

KARLA NAYANNE CARVALHO PINTO

**TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE MELÃO (*Cucumis
melo* L.) PARA MAXIXE (*Cucumis anguria* L.)**

MOSSORÓ – RN

2015

KARLA NAYANNE CARVALHO PINTO

**TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE MELÃO (*Cucumis
melo* L.) PARA MAXIXE (*Cucumis anguria* L.)**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Departamento de Ciências Vegetais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ioná Santos Araújo Holanda – UFERSA

Co-orientador: Prof.^o D.Sc. Glauber Henrique de Sousa Nunes

MOSSORÓ – RN

2015

Catálogo na Fonte Catálogo de Publicação na Fonte. UFERSA - BIBLIOTECA ORLANDO
TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Pinto, Karla Nyanne Carvalho.

Transferibilidade de marcadores microssatélites de melão *Cucumis melo* L. para maxixe *Cucumis anguria* L. / Karla Nyanne Carvalho Pinto. - Mossoró, 2015.
29f: il.

Monografia. Graduação em Agronomia.

Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação.

Orientadora: Prof. Dr. Ioná Santos Araújo Holanda.

Co-orientador: Prof. D.Sc. Glauber Henrique de Sousa Nunes.

1. Melão. 2. Marcadores de DNA. 3. Primers. I. Título

RN/UFERSA/BOT/15/115

CDD 635.611 P659t

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba
CRB-15/452

KARLA NAYANNE CARVALHO PINTO

**TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE
MELÃO (*Cucumis melo* L.) PARA MAXIXE (*Cucumis anguria* L.)**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido -
UFERSA, Departamento de Ciências
Vegetais, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.

APROVADA EM: 29/01/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Ioná Santos Araújo Holanda
Orientadora

Prof. Dr^a Lidianne Kely de Lima
Primeiro Membro

Eng^a Agr^a Shamyra Georgi^a de Azevedo e Silva
Segundo Membro

Aos meus pais, Luiz Lopes Pinto e Lourdes
Maria Gomes de Carvalho por todo amor,
carinho, incentivo e educação que me deram.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre me abençoando com saúde e disposição para desenvolver minhas atividades acadêmicas.

Aos meus pais, Luiz e Lourdes que sempre me apoiaram nos estudos e na formação acadêmica. A minha irmã Carmélia, que contribuiu direta e indiretamente para a minha formação.

Ao meu namorado Raulino Cardoso, que tem me dado muito apoio e incentivo como pessoa e como profissional.

A minha amiga Ioná Araújo, que foi a minha orientadora no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa Biotecnologia Vegetal, em especial a Emanuela, Elizângela, Shamyra e Moacília que ajudaram a desempenhar as atividades da pesquisa.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos.

À UFERSA pela a oportunidade de estar me graduando em Engenharia Agrônômica.

RESUMO

O maxixe (*Cucumis anguria* L.) é uma hortaliça de origem africana, que pertence à família das cucurbitáceas como a abóbora e o melão, e amplamente cultivada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Por fazer parte da mesma família que o melão (*Cucumis melo* L.), o maxixe poderá ser submetido a uma análise comparativa referente ao mesmo, para se detectar o polimorfismo entre sequências de DNA. Uma das técnicas mais indicada é a com marcador molecular SSR ("*Simple Sequence Repeats*") ou microssatélites, a qual se baseia no uso de pares de *primers* na reação de PCR para encontrar variações em locos de sequências repetidas. Considerando o alto custo para o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites, a análise de transferibilidade desses marcadores de uma espécie para outra relacionada é bastante viável. Portanto o objetivo deste trabalho foi verificar através da transferibilidade de *primers* microssatélites desenvolvidos para melão a homologia de tais regiões que flanqueiam os microssatélites, em maxixe. Foram utilizadas sementes de duas cultivares de maxixe (Maxixe do Norte e Maxixe Liso Calcutá), as quais foram semeadas em bandeja de 200 células contendo o substrato tropstrato. Após 30 dias as folhas de cada cultivar foram coletadas e o DNA extraído pelo método CTAB. As análises de PCR foram realizadas utilizando 31 *primers* específicos para melão. Foi constatado que, dentre os 31 pares de *primers* testados, 21 amplificaram, dos quais 20 foram na cultivar Maxixe do Norte (MN) e 14 em MLC (Maxixe Liso Calcutá). Os alelos tiveram seus tamanhos variando de 100 a 500 pares de base, sendo 12 com tamanho esperado, 8 acima e 1 abaixo. Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que a porcentagem de transferibilidade dos *primers* de melão foi de 67,74%. Estes dados são de grande importância, pois viabilizará futuros estudos moleculares deste marcador na cultura do maxixe.

Palavras-Chave: Transferibilidade, marcadores de DNA, *primers*

ABSTRACT

The gherkin (*Cucumis anguria* L.) is a vegetable of African origin, which belongs to the Cucurbitaceae family as pumpkin and melon, and widely cultivated in the North and Northeast of Brazil. To be part of the same family as the melon (*Cucumis melo* L.), maxixe may be subjected to a comparative analysis of the same, to detect the polymorphism of DNA sequences. One of the techniques is given molecular SSR marker ("Simple Sequence Repeats") or microsatellites, which is based on the use of pairs of primers in the PCR reaction to find loci variations in repeat sequences. Considering the high cost for the development of microsatellite markers, transferability analysis of these markers from one species to another related is quite feasible. Therefore the aim of this study was to verify through the transferability of microsatellite primers developed for melon homology of such regions flanking the microsatellite in gherkin. Were used seeds of two varieties of gherkin (Northern Gherkin Gherkin and smooth Calcutta), which were planted in trays containing 200 cells tropstrato the substrate. After 30 days the leaves of each cultivar were collected and the DNA extracted by the CTAB method. PCR analysis was performed using primers specific for 31 melon. It was found that among the 31 tested primers, 21 amplified, of which 20 were in North Maxixe (MN) and 14 in MLC (Maxixe Straight Calcutta). Alleles had their sizes ranging from 100 to 500 base pairs and 12 were expected size 8 above and one below. Based on the results obtained, it can be inferred that the percentage of transferability of melon primers was 67.74 %. These data are of great importance as it will enable future molecular studies of this marker in gherkin cultivation.

