

**Análise da Variabilidade Genética
de Acessos de uma Coleção de
Germoplasma de Melão
(*Cucumis melo* L.) Utilizando
Marcadores RAPD**



Análise da variabilidade
2001 FL - 11110



39540-1

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida

Presidente

Alberto Duque Portugal

Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast

José Honório Accarini

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal

Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Bonifacio Hideyuki Nakasu

José Roberto Rodrigues Peres

Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro

Chefe-Geral

Arthur da Silva Mariente

Chefe-Adjunto de Administração

Bonifacio Peixoto Magalhães

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral Sousa Dias

Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 5



Análise da Variabilidade Genética de Acessos de uma Coleção de Germoplasma de Melão (*Cucumis melo* L.) Utilizando Marcadores RAPD

Gláucia Salles Cortopassi Buso
Tulio César de Lima Lins
Rodrigo Tristan Lourenço
Hélio Márcio Ferreira Tavares
José Amauri Buso
Patricia Silva Ritschel
Márcio Elias Ferreira

Brasília, DF
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 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 da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

 Marcos Rodrigues de Faria

 Marta Aguiar Sabo Mendes

 Sueli Correa Marques de Mello

 Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

 José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual

Normalização bibliográfica: Maria Lara Pereira Machado

 Ermelindo Antônio Quilambo

Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2001): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

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

BUSO, G. S. C.; LINS, T. C. de L.; LOURENÇO, R. T.; TAVARES, H. M. F.;

BUSO, J. A.; RITSCHHEL, P. S.; FERREIRA, M. E. **Análise da**

variabilidade genética de acessos de uma coleção de germoplasma de

melão (*Cucumis melo* L.) utilizando marcadores RAPD. Brasília:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 19p. (Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e

Desenvolvimento, 5).

ISSN 1676 - 1340

1. Melão - melhoramento genético 2. *Cucumis melo* L. 3. Marcador molecular I. Lins, T. C. de L. II. Lourenço, R. T. III. Tavares, H. M. F. IV. Buso, J. A. V. Ritschchel, P. S. VI. Ferreira, M. E. VII. Título VIII. Série

CDD 635.61

Autores

Gláucia Salles Cortopassi Buso

Eng^a. Agr^a., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: buso@cenargen.embrapa.br

Tulio César de Lima Lins

Estudante de graduação, Universidade de Brasília.

Rodrigo Tristan Lourenço

Estudante de graduação, Universidade de Brasília.

Hélio Márcio Ferreira Tavares

Estudante de graduação, Universidade de Brasília.

José Amauri Buso

Eng^a. Agr^a., PhD, Embrapa Hortaliças.

Patricia Silva Ritschel

Eng^a. Agr^a., Estudante de pós-graduação, Universidade de Brasília.

Márcio Elias Ferreira

Eng^o. Agr^o., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília.

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	1
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	15
Conclusões	19
Referências Bibliográficas	19

Análise da Variabilidade Genética de Acessos de uma Coleção de Germoplasma de Melão (*Cucumis melo* L.) Utilizando Marcadores RAPD

Resumo

Parte da produção brasileira de melão é exportada e, recentemente, vem aumentando a preocupação com possíveis perdas de mercado devido à baixa qualidade de parte dos frutos exportados, principalmente com respeito ao baixo teor de açúcares (medidos em graus-brix). Uma das formas de aumentar a competitividade do produto brasileiro no mercado internacional e, ao mesmo tempo, incrementar o consumo interno desta fruta é através do melhoramento genético. O primeiro passo para o estabelecimento de um programa de melhoramento populacional é a realização de um estudo detalhado da variabilidade genética disponível, que permita o planejamento de cruzamentos divergentes e, conseqüentemente, o estabelecimento de populações segregantes. Para se gerar conhecimento sobre a variabilidade genética disponível, se faz necessária a caracterização do germoplasma existente. Marcadores do tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") são marcadores moleculares de baixo custo e extremamente eficientes na análise de coleções de germoplasma muito extensas. Sua aplicação na análise de diversidade genética de melão pode trazer novas informações e auxiliar o programa de melhoramento desta espécie. O objetivo deste trabalho foi a utilização de marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética entre 32 acessos existentes na coleção de germoplasma de melão da Embrapa Hortaliças, visando a identificação de acessos divergentes para enriquecimento da base genética de população inicial do programa de melhoramento. Com a utilização de 90 marcadores RAPD polimórficos foi

