

**ANÁLISE DE TRANSFERIBILIDADE DE
PRIMERS MICROSSATÉLITES DE
Cucumis melo PARA *Cucurbita moschata*
E *Luffa cylindrica***

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 203

ANÁLISE DE TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Cucumis melo* PARA *Cucurbita moschata* E *Luffa cylindrica*

Thiago Lobo Leite

Marco Antônio Ferreira

Bruno Diniz Tarchetti

Maria Aldete Justiniano da Fonseca Ferreira

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral

Gláucia Salles Cortopassi Buso

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 532 Análise de transferibilidade de primers microssatélites de Cucumis melo para Cucurbita moschata e Luffa cylindric / Thiago Lobo Leite ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
10 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 203).

1. Melão - transferibilidade - otimização - amplificação de primers SSR. 2. Microssatélites. 3. Melão - transferibilidade - abóbora e bucha. I. Leite, Thiago Lobo. II. Série.

583.63 CDD - 21.

ANÁLISE DE TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Cucumis melo* PARA *Cucurbita moschata* E *Luffa cylindrica*

Thiago Lobo Leite¹

Marco Antônio Ferreira¹

Bruno Diniz Tarchetti¹

Maria Aldete Justiniano da Fonseca Ferreira²

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral²

Gláucia Salles Cortopassi Buso²

Resumo

Com significativa presença no agronegócio brasileiro, e de bastante importância na agricultura familiar, a família *Cucurbitaceae* apresenta espécies em cultivo como o melão (*Cucumis melo*), abóbora (*Cucurbita moschata*) e a abobrinha (*Cucurbita pepo*), entre outras que colaboram para a importância econômica dessa família. Contrastando com esse cenário temos a *Luffa cylindrica* (bucha vegetal) que apesar de ter menos importância econômica, apresenta grandes vantagens em relação às sintéticas por serem biodegradáveis. O conhecimento da variabilidade genética de espécies vegetais e como ela se distribui, proporciona o uso racional e sustentável dos recursos genéticos nativos ou naturalizados. Uma das ferramentas a serem utilizadas para se obter este conhecimento é o uso de marcadores moleculares, tais como Sequências Simples Repetidas (SSR), ou microssatélites. Considerando o alto custo para o desenvolvimento destes marcadores, a análise de transferibilidade desses microssatélites de uma espécie para outra é bastante oportuna. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a transferibilidade, por meio da otimização das condições de amplificação de primers SSR, desenvolvidos para melão, em abóbora e bucha, que por serem espécies aparentadas podem possuir homologia das regiões que flanqueiam os microssatélites. Através dessa transferibilidade poderão ser economizados tempo e recursos financeiros para obtenção de marcadores de ponta e realização de estudos de variabilidade de abóbora e bucha.

Transferability analysis of *Cucumis melo* microsatellite primers to *Cucurbita moschata* & *Luffa cylindrica*

¹ Agronomia, UnB

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

With significant presence in the Brazilian agribusiness and with high importance in the familiar agriculture, the *Cucurbitaceae* family has many cultivated species as melon (*Cucumis melo*), pumpkin (*Cucurbita moschata*) and squash (*Cucurbita pepo*), within other species that also have economical importance. In contrast with this canary there is the *Luffa cylindrica* that in spite of being less economically important, it has great advantages in relation to synthetic wad because they are biodegradable. The genetic variability knowledge of plant species and how it is distributed propitiate a rational and sustainable use of native or naturalized genetic resources. One of the tools to be used to obtain this knowledge is molecular markers, as Simple Sequence Repeated (SSR) or microsatellite. Considering the high development costs of these type of markers, the transferability analysis of these SSRs from one species to another presents a good opportunity. Therefore, the objective of this work was to verify the transferability, through the optimization of amplification conditions of SSR primers developed for melon in pumpkin and wad, which being close related species may have homolog regions that flank the microsatellites. Through this transferability, time and fundings can be saved and turn possible advanced markers obtaining of for these cultures.

