

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ENTRE E DENTRO DE ACESSOS DE MELANCIA ATRAVÉS DE RAPD - PCR

Andréa CAPELATO

Universidade estadual paulista -faculdade de ciências agrárias e veterinárias – campus de Jaboticabal
Sandra Helena Trevisoli UNEDA

Universidade estadual paulista -faculdade de ciências agrárias e veterinárias – campus de Jaboticabal
Antônio Orlando MAURO

Universidade estadual paulista -faculdade de ciências agrárias e veterinárias – campus de Jaboticabal

RESUMO

A maioria dos cultivares comerciais de melancia do Brasil, é de origem americana e japonesa e apresentam deficiências em relação a caracteres agrônômicos importantes, evidenciando a necessidade de programas de melhoramento genético que originem cultivares superiores. Para tanto, faz-se necessário o conhecimento da diversidade genética existente nos acessos explorados. Com este objetivo, realizou-se um estudo de divergência genética entre e dentro de 18 acessos pela técnica de RAPD-PCR com 59 iniciadores, onde para a análise dos dados utilizou-se o complemento aritmético de Jaccard, e a posterior construção dos dendrogramas, pelo critério UPGMA. Através da dissimilaridade entre os 18 genótipos, observou-se a formação de dois grupos distintos, A e B. Os acessos de menor variação entre si foram A19 e A20 e os de maior dissimilaridade genética foram o A07 e A16. Nas análises dentro de todos os 18 genótipos, foi possível observar variabilidade entre as 20 progênies. Sendo assim, após o presente trabalho, será possível o direcionamento na elaboração dos cruzamentos que darão origem às populações a serem melhoradas.

PALAVRAS-CHAVE: melancia, DNA, dissimilaridade

SUMMARY

Most of the watermelon commercial varieties grown in Brazil, is of American or Japanese origin and they all show deficiencies in important agronomic traits. This suggests the necessity of genetic improvement programs that originate most suitable varieties to the growing condition in Brazil. However, to run a program of genetic improvement, it is necessary to know the genetic diversity of these watermelon genotypes. In this way, genetic divergence among and within 18 accessions were studied, using RAPD-PCR technique, and 59 primers. Data analysis was based on Jaccard's arithmetic complement, from which the dissimilarity matrix was estimated and UPGMA based dendrograms were created. Genetic distances among the 18 genotypes showed the existence of two different groups, A and B, the latter including most of the genotypes. Genotypes A19 and A20 showed to be the most similar genetically, while the largest dissimilarity was observed between A07 and A16. Analyses of 20 samples from each genotype have shown variability within all 18 accessions.

Thus, it will be possible to direct cross-breedings that will originate the segregating populations to be genetically improved, with regard to the analyzed genotypes.

KEYWORDS: watermelon, DNA, dissimilarity.

1. INTRODUÇÃO

Os cultivares e híbridos de melancia disponíveis no mercado brasileiro são, na sua grande maioria, de origem americana e suscetíveis às principais doenças e pragas. Diante deste fato, a Embrapa Semi-Árido, possui um Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas constituído por cerca de 1500 acessos, onde vem sendo realizado um trabalho amplo em detalhar diversos caracteres de importância agrônômica como a variabilidade genética, podendo esta ser utilizada em programas de melhoramento para obtenção de cultivares que supram às exigências do mercado produtor e consumidor. Neste contexto, grande destaque tem sido dado ao uso de marcadores moleculares, tais como o RAPD, pois além de identificarem polimorfismo não apresentam interação com o ambiente, podendo ainda serem avaliados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Sendo assim, o presente trabalho objetivou a análise da dissimilaridade entre e dentro de 18 acessos de melancia, oriundos do BAG de Cucurbitáceas da Embrapa Semi – Árido, através de marcadores moleculares RAPD.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas do Departamento de Produção Vegetal da UNESP - Câmpus de Jaboticabal. Foram utilizados 18 acessos de melancia os quais estão identificados na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação dos acessos de melancia e origem.

