

**Análise da variabilidade genética de
linhagens de melão do tipo pele de sapo
utilizando marcadores SSR e ISSR.**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
317**

**Análise da variabilidade genética de
linhagens de melão do tipo pele de sapo
utilizando marcadores SSR e ISSR.**

*Nayara Carvalho
Felipe Montalvão Canela
Marco Antônio Ferreira
Valter Rodrigues Oliveira
Mateus Figueiredo Santos
Nara Oliveira Silva Souza
Gláucia Salles Cortopassi Buso*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717 , Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva; Maria Cléria Valadares Inglis; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Antonieta Nassif Salomão

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

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

Análise da variabilidade genética de linhagens de melão do tipo pele de sapo utilizando marcadores moleculares *ssr* e *issr* / Nayara Carvalho ... [et al.] - Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

19p. il. color. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Boletim de Pesquisa Desenvolvimento, 340)

ISSN: 0102-0110

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web

1. *Cucumis melo* L. 2. Melão. I. Carvalho, Nayara. II. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Ana Flávia do N. Dias Côrtes (CRB – 1999)

CDD 631.53

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Considerações Finais.....	12
Agradecimentos.....	12
Referências	13
Anexos.....	15

Análise da variabilidade genética de linhagens de melão do tipo pele de sapo utilizando marcadores SSR e ISSR

Nayara Carvalho¹

Felipe Montalvão Canela²

Marco Antônio Ferreira³

Valter Rodrigues Oliveira⁴

Mateus Figueiredo Santos⁵

Nara Oliveira Silva Souza⁶

Gláucia Salles Cortopassi Buso⁷

Resumo – Nas últimas duas décadas, o agronegócio do melão no Brasil teve um crescimento de mais de 800%. Dentro deste mercado, a variedade tipo pele de sapo representa, atualmente, de 15% a 18% da área plantada. Estudos de variabilidade genética que utilizam marcadores moleculares auxiliam programas de melhoramento, possibilitando a seleção de linhagens parentais para a obtenção de populações com efeitos heteróticos significativos e híbridos superiores. Com esse objetivo, 58 linhagens de melão do tipo pele de sapo foram analisadas utilizando-se marcadores SSR e ISSR. A separação dos fragmentos SSR foi realizada por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 5% e coloração com nitrato de prata e a dos fragmentos ISSRs, em eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os marcadores SSR amplificaram um total de 45 alelos para os 58 genótipos, enquanto que os marcadores ISSR amplificaram 74 bandas polimórficas. Os dendrogramas gerados por ambos os marcadores (SSR e ISSR) apresentaram resultados satisfatórios, permitindo-se sugerir

¹ Engenheira Agrônoma, doutora, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Agrônomo, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Engenheiro Químico, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Agrônomo, doutor, pesquisador da Embrapa Hortaliças

⁵ Engenheiro Agrônomo, doutor, pesquisador da Embrapa Gado de Corte

⁶ Engenheira Agrônoma, doutora, professora da UnB

⁷ Engenheira Agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

maior heterose pelo cruzamento entre linhagens dos principais grupos divergentes, e a utilização das linhagens 43, 1 e 25, provavelmente, aumentará a variabilidade alélica no programa de melhoramento de meloeiro da Embrapa.

Termos para indexação: SSR, ISSR, *Cucumis* melo L.

Genetic diversity of pele de sapo type melon lines as revealed by SSR and ISSR markers

Abstract – Melon agribusiness in Brazil increased by over 800% in recent two decades. Within this market, the pele de sapo-type is currently grown in 15% to 18% of the planted area. Genetic variability studies with molecular markers can assist in breeding programs, allowing the selection of parental lines to obtain populations with significant heterosis and superior hybrids. For this, 58 melon lines of pele de sapo-type were analyzed using SSR and ISSR markers. The separation of SSRs fragments was performed by vertical electrophoresis on 5% polyacrylamide gel and silver staining, and the ISSRs fragments by horizontal electrophoresis on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. The SSR markers amplified a total of 45 alleles for the 58 genotypes, whereas ISSR markers amplified 74 polymorphic bands. The dendrograms generated by both markers (SSR and ISSR) showed satisfactory results allowing to suggest a higher heterosis by crossing lines of the two main different groups, and the use of the lines 43, 1, and 25 is likely to increase the allelic variability in the melon breeding program of Embrapa.