8 **Análise da Variabilidade Genética de Acessos de uma Coleção de Germoplasma de Melão (*Cucumis melo* L.) Utilizando Marcadores RAPD**

possível identificar dois grupos maiores contendo em sua maioria acessos de melão do tipo Valenciano. Alguns acessos nestes grupos foram identificados como geneticamente distantes e promissores na utilização em programas de melhoramento com a finalidade de se obter cruzamentos divergentes visando o aumento da variabilidade de populações segregantes.

Termos para indexação: Marcadores moleculares, *Cucumis melo* L., melão tipo amarelo, melhoramento

Analysis of Genetic Variability of Accessions of a Melon (*Cucumis melo* L.) Germplasm Collection Using RAPD Markers

Abstract

Part of the Brazilian melon production is exported and, recently, the loss of the external market has been increased due to the low quality of part of the exported fruits, mainly with respect to low brix level. One way to increase the Brazilian product competitiveness and, at the same time, to increase the internal consumption of this fruit species is through breeding. The first step to establish a breeding program is to carry out a detailed study of the available genetic variability, aiming at identifying divergent crossings and, consequently, the establishment of segregating populations with sufficient genetic variability. In order to know the available genetic variability it is necessary to characterize the available germplasm. Markers as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) are molecular markers of low cost, and extremely efficient to analyze extensive germplasm collections. Its application in melon genetic diversity analysis may bring new information and may help the breeding program of this species.

The objective of this work was the utilization of molecular markers in the genetic variability study of 32 accessions from the Embrapa Hortaliças germplasm collection, to identify divergent accessions which will increase the genetic basis of the breeding program initial population. With the utilization of 90 polymorphic RAPD markers it was possible to identify two large groups, the largest comprising the majority, Valenciano fruit type accessions. Some accessions within this group were identified as genetically divergent, and are promising to

10 **Análise da Variabilidade Genética de Acessos de uma Coleção de Germoplasma de Melão (*Cucumis melo* L.) Utilizando Marcadores RAPD**

be used for future crossing with the aim to obtain divergent crossings to increase the variability of segregating populations.

Index terms: Molecular markers, winter melon, *Cucumis melo* L., breeding

Introdução

No Brasil, a cultura do melão vem se expandindo especialmente no Semi-árido Nordeste, onde apresentou um crescimento estimado em 58% no período compreendido entre 1987 e 1991. Este incremento na produção de melão se deve tanto a um aumento na área cultivada (48%), quanto ao aumento da produtividade (27%). Em 1996, a produtividade brasileira de melão foi de cerca de 20t/ha (Dias, 1997). Entretanto, a posição brasileira no cenário mundial ainda é tímida, respondendo por apenas 1,5% da produção total (FAO, 2001). Parte da produção brasileira é exportada e, recentemente, vem aumentando a preocupação com possíveis perdas de mercado devido à baixa qualidade de parte dos frutos exportados, principalmente com respeito ao baixo teor de açúcares (medidos em graus-brix). Uma das formas de aumentar a competitividade do produto brasileiro no mercado internacional, e ao mesmo tempo, incrementar o consumo interno desta fruta é através do melhoramento genético. O primeiro passo para o estabelecimento de um programa de melhoramento populacional é a realização de um estudo detalhado da variabilidade genética disponível, visando o planejamento de cruzamentos divergentes e, conseqüentemente, o estabelecimento de populações segregantes com variabilidade genética suficiente. Para se gerar conhecimento sobre a variabilidade genética disponível, se faz necessária a caracterização do germoplasma existente em coleções de trabalho do melhorista. A forma mais utilizada de se realizar a caracterização do germoplasma é o levantamento de características morfológicas e agrônômicas.

