

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Caracterização molecular de recursos genéticos de
Cucurbita argyrosperma, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita
pepo***

Daniela Priori

Pelotas, 2011

Daniela Piori

**Caracterização molecular de recursos genéticos de *Cucurbita argyrosperma*,
Cucurbita ficifolia e *Cucurbita pepo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientadora: Rosa Lía Barbieri

Co-Orientador: Antonio Costa de Oliveira

Pelotas, 2011

Banca examinadora:

Dr^a Rosa Lía Barbieri – Embrapa Clima Temperado (presidente)

Dr. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPel

Dr^a Caroline Marques Castro – Embrapa Clima Temperado

Dr^a Semíramis Rabelo Ramalho Ramos – Embrapa Tabuleiros Costeiros

A Deus

Aos meus pais Olavo e Maria Inês

Dedico

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com inúmeras colaborações, por isso não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me apoiaram e de alguma forma contribuíram para a concretização deste projeto.

À Deus, pela vida, saúde, proteção e por sempre guiar o meu caminho.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, amor, compreensão e incentivo.

À minha orientadora Rosa Lía Barbieri pela excelente orientação, dedicação, paciência e confiança em todas as etapas da realização deste trabalho. Além disso, pela generosidade na transmissão dos conhecimentos e pela relação de respeito e amizade desenvolvida ao longo destes dois anos de convivência, assim como pelo seu profissionalismo e competência.

Ao meu co-orientador prof. Antonio Costa de Oliveira pelos ensinamentos, oportunidade e incentivo. Ao prof. Luciano Carlos da Maia pela ajuda e transmissão de conhecimentos.

À pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Caroline Marques Castro, pela amizade, apoio e ajuda na utilização dos programas estatísticos.

Ao pesquisador Sandro Bonow pela amizade, apoio e incentivo.

Aos colegas e amigos, Claudete Mistura, Juliana Castelo Branco, Raquel Neitzke, Carla Sigales Vasconcelos, Natércia Lobato Pinheiro, Taíse Carbonari, Henrique Padilha, Sântia Fischer, Lidiane Strelow, Angela Rohr, pelos momentos vividos e pelo constante incentivo e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas colegas e grande amigas Taciane Finatto e Thaís Raquel Hagemann, pelos agradáveis momentos de convivência e troca de experiências.

As minhas irmãs Daliane e Gabriela, pelo incentivo e apoio durante essa etapa da minha formação. As minhas sobrinhas Emanuely e Emilly pelo amor e carinho.

Aos meus avôs José e Maria por toda a força e incentivo e por sempre estarem rezando por mim.

À todos os colegas e amigos do Fitomelhoramento.

À minha amiga Elaine Serraglio pela amizade, força, carinho, incentivo e pelo exemplo de luta e perseverança constante.

Ao meu amigo Arlan pela força, carinho, apoio e por fazer- me acreditar que dias melhores virão.

Ao Programa de Pós - graduação em Agronomia/FAEM-UFPeI, pela oportunidade de realização do curso. À CAPES, pela viabilização financeira deste projeto.

À Embrapa Clima Temperado pela oportunidade e infra-estrutura disponibilizada ao desenvolvimento deste trabalho, especialmente ao laboratório de Biologia Molecular.

Agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não há saber mais, nem saber menos. Há saberes diferentes”.