Index terms: SSR, ISSR, *Cucumis* melo L..

Introdução

O melão é um fruto que tem grande representatividade no mercado internacional da fruticultura, especialmente no Brasil, onde grande parte da produção é destinada à exportação. Segundo dados da FAO (2012), nas últimas duas décadas, o agronegócio do melão no Brasil teve um crescimento de mais de 800%, gerando muitos empregos, sobretudo na região Nordeste, que apresenta condições edafoclimáticas favoráveis à produção do fruto, sendo a principal região produtora do País, contribuindo com mais de 90% da produção nacional.

O desenvolvimento de cultivares de melão mais adaptadas às regiões do semiárido, que apresentem resistência ou tolerância às principais pragas e doenças, e produzam frutos de qualidade superior, com alto teor de sólidos solúveis, polpa firme e espessa e maior conservação pós-colheita, aumenta a competitividade do fruto brasileiro no mercado internacional e tem representado uma demanda cada vez maior no agronegócio nacional.

A seleção de indivíduos superiores em programas de melhoramento pode ser feita de forma indireta por meio do uso de marcadores moleculares associados às características de interesse. Além dessa aplicação, marcadores moleculares podem ser úteis em análises de variabilidade genética que auxiliam na identificação de parentais divergentes, orientando os melhores cruzamentos, visando à obtenção de descendentes com alta variabilidade genética e efeitos heteróticos significativos, além de híbridos superiores.

No melhoramento genético de plantas cultivadas, a quantificação da divergência genética pode auxiliar o melhorista na escolha das linhagens a serem utilizadas em cruzamentos de um programa de melhoramento, de forma a maximizar as diferenças genéticas e a combinação de genes de interesse. Nesta seleção procura-se, normalmente, genitores com maior distância genética com a finalidade de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações favoráveis (Freitas e Bered, 2003).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de 58 linhagens parcialmente endogâmicas de melão do tipo pele de sapo, oriundas da Embrapa Hortaliças, utilizando marcadores moleculares SSR (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats),

a fim de auxiliar na definição de cruzamentos para obtenção dos melhores híbridos e com maior heterose.

Material e Métodos

O material selecionado para a análise da variabilidade genética consistiu de 58 linhagens de melão do tipo pele de sapo parcialmente endogâmicas em S4, do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, obtidas pelo método SSD (Single Seed Descent), a partir de população F2. A seleção partiu de um grupo de linhagens e foram avaliados caracteres de vigor, resistência às pragas e doenças, e qualidade de fruto na região Nordeste.

Foram coletadas folhas de plântulas, e o DNA genômico foi extraído utilizando-se o protocolo de extração CTAB 2% (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Buso, 2005). Para verificar a quantidade e qualidade, o DNA foi quantificado por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%. Para a realização das reações de PCR, tanto para marcadores SSR quanto para marcadores ISSR, foram utilizados 3 μL de DNA a aproximadamente 3 ng/ μL ; 3 μL de *primer* (oligonucleotídeos desenhados para serem complementares à sequência alvo) a 0,9 μM para marcadores SSR e 1,2 μM para marcadores ISSR; e 7 μL de mix (Marcadores SSR: 2,65 μL de água; 1,3 μL de dNTP a 2,5 μM cada; 1,3 μL de BSA a 2,5 ng/mL; 1,3 μL de tampão 10x (100 μM Tris-HCl pH 8,3; 500 μM KCl); 0,25 μL de MgCl_2 50 μM e 0,2 μL de Taq DNA polimerase a 5,0 U/ μL .; Marcadores ISSR: 2,59 μL de água; 1,3 μL de dNTP a 2,5 μM ; 1,3 μL de BSA a 2,5 ng/mL; 1,3 μL de tampão 10x (100 μM Tris-HCl pH 8,3; 500 μM KCl); 0,25 μL de MgCl_2 50 mM e 0,26 μL de Taq DNA polimerase a 5,0 U/ μL .), totalizando 13 μL de reação.

Para os marcadores SSR, os *primers* utilizados foram desenvolvidos por Ritschel et al. (2004) e Ohse et al. (2005). As PCRs foram realizadas em termociclador simples de um bloco, Veriti 96 well (Applied biosystems) e as condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto na temperatura de anelamento (otimizada para cada primer, variando de 52 a 60°C), e 1 minuto a 72°C, seguidos de um ciclo final de 10 minutos a 72°C. A separação dos fragmentos foi realizada por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrila-

mida 5%, coloração com nitrato de prata (AgNO_3) e revelação com carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3), conforme Creste et al., 2001.