Keywords: Transferability. primers, DNA markers

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos <i>primers</i> de microssatélites sintetizados para <i>Cucumis melo</i> , Mossoró-RN, UFERSA, 2015.....	19
Tabela 2 – Resultados dos pares de bases dos <i>primers</i> transferíveis, a cultivar e caracterização de monomorfismo, 2015.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR - CMMS 1-3; CMMS 2-3; CMMS 3-2; CMMS 4-3; CMMS 12-6; CMMS 15-4; CMMS 22-2; CMMS 24-3 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.....24

Figura 2 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR - CMMS 30-3; CMMS 33-1; CMMS 33-2; CMMS 34-8; CMMS 34-10; CMMS 35-4; CMMS 35-5 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.....24

Figura 3 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR – CMGA 104; CMCT160a+b; CMBR 96; CMBR 109; CMBR 44; CMBR 120; CMBR 08; CMAGN 68; CMGA 165 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.....25

Figura 4 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR – CMTAAN 100; CMTAA 166; CMBR 16; CMTCN 14; CMBR 111; CMATN22; CMCT505 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.....25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
	2.1 CULTURA DO MAXIXE	13
	2.2 IMPORTÂNCIA DO MAXIXE	14
	2.3 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES	14
	2.4 TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
	3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	17
	3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	17
	3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	17
	3.3.1 Extração do DNA	17
	3.3.2 Análise com os marcadores microsatélites.....	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
	4.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	22
	4.1.1 Marcador Microsatélite	22
5	CONCLUSÕES	26
	REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

O maxixeiro (*Cucumis anguria* L.) é uma planta de origem africana, também conhecida como pepino indiano que pertence à família das curcubitáceas como a abóbora e o melão. Seus frutos são fontes de minerais (cálcio, fósforo, ferro, magnésio e zinco) e vitaminas (C e do complexo B). O maxixe raramente é submetido ao cultivo racional e na maioria das vezes é coletado nas populações subespontâneas em roçados ou plantio de subsistência. Os frutos são consumidos cozidos, fritos, ou usados frescos em saladas. Na maxixada, prato típico do Nordeste, o maxixe é cozido juntamente com carnes, abóbora, quiabo e temperos (LIMA et al., 2009).

Por fazer parte da mesma família que o melão (*Cucumis melo*), o maxixe poderá ser submetido a uma análise comparativa referente ao mesmo, para se detectar o polimorfismo entre sequências de DNA. Uma das técnicas mais indicada é a com marcador molecular SSR ("*Simple Sequence Repeats*") ou microssatélites (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989), a qual se baseia no uso de pares de *primers* na reação de PCR para encontrar variações em locos de sequências repetidas. Estas são constituídas de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado no genoma de eucariotos, revelando polimorfismo em um loco devido a diferenças no número de vezes que cada um aparece naquele loco. Essas variações no número de repetições constituem-se, em última análise, em variações no comprimento do segmento detectado pela reação de polimerase em cadeia e na separação de fragmentos amplificados em gel de eletroforese.

A partir do conhecimento da variabilidade genética de espécies vegetais e como é distribuída, pode-se fazer o uso racional e sustentável dos recursos genéticos naturalizados. Considerando o alto custo para o desenvolvimento de marcadores moleculares SSR, a análise de transferibilidade desses microssatélites de uma espécie para outra é bastante viável. Portanto o objetivo deste trabalho foi verificar por meio da transferibilidade de *primers* SSR desenvolvidos para melão a homologia das regiões que flanqueiam os microssatélites em maxixe.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO MAXIXE

O maxixe (*Cucumis anguria* L.) é considerado uma hortaliça amplamente cultivada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, e apresenta origem africana (MODOLO; COSTA, 2003).

É uma planta anual, de caule rastejante ou trepador. Apresenta polimorfismo nas folhas, embora estas contenham mais comumente cinco lobos dispostos palmadamente. As flores são de sexos separados (monóicas) e dispostas em inflorescências racemosas reduzidas: as masculinas, em número de 3 a 10 por inflorescências; e a inflorescência feminina contém uma única flor. O fruto, que é sustentado por um pedúnculo de 4-19 cm, varia de elipsóide a obovóide e pode apresentar-se ornado ou não de espículas de até 2 cm de comprimento; antes da maturação, sua superfície pode ser verde uniforme ou bicolor (devido à presença de estrias verde-claras longitudinais), passando a verde-amarelada ou amarelada quando maduro. As sementes são numerosas, de formato elíptico com 5-6 mm x 2-2,5 mm e 1 mm de espessura (KIRKBRIDE, 1993). É uma espécie de crescimento indeterminado, cujos frutos têm, em média, massa em torno de 30 g, sabor amargo (MELO; TRANI, 1998), e sementes com endosperma escasso ou ausente (MACKEE, 1994).

