampla variabilidade, constituindo fonte de variabilidade para programa de melhoramento da espécie na região. Silveira (2009) descreve a ocorrência de fontes de resistência entre acessos de melancia do BAG de Cucurbitáceas. A separação dos acessos revelou grupos de divergências favoráveis à seleção de genitores promissores para compor programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

BISOGNIN, D. A. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*, v.32, n.5, p.715-723, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; SIMMONS, A. M.; THIES, J.A. Analysis based on RAPD and ISSR markers reveals closer similarities among *Citrullus* and *Cucumis* species than with *Praecitrullus fistulosus* (Stocks) Pangalo, *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 52, p. 465–472, 2005.

SILVA, M.L. Avaliação molecular da variabilidade genética do Banco Ativo de Germoplasma de melancia do nordeste brasileiro. *Tese* (em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, 106p, 2010.

SILVEIRA, L. M.; QUEIROZ, M.A.; LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; NETO, I.S. L. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. *Tropical Plant Pathology*, vol. 34, 2, 123-126. 2009.

SILVA, M.L.; QUEIROZ, M.A.; FERRERIA, M.A.J.F.; BENKO-ISEPPOM, A.M. 2012. Caracterização molecular por ISSR de acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas. Horticultura Brasileira 30: S4445-S4451.

ROMÃO, R.L. Northeast Brazil: A secondary center of diversity for watermelon (*Citrullus lanatus*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 207-212, 2000.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. DNA fingerprinting in plants. Principles, Methods and Applications. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Cold Spring Harbour, New York, USA, 444 pp. 2000

Tabela 1. Acessos de melancia avaliados com o marcador ISSR, com a respectiva identificação das espécies e local de origem, Petrolina – PE, 2012. [Watermelon accessions evaluated with ISSR markers, with their identification and place of origin, Petrolina – PE, 2012].

Acessos de melancia	Espécies	Origem
1	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
2	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
3	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
4	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
5	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
6	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
7	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
8	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
9	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
10	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
11	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
12	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
13	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
14	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
15	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
16	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
17	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
18	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Massaroca, Juazeiro – BA
19	<i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Planta introduzida da África
20	<i>C. colocynthis</i>	Planta introduzida da África
21	<i>Cucumis melo</i>	Variedade comercial

Tabela 2. Marcadores ISSR usados na amplificação do DNA de acessos de melancia, com respectivos números de bandas polimórficas [ISSR markers used in the DNA amplification of watermelon accessions, with number of polymorphic bands].

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Polimorf. lanatus</i>	<i>Polimorf. Citroides</i>	<i>Polimorf. colocynthis</i>	<i>Polimorf. Cucumis</i>	Total Polimorf	Total Bandas
811	(GA) ₈ T	6	3	2	4	15	16
841	(GA) ₈ YC	5	2	3	2	7	11
842	(GA) ₈ YG	4	2	6	3	15	16
844	(CT) ₈ RC	8	5	3	3	10	12
845	(CT) ₈ RC	6	3	4	6	9	13
846	(CA) ₈ RT	5	1	3	3	12	17
850	(GT) ₈ YC	4	1	1	1	5	7
852	(TC) ₈ RA	4	2	2	0	5	7
853	(TC) ₈ RT	4	1	2	4	6	10
855	(TC) ₈ YT	4	5	2	6	8	11
856	(AC) ₈ YA	3	3	4	1	8	10
Total		53	28	32	33	100	130