Para os marcadores ISSR, foram selecionados 35 *primers*, sendo 24 desenhados para milho (*Zea mays* L.) (Gianfilippi, 2006) e 11 para feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Acampora et al., 2007). As PCRs foram realizadas em termociclador Veriti 96 well (Applied biosystems) e as condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C , seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C , 1 minuto a 56°C na temperatura de anelamento (56°C estabelecida para todos os *primers*), e 1 minuto e meio a 72°C , seguidos de um ciclo final de 7 minutos a 72°C . A separação dos fragmentos foi realizada por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%.

Os dados para marcadores codominantes, como é o caso dos SSRs, foram codificados na forma x/y (tamanho de cada alelo no loco) e os dados obtidos foram analisados por meio do uso do software GDA (Lewis & Zaykin, 2001), que forneceu o número de genótipos observados em cada loco (n), o número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), e o índice de fixação de Wright (1965) ou coeficiente de endogamia (f), que representa a proporção de homozigotos na população e é estimado por $1-(H_o/H_e)$. Também foi utilizado o software NTSYS (Rohlf, 1992), para estimar a similaridade genética, por meio do coeficiente BAND (Band-Sharing Coefficient of Lynch) (Lynch, 1990), e para a análise de agrupamento, pelo método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average”). O coeficiente BAND é estimado baseado no número de alelos comuns dividido pela soma dos alelos dos dois genótipos que estão sendo comparados, conforme a seguir (Lynch, 1990):

$$S_{xy} = N_{xy} / N_x + N_y$$

Para marcadores ISSR, os dados foram codificados como: 1 (presença do marcador) ou 0 (ausência do marcador) e foram computados no software NTSYS (Rohlf, 1992), que forneceu estimadores de similaridade genética com o uso do coeficiente de JACCARD e agrupamento pelo método UPGMA.

Resultados e Discussão

SSR

Foram testados para polimorfismo em screening 294 pares de *primers*. Destes, 103 não amplificaram, 156 não apresentaram alelos diferentes entre os genótipos (monomórficos) e 35 apresentaram polimorfismo. Foram analisados 18 dos 35 locos polimórficos, por apresentarem bandas bem definidas e mais nítidas para os 58 genótipos. Os 18 pares de *primers* amplificaram um total de 45 alelos, com média de 2,5 alelos por loco (Tabela 1). A H_e se apresentou medianamente informativa para a maioria dos locos em questão, apresentando valor médio de 0,334 (Tabela 1). A H_o , que representa a proporção de indivíduos heterozigotos para o loco em questão, mostrou que muitos locos estão em homozigose, com valores de zero absoluto e média de 0,011 (Tabela 1). Os baixos valores de H_o condizem com o esperado, já que se trata da análise de linhagens parcialmente endogâmicas. O coeficiente de endogamia (f) variou de -0,08 no loco CM311, indicando um excesso de heterozigotos para este loco, a 1 na maioria dos locos, indicando alta taxa de endogamia.

Os estimadores de similaridade genética e agrupamento foram representados no dendrograma (Figura 1), que agrupou os 58 genótipos com uma similaridade genética variando de 0,495 a 1. De forma geral, observou-se o agrupamento dos genótipos em dois principais grupos (1 e 2) com 49,5% de similaridade entre eles e dois subgrupos (1.1 e 1.2) com 51% de similaridade. O genótipo 43 foi individualizado no segundo grupo, o que pode ser justificado pela presença de um alelo exclusivo no loco CM320.

Considerando o valor de corte da linha de similaridade média entre os genótipos ($=0,75$), baseada no estimador: $sgm = \sum s_{gij} / N$, em que, s_{gij} corresponde à similaridade genética entre cada par de indivíduos e N é o número de pares obtidos (Sousa, et al. 2013), os genótipos formaram 9 grupos. Ainda assim, nos grupos 1, 3 e 5, onde a maioria dos genótipos estão contidos, muitos apresentaram similaridade genética igual a 1, evidenciando a necessidade do uso de mais iniciadores ou outro tipo de marcador que diferencie melhor essa população. Nesse mesmo referencial de corte, os

genótipos 57, 52, 50, 51 e 43, foram agrupados sozinhos, o que pode ser explicado pela presença de alelos diferentes.