Identificação acesso	Origem	Identificação acesso	Origem
A6 (02)	São Luís – MA	A17 (26)	São Luís – MA
A7 (03)	São Luís – MA	A18 (27)	São Luís – MA
A8 (04)	São Luís – MA	A19 (28)	São Luís – MA
A9 (05)	São Luís – MA	A20 (29)	São Luís – MA
A10 (06)	São Luís – MA	A21 (30)	São Luís – MA
A12 (08)	São Luís – MA	A22 (31)	São Luís – MA
A13 (09)	São Luís – MA	A23 (36)	São Luís – MA
A15 (24)	São Luís – MA	A24 (52)	Barra do Corda-MA
A16 (25)	São Luís – MA	A25 (83)	Itapecuru- MA

O método utilizado para a extração de DNA, a partir de tecido foliar, foi o CTAB, descrito por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1996). A quantificação do DNA extraído foi realizada em espectrofotômetro, as reações de PCR, utilizando-se 59 iniciadores aleatórios RAPD foram preparadas com volume final de 25 µL, conforme descrito por FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996.

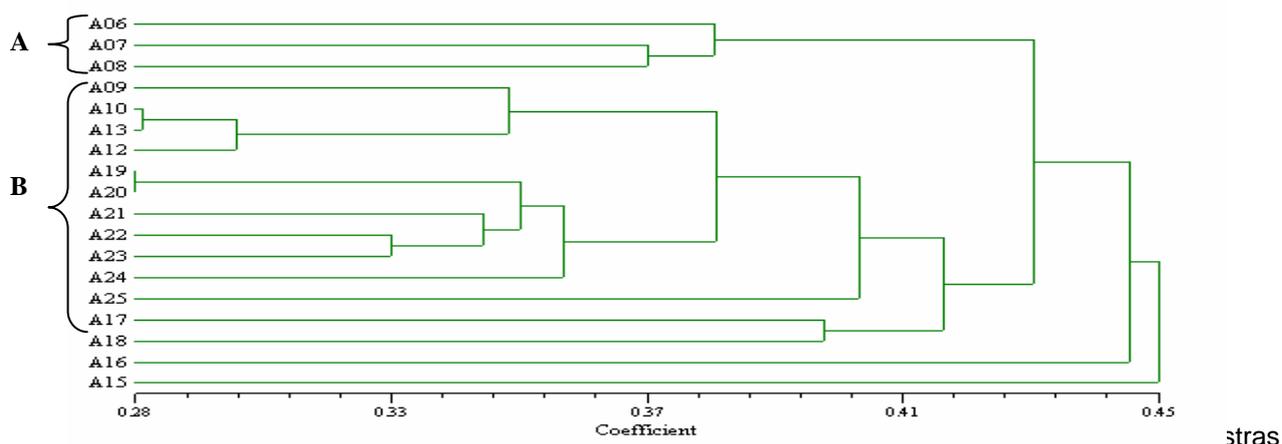
Para a realização da PCR, foi utilizado um aparelho termociclador, sendo empregado o seguinte programa: 1' a 92° C; 1' a 35° C; 2' a 72° C. Este ciclo foi repetido 42 vezes, finalizando o programa com 10' a 72° C com posterior manutenção da temperatura a 4° C, até que fossem submetidas a eletroforese horizontal. Através da análise do padrão de bandas produzido por cada iniciador, iniciou-se a montagem

das matrizes binárias, onde foi conferido o valor 1 para a presença e 0 para a ausência de bandas. A partir destas foram formadas as matrizes de distâncias genéticas através do programa Genes (CRUZ, 1997). Para o cálculo da matriz de dissimilaridade, foi utilizado o complemento aritmético de Jaccard e a partir da mesma, foi construído o dendrograma pelo critério de agrupamento hierárquico UPGMA, através do programa NTSYSpc 2.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise de similaridade entre os 18 acessos de melancia, foram geradas de 4 a 11 bandas, num total de 417 bandas. A análise das distâncias genéticas entre os acessos resultou em uma dissimilaridade média de 0,41. A menor variação ocorrida foi de 0,28 entre os acessos A19 e A20 e a maior foi de 0,49 entre os acessos A07 e A16. Analisando-se o agrupamento dos acessos representado pelo dendrograma (Figura 1), observou-se a formação de 2 grupos principais: um grupo A onde foram agrupados os acessos A06, A07 e A08, e um grupo B onde foram agrupados a maioria dos demais acessos. Este grupo B pode ser novamente dividido em três subgrupos, um onde foram agrupados os acessos A09, A10, A13 e A12, um outro subgrupo formado pelos acessos A19, A20, A21, A22, A23 e A24 e um último subgrupo formado pelos acessos A17 e A18. Por sua vez, o genótipo A25 apresentou-se intermediário aos três subgrupos. Os acessos A15 e A16, foram os que apresentaram maior divergência, não estando incluídos nos grupos formados. Portanto, os acessos A19 e A20, deverão ser melhor avaliados em função da possível redundância existente entre eles, e os acessos A07 e A16 que em função de suas características contrastantes podem ser utilizados em trabalhos futuros na elaboração de cruzamentos contrastantes.

Figura 1. Padrão de similaridade genética obtido entre 18 acessos de melancia definido pelo critério de agrupamento UPGMA.



tomadas dentro de cada acesso. As medidas de distância e análise de agrupamento seguiram os mesmos procedimentos da avaliação entre acessos. Através do agrupamento de cada acesso, pode-se observar a existência de variação entre as 20 amostras em todos os acessos avaliados (Tabela 3). A maior divergência entre as amostras foi observada no genótipo A08 e o acesso com menor divergência foi o A19.

Tabela 3. Resultados das dissimilaridades genéticas observadas dentro dos 18 acessos de melancia.

Acessos	Dissimilaridade	Acessos	Dissimilaridade	Acessos	Dissimilaridade
A 06	0.18	A 13	0.13	A 20	0.14
A 07	0.23	A 15	0.19	A 21	0.15
A 08	0.21	A 16	0.21	A 22	0.17
A 09	0.17	A 17	0.15	A 23	0.15
A 10	0.16	A 18	0.20	A 24	0.16
A 12	0.20	A 19	0.11	A 25	0.18

Os resultados demonstram que a maioria dos acessos apresentam considerável divergência entre as amostras tomadas podendo ser então observada a variabilidade existente, dentro do genótipo. Tal fato pode ser conferido ao seu sistema misto de reprodução e a uma alta taxa de alogamia. Enquanto que para os acessos A10, A13, A17, A19, A20, A21, A23 e A24 o agrupamento de todas suas amostras se deu com menor divergência, conferindo uma pequena variabilidade dentro do mesmo.

Portanto, torna-se essencial a determinação consistente da taxa de fecundação cruzada das populações que se pretende explorar, pois isso proporciona um melhor conhecimento da estrutura genética das populações. A importância desses parâmetros em populações de melancia é significativa, em decorrência do fato de a expressão sexual e conseqüentemente do sistema reprodutivo serem condicionados por fatores genéticos além de sofrerem muita influência dos fatores ambientais tais como agentes polinizadores, vento, etc. Contudo, a técnica baseada em PCR-RAPD que utiliza iniciadores aleatórios, foi eficiente na caracterização da divergência existente entre e dentro dos 18 acessos analisados neste trabalho.

4. CONCLUSÕES

a) a técnica RAPD foi eficiente na caracterização e avaliação da divergência genética entre e dentro de acessos de melancia; b) os iniciadores mais polimórficos dentre os observados neste trabalho foram os AD 04 (GTAGGCCTCA) e O 05 (CCCAGTCACT), com a formação de 11 bandas e os AW 07 (AGCCCCAAG), AW 14 (GGTTCTGCTC), AX 02 (GGGAGGCAAA) e AX 06 (AGGCATCGTG), com a formação de 10 bandas, podendo ser selecionados para posteriores estudos; c) os acessos A 07 e A 16 foram os mais divergentes podendo ser selecionados para futuros trabalhos de melhoramento da cultura; d) os acessos A 19 e A 20 foram os que apresentaram maior similaridade entre si, podendo se tratar de duplicatas de um mesmo material.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUZ, C.D. **Programa genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- FERREIRA, M.A.J. da F. **Sistema Reprodutivo e Potencial para o Melhoramento Genético de uma População de Melancia**. 2000. 148f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2000.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares**. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996. 220p.
- WILLIAMS, J. G. K.; et al. DNA Polimorfims Amplified by Arbitrary Primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research.**, v. 18, n 22, p. 6531-6535, 1990.