Introdução

A família *Cucurbitaceae*, grupo vegetal que habita as regiões tropicais do mundo, é formada por cerca de 118 gêneros que contém em torno de 825 espécies. Segundo Lopes (1991), a produção brasileira de cucurbitáceas vem crescendo cerca de 10% ao ano a partir de 1988, destacando-se a abóbora, abobrinha, chuchu, melão, melancia, moranga e pepino como as espécies mais expressivas na economia agrícola nacional. O melão (*Cucumis melo*), abóbora (*Cucúrbita moschata*) e a abobrinha (*Cucúrbita pepo*) apresentam também grande importância para a agricultura familiar, pois são utilizadas em lavouras de subsistência. A espécie *Luffa cylindrica* (bucha vegetal), apesar de apresentar menor expressão econômica, é cultivada em áreas onde predomina a agricultura familiar, apresentando uma série de vantagens em relação às aquelas fabricadas com materiais sintéticos pelo fato de serem naturais, biodegradáveis e não poluentes, já que não geram resíduos contaminantes na sua produção e beneficiamento. Essas espécies, apesar de não serem nativas, apresentam uma ampla variabilidade genética no Brasil em virtude de terem sido domesticadas e cultivadas há décadas. Esta variabilidade consiste em importante fonte de germoplasma para programas de melhoramento, visto que o cultivo é realizado sem o uso de insumos agrícolas, havendo a possibilidade de existirem fontes de tolerância a fatores abióticos e bióticos. Portanto, o conhecimento da variabilidade genética de espécies vegetais e como ela se distribui, proporciona o uso racional e sustentável dos recursos genéticos nativos ou naturalizados.

Uma das ferramentas a serem utilizadas para se obter este conhecimento é o uso de marcadores moleculares. Sequências Simples Repetidas (SSR), ou microssatélites, são marcadores genéticos poderosos para uma análise genômica detalhada. SSRs são marcadores genéticos poderosos para uma análise genômica detalhada, e são apropriados para esse fim, pois são baseados em PCR, têm herança codominante, alto conteúdo de informação, são multialélicos e podem ser semi-automatizados em ensaios multiplex (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Mas devido a grande quantidade de trabalho e recursos financeiros necessários ao desenvolvimento de microssatélites busca-se a transferibilidade de marcadores SSRs desenhados para melão para abóbora e bucha, pois, a observação de que ocorre conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas torna possível, em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies ou mesmo gêneros usando-se primers heterólogos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Para algumas espécies dentro do mesmo gênero, a taxa de transferência de marcadores tem sido elevada (SARDAGMA et al., 2001; MARTINS et al., 2006). Considerando o alto custo para o desenvolvimento de marcadores microssatélites, a estratégia de análise de transferibilidade desses microssatélites de uma espécie para outra é bastante oportuna. Com isso, esse trabalho tem como objetivo analisar a transferibilidade de primers microssatélites desenvolvidos para melão (RITSCHER, et al., 2004), para abóbora e bucha, fornecendo ferramenta biotecnológica de ponta para estas espécies.

Material e métodos

O material utilizado para cada primer testado e otimizado foi: dois genótipos de Melão (Híbrido e F2P79), três de abóbora originários do Mato Grosso e Espírito Santo e três indivíduos de Bucha originários do Espírito Santo e Tocantins.

A reação de PCR é composta de vários ciclos, sendo que cada um deles é composto de três etapas. A primeira é a desnaturação onde a fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na segunda etapa tem o anelamento, onde a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo do tamanho e da sequência do primer utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada primer com as seqüências complementares que flaqueiam a região alvo. Na terceira e ultima etapa, a temperatura é elevada a 72°C para que a enzima DNA polimerase adicione nucleotídeos a partir de cada terminal 3' dos primers, utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma copia desta seqüência seja feita. Esse ciclo é repetido varias vezes onde a amplificação segue uma progressão geométrica devido a quantidade DNA dobrar a cada ciclo.