Nesse dendrograma, muitos genótipos apresentaram o mesmo padrão de banda para os 18 locos analisados. Dessa forma, o número de marcadores não foi suficiente para diferenciar alguns dos genótipos analisados, optando-se pela utilização dos marcadores ISSR para complementação do estudo.

ISSR

Foram testados para polimorfismo 35 *primers* ISSR. Destes, 7 não amplificaram, 12 foram monomórficos e 16 mostraram-se polimórficos. Foram analisados apenas 13 dos 16 locos polimórficos, por apresentarem bandas bem definidas e mais nítidas nos 58 genótipos.

Foram obtidas 74 bandas polimórficas. A similaridade genética variou de 0,38 a 0,98 e o dendrograma resultante agrupou os genótipos em dois principais grupos (1 e 2) (Figura 2) com 38% de similaridade entre eles. No primeiro grupo, foram formados dois subgrupos (1.1 e 1.2). No sub-grupo 1.1, a linhagem 1 foi a mais divergente, com 52% de similaridade com as linhagens restantes dentro de seu subgrupo. No segundo grupo, também foram formados dois subgrupos (2.1 e 2.2), sendo o primeiro composto apenas pela linhagem 25 que apresentou 54% de similaridade com as outras 24 linhagens restantes dentro de seu subgrupo.

Considerações finais

Marcadores ISSR mostraram-se mais informativos e com maior poder discriminativo, já que distinguiram melhor todos os genótipos, ou seja, não foi observada similaridade igual a 1. Já os dados gerados por SSR apresentaram genótipos com similaridade igual a 1, e na análise de agrupamento geral, apenas um genótipo (43) foi alocado no segundo grupo, enquanto para marcadores ISSR, o genótipo 1 foi alocado individualmente no subgrupo 1.1 e o genótipo 25 igualmente no subgrupo 2.1, o que pode ser justificado pela presença de alelos diferentes. Dessa forma, prevê-se uma maior heterose pelo cruzamento entre linhagens dos dois principais grupos divergentes e a utilização das linhagens 1, 25, 43, 50, 51, 52 e 57, que apresentaram os menores valores médios na matriz de similaridade (0,71; 0,75; 0,54; 0,53; 0,51; 0,49 e 0,59 respectivamente) pode contribuir para aumentar a variabilidade genética no programa de melhoramento de melão.

Sugere-se, também, pela análise de variabilidade dos genótipos de melão, mais ciclos de autofecundação para os genótipos que apresentaram mesmo padrão de banda (similaridade genética igual a 1). Dessa forma, provavelmente possíveis alelos exclusivos possam ainda ser fixados.

Agradecimentos

À Universidade de Brasília (UnB), por possibilitar a realização do meu mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional, especialmente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), pelo apoio logístico e financeiro para a realização desta pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Referências Bibliográficas

ACAMPORA, A.; CIAFFI, M.; PACE, C.; PAOLACCI, A. R. TANZARELLA, O. A. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. **Euphytica**, v. 157, n. 1-2, p. 69-82, 2007.

BUSO, G. S. C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 22 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 137).

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p. 299-306, 2001.

FAO. (Food and Agriculture Organization). **Base de Dados Agrícolas de FAOSTAT**, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>> Acesso em: 28 abril 2016.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).

FREITAS de, L. B; BERED, F. Genética e evolução vegetal. In: CAVALLI, S. S. (Ed.). **Polimorfismos moleculares**. Porto Alegre: UFRS, 2003. p. 311-332.

GIANFILIPPI, F. **Studio della diversità molecolare in popolazioni locali italiane di lenticchia (*Lens culinaris* Medik) tramite marcatori**. 2006. Tese (Tesi de láurea Agrária) Tuscia: Università degli studi della Tuscia, 2006.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1. 2001. (d16c).

LYNCH, M. The similarity index and DNA fingerprinting. **Molecular Biology and Evolution**, v.7, n.5, p. 478-484, 1990.

OHSE, B. J. G. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSRs) para análise genética de melão (*Cucumis melo* L.)**. 2005. 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia). Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2005.

RITSCHER, P. S.; LINS, T. D.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, n.1, p.9-24, 2004.

ROHLF, J. F. NTSYS-pc **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**: Version 2.2. New York: Exeter Publications. 1992.