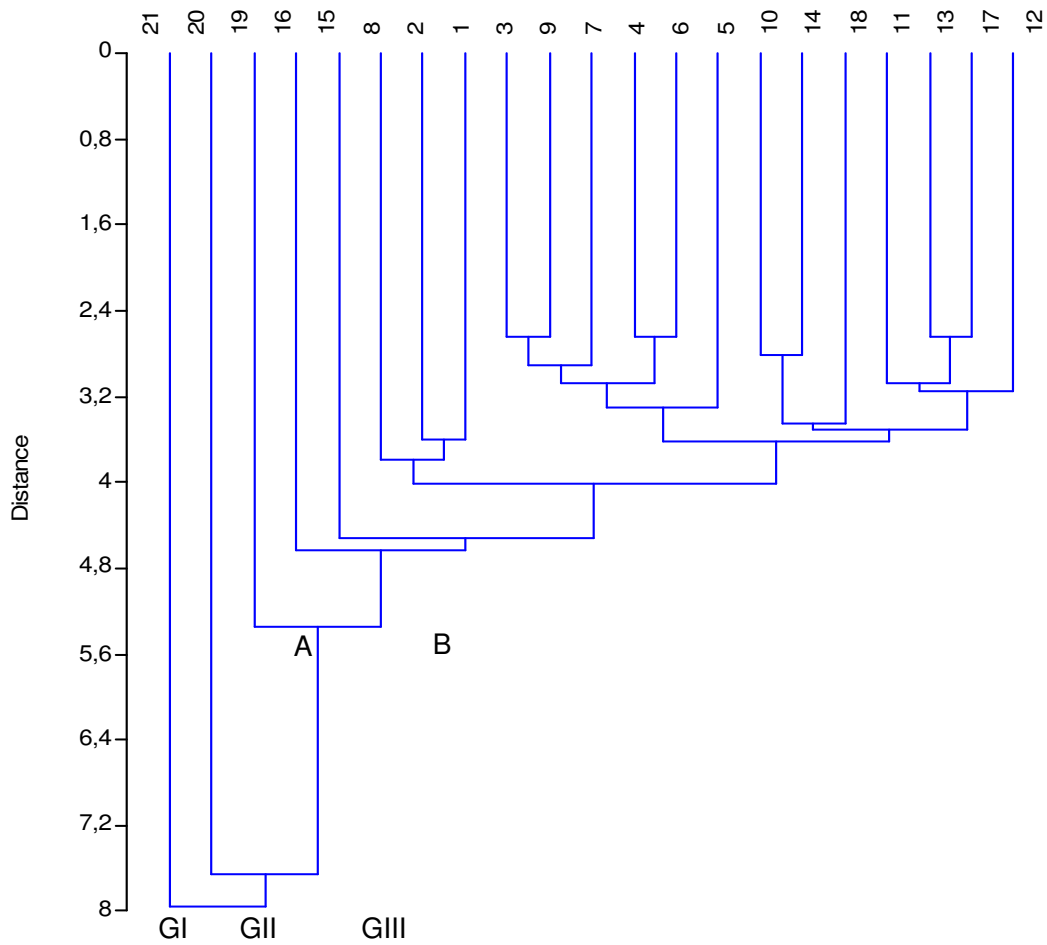


Figura 1. Dendrograma de acessos de melancia e melão do BAG de Cucurbitáceas, baseado nos marcadores ISSR [Watermelon and *Cucumis* dendrogram of the Cucurbitaceae Bank based on ISSR markers]



Tabela 1. Distância genética entre acessos de melancia e melão do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitaceae. [Genetic distance between watermelon and *Cucumis* from the Cucurbitaceae Active Germplasm Bank]

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	1,00																				
2	0,79	1,00																			
3	0,78	0,76	1,00																		
4	0,82	0,77	0,87	1,00																	
5	0,74	0,72	0,82	0,86	1,00																
6	0,77	0,78	0,86	0,89	0,84	1,00															
7	0,84	0,77	0,87	0,85	0,83	0,86	1,00														
8	0,80	0,76	0,72	0,84	0,74	0,79	0,78	1,00													
9	0,80	0,78	0,89	0,86	0,78	0,82	0,86	0,76	1,00												
10	0,66	0,71	0,78	0,82	0,74	0,80	0,79	0,73	0,83	1,00											
11	0,78	0,76	0,75	0,79	0,74	0,77	0,81	0,83	0,79	0,78	1,00										
12	0,74	0,68	0,74	0,83	0,75	0,79	0,80	0,81	0,81	0,82	0,84	1,00									
13	0,75	0,71	0,81	0,84	0,76	0,85	0,86	0,83	0,82	0,81	0,86	0,87	1,00								
14	0,74	0,72	0,82	0,85	0,83	0,84	0,82	0,79	0,83	0,88	0,81	0,86	0,84	1,00							
15	0,65	0,70	0,67	0,68	0,63	0,67	0,68	0,65	0,77	0,76	0,73	0,67	0,65	0,71	1,00						
16	0,62	0,63	0,65	0,66	0,71	0,69	0,68	0,60	0,69	0,70	0,65	0,67	0,68	0,74	0,64	1,00					
17	0,74	0,72	0,82	0,79	0,77	0,83	0,85	0,81	0,83	0,82	0,87	0,85	0,89	0,85	0,66	0,66	1,00				
18	0,65	0,71	0,78	0,76	0,74	0,80	0,78	0,70	0,83	0,84	0,75	0,79	0,81	0,79	0,70	0,75	0,84	1,00			
19	0,57	0,55	0,59	0,66	0,62	0,61	0,64	0,65	0,62	0,61	0,64	0,69	0,66	0,62	0,56	0,58	0,62	0,61	1,00		
20	0,27	0,21	0,30	0,31	0,28	0,28	0,31	0,29	0,30	0,31	0,33	0,35	0,33	0,30	0,25	0,25	0,34	0,30	0,35	1,00	
21	0,19	0,21	0,19	0,20	0,19	0,20	0,22	0,21	0,20	0,23	0,20	0,21	0,20	0,22	0,23	0,19	0,20	0,21	0,15	0,19	1,00

Salvador-BA
16 a 20 de julho de 2012