A detecção de seqüências SSR via PCR é feita em gel de eletroforese utilizando-se poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução, uma vez que é necessário um gel adequado para a separação de segmentos que diferem por poucos pares de bases, dependendo numero de nucleotídeos do elemento repetido no microsatélite. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídio, nitrato de prata ou através de autoradiografia.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi testado um conjunto de 150 primers microsatélites desenvolvidos para melão, em reações de PCR otimizadas para abóbora e bucha. Para as reações de PCR foi feito um mix contendo: 2,55 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, 3 µl de primer a 0,9uM; 0,3 µl de *Taq* e mais 3 µl de DNA genômico a 3ng/µl (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998) . As reações de amplificação dos primers SSR ocorreram da seguinte forma: 95 °C por 5 min para desnaturação, 1 min a 94°, 1 min à temperatura de anelamento, 1 min a 72° C durante 30 ciclos, e mais uma extensão de 72° C por 7 min. As temperaturas de anelamento variaram entre 48 a 60°C. Para a visualização dos resultados das reações de PCR foi utilizado gel de acrilamida a concentração de 4% corado com nitrato de prata.

Resultados e discussão

Tabela1. Lista de alguns primers publicados para melão (RITSCHER et al., 2004) que amplificaram em abóbora e bucha e a temperatura de anelamento otimizada

Primers	Abóbora	Bucha
CM5	56°C	48°C
CM6	-	48°C e 56°C
CM12	48°C	48°C
CM13	-	48°C e 52°C
CM14	52°C	48°C
CM17	-	52°C
CM19	60°C	48°C
CM30	56°C	-
CM34		52°C
CM82	48°C	52°C

Para o conjunto de primers de melão (*C. melo*) otimizados e testados até o momento para *Cucurbita moschata* (Abóbora) e *Luffa cylindrica* (bucha para banho), 31,25% mostraram-se promissores com tamanhos de fragmentos que oscilaram de 80 a 300 pb (pares de base) (Tabela 1). Esse valor de transferibilidade é maior do que o encontrado por Ritschell et al. (2004) de 16,4% de melão para *C. moschata*. Outros trabalhos estimaram a transferibilidade de melão para pepino de aproximadamente 50% (DANIN-POLEG et al., 2001). Parece, portanto, que o nível de transferibilidade no gênero *Cucumis* se assemelha a outras comparações intra-genus como em soja, onde observou-se até 65% de microssatélites desenvolvidos para soja, foram transferidos para outras espécies de *Glycine*. Isso propicia resultados de uma rápida disseminação no uso de marcadores e facilitará muito os estudos de variabilidade, mapeamento e genética comparativa. Da mesma forma, a possibilidade de utilização de marcadores SSR de melão para acesso ao polimorfismo de DNA em espécies de Cucurbitáceas representa uma redução significativa de custos e tempo no desenvolvimento de marcadores e um “shortcut” para análises genéticas mais profundas dessas espécies.

Conclusões

Devido a alta transferibilidade dos primers SSR de melão, tem-se disponíveis, para a comunidade científica marcadores de ponta para estudos genéticos de abóbora e bucha.

REFERÊNCIAS

- DANIN-POLEG, Y.; REIS, N.; TZURI, G.; KATZIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, p. 61-72, 2001.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).
- LOPES, J. F. Cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 9, p. 98-99, 1991.
- MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 957-989, 2006.
- SARDAGMA, A. A.; WELTER, L.; BOITEAUX, L.; BUSO, G. S. C.; FERREIRA, M. E. Conservação de regiões flanqueadoras de locos hipervariáveis do gênero *Capsicum* spp em outros gêneros da família Solanaceae. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47., 2001, Águas de Lindóia. **A Genética no Século XXI: desafios**: [anais]. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. 1 CD-ROM.
- 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**, v. 4, p. 9-23, 2004.