De acordo com Robinson e Decker-Walters (1997) as folhas do maxixe são menores do que as de pepino. Essa cultura produz grandes quantidades de frutos durante todo o seu período de crescimento.

As populações brasileiras de *Cucumis anguria* L. são caracterizadas pela produção de frutos grandes, lisos e não amargos. No entanto, para as características vegetais e dos frutos são observadas pouca variabilidade genética entre as populações de maxixe, indicando que a base genética é bastante estreita (PATERNIANI; COSTA, 1992).

Geralmente as plantas de maxixes são encontradas crescendo de modo subespontâneo no meio de outras plantações, porém a sua produção atende ao consumo doméstico e ao mercado, quando há demanda. Esta hortaliça pode ser utilizada na forma de fruto imaturo, sendo consumido *in natura* (salada), em conserva (pickles) ou cozido (refogados, sopas etc.). De modo geral, é um fruto subutilizado como alimento, tanto no Brasil quanto no resto do mundo (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Apesar de ser um alimento basicamente energético, sendo uma fonte valiosa de vitaminas e sais minerais e possuir alto teor de zinco, elemento, este, que se perde com o cozimento (MODOLO; COSTA, 2003).

O maxixe, apesar de ser pouco exigente em solo, adapta-se melhor àqueles arenosos, leves e soltos. Quanto a sua fertilização, muitos produtores não realizam adubações, devido ter a capacidade de se beneficiar com resíduos de nutrientes aplicados anteriormente. Não obstante, em solos pobres é recomendado o fornecimento de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e potássio (PIMENTEL, 1985; FILGUEIRA, 2000).

2.2 IMPORTÂNCIA DO MAXIXE

Apesar de não ser habitual, o maxixe poderia substituir com vantagem o pepino por ser menos indigesto (MADOLO, 2003). Recentemente, há um aumento no interesse em antioxidantes naturalmente encontrados em frutos e hortaliças para uso em fitoterápicos, a fim de substituí-los pelos antioxidantes sintéticos, os quais têm uso restrito devido a seus efeitos colaterais, tais como carcinogenicidade (CATANEO, 2008). E o maxixe por fazer parte do grupo das hortaliças pode apresentar essa capacidade antioxidante.

Outro estudo realizado com *Cucumis anguria* L. revelou que em seu fruto estão presentes componentes ativos medicinais. A identificação de compostos fitoquímicos baseia-se na área do pico, o peso molecular e fórmula molecular (SENTHIL KUMAR S.; KAMARAJ M., 2010). Os resultados dão crédito ao uso desta planta no tratamento de infecções microbianas e mostra que o maxixe pode ser explorado para novos potentes agentes antimicrobianos.

Segundo Kroon et al. (1979) o maxixe possui genes para resistência ao Vírus Mosqueado Verde do Pepino e ao Ácaro Branco do Feijão (*Tetranychus urticar*, Koch). Em experimentos com inoculações de nematoides Wistead e Sasser (1956) detectaram resistência à *Meloidogyne hapla*, *M. javanica* e *M. incógnita* v. *acrida*.

2.3 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

Marcadores de DNA microssatélites são os marcadores genéticos mais escolhidos em espécies de plantas em função de sua abundância, alto grau de polimorfismo, e adequação para automação (WEBER; MAY, 1989). Marcadores de microssatélites têm várias vantagens em relação a outros marcadores moleculares, portanto são mais viáveis para DNA fingerprinting. Eles mostram herança codominante, têm grande número de alelos por loco, e são abundantes nos genomas. Além disso, o uso de microssatélites é baseado no método da

reação da polimerase em cadeia (PCR), que é uma técnica simples e requer apenas uma pequena quantidade de DNA. No entanto, microssatélites precisam ser isolados muitas vezes antes de poderem ser utilizados para cada espécie, o que geralmente exige um tempo considerável e custos elevados. Recentemente, tem sido amplamente aceito que microssatélites isolados a partir do genoma de origem possam ser transferidos para diferentes indivíduos da mesma espécie ou do mesmo gênero (BARBARA et al., 2007). Por exemplo, a amplificação de espécies cruzadas é prevalente em *Brassica* (SZEWC-McFADDEN et al., 1996), *Actinidia* (WEISING et al., 1996), e *Prunus* (DOWNEY; IEZZONI, 2000).

Na família Cucurbitaceae, o cruzamento de espécies foi relatado principalmente em grandes culturas como melão, pepino, abóbora e melancia (DANIN-POLEG et al., 2000; CHIBA et al, 2003; FUKINO et al, 2007), mas não no maxixe.

Os marcadores microssatélites por serem altamente polimórficos, codominantes e serem facilmente reproduzíveis e de fácil interpretação (CRESTE et al., 2003), com possibilidade de automação e análise, além de não necessitar de hibridização e não utilizar de meios radioativos vem se destacando pelo seu uso na caracterização varietal para fins de proteção e de conservação de germoplasma.

Variações nos marcadores microssatélites apresentam elevado poder discriminatório, onde poucos locos garantem a diferenciação dos genótipos, o que é de grande importância quando se considera genótipos muito próximos ou essencialmente derivados (GUIMARÃES et al., 2004).