Paulo Freire

Resumo

PRIORI, Daniela. **Caracterização molecular de recursos genéticos de *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita pepo***. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os recursos genéticos conservados em bancos de germoplasma apresentam grande valor do ponto de vista da conservação de tipos raros, quando os mesmos são ameaçados pelo abandono do cultivo ou como recurso insubstituível para programas de melhoramento genético vegetal. Dentre os acessos contidos nos bancos de germoplasma podem ser encontradas importantes fontes de variabilidade genética para a obtenção de genótipos mais produtivos, tolerantes a estresses bióticos e abióticos e com melhor qualidade nutricional. Para que haja sucesso nessa demanda é necessário que os acessos contidos nos bancos de germoplasma sejam caracterizados e avaliados, tanto em termos de caracteres qualitativos quanto quantitativos. No Brasil, há pouca informação sobre os recursos genéticos de Cucurbitáceas, de modo especial no que se refere à *Cucurbita argyrosperma* e *Cucurbita ficifolia*. Grande número de variedades locais de *Cucurbita* cultivadas no país poderiam ser melhor exploradas como fontes de genes para programas de melhoramento, após a devida caracterização. Muito da diversidade genética das variedades locais de diferentes espécies de *Cucurbita* cultivadas no Sul do Brasil vem sendo perdida devido ao abandono do cultivo ou à sua substituição por variedades híbridas comerciais. Este trabalho foi realizado com o objetivo geral de contribuir para o conhecimento relacionado aos recursos genéticos de *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* e *C. pepo*, e objetivos específicos de avaliar a transferibilidade de loci de microssatélites de *C. pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*; e avaliar a variabilidade genética entre e dentro de variedades locais de *C. pepo* cultivadas no Rio Grande do Sul por meio da análise de marcadores microssatélites. Foram analisados dez acessos de *C. pepo*, nove de *C. argyrosperma* e cinco de *C. ficifolia* do acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. A distância genética entre esses acessos foi determinada. A transferibilidade de locos SSR de *C. pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* foi de 85% e 80%, respectivamente. A análise dos 24 acessos de *Cucurbita* por meio de 35 loci SSR gerou um total de 105 marcadores SSR, com variação de um a quatro alelos por loco, dos quais 56 (53,33%) foram polimórficos, evidenciando que há diversidade genética entre os acessos analisados. Através dos dados de presença e ausência de marcadores obtidos com 34 combinações de *primers*, foram encontrados 100 locos com variação de um a cinco alelos por loco, com média geral de três alelos por marcador analisado. Dentre os 40 locos analisados, 29 (85,3%) foram polimórficos, evidenciando que há variabilidade genética entre os acessos de *C. pepo* analisados. A avaliação dos dados moleculares foi feita pela análise molecular da variância (AMOVA). Deste modo, foi possível verificar que 54,60% da variabilidade genética é atribuída à variação entre acessos e 45,39% é atribuída a diferenças dentro dos acessos. Foi feita a análise comparativa entre os dez acessos estudados, analisados dois a dois, pela análise AMOVA. Das 45 comparações entre os dez acessos, foram significativas as diferenças entre 35 delas, com média de 57,10% da variação molecular atribuída às diferenças entre acessos. A variação genética entre os municípios onde os acessos

foram coletados não foi significativa, indicando que não ocorre subdivisão de populações em função da região geográfica. Os resultados obtidos indicam que os microssatélites foram eficientes para a caracterização molecular e a análise da divergência genética. É possível utilizar primers de microssatélites desenvolvidos para *C. pepo* na caracterização molecular de *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. Variedades locais de *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* apresentam pouca variabilidade genética, enquanto que *C. pepo* evidencia grande variabilidade genética. A maior proporção da variabilidade em *C. pepo* encontra-se distribuída entre os acessos, e não dentro dos acessos.

Palavras-chave: variedades locais, banco ativo de germoplasma, marcadores moleculares, SSR, Cucurbitaceae