Nos últimos anos, grandes avanços têm sido obtidos com várias técnicas moleculares, as quais têm tornado possível os estudos de variabilidade, de similaridades e de distâncias genéticas entre organismos através do estudo de variações do DNA. Marcadores do tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") são marcadores dominantes, sendo um dos marcadores moleculares de menor custo e extremamente eficientes na análise de coleções de germoplasma muito extensas. Sua aplicação na análise de diversidade genética de melão pode trazer novas informações e auxiliar o programa de melhoramento desta espécie.

O objetivo deste trabalho foi a utilização de marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética de uma amostra de acessos mantidos na coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças. Estes resultados, junto às informações morfológicas e agrônômicas, foram utilizados na identificação de acessos divergentes para enriquecimento da base genética da população inicial do programa de melhoramento.

Material e Métodos

Trinta e dois acessos da coleção de germoplasma de melão mantida pela Embrapa Hortaliças foram selecionados para realização de uma análise de similaridade genética, com a utilização de marcadores RAPD. O grupo é formado por 9 híbridos comerciais, 14 acessos do tipo Valenciano, dois do tipo Cantaloupe e 7 acessos de casca amarela que não se caracterizam nos grupos Valenciano, Galia ou Cantaloupe (Tabela 1). Estes acessos, em sua maioria de melão do tipo Valenciano, foram coletados no Brasil ou foram introduzidos de outros países produtores, tais como Japão, Coréia e Índia. DNA genômico total foi isolado de folhas jovens de acordo com Doyle & Doyle (1987).

Para realização do estudo genético, utilizou-se uma mistura equitativa de DNA extraído de folhas jovens de 15 indivíduos de cada acesso, amplificada por PCR ("Polymerase Chain Reaction") com a utilização de "primers" ou iniciadores randômicos, conforme descrito em Ferreira & Grattapaglia (1995). As reações foram feitas em volumes de 13 ml, contendo: Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, BSA 1,0 mg/ml, dNTP 0,2 mM, primer 0,4 mM, 7,5 ng de DNA genômico e 1 unidade de Taq polimerase. As reações de RAPD foram feitas num termociclador MJ, programado para 40 ciclos de: 1 min a 92°C, 1 min a 35°C, 2 min a 72°C. Os produtos das reações foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% usando tampão Tris-Borato-EDTA (TBE). Foram obtidas fotos de géis corados com brometo de etídio sob luz UV. A seleção das bandas se baseou na repetibilidade, clareza e resolução das mesmas. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com o marcador 1 Kb.

Foram testados 80 "primers" (Operon Technologies) RAPD, dos quais 35 (OP-A01, OP-A02, OP-A10, OP-A11, OP-AB18, OP-F01, OP-F03, OP-F05, OP-F10, OP-F12, OP-F14, OP-F20, OP-G09, OP-J01, OP-K09, OP-N08, OP-O03, OP-O04, OP-O05, OP-O06, OP-O07, OP-O09, OP-P14, OP-R08, OP-X05, OP-X13, OP-X14, OP-X18, OP-Y01, OP-Y04, OP-Y06, OP-Y07, OP-Y15, OP-Y17 E OP-Y20) foram selecionados por serem informativos, ou seja, polimórficos, reproduzíveis e por produzirem bandas de alta intensidade. Os fragmentos polimórficos amplificados pelos 35 "primers" selecionados foram utilizados para estimativa dos coeficientes de similaridade e agrupamento. Os dados foram analisados de acordo com a presença ou ausência da banda no gel sendo o nível de similaridade genética entre os acessos estimado através do índice de Jaccard, utilizando-se o programa NTSYS versão 2.02pc (Rohlf, 1992). As estimativas de similaridade genética foram empregadas em análise UPGMA e os agrupamentos observados através de dendrograma.