2.4 TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Para a caracterização molecular, os marcadores do tipo microssatélites são amplamente utilizados devido à abundância e uniformidade na sua distribuição no genoma, natureza multialélica e codominante, fácil detecção por reação em cadeia de polimerase, necessidade de baixa quantidade de DNA, alta reprodutibilidade e baixo custo (SHARMA et al., 1995; SANTOS et al., 2007). Porém, para a amplificação de locos de microssatélites, o conhecimento de sua sequência de DNA é necessária, o que implica que o desenvolvimento de *primers* específicos para esse tipo de análise seja um processo caro e demorado (ZUCCHI et al., 2003). No entanto, existe a possibilidade de transferir marcadores microssatélites entre espécies aparentadas, reduzindo consideravelmente os custos e o tempo das investigações genéticas (LORIEUX et al., 2000). Como exemplo de sucesso na transferência de SSR

(Simple Sequence Repeats) entre espécies dentro de um mesmo gênero tem sido relatado em *Pinus* (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2004), e *Cucumis* (RITSCHER et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA. O município de Mossoró está situado na latitude Sul 5° 11', longitude 37° 20' a oeste de Greenwich e com altitude de 18 m. O clima, segundo a classificação de Koppen é 'BSWh' (muito seco, com estação de chuva no verão atrasando-se para o outono) (CARMO FILHO; OLIVEIRA, 1989).

3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material genético utilizado foi constituído de plântulas de maxixe das cultivares, Maxixe do Norte e Maxixe Liso Calcutá. As plântulas foram obtidas por meio da sementeira em bandeja de polietileno de 200 células em substrato tropstrato. Após 30 dias seguintes a germinação, foi realizada a extração do DNA das plântulas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.3.1 Extração do DNA

O DNA de cada um dos genótipos foi extraído a partir do protocolo desenvolvido por DOYLE; DOYLE (1990), com modificações. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos estéreis de 2 mL. O tampão de extração foi preparado contendo 100 µL de Tris-HCl (100 µM), 280 µL de NaCl (1,4M), 400 µL de EDTA (20mM), 300 mL de CTAB (2,0%), 0,01 g de PVP40 (1,0%), 278 µL água Miliq e 2 µL de β-mercaptoetanol (0,2%), e logo após pipetou-se 800 µL desse tampão de extração, os quais foram colocados nos microtubos. Os microtubos foram vertidos e colocados em banho-maria à temperatura de 65 °C durante 40 minutos, sendo estes, agitados a cada 10 minutos. Em seguida foram adicionados 600 µL de álcool isoamílico (24:1) nos microtubos, os quais foram vertidos e centrifugados à 14.000 rpm, durante 7 minutos e, em seguida, transferiu-se a fase superior (aquosa) para novo microtubo, sendo esta etapa, repetida mais uma vez. Logo após, adicionou-se à fase aquosa 400 µL de isopropanol gelado, homogeneizando a solução até a formação do *pellet*. As amostras foram colocadas em congelador por 2 horas e posteriormente

centrifugadas à 14.000 rpm, durante 10 minutos. Para limpeza do *pellet*, adicionou-se 1 mL de etanol 70% no microtubo, sendo os mesmos centrifugados à 14.000 rpm durante 8 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 1 mL de etanol 90% aos microtubos, os quais foram centrifugados novamente à 14.000 rpm durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente, deixando apenas o *pellet* no microtubo. As amostras foram colocadas em cima de uma bancada para a evaporação do álcool, e logo após, adicionou-se 20 µL de RNase nos microtubos, os quais foram incubados à 37 °C em banho-maria. A quantificação de DNA foi realizada em géis de agarose a 1% (p/v), comparando-se visualmente a intensidade das bandas do DNA dos genótipos extraído, com bandas de peso molecular conhecido de 1 kb. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura e foram padronizadas em 10 ng µL⁻¹ para serem utilizados nas reações de PCR.

3.3.2 Análise com os marcadores microssatélites

Foram testados 31 pares *primers* microssatélites desenvolvidos para melão (CHIBA et al., 2003) em duas cultivares de maxixe, Maxixe do Norte e Maxixe Liso Calcutá.

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 10 µL, contendo 10 mM (pH 8,3) de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25mM de cada dNTP, 250 nM de cada um dos 21 diferentes primers SSR (Tabela 1), 0,5 U de Taq DNA polimerase e, aproximadamente, 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador de acordo com o seguinte programa: 94°C por 2 min, mais 35 ciclos de 94°C por 1 min, 40°C por 1 min, 72°C por 1 min, extensão final de 72°C por 4 min e redução a 10°C. Após a reação foram adicionados 2,4 µL de azul de bromofenol a 0,05%. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 2,0% de concentração, corado com brometo de etídio para a verificação do perfil eletroforético obtido. O gel foi submetido a uma corrente de 100 volts por aproximadamente 1h, e fotografados sob luz ultra-violeta.

Tabela 1. Características dos primers de microsatélite sintetizados para *Cucumis melo* (CHIBA et al., 2003). Mossoró-RN, UFERSA, 2015.