SOUSA, M. B. e; SANTOS, M. F. dos; PIRES, C. de J.; SILVA, K. J. D. e; ROCHA, M. de M. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e semiereto por meio de marcadores ISSR. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 3., 2013, Recife. **Feijão-Caupi como alternativa sustentável para os sistemas produtivos familiares e empresariais**. Recife: IPA, 2013. CONAC 2012.

Anexos

Tabela 1: Medidas descritivas para estudos de variabilidade baseados nos marcadores SSR polimórficos em 58 genótipos de melão do tipo Pele de Sapo, estimados pelo software GDA.

Loco	N	A	He	Ho	f
CM197	58	3	0,464	0,068	0,852
CM191	56	3	0,427	0,000	1,000
CM302	58	2	0,287	0,000	1,000
CM320	58	2	0,034	0,000	1,000
CM104	56	2	0,247	0,000	1,000
CM152	54	2	0,442	0,018	0,958
CM331	56	3	0,436	0,000	1,000
CM311	58	2	0,034	0,034	-0,008
CM15	57	2	0,478	0,000	1,000
M177	47	3	0,463	0,000	1,000
CM224	56	3	0,069	0,017	0,746
CM35	34	2	0,365	0,000	1,000
CM319	56	2	0,504	0,017	0,964
CM72	42	2	0,312	0,000	1,000
CM107	52	5	0,525	0,000	1,000
CM102	58	2	0,500	0,051	0,897
CM89	56	3	0,196	0,000	1,000
CM112	54	2	0,227	0,000	1,000
Media	53,666	2,5	0,334	0,011	0,965

N: Número de genótipos; **A:** Número de alelos; **He:** Heterozigosidade esperada; **Ho:** Heterozigosidade observada; **f:** Coeficiente de endogamia.