Tabela 1. Acessos de melão da Coleção de Germoplasma da Embrapa Hortaliças utilizados na análise com marcadores RAPD

No.	No. Embrapa Hortaliças	Nome comum	Tipo	Origem
1	82-015	Amarelo	Valenciano	Agroceres (Pai recorrente do Eldorado)
2	82-038	Valência	Valenciano	Dessert Seed
3	83-040	Napoletano	Valenciano	FAO
4	83-068	Sib do Valência	Valenciano	Dessert Seed
5	83-077	USDA 164320	*Outros	Índia
6	83-079	USDA 255478	*Outros	Coréia
7	83-101	Golden Charm	*Outros	USDA
8	83-102	Farmies Yellow	Cantaloupe	USDA
9	84-172	BRA 000621	Valenciano	Valência-Espanha
10	82-201	B633.3	Cantaloupe	INRA-França
11	84-306	Amarelo	Valenciano	Comercial
12	87-338	Eldorado	Valenciano	CNPH
13	88-374	Valenciano	verde redondo	Valenciano Supermercado DF
14	88-375	Valenciano	verde elíptico	Valenciano Supermercado DF
15	88-410	Valência	Valenciano	Autofecundação 82-038
16	88-427	Elizabeth 239 F1	*Outros	Japão Mikado Co.
17	88-428	Elizabeth PMR F1	*Outros	Japão Mikado Co.

Continua...

Continuação da Tabela 1.

18	89-538	Desconhecido	Valenciano	CEASA-RN
19	88-498	Hoon	*Outros	Portugal
20	89-537	Panaú Amarelo	Valenciano	Ceará Mirim-RN
21	93-688	Legend F1	*Outros	Asgrow
22	95-839	Amarelo	Valenciano	CNPH
23	98-848	Amarelo Polpa Branca	Valenciano	University of Wisconsin
24	AF-682	Híbrido	Valenciano	Agroflora
25	AF-646	Híbrido	Valenciano	Agroflora
26	Rochedo	Híbrido	Valenciano	Asgrow
27	Gold Mine	Híbrido	Valenciano	Petoseed
28	Hy-Mark	Híbrido	Cantaloupe	Petoseed
29	Mission	Híbrido	Galia	Asgrow
30	Yellow King	Híbrido	Valenciano	Asgrow
31	Yellow Queen	Híbrido	Valenciano	Asgrow
32	Gold Pride	Híbrido	Valenciano	Asgrow

* Outros - Casca amarela mas não se caracteriza nos grupos Valenciano, Galia ou Cantaloupe.

As informações sobre morfologia e graus brix, ou teor de açúcares, foram recuperadas no Banco de Dados da Coleção de Germoplasma de melão da Embrapa Hortaliças. A característica “porcentagem de graus-brix” é uma das mais importantes na determinação da qualidade do fruto. Frutos para exportação devem ter brix acima de 10 (Gorgatti Neto et al., 1994).