Primer	Seqüência do primer (5' to 3')	Pares de base (pb) esperados
CMMS1-3 (Forward)	TTGAATGATTGGAGGGAAGATAACG	259
CMMS1-3 (Reverse)	CAAATATTGATGGATTTAATATATT	
CMMS2-3 (Forward)	ATCACCCACCCCACCACTGCCAAAA	213
CMMS2-3 (Reverse)	CCTTGAAAAACCACCAACATAACAC	
CMMS3-2 (Forward)	AGTTTTTGGGCATTTTATAGTTGGAT	420
CMMS3-2 (Reverse)	GGCTTATCTCCCACCCAACCATTCT	
CMMS4-3 (Forward)	ACCGAAATCATAAGGAACATAAGAG	292
CMMS4-3 (Reverse)	TATGAGCTGTGTTGTGTATGAAAAC	
CMMS12-6 (Forward)	AACATGATGTGTTTACCAACTTTTT	174
CMMS12-6 (Reverse)	GGTTAAGGGAAA GTGAAGAGATGGT	
CMMS15-4 (Forward)	GTCCGCCATCGCCACTACAAATCAA	116
CMMS15-4 (Reverse)	CTCCGTAAAACCTTCTTCCTCTCTC	
CMMS22-2 (Forward)	CGTTATACAAGATAGAGATAGAGAG	178
CMMS22-2 (Reverse)	TTCAACTAATCCCCAAGACAAACAA	
CMMS24-3 (Forward)	GAGGGAGAGAGTTTGTAaaaaaATG	136
CMMS24-3 (Reverse)	TCGCCAATTACATTACAACCTTTTC	
CMMS30-3 (Forward)	TTCCCACCAGCCCAACGGACACACT	271
CMMS30-3 (Reverse)	GAGATACAGAAACGACGACTAACCT	
CMMS33-1 (Forward)	TGTAATAGGATGACCAAGGGGAGTT	420
CMMS33-1 (Reverse)	TTCAGGAGCTACAACAAGATTTCAA	
CMMS33-2 (Forward)	GCTACTTTTTATGGCGGCAGTGACG	269
CMMS33-2 (Reverse)	ATTCGGATGATTATTCTTCGCAGTT	
CMMS34-8 (Forward)	TTTCTTACTTTTTGGTTTGGTTCTG	480
CMMS34-8 (Reverse)	GGCGCTGTGGTGAGTGTCGGGAGAG	
CMMS34-10 (Forward)	GGGGTGTGAAGCTGAAGGCAAAGTC AAAGGAAGAAGAAGAAAAAGGAGAA	351
CMMS34-10 (Reverse)		
CMMS35-4 (Forward)	ACGGATACATCGAGGAGACTTCATG	105

CMMS35-4 (Reverse)	GTCAGCTTCAACCCTTTACTTTTTC	
CMMS35-5 (Forward)	AACGGGATTTTGGAGGCATATTCGG	174
CMMS35-5 (Reverse)	CTCCCCAGTGTATCAGCCAAATCTC	
CMGA 104 (Forward)		125
CMGA 104 (Reverse)		
CMCT160a+b		215
(Forward)		
CMCT160a+b		
(Reverse)		
CMBR 96 (Forward)		163
CMBR 96 (Reverse)		
CMBR 109 (Forward)		148
CMBR 109 (Reverse)		
CMBR 44 (Forward)		108
CMBR 44 (Reverse)		
CMBR 120 (Forward)		167
CMBR 120 (Reverse)		
CMBR 08 (Forward)		104
CMBR 08 (Reverse)		
CMAGN 68 (Forward)		190
CMAGN 68 (Reverse)		97
CMGA 165 (Forward)		
CMGA 165 (Reverse)		175
CMTAAN 100		
(Forward)		
CMTAAN 100		
(Reverse)		167
CMTAA 166		
(Forward)		
CMTAA 166 (Reverse)		131
CMBR 16 (Forward)		
CMBR 16 (Reverse)		165
CMTCN 14 (Forward)		
		111

CMTCN 14 (Reverse)	
CMBR 111 (Forward)	166
CMBR 111 (Reverse)	
CMATN22 (Forward)	219
CMATN22 (Reverse)	
CMCT505 (Forward)	
CMCT505 (Reverse)	

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.1.1 Marcador Microsatélite

Foi constatado que, dentre os 31 pares de *primers* testados e desenvolvidos para melão, 21 amplificaram para maxixe, dos quais 20 foram na cultivar Maxixe do Norte (MN) e 14 em Maxixe Liso Calcutá (MLC). Nas duas cultivares, ao mesmo tempo, amplificaram 13 *primers* (CMMS 2-3; CMMS 4-3; CMMS 30-3; CMMS 33-1; CMMS 33-2; CMMS 34-8; CMMS 34-10; CMMS 35-4; CMMS 35-5; CMGA 104; CMBR 96; CMBR 109; CMATN22), os quais foram considerados monomórficos, outros 7 *primers* (CMMS 3-2; CMMS 15-4; CMMS 22-2; CMMS 24-3; CMCT160a+b; CMBR 44; CMAGN 68) em apenas MN e 1 *primer* (CMGA 165) somente em MLC. O peso molecular dos fragmentos de amplificação gerados variou de 100 a 500 Pb, sendo 12 com tamanho esperado, 8 acima e 1 abaixo, como mostra a tabela 2. O fato dos alelos terem apresentado tamanho acima do esperado, conforme foi observado em alguns *primers*, pode ser explicado pelo fato de que o genoma do maxixe possui mais repetições naquela região específica comparada à do melão. O padrão de bandas e a qualidade dos produtos da amplificação são mostrados nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que a porcentagem de transferibilidade dos *primers* de melão foi de 67,74%. Este percentual pode ser muito variável dependendo das espécies em estudo. Ristchel et al. (2004), ao analisarem 67 *primers* desenvolvidos para melão (*Cucumis melo* L.) e testados em melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.), ambas espécies da família Cucurbitaceae, obtiveram 23% de transferibilidade.

