

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSR) PARA MELÃO (*Cucumis melo*)

Suporte Financeiro: Programa Avança Brasil

Ritschel, P.S.¹, Buso, G. S. C.², Buso, J.A³ e Ferreira, M.E⁴

¹Eng. Agr., Doutoranda, UnB / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Eng. Agr., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³Eng. Agr., PhD, Embrapa Hortaliças

⁴Eng. Agr., PhD, Universidade Católica de Brasília

A produção mundial de melão vem apresentando uma tendência ao crescimento, nos últimos anos. Em 1996, foram produzidas cerca de 16.000.000 toneladas de melão em nível mundial, sendo os maiores produtores a China, o Irã, a Turquia, a Espanha e os Estados Unidos. No Brasil, o cultivo do melão, principalmente do tipo Amarelo, vem crescendo nos últimos anos, especialmente no semi-árido nordestino, apresentando um crescimento estimado em 58% no período compreendido entre 1987 e 1991, devido tanto a um aumento na área cultivada (48%), quanto ao aumento da produtividade (cerca de 27%). Entretanto, a posição brasileira no cenário mundial ainda é tímida, respondendo por apenas 1,5% da produção de melão.

Uma das formas de aumentar a competitividade do produto brasileiro no mercado internacional e ao mesmo tempo incrementar o consumo interno desta olerícola é através do melhoramento genético da qualidade do fruto, especialmente no que diz respeito ao conteúdo de açúcares, expresso como teor de sólidos solúveis (graus-brix) da polpa do fruto. Um dos exemplos mais bem sucedidos do melhoramento genético do teor de sólidos solúveis e da qualidade do fruto é o da cultura do tomate. Através da utilização da metodologia de linhagens retrocruzadas e autofecundadas (backcrossed inbred lines ou BILs) aliada ao uso de marcadores moleculares, foram identificados marcadores moleculares ligados a segmentos cromossômicos que influenciam o teor de sólidos solúveis em tomate (Tanksley, S.D. & Nelson, J.C. Theoretical and applied Genetics v.92, p. 191-203, 1996). Um tipo de trabalho semelhante pode ser conduzido na cultura de melão, com objetivo de não só de incrementar o teor de sólidos solúveis, mas também de melhorar outras caracteres quantitativos de interesse, relacionados com a qualidade do fruto (formato, firmeza, espessura da polpa) ou ainda com a produtividade ou a resistência a doenças. O desenvolvimento de tecnologias de análise genômica na cultura do melão ainda é muito incipiente. Existem vários trabalhos envolvendo marcadores RFLP, AFLP e RAPD, mas apenas seis marcadores microsatélites estão descritos para melão na literatura (Katzir *et al.*, Theoretical and Applied genetics v.93, p.1282-1290, 1996).

Marcadores microsatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetitivas) são ideais para aplicações em Melhoramento de Plantas por sua natureza co-dominante, alto polimorfismo, riqueza em alelos, alta heterozigosidade e conteúdo informativo. Seqüências repetitivas são formadas por famílias de repetições em "tandem" contendo dois, três, quatro e até seis nucleotídeos (do tipo ATAT...). A enorme variação observada nestas frações repetitivas do genoma, causada por diferenças no número de repetições do "motif", reforça a idéia de que estas seqüências não têm efeito sobre o fenótipo e, conseqüentemente de que não existe pressão seletiva sobre as mesmas, o que aumentou o interesse em sua utilização como marcadores moleculares. Seqüências microsatélites estão distribuídas por todo o genoma e o seqüenciamento de suas regiões flanqueadoras, visando o desenho de primers específicos, possibilitou sua amplificação por PCR. O uso deste tipo de seqüência como marcadores moleculares foi inicialmente proposto para aplicações em genética humana, mas sua aplicação em outros organismos logo foi estabelecida. Pouquíssimos marcadores deste tipo estão disponíveis para a cultura do melão (Katzir *et al.*, 1996). Desta forma, a primeira etapa de um trabalho de melhoramento assistido por marcadores moleculares em melão, tendo como principal meta o aumento do teor de sólidos solúveis do fruto,

é o desenvolvimento de um número suficiente de marcadores SSR, que possibilite a construção de um mapa genético de alta densidade.

Em linhas gerais, o desenvolvimento de marcadores microssatélites pode ser resumido nos seguintes passos (Rafalski *et al.* Genomic Analysis: A practical guide. Academic Press Inc., 1996. p. 73-134):

- Construção de uma biblioteca genômica de DNA.
- Avaliação da Biblioteca por hibridização com segmentos de sequências repetidas visando selecionar clones que apresentem estas sequências.
- Confirmação da seqüência de DNA dos clones positivos, com a utilização de seqüenciamento de DNA.
- Desenho de primers específicos para amplificação das sequências repetidas (marcadores SSR).

Construção e Enriquecimento de Bibliotecas genômicas

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas de plântulas do híbrido de melão AF686. Em seguida, foi realizado um teste de digestão enzimática, com o objetivo de selecionar enzimas de restrição que gerassem fragmentos de tamanho adequado, entre 300 e 800 pb. As enzimas Mse I e Tsp 509 I foram escolhidas para a construção das Bibliotecas Genômicas. O DNA de melão foi então digerido com as enzimas de restrição selecionadas. O resultado de cada digestão foi separado em gel de agarose 3,5% e os fragmentos de tamanho entre 300 e 800 bp foram recuperados em membrana DEAE-celulose NA-45. Os fragmentos selecionados foram purificados e ligados a adaptadores contendo sítios de restrição complementares à respectiva enzima de restrição. O enriquecimento das Bibliotecas para seqüências microssatélites foi realizado através da hibridização com oligonucleotídeos biotinilados. Grupos de fragmentos resultantes da digestão com Mse foram hibridizados apenas com sondas (AG)₁₃, enquanto os fragmentos originados da digestão com Tsp foram hibridizados com sondas (AC)₁₃ ou (AG)₁₃. Os fragmentos selecionados foram recuperados com a utilização de contas magnéticas. O controle do enriquecimento foi realizado através de uma reação de PCR, utilizando-se primers complementares ao sítio alvo da respectiva enzima de restrição. A recuperação preferencial de fragmentos contendo regiões SSR foi confirmado por Southern Blot.

Os fragmentos resultantes de cada digestão enzimática e enriquecidos para as seqüências microssatélites mencionadas acima foram então clonados no plasmídeo PGEMT. Através de choque térmico, células de *E. coli* linhagem XL1Blue foram transformadas com os plasmídeos PGEMT clonados, resultando na construção de três bibliotecas genômicas de melão, Mse-AG/TC, Tsp-AC/TG e Tsp-AG/TC .

Seleção e identificação de clones positivos

A biblioteca Tsp AG/TC foi avaliada para clones que continham a inserção de fragmentos com seqüências SSR pela hibridização das colônias transferidas para uma membrana de nylon com sondas que possuíam seqüências complementares para o dinucleotídeo para o qual o enriquecimento foi realizado (AG/TC). A confirmação da presença, orientação e tamanho do microssatélite nos clones selecionados foi realizada através de uma série de cinco reações de PCR, conhecida como etapa do PCR-ancorado. O DNA plasmidial dos clones onde a inserção microssatélite for confirmada e caracterizada nesta fase foi extraído e preparado para seqüenciamento.

Seqüenciamento dos clones positivos e desenho dos primers

As reações de sequenciamento estão sendo realizadas com a utilização dos kits "Dye-Terminator" e "Big-Dye". Em seguida, os fragmentos foram purificados e seqüenciados em um seqüenciador automático ABI-377.

Pares de primers específicos, únicos e complementares às regiões que flaqueiam as seqüências microssatélites estão sendo desenhados utilizando-se o programa PRIMER (<http://www.genome.wi.mit.edu>). Além das características mencionadas foram ainda consideradas as possibilidades de auto-anelamento dos dois primers, o conteúdo G+C (50%) e a temperatura de anelamento das reações de PCR (55-60°C).

Como resultado da hibridização das colônias desta Biblioteca com a sonda (AG)₁₃, foram identificados 324 clones positivos, contendo possíveis inserções de microssatélites. Além de confirmar a seleção de 224 clones, reações de PCR ancorado foram usadas para identificar o tamanho e orientação das regiões microssatélites. O conhecimento das seqüências que flanqueiam as repetições está sendo usado no desenho de primers visando a análise genômica de melão. Cerca de cem novos marcadores SSR foram desenhados e quarenta destes marcadores já foram parcialmente caracterizados para utilização em análise genética de melão (Tabela 1). As seqüências repetidas são do tipo (AG) e (TC), com um número de repetições bastante variável. Sete marcadores são do tipo composto, apresentando também "motifs" do tipo (AT), (CA) ou (CAT). Seis marcadores são do tipo imperfeito, apresentando seqüências diferentes entre as repetições e o restante é do tipo perfeito. Os procedimentos descritos no trabalho com a Biblioteca Tsp-AG/TC serão realizados também com as outras Bibliotecas Genômicas já construídas, Mse-AG/TC e Tsp-AC/TG.

Tabela 1. Caracterização dos novos marcadores SSR desenvolvidos para análise genômica de melão.

Marcador	Repetição	Tipo
CM1	(TC) ₃₂ (AT) ₃	composto
CM2	(AG) ₂₂	perfeito
CM3	(TC) ₂₀	perfeito
CM4	(AG) ₂₁	perfeito
CM5	(TC) ₁₈	perfeito
CM6	(TC) ₁₃	perfeito
CM7	(AG) ₃₀	perfeito
CM8	(TC) ₂₆	perfeito
CM9	(AG) ₂₇	perfeito

CM10	(AG) ₁₇	perfeito
CM11	(TC) ₁₄	perfeito
CM12	(TC) ₁₅	perfeito
CM13	(TC) ₁₁	perfeito
CM14	(AG) ₂₃	perfeito
CM15	(AG) ₁₇	perfeito
CM16	(AG) ₁₈	perfeito
CM17	(AG) ₂₀	perfeito
CM18	(TC) ₂₀	perfeito
CM19	(CA) ₇ (TC) ₃₄	composto
CM20	(CAT) ₃ (TC) ₁₃ (AT) ₈	composto
CM21	(TC) ₁₃	perfeito
CM22	(AG) ₂₄	perfeito
CM23	(TC) ₂₆ (AT) ₄	composto
CM24	(TC) ₂₂	perfeito
CM25	(TC) ₂₄	perfeito
CM26	(GA) ₄₀	perfeito
CM27	(TA) ₃ (TC) ₁₆	composto
CM28	(GA) ₂₈ (GAA)(AAG)(GA)	imperfeito
CM29	(GA) ₂₂ (G) ₅ T(GA)A(GA)	imperfeito

CM30	(TC) ₃₅	perfeito
CM31	(GA) ₅ (TA)(GA) ₃ (GACA) 2(GA) ₂	imperfeito
CM32	(GAA)(GGA)(GA) ₂₀	perfeito
CM33	(GA) ₂₃	perfeito
CM34	(TC)(T)(TC) ₈ (CTCATT)(CTT) ₂ (C)(TC) ₂ (CT) (T) ₂ (TC)(CTCATT) (TC) ₃ (CT)(G)(T) ₇ (CT)	composto
CM35	(CT) ₁₉ (CA)(CT) ₃ (AT)(CT) ₂ (T)(TC) ₃ (AT) ₂	composto
CM36	(CT) ₂₀	perfeito
CM37	(GA) ₃₄	perfeito
CM38	(TA) ₄ (CT) ₂ (CCTCT) ₂ (T)(CTT)(T) ₂ (C) ₅ (AT)(A) ₂ (T)(CT) ₂ (C) ₃ (T)(C) ₃ ^{AA} (CT) ₁₀ (CCT)(TC) ₃ (CT) ₆	composto
CM39	(GA) ₂ (G)5T(GA)CA(GA)	imperfeito
CM40	(CT) ₁₅ (T) ₃ (C)(T) ₂ (CT) ₂	imperfeito