Abstract

PRIORI, Daniela. **Molecular characterization of genetic resources of *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* and *Cucurbita pepo***. 2011. 79p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Genetic resources conserved in genebanks have a great value in terms of conservation of rare types, when they are threatened by abandonment of farming or as a unique resource for plant breeding programs. Among the accessions conserved in genebanks important sources of genetic variability can be found for obtaining more productive genotypes tolerant to biotic and abiotic stresses and improved nutritional quality. To have success in that demand is necessary that the accessions contained in genebanks are characterized and evaluated in terms of both qualitative and quantitative characters. The characterization and evaluation of accessions conserved in genebanks must be priorities in the strategy for management of genetic resources, as they provide better knowledge of the germplasm available, is essential for use in breeding programs. In Brazil, there is little information on genetic resources of Cucurbits, especially as regards *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita argyrosperma*. Large number of *Cucurbita* landraces grown in the country could be better exploited as sources of genes for breeding programs, after genetic characterization. Much of the genetic diversity of different *Cucurbita* landraces grown in southern Brazil has been lost due to neglect of cultivation or its replacement by commercial hybrid varieties. This work was carried in order to contribute to general knowledge related to genetic resources of *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* and *Cucurbita pepo*, and with specific objectives to assess the transferability of primers designed to *C. pepo* in *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* and to evaluate the genetic variability within and among landraces of *C. pepo* grown in Rio Grande do Sul through analysis of microsatellite markers. Ten accessions of *C. pepo*, nine of *C. argyrosperma* and five of *C. ficifolia* belonging to the Active Germplasm Bank of Cucurbitaceae from Embrapa Temperate Agriculture were submitted to molecular characterization. The genetic distance between these accessions was determined. The transferability of SSR loci from *C. pepo* to *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* was 85% and 80% respectively. The analysis of these 24 accessions with 35 loci generated a total of 105 SSR markers, ranging from one to four alleles per locus, of which 56 (53,33%) were polymorphic, showing that there is genetic diversity in the accessions analyzed. The presence and absence of markers allowed to find 100 loci, varying from one to five alleles per locus, with overall average of three alleles per marker analyzed. Among the 34 loci tested, 29 (85.2%) were polymorphic, showing that there is genetic variability among the accessions of *C. pepo* analyzed. Data evaluation was done by molecular analysis of molecular variance (AMOVA). It was observed that 54.60% of genetic variability is attributable to variation between accessions and 45.39% is attributed to differences within accessions. A comparative analysis was made between the ten accessions studied, analyzed two by two by AMOVA. From 45 comparisons between the ten accessions significant differences there were detected between 35 comparisons, with average of 57.10% of molecular variation attributed to differences between accessions. Genetic variation among counties where the accessions were collected was not significant, indicating that there is not population subdivision according to geographic region. Results indicate that the microsatellites were efficient for the characterization and molecular analysis

of genetic divergence. These studies contributed to increase the knowledge related to these genetic resources. SSR primers developed for *Cucurbita pepo* can be used for molecular characterization of *C. argyrosperma* and *C. ficifolia*. Landraces of *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* showed low genetic variation, while *C. pepo* shows great variability. The largest proportion of variability in *C. pepo* is distributed between accessions and not within accessions.

Key-words: landraces, molecular markers, SSR, *Cucurbitaceae*

Lista de figuras

2 Abóbora gila (*Cucurbita ficifolia*), uma hortaliça pouco convencional cultivada no Rio Grande do Sul

Figura 2.1 – Folhas e frutos de *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011 _____26

Figura 2.2 – Fruto aberto de *Cucurbita ficifolia* mostrando a casca espessa e a polpa fibrosa, Pelotas, 2011 _____27

Figura 2.3 – Sementes de *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011 _____27

Figura 2.4 – Frutos de duas variedades locais de *Cucurbita ficifolia* cadastradas como acessos no Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2011 _____28

Figura 2.5 – Cozimento (a), separação da casca e da polpa (b), desfibramento da polpa (c) e polpa pronta para uso em doces (d) de *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011 _____29

3 Transferibilidade de marcadores microssatélites de *Cucurbita pepo* para *Cucurbita argyrosperma* e *Cucurbita ficifolia*

Figura 3.1 –Perfil de amplificação de acessos de *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita pepo* do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. Os produtos da PCR foram amplificados com o Primer SSR – CMTP210 e revelados em gel de agarose 3,5%. Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), Pelotas, 2011 _____45

Figura 3.2 - Dendrograma resultante da análise de 24 genótipos de *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* e *C. pepo* obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio

do coeficiente de Dice, utilizando 35 marcadores SSR. Os valores encontrados nos grupos indicam o percentual de vezes que os genótipos agrupam juntos em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,92. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011. _____48

4 Avaliação da variabilidade genética em variedades locais de *Cucurbita pepo* por meio de marcadores microssatélites

Figura 4.1 – Perfil de amplificação de acessos de *C. pepo* do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. Os produtos da PCR foram amplificados com o Primer SSR – CMTP141 e revelados em gel de agarose 3,5%. Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), Pelotas, 2011. _____66

Figura 4.2 – Variabilidade genética dos frutos das variedades locais de *Cucurbita pepo* (C148-poronguinho, C199-mogango amarelo, C222-abóbora-de-coco, C224-mogango verrucoso, C260-abóbora-ovo, C276-abóbora, C290-abóbora-estrela, C299-moganguinho alongado, C377-abobrinha ornamental, C381- abóbora-estrela) avaliadas no presente trabalho, acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011. _____70