Os resultados foram superiores também aos estudos realizados com outras espécies de cucurbitáceas, onde alguns *primers* de melão (*Cucumis melo*), otimizados e testados em abóbora (*Cucurbita moschata*) e bucha (*Luffa cylindrica*), tiveram 31,25% de transferibilidade (LEITE et al., 2007); e de melão (*Cucumis melo*) para pepino (*Cucumis sativus*), com aproximadamente 50% de sucesso (DANIN-POLEG et al., 2001).

Não foi possível observar nesse estudo polimorfismo entre os DNA's avaliados quando houve amplificação de ambos para alguns *primers*. Isto pode ser explicado pelo fato de que a análise foi realizada em gel de agarose, o qual tem baixa resolução quando comparado ao gel de acrilamida, ou até mesmo pela homologia entre as cultivares. Análises

futuras, com gel de acrilamida, são sugeridas para a confirmação do monomorfismo encontrado.

Com base no conhecimento da variabilidade genética de espécies vegetais, pode-se fazer o uso racional e sustentável dos recursos genéticos naturalizados. Considerando o alto custo para o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para a análise de microsatélites, o teste de transferibilidade desses *primers* de uma espécie para outra, mostra que os resultados deste trabalho possibilita tornar mais eficiente o processo de caracterização molecular dos recursos genéticos dessas espécies.

Tabela 2 – Resultados dos pares de bases dos *primers* transferíveis, a cultivar e caracterização de monomorfismo.

Primers	Pares de bases	Resultado – Pb	Monomórficos	Transferíveis nos DNA's	
				MN	MLC
CMMS 1-3	259	-	-	-	-
CMMS 2-3	213	Acima	X	X	X
CMMS 3-2	420	Esperado	-	X	-
CMMS 4-3	292	Abaixo	X	X	X
CMMS 12-6	174	-	-	-	-
CMMS 15-4	116	Acima	-	X	-
CMMS 22-2	178	Esperado	-	X	-
CMMS 24-3	136	Acima	-	X	-
CMMS 30-3	271	Esperado	X	X	X
CMMS 33-1	420	Esperado	X	X	X
CMMS 33-2	269	Esperado	X	X	X
CMMS 34-8	480	Esperado	X	X	X
CMMS 34-10	351	Esperado	X	X	X
CMMS 35-4	105	Acima	X	X	X
CMMS 35-5	174	Acima	X	X	X
CMGA 104	125	Esperado	X	X	X
CMCT160a+b	215	Esperado	-	X	-
CMBR 96	163	Acima	X	X	X
CMBR 109	148	Acima	X	X	X
CMBR 44	108	Esperado	-	X	-
CMBR 120	167	-	-	-	-
CMBR 08	104	-	-	-	-
CMAGN 68	190	Esperado	-	X	-
CMGA 165	97	Acima	-	-	X
CMTAAN 100	175	-	-	-	-
CMTAA166	167	-	-	-	-

CMBR 16	131	-	-	-	-
CMTCN 14	165	-	-	-	-
CMBR 111	111	-	-	-	-
CMATN 22	166	Esperado	X	X	X
CMCT 505	219	-	-	-	-

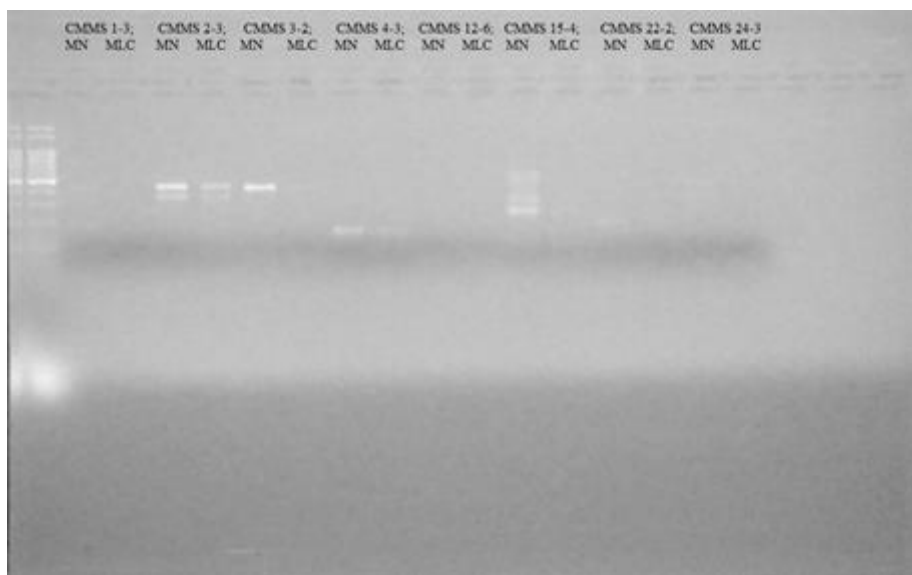


Figura 1 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR - CMMS 1-3; CMMS 2-3; CMMS 3-2; CMMS 4-3; CMMS 12-6; CMMS 15-4; CMMS 22-2; CMMS 24-3 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.

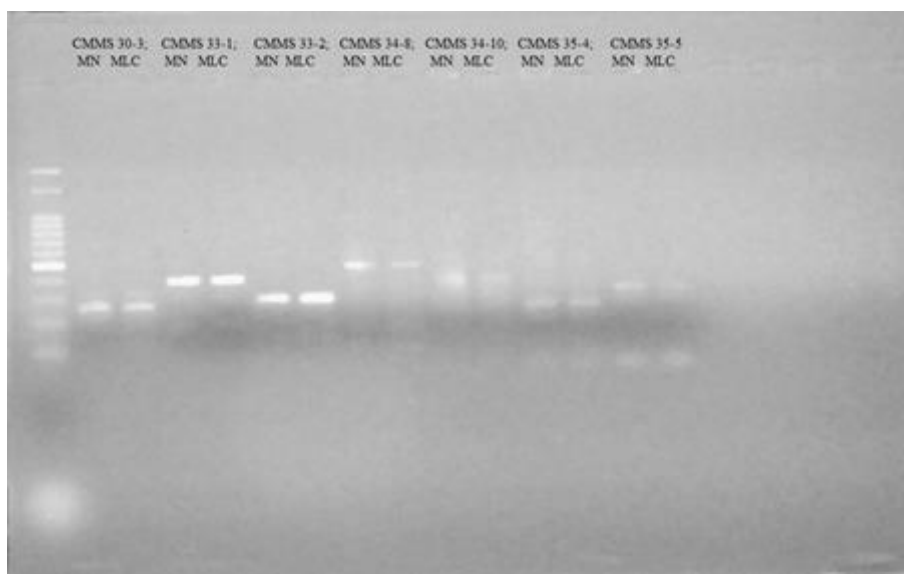


Figura 2 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR - CMMS 30-3; CMMS 33-1; CMMS 33-2; CMMS 34-8; CMMS 34-10; CMMS 35-4; CMMS 35-5 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.

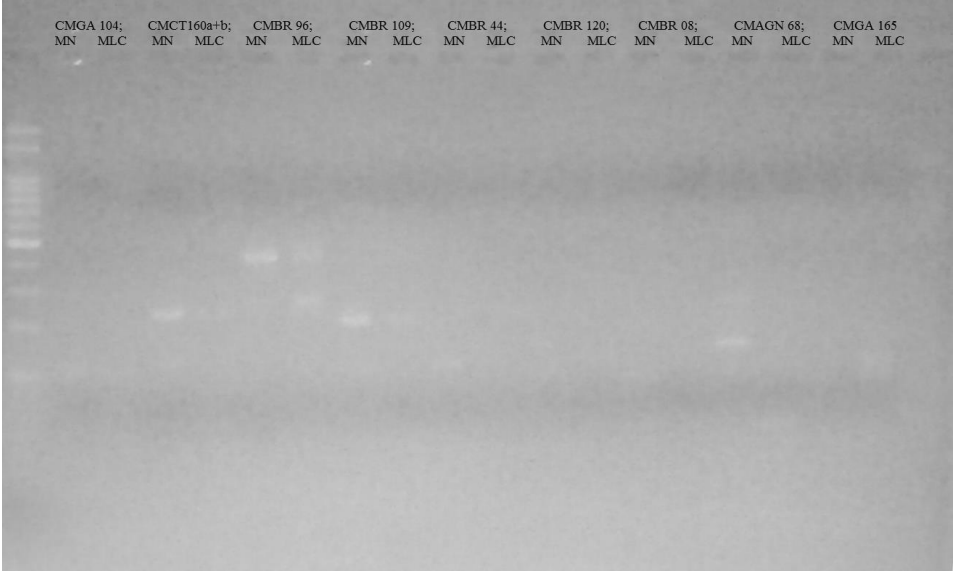


Figura 3 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR – CMGA 104; CMCT160a+b; CMBR 96; CMBR 109; CMBR 44; CMBR 120; CMBR 08; CMAGN 68; CMGA 165 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.



Figura 4 - Perfil de amplificação de DNA's de *Cucumis anguria* L., Cucurbitáceas. Os produtos da PCR foram amplificados com os *primers* SSR – CMTAAN 100; CMTAA 166; CMBR 16; CMTCN 14; CMBR 111; CMATN22; CMCT505 e revelados em gel de agarose 2%. Marcador: DNA Ladder 100 Pb.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o teste de transferibilidade dos marcadores microssatélites de *Cucumis melo* L. para *Cucumis anguria* L. foram altamente satisfatórios, mostrando que existe homologia das regiões que flanqueiam os microssatélites de melão na cultura do maxixe.

REFERÊNCIAS

- BARBARÁ T., PALMA-SILVA C., PAGGI G. M., BERED F., FAY M. F., LEXER C. (2007). **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations.** *Mol. Ecol.*, 16: 3759–3767.
- CARMO F. F.; OLIVEIRA O. F. **Mossoró: um município do semi-árido nordestino características e aspectos florísticos.** Mossoró: ESAM, 1989. 62p. (Coleção Mossoroense, B, n.672).
- CATANEO, Ciriele Boeira; CALIARI, Vinícius; GONZAGA, Luciano Valdemiro; KUSKOSKI, Eugênia Marta; FETT, Roseane. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar. 2008.
- CHIBA N., SUWABE K.; NUNOME T.; HIRAI M. (2003). Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. **Breed. Sci.**, 53:21–27.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S. O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, n. 132, p. 259-268, 2003.
- DANIN-POLEG Y.; REIS N.; BAUDRACCO-ARNAS S.; PITRAT M.; STAUB J. E.; OLIVER M.; ARUS P.; DEVIENTE C. M.; KATZIR N. (2000). Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging. **Genome**, 43: 963–974.
- DANIN-POLEG Y.; REIS N.; TZURI G.; KATZIR N. (2001). Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. **Theor. Appl. Genet.**, 102: 61–72.
- DOWNEY S. L.; IEZZONI A. F. (2000). Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 125: 76–80.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. (1990). **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** *Focus* 12:13-15.
- FILGUEIRA. 2000. **Novo manual de olericultura.** Viçosa: UFV, 402p
- FUKINO N.; SAKATA Y.; KUNIHISA M.; MATSUMOTO S. (2007). Characterisation of novel simple sequence repeat (SSR) markers for melon (*Cucumis melo* L.) and their use for genotype identification. **J. Hort. Sci. Biotech.**, 82: 330–334.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S. C.; ROBLEDOARNUNCIO J. J.; COLLADA C.; DIAZ A.; WILLIAMS C. G.; ALÍA R.; CERVERA M. T. (2004). Cross-amplification and sequence

variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines. **Theoretical and Applied Genetics** **109**: 103-111.

GUIMARÃES, C. T.; PADILHA, L.; SOUZA, I.R.P.; PAIVA, E. **“Fingerprinting” Molecular de linhagens de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, (2004). 4p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, n.92).

KIRKBRIDE, J. H., Jr. **Biosystematic Monograph of the Genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): Botanical Identification of Cucumbers and Melons**. Boone, N.C.: Parkway Publishers, 1993. 159p.

KROON, G. H.; CUSTERS, J. B. M.; KHO, Y. O. ; DEMIJIS, A. P. M. ; VAREKAMP, H. Q. (1979). Inter-específic hybridization in *Cucumis* (L.) I. Need for Genetic variation biosystematic relations na possibilities to overcome crossability Barriers. **Euphitica**, 28: 723-728.

LEITE T. L.; FERREIRA M. A.; TARCHETTI B. D.; FERREIRA M. A. J. F.; AMARAL Z. P. S; BUSO G. S. C. (2007). Análise de transferibilidade de primers microssatélites de *Cucumis melo* para *Cucurbita moschata* e *Luffa cylindrica*. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 10p.

LIMA, A.S. et al. Caracterização centesimal de maxixe e sua aplicação na produção e pickles. **Alim. Nutr.**, v.17, n.4, p.407-412, 2009.

LITT, M.; LUTY, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in-vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Human Genet.** 44: 397-101.

LORIEUX M.; NDJIONDJOP M. N.; GHESQUIÈRE A.(2000). A first interespecific *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetical linkage map. **Theoretical and Applied Genetics** 100: 593-601.

MACKEE, H. S. **Catalogue des plantes introduites et cultivées en Nouvelle-Calédonie**. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle, 164 p. 1994.

MELO, A. M. T.; TRANI, P. S. Maxixe. In: FAHL, J. I.; CAMARGO, M. B. P.; PIZZINATTO, M. A.; BETTI, J. A.; MELO, A. M. T.; De MARIA, I. C.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. 393p. (IAC. Boletim Técnico, 200).

MODOLO, Valéria Aparecida; COSTA, Cyro Paulino da. **Maxixe**: uma hortaliça de tripla forma de consumo. 19. ed. Piracicaba: Serviço de Produções Gráficas - Usp/esalq, 2003. 24 p. (Série produtor rural).

PATERNIANI, M. E. A.G. Z., COSTA C. P. (1992). Evaluation of interespecific hybridization in the genus *Cucumis* L. **Revista Brasileira de Genética**: 15(2): 399-405.

PIMENTEL. (1985). **Olericultura no Trópico úmido**, São Paulo: Ceres. 321p.

RITSCHER P. S.; LINS T. C.; TRISTAN L.; BUSO G. S. C.; BUSO J. A.; FERREIRA M. E. (2004). Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.) **BMC Plant Biol.**, 4: 9.

ROBINSON R. W.; DECKER-WALTER D. S. (1997). **Cucurbits**. New York: CAB International, 225p.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F., MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. (1985) Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** **230**: 1350-1354.

SANTOS K. L.; WELTER L. J.; DANTAS A. C. M.; GUERRA M.; DUCROQUET J. P. H. J.; NODARI R. O. (2007). Transference of microsatellite markers from Eucalyptus spp. to Accasello wiana and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology** **30**: 73-79.

SHARMA P. C.; WINTER P.; BUNGER T.; HUTTEL B.; WEINGAND F.; WEISING K.; KAHL G. (1995). Abundance and polymorphism of di, tri and tetranucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicerari etinum* L.). **Theoretical and Applied Genetics** **90**: 90-96.

SENTHIL KUMAR S.; KAMARAJ M. (2010). Analysis of Phytochemical Constituents an Antimicrobial Activities of *Cucumis anguria* L. Against Clinical Pathogens. **American-Erasian j. Agric. & Environ. Sci.**, 7 (2): 176-178, 2010.

SZEWC-MCFADDEN A. K.; KRESOVICH S.; BLIEK S. M.; MITCHELL S. E.; MCFERSON J. R. (1996). Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species. **Theor. Appl. Genet.**, 93: 534-538.

WEBER J. K.; MAY P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Amer. J. Hum. Genet.**, 44: 388-397.

WEISING K.; FUNG R. W. M.; KEELING D. J.; ATKINSON R. G.; GARDNER R. C. (1996). Characterization of microsatellites from *Actinidia chinensis*. **Mol. Breed.**, 2: 117-131.

WINSTED, N. N.; SASSER, J. N. (1956). Reaction of cucumber varieties to five root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Plant Disease Reporter**. 40 (4): 272-275.

ZUCCHI M. I.; BRONDANI R. P. V.; PINHEIRO J. B.; CHAVES L. J.; COELHO A. S. G.; VENCOSKY R. (2003). Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology** **26**: 449-457.