Resultados e Discussão

Os dados foram utilizados para estimar o nível de similaridade genética entre os acessos de melão através do índice de Jaccard (Tabela 2). As estimativas de similaridade genética foram utilizadas em análise de UPGMA e os agrupamentos observados através da análise do dendrograma (Fig. 2). Um total de 196 fragmentos polimórficos RAPD foi obtido, através da amplificação de 35 primers randômicos, selecionados em uma análise anterior com base no nível e qualidade de polimorfismo. Em média, cada primer gerou 2,5 fragmentos polimórficos. Dos 196 fragmentos gerados, 90 fragmentos polimórficos apresentaram-se com bandas intensas (Fig. 1). A análise do dendrograma permite notar a formação de dois grupos principais, o primeiro grupo contendo cerca de 90 % dos acessos e o segundo formado pelos acessos USDA 164320 (CNPH 83-077), originário da Índia, USDA 255478 (CNPH 83-079), da Coréia e Golden Charm (CNPH 83-101), cedidos pelo USDA. O primeiro grupo caracteriza-se por incluir subgrupos bastante diversos, com tão baixa similaridade (49%) entre si quanto os dois grupos principais. Neste grupo, os acessos do tipo Valenciano formaram um subgrupo com similaridade entre os acessos maior que 70%, com exceção do acesso Panaú Amarelo. Os acessos do tipo Cantaloupe e os de casca amarela que não são do tipo Valenciano ficaram em agrupamento diferente dos acessos do tipo Valenciano. A similaridade entre os híbridos Hy-Mark e Mission (tipo Cantaloupe e Galia, respectivamente) foi de 0,75. Já para os híbridos AF682 e AF646, a similaridade para o Gold Mine (todos do tipo Valenciano), foi de 0,86 e 0,75, respectivamente. Esta alta similaridade entre híbridos comerciais demonstra a necessidade de identificação de acessos divergentes de melão visando a formação de populações segregantes. Dentro de acessos do grupo Valenciano foi possível identificar acessos divergentes, como o Amarelo Valenciano - Agroceres (CNPH 82-015) e o Panaú Amarelo (CNPH 89-537) (coletado em Ceará Mirim, RN), com similaridade de 0,66.

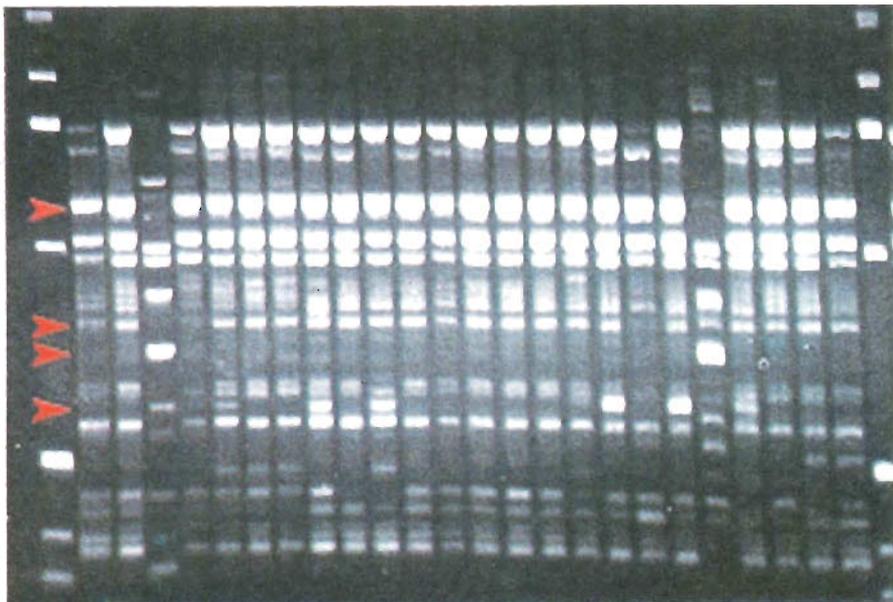


Fig. 1. Eletroforese de fragmentos RAPD (primer OPX13) em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Da esquerda para direita: Pista 1 e 25: Ladder 1Kb Pistas 2-24: Acessos de Melão. As setas indicam os fragmentos RAPD informativos usados na análise.

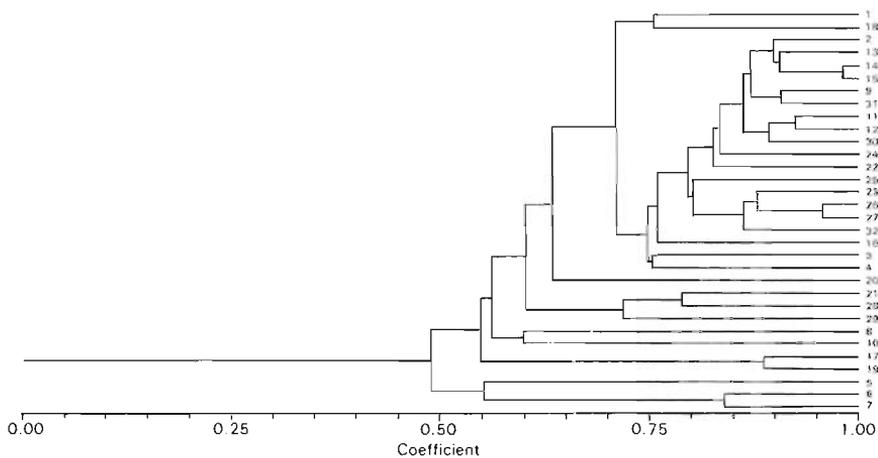


Fig. 2. Análise de aglomeração hierárquica pelo método UPGMA de 32 acessos de melão baseada na estimativa de similaridade genética computada pela análise de 90 fragmentos de DNA amplificados ao acaso.

Com base nesses dados foram selecionados os acessos descritos na Tabela 3: Amarelo (CNPH 82-015), Farmies Yellow (CNPH 83-102) e B633.3 (CNPH 84-201) que se apresentaram geneticamente distantes e contrastantes para características morfológicas e de interesse agrônomo, como graus-brix, com a finalidade de se obter cruzamentos divergentes visando o aumento da variabilidade das populações segregantes.

Tabela 3: Características Morfológicas dos acessos geneticamente distantes escolhidos como pais para realização de cruzamentos divergentes, com o objetivo de incrementar a variabilidade das populações utilizadas no Programa de Melhoramento de Melão, Dados obtidos do Banco de Dados do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças.

Acessos	Características Morfológicas
Amarelo (Agroceres) (CNPH 82-015)	Frutos uniformes de forma globular, com casca dura de cor amarela com textura suavemente ondulada, apresentando papilas e verrugas e polpa branca / verde de textura macia e com umidade intermediária, cavidade de cor verde/amarela, brix 15,8, sem ocorrência de rachaduras, sem aroma externo e com aroma interno, com polpa de sabor doce.
Farmies Yellow/USDA (CNPH 83-102)	Frutos uniformes com formato periforme, com casca mole de cor laranja com textura macia e polpa laranja de textura firme e com umidade intermediária, cavidade de cor laranja, brix 5,6, sem ocorrência de rachaduras, com aroma interno e externo e polpa de sabor intermediário.
B633.3/INRA-França (CNPH 84-201)	Frutos uniformes e elípticos, com casca mole de cor amarela e listras verdes, textura macia e polpa branca, textura macia e com umidade baixa, cavidade de cor laranja, brix 6,0, sem ocorrência de rachaduras, sem aroma externo e com aroma interno, com polpa sem sabor.

Conclusões

- Marcadores RAPD mostraram-se de grande utilidade para a rápida análise da variabilidade genética de acessos da coleção de germoplasma de melão.
- A coleção de germoplasma de melão mantida na Embrapa Hortaliças apresenta consideráveis níveis de variabilidade genética.
- Os resultados indicaram acessos geneticamente divergentes, que poderão ser introduzidos em cruzamentos que visem o aumento da variabilidade genética no programa de melhoramento da cultura.

Referências Bibliográficas

DIAS, R. de C. S. (Coord.) **A cadeia produtiva do melão na região nordeste**. Pretolina: EMBRAPA - CPATSA, 1997. 73p.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1987.

GORGATTI NETTO, A.; GAYET, J.P.; BLEINROTH, E. W.; MATALLO, M.; GARCIA, E. E. C.; GARCIA, A. E.; ARDITO, E. F. G.; BORDIN, M.R. **Melão para exportação**: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. 37 p. (EMBRAPA - SPI. Série Publicações Técnicas. Frupex, 6).

FAO (Roma). **Statistics sur la production agricole du Cantaloupe et autres melons**. Database Results, 1997. Disponível em:
<<http://apps.fao.org/page/collections>>. Acesso em: mar. 2001.

FERREIRA, M.E. ; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate System**. New York: Applied Biostatistics, 1992. não paginado.