

Estudo da Divergência Genética de Linhagens de Melão, do tipo Pele de Sapo, Utilizando Marcadores SSR

Raphael Henrique Lima dos Santos³, Marina Rolim da Costa³, Marco Antônio Ferreira¹, Mateus Figueiredo Santos², Valter Rodrigues Oliveira², Glauca Salles Cortopassi Buso¹

Resumo

O agronegócio do melão brasileiro alcança quase 500 toneladas de frutos por ano, tornando o melão uma importante fruta nacional, em volume, valor de exportação e em valor exportado, estando esta atividade concentrada no semiárido brasileiro. Mesmo assim, o Brasil é o décimo segundo país em produção e área plantada e vigésimo terceiro em produtividade. Com a crescente demanda do mercado exterior, a tendência é o aumento da área de cultivo com o melão Pele de Sapo, programas de melhoramento genético vêm sendo desenvolvidos para aumentar a eficiência do sistema produtivo e a qualidade final do produto. Uma forma eficiente de auxiliar os programas de melhoramento genético de melão é a análise da variabilidade genética de genitores por meio de marcadores moleculares, pois detectam dissimilaridades entre diferentes acessos em nível de DNA. Com este objetivo, 24 linhagens endogâmicas de melão do tipo Pele de Sapo desenvolvidas no programa de melhoramento genético da Embrapa Hortaliças foram analisadas por meio de marcadores SSR visando à indicação do nível de divergência entre elas. A análise demonstrou haver grande variabilidade genética entre as linhagens, com poucos pares de linhagens apresentando similaridade maior que 90%. Prevê-se que poderá ser obtido número elevado de combinações híbridas a partir das linhagens avaliadas, selecionando-se linhagens com similaridade menor que 85%.

Introdução

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma planta de origem asiática, rasteira e herbácea da família Cucurbitaceae, seus frutos são de formato variável e apresentam grande variação em aroma e cor de polpa.

No Brasil, a área plantada com melão passou de 7,8 mil ha, em 1990, para 22,05 mil ha, em 2007, havendo nesse período crescimento da produção e produtividade. Em 2007, foram produzidas 495 mil toneladas, com um valor de produção de R\$316 milhões, concentrada no Nordeste (95,8%), região carente de recursos e oportunidades (Aragão, 2011). Contudo, o Brasil é apenas o décimo segundo país em produção e área plantada e vigésimo terceiro em produtividade, evidenciando que ainda existe muito por ser feito em termos de melhoramento da cultura (Aragão, 2011).

No Brasil os melões cultivados são agrupados numa classificação comercial, denominada “tipo”. Esta classificação define um grupo de cultivares com características semelhantes, facilmente identificadas e diferenciadas das demais. Atualmente, os melões amarelos são os mais cultivados no Nordeste brasileiro, seguidos pelos tipos Cantaloupe e Pele de Sapo, com alguns híbridos ocupando áreas substanciais. Embora a maior parte do melão produzido no estado seja do tipo amarelo, nos últimos anos tem aumentado a área

de cultivo do melão pele-de-sapo, em razão da boa cotação do produto na Europa. O melão do tipo Pele de Sapo tem casca verde-claro com manchas verde-escuro, com frutos grandes de polpa verde e consistência firme (Aragão, 2011).

Com a crescente demanda do mercado exterior, a tendência é o aumento da área de cultivo com o melão Pele de Sapo, programas de melhoramento genético vêm sendo desenvolvidos para aumentar a eficiência do sistema produtivo e a qualidade final do produto (Nunes et al., 2008). Uma forma eficiente de auxiliar o melhoramento genético de melão consiste na análise da variabilidade genética de linhagens e populações de melhoramento por meio da utilização de marcadores moleculares que detectam dissimilaridades em nível de DNA. Estudos dessa natureza permitem a identificação da divergência genética, o que pode auxiliar no direcionamento de cruzamentos entre linhagens de melão, com o objetivo de indicar cruzamentos visando a obtenção de populações segregantes com alta variabilidade e efeitos heteróticos significativos.

1 Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN – glauca.buso@embrapa.br

2 Pesquisador da Embrapa Hortaliças – CNPH

3 Estudante Universidade de Brasília - UnB

Sequências Simples Repetidas (SSR), ou microssatélites, são marcadores genéticos poderosos para uma análise genômica detalhada. Marcadores SSR caracterizam-se por serem codominantes, facilmente detectáveis por PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos avaliados para fins de análise. O conteúdo informativo de um loco SSR é alto, justamente por se tratar de sequências de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma de estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar linhagens endogâmicas de melão, do tipo Pele de Sapo, desenvolvidas no programa de melhoramento genético de melão da Embrapa Hortaliças por meio de marcadores SSR visando à indicação do nível de divergência genética entre elas.

Material e Métodos

O material utilizado para a análise de divergência genética incluiu 24 linhagens endogâmicas de melão do tipo pele-de-sapo obtidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, por meio do método SSD a partir de populações F2. Essas linhagens foram selecionadas de um grupo de 97 linhagens avaliadas para caracteres de planta, como vigor, resistência a doenças, pragas e de qualidade de fruto na Região Nordeste. Futuramente, serão utilizadas para a obtenção de híbridos de melão pele de sapo. Para a realização da análise, coletou-se folhas jovens das linhagens e a extração de DNA foi realizada conforme descrito em Ferreira e Grattapaglia (1998).

Para a escolha dos marcadores polimórficos, foram avaliados 135 *primers* microssatélites, dos quais 103 *primers* já mapeados e 32 desenhados a partir de sequências de EST. Para as reações de PCR foi feito um mix constituído de: 1,65 µl de água MilliQ; 1,3 µl de tampão 10X; 0,25 µl de MgCl₂ 50 mM; 1,3 µl de dNTPs 25 mM cada; 1,3 µl de BSA 10 µg/µl, 4 µl de primer 1 µM; 0,2 µl de *Taq* e 3 µl de DNA genômico a 3 ng/µl. As reações de amplificação com *primers* SSR foram realizadas como se segue: 95 °C por 5 min de denaturação, 1 min a 94 °C, 1 min na temperatura de anelamento, 1 min a 72 °C por 30 ciclos, e uma extensão de 72 °C por 7 min. As reações foram feitas usando temperaturas de anelamento de 48 °C, 52 °C, 56 °C e 58 °C (Ritschel, et al. 2004).

A caracterização de cada loco SSR polimórfico foi feita considerando-se a amplitude alélica e tamanho do loco. Foram calculados número de alelos por loco e PIC (“polymorphism information content”) utilizando-se o programa GDA (Lewis & Zaykin 2001). As distâncias genéticas entre os acessos de melão foram estimadas pela distância baseada em alelos compartilhados (“Shared Alleles Distance”), que se baseia na soma da proporção de alelos comuns dividido pelo dobro do total de locos analisados ($Das=1-Psa$, com $Psa=\sum s/Sr$) (Jin e Chakraborty, 1993). Formou-se uma matriz diagonal, que foi então submetida à análise de agrupamento pelo método UPGMA.

Resultados e Discussão

Dos 135 marcadores microssatélites usados, 25 mostraram polimorfismo entre as linhagens e somente 17 foram utilizados na atual análise, por produzirem fragmentos bem definidos e reproduzíveis. Os valores de PIC variaram de 0,04 a 0,51, com média de 0,37 (Tabela 1). O valor mais alto foi para o loco CM314 e o mais baixo para os locos CM310 e CM311. PIC se refere ao valor do marcador para detectar polimorfismo numa população, dependendo do número de alelos detectáveis e da distribuição de suas frequências e tem sido utilizado como uma medida geral de quão informativo é o marcador. Os valores de PIC demonstram que os marcadores SSR utilizados nesse estudo apresentam, em média, alto nível de informação.

Tabela 1. Número de alelos por loco, heterozigosidade observada e PIC (“polymorphism information content”) para os marcadores SSR examinados em 24 linhagens endogâmicas de melão do tipo pele-de-sapo.

Locus	No alelos	Ho	PIC
CM8	2	0.826087	0.507246
CM58	2	0.958333	0.509752
CM116	2	0.750000	0.480769
CM126	2	0.583333	0.421986
CM128	2	0.333333	0.283688
CM130	2	0.695652	0.463768
CM141	2	0.608696	0.432850
CM165	2	0.681818	0.459831
CM302	2	0.250000	0.223404
CM303	2	0.363636	0.359408
CM304	2	0.500000	0.478723
CM306	2	0.083333	0.081560
CM310	2	0.041667	0.041667
CM311	2	0.041667	0.041667
CM314	2	0.403369	0.541667
CM320	2	0.958333	0.509752
CM331	2	0.916667	0.507092

Nenhuma das linhagens foi homocigota para todos os locos analisados, indicando um nível não elevado de endogamia, fato coerente com o nível de autofecundação dos genótipos.

A similaridade das linhagens variou de 0,80 a 1,00, indicando que com esse conjunto de primers SSR, algumas linhagens se mostraram idênticas, portanto, provavelmente seria recomendável a adição de locos SSR no estudo. Na análise de agrupamento, três grupos foram formados, sendo que o mais divergente deles compreende uma só linhagem (17-7711), com 80% de similaridade com os outros dois grupos. As demais linhagens formaram dois grupos com 85% de similaridade entre eles. Uma boa escolha de genitores para hibridação é função direta da sua distância genética, além de características desejáveis. Assim, será possível a obtenção de híbridos por meio de cruzamento entre linhagens divergentes dos dois agrupamentos diferentes ou com a linhagem mais divergente, como a linhagem 17-7711, podendo assim ser uma das indicadas para obtenção de populações segregantes e, possivelmente de genótipos superiores.

Referências

- ARAGÃO, F.A.S. Divergência genética de acessos e interação genótipoXambiente de famílias de meloeiro. Tese (doutorado) Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011. 137f.
- FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. Pp 220. 1998
- LEITE, T. L.; DINIZ, B.T.; FERREIRA, M.A.; FERREIRA, M.A.J. da F.; AMARAL, Z.P.de S.; BUSO, G.S.C. Análise de Transferibilidade de Primers Microssatélites de *Cucumis melo* para *Cucurbita moschata* e *Luffa cylindrica*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da EMBRAPA**, v. 203, p. 1-9, 2007.
- LEWIS P.O. e ZAYKIN D. 2001. Genetic data analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data (version 1.1). *Free program distributed by the authors over the internet from:* <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- NUNES, G.H.S.; PEREIRA EWL; SALES JUNIOR R; BEZERRA NETO F; OLIVEIRA KC; MESQUITA LX. 2008. Produtividade e qualidade de frutos de melão pele-de-sapo em duas densidades de plantio. **Horticultura Brasileira** 26: 236-239.

PowerMarker, versão 3.25: LIU, K. & MUSE, S.V. PowerMarker: Integrated analysis enviroment for genetic marker data. **Bioinformatics** 21(9):2128-2129, 2005.

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 (*Cucumis melo* L.). **Bmc Plant Biology**, USA, v. 4, p. 9-23, 2004.