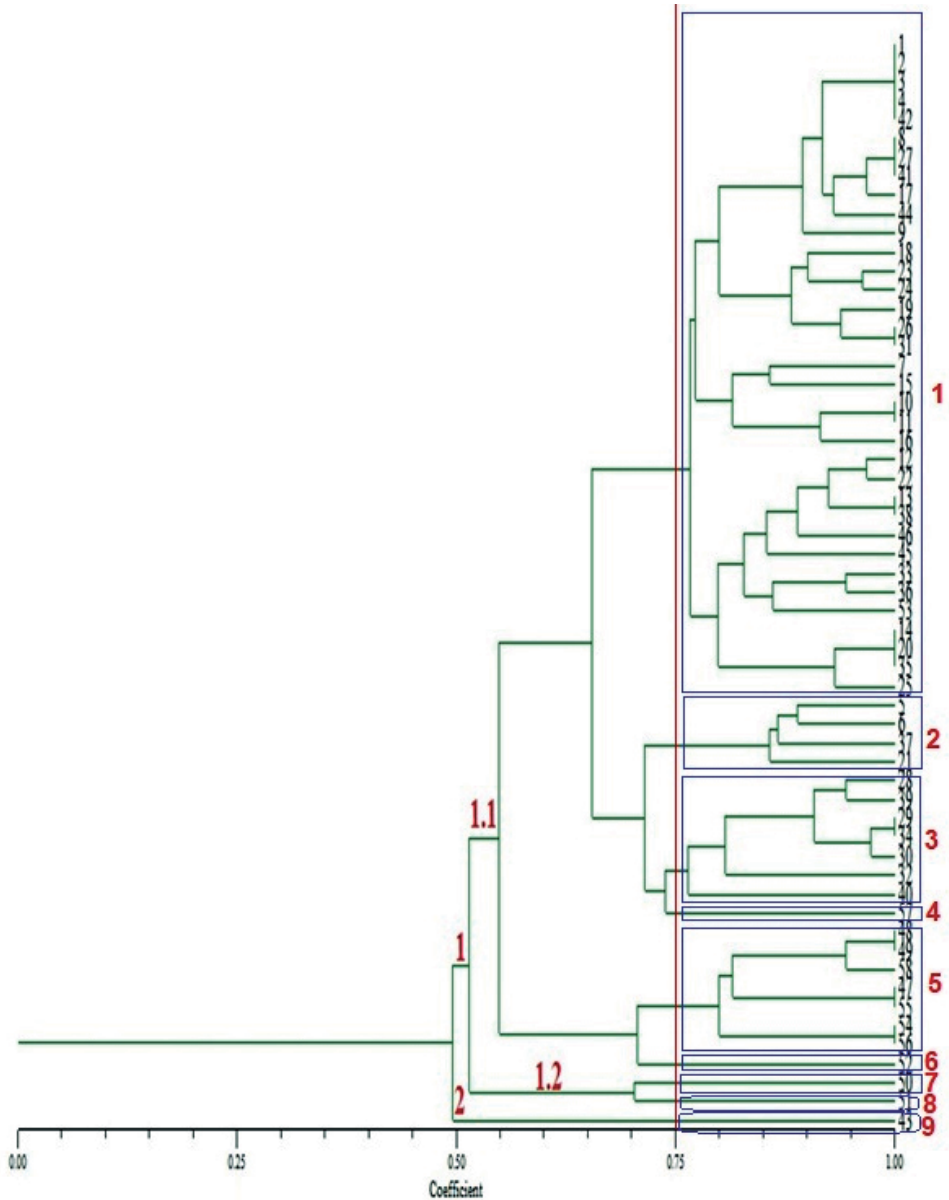


Figura 1: Dendrograma das 58 linhagens gerado pelo software NTSYS a partir da análise de 18 *primers* SSR polimórficos utilizando o coeficiente BAND e o método de agrupamento UPGMA. 1 e 2: Grupos principais; 1.1 e 1.2: Subgrupos.

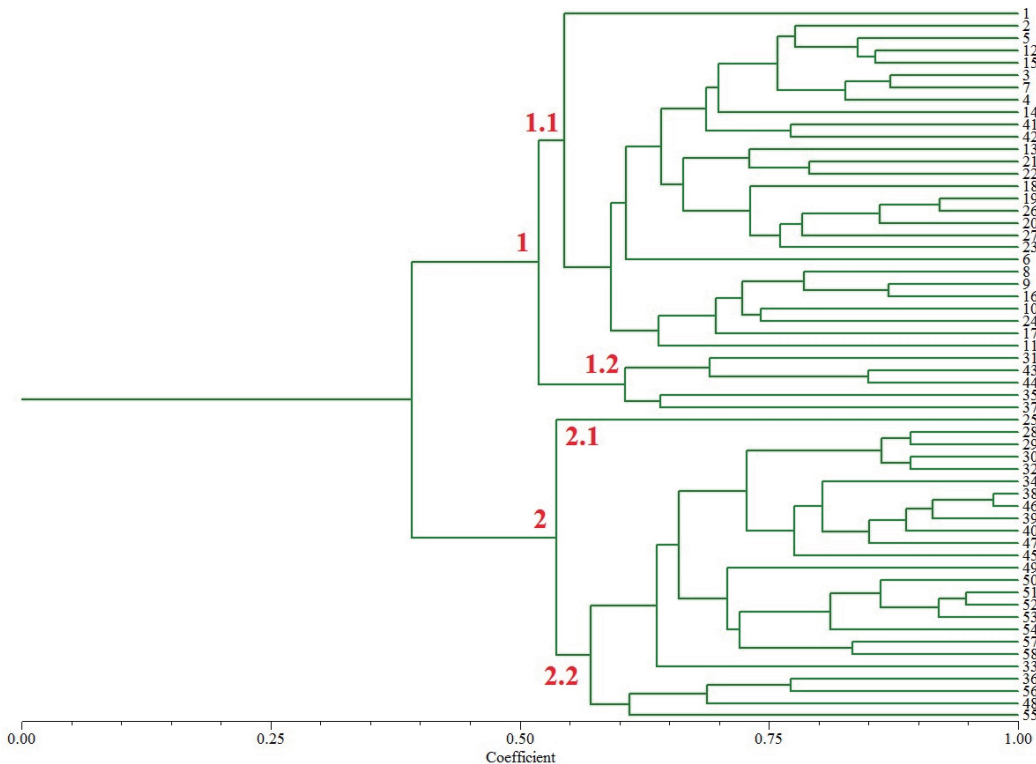


Figura 2: Dendrograma das 58 linhagens gerado pelo software NTSYS a partir da análise de 74 marcadores ISSR polimórficos utilizando o coeficiente JACCARD e o método de agrupamento UPGMA. 1 e 2: Grupos principais; 1.1 e 1.2: Subgrupos do grupo 1; 2.1 e 2.2: Subgrupos do grupo 2.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

CGPE: 14795

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