Figura 4.3 – Dendrograma resultante da análise de 50 indivíduos de *Cucurbita pepo*, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio do coeficiente de Rogers modificado, utilizando 34 marcadores SSR. Os valores encontrados nos grupos indicam o percentual de vezes que os genótipos agrupam juntos em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,86. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011. _____71

Lista de tabelas

3 Transferibilidade de marcadores microssatélites de *Cucurbita pepo* para *Cucurbita argyrosperma* e *Cucurbita ficifolia*

Tabela 3.1 – Acessos de variedades locais de *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita pepo* submetidos à caracterização molecular, Pelotas, 2011 _____ 40

Tabela 3.2 – Primers desenhados para *Cucurbita pepo* utilizados para a transferibilidade em *Cucurbita argyrosperma* e *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011 _____ 42

4 Avaliação da variabilidade genética em variedades locais de *Cucurbita pepo* por meio de marcadores microssatélites

Tabela 4.1 – Acessos de variedades locais de *Cucurbita pepo* coletadas no Rio Grande do Sul submetidos à caracterização molecular, Pelotas, 2011. _____ 60

Tabela 4.2 – Características dos locos de microssatélites validados em 10 acessos de *Cucurbita pepo*, Pelotas, 2011. _____ 64

Tabela 4.3 – Distribuição da variabilidade genética dentro e entre acessos e entre regiões de *Cucurbita pepo* com base na análise molecular da variância (AMOVA), Pelotas, 2011 _____ 67

Tabela 4.4 – Análise comparativa 2x2 entre acessos de *Cucurbita pepo* obtidas por meio da AMOVA. A porcentagem da variação molecular total existente entre os acessos (F_{st}) é a medida da distância genética entre os acessos, Pelotas, 2011. _____ 68

Sumário

Resumo	8
Abstract	10
Lista de figuras	12
Lista de tabelas	14
1 Introdução geral	17
2 Abóbora gila (<i>Cucurbita ficifolia</i>), uma hortaliça pouco convencional cultivada no Rio Grande do Sul	21
Resumo	21
Abstract	22
2.1 Introdução	23
2.2 Origem, variabilidade genética e relações filogenéticas	24
2.3 Características morfológicas	26
2.4 Usos de <i>Cucurbita ficifolia ficifolia</i>	28
2.5 O cultivo de <i>Cucurbita</i>	30
2.6 Considerações finais	31
2.7 Referências	32
3 Transferibilidade de marcadores microssatélites de <i>Cucurbita pepo</i> para <i>Cucurbita argyrosperma</i> e <i>Cucurbita ficifolia</i>	34
Resumo	34
Abstract	35
3.1 Introdução	36
3.2 Material e métodos	39
3.3 Resultados e discussão	44
3.4 Conclusão	50
3.5 Referências	51
4 Avaliação da variabilidade genética em variedades locais de <i>Cucurbita pepo</i> por meio de marcadores microssatélites	55
Resumo	55
Abstract	56
4.1 Introdução	57
4.2 Material e métodos	60
4.3 Resultados e discussão	63

4.4 Conclusão	72
4.5 Referências	73
5 Considerações finais	76
6 Referências (Introdução geral)	78

1. Introdução geral

As abóboras pertencem ao gênero *Cucurbita*, da família Cucurbitaceae. Apresentam grande importância para a agricultura familiar no Brasil, onde seu cultivo é bastante difundido e tem importância por fazer parte da alimentação em várias regiões (RAMOS, QUEIROZ, 2005). A família Cucurbitaceae compreende 118 gêneros e 825 espécies, com uma distribuição predominantemente tropical. Aproximadamente 30 destas espécies são utilizadas com fins econômicos, destacando-se as abóboras (*Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* e *Cucurbita pepo*), as melancias (*Citrullus lanatus*), os melões (*Cucumis melo*) e os pepinos (*Cucumis sativus*). As cinco espécies domesticadas de *Cucurbita* são cultivadas no Brasil, sendo estas conhecidas por uma grande diversidade de nomes populares, particulares ou em comum (HEIDEN et al., 2007).

O gênero *Cucurbita* apresenta uma ampla diversidade genética. As espécies cultivadas são bastante variáveis no que diz respeito à adaptação às condições ambientais contrastantes, ciclos fenológicos, hábitos de crescimento, caracteres morfológicos, características nutricionais e grau de resistência a doenças. As espécies silvestres constituem importantes fontes de genes para o melhoramento genético e algumas delas têm grande potencial para produção de novos produtos (FERREIRA, 2008).

Dentro do gênero *Cucurbita* todas as espécies são diplóides, com 20 pares de cromossomos ($2n=40$), apesar de haver evidências de que o gênero é um antigo tetraplóide (WEEDEN e ROBINSON, 1990, citados por LIRA-SAADE, 1995). As plantas são rasteiras, trepadeiras ou subarborescentes, e as flores são predominantemente unissexuais, grandes, solitárias e opostas às gavinhas, com coloração variando de amarelo-clara a amarelo-alaranjado. A polinização é realizada

por abelhas. Os frutos das espécies cultivadas são mais diversificados que os das espécies silvestres, pois variam amplamente em termos de formato, tamanhos, cores e tipos de superfície (LIRA-SAADE, 1995).

As abóboras são nativas das Américas e faziam parte da base alimentar da civilização Olmeca, posteriormente incorporada pelas civilizações asteca, inca e maia. O processo seletivo, com base em mutantes de polpa não amarga, deu origem às espécies domesticadas. As espécies domesticadas de *Cucurbita* (*Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* e *Cucurbita pepo*) são provavelmente algumas das plantas mais antigas a serem cultivadas na América (FERREIRA, 2008).

No Brasil, as abóboras estiveram associadas ao milho e à mandioca, constituindo a base alimentar das populações indígenas antes do período colonial e foi, após a chegada dos navegadores e a colonização, incorporada à dieta dos escravos africanos (VERGER, 1987, citado por RAMOS, QUEIROZ, 2005). As abóboras foram dispersas para outros continentes por transporte marítimo no século 16 e se tornaram um cultivo importante para muitos países (PARIS et al., 2006).

As abóboras são ricas em vitamina A e também fornecem vitaminas do complexo B, cálcio e fósforo. Sob o ponto de vista nutricional, a abóbora é fonte de beta caroteno, um precursor da vitamina A, numa faixa variando de 0,4 a 9,0 mg/100g de peso fresco. (FRANCIS, SMITH, citados por RAMOS, QUEIROZ 2005),

As espécies de *Cucurbita* apresentam grande diversidade no que diz respeito aos seus usos. As espécies silvestres têm sido utilizadas pelo homem para diversos fins, como alimentação de animais no México (*C. argyrosperma* ssp. *sororia*). Na alimentação humana, são usadas as sementes tostadas ou assadas e os frutos imaturos de algumas espécies. Os frutos imaturos são consumidos como verdura, sendo usados aqueles que não possuem sabor amargo, característico de altas concentrações de cucurbitacina. Em relação ao uso das espécies cultivadas, tanto os frutos, quanto as sementes, são comumente utilizados na alimentação humana em todo o mundo. As flores masculinas e as partes tenras dos talos também são usadas na alimentação (FERREIRA, 2008). Os frutos de algumas variedades tem uso ornamental, e são usados na decoração de ambientes (HEIDEN et al., 2007).

Embora o cultivo de abóboras seja amplamente difundido em todo o mundo, grande parte da produção é realizada em pequenas propriedades, para subsistência, ou destinada aos mercados locais (NUEZ et al., 2000). No Brasil, existem muitas variedades locais (também chamadas de variedades crioulas) nas diferentes regiões do país (HEIDEN et al., 2007). Ao longo dos anos, estas variedades têm sido selecionadas pelos agricultores, resultando em populações adaptadas às condições locais de cultivo. A seleção dessas variedades locais é muito importante por proporcionar adaptação às condições ecológicas do local onde foram selecionadas (WALTER et al., 2005).

É grande a variabilidade genética existente entre e dentro das populações dessas variedades locais, o que resulta em frutos das mais variadas cores, texturas, formas, tamanhos e sabores (FERREIRA, 2008). Isso é resultado da seleção natural e artificial sobre as populações dessas plantas alógamas.

Os agricultores cultivam as variedades locais de *Cucurbita* e realizam a própria seleção de frutos, utilizando sementes próprias para o cultivo do ano seguinte. Por usarem suas próprias sementes, as quais são resultantes de uma seleção continuada, os agricultores obtêm tipos muito diversos, considerados recursos genéticos, que são manejados desde que começam a cultivar as plantas dentro de seus sistemas de produção agrícola (RAMOS, QUEIROZ, 2005). Esses recursos genéticos podem ser fonte de genes para tolerância a estresses bióticos e abióticos para programas de melhoramento genéticos, além de fornecerem genes para maior qualidade nutricional.

Os recursos genéticos podem ser conservados *ex situ*, em bancos de germoplasma mantidos por instituições de pesquisa, ou *in situ*, em unidades de conservação. A conservação *on farm*, que consiste na conservação de recursos genéticos realizada pelos agricultores, permite a dinâmica de interação entre planta, homem e meio, propiciando a manutenção e enriquecimento da diversidade genética e cultural, e a manutenção de processos ecológicos (EYZAGUIRRE; IWANAGA, 1995; RERKASEM; PIÑEDO-VASQUEZ, 2007). Adicionalmente, o manejo exercido na propriedade também pode promover o melhoramento genético e gerar variabilidade genética proveniente dos cruzamentos intencionais e não intencionais que os agricultores promovem (BELLON, 1991; TUXILL; NABHAN, 2001). Neste sentido, a estratégia de conservação nas unidades de produção familiar não se

limita apenas à conservação, mas sim a um manejo ecológico e adaptativo da diversidade genética (BOEF, 2000).

Para que possam ser usados em programas de melhoramento genético, é importante que os recursos genéticos conservados *ex situ* ou *on farm* sejam devidamente caracterizados, tanto morfológicamente quanto a nível molecular. No âmbito da biologia molecular, os marcadores moleculares são muito utilizados para a detecção de polimorfismo, pois permitem a análise de um número ilimitado de marcadores. Estes marcadores são caracteres qualitativos com herança mendeliana simples cuja expressão não é influenciada pelo ambiente e que podem ser empregados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos. (CAVALLI, 2003). Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites apresentam abundância e uniformidade na sua distribuição no genoma, natureza multialélica e codominante, fácil detecção por reação de polimerização em cadeia, necessidade de baixa quantidade de DNA, possibilidade de transferibilidade dos locos entre espécies aparentadas, alta reprodutibilidade, baixo custo e a possibilidade de semi-automatização da análise com uso de iniciadores marcados com fluorescência (SHARMA et al., 1995; CIAMPI, BRONDANI, GRATTAPAGLIA, 2002; SANTOS et al., 2007).

Considerando estes aspectos, os capítulos apresentados a seguir pretendem apresentar uma revisão bibliográfica sobre *Cucurbita ficifolia*, a espécie menos conhecida dentre as abóboras cultivadas; relatar a transferibilidade de primers de microssatélites desenhados para *Cucurbita pepo* em *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*, realizar a caracterização molecular de variedades locais dessas espécies cultivadas no Sul do Brasil; e avaliar a variabilidade genética dentro e entre variedades locais de *Cucurbita pepo* por meio da análise de marcadores de microssatélites.

2 Abóbora gila (*Cucurbita ficifolia*), uma hortaliça pouco convencional cultivada no Rio Grande do Sul

Resumo

Cucurbita ficifolia é uma cucurbitácea esporadicamente cultivada no Sul do Brasil, conhecida popularmente como gila. É a espécie domesticada menos conhecida entre as espécies do gênero *Cucurbita*. Esta revisão tem como objetivo reunir e divulgar informações sobre a origem, a morfologia, o cultivo e os usos da gila. Essa espécie é originária das Américas, mas não há consenso sobre o local exato de sua domesticação. De acordo com alguns autores, é originária da América Central ou do sul do México, porém outros sugerem que a sua domesticação tenha ocorrido na América do Sul, mais especificamente nos Andes. *Cucurbita ficifolia* possui a menor diversidade genética dentre todas as demais do gênero *Cucurbita*, apresentando pequena variação nos padrões de coloração e dimensão dos frutos. Os frutos têm formato oval ou oblongo, com casca de desenho rendilhado verde-escuro sobre fundo verde-claro ou branco. A polpa apresenta consistência fibrosa de cor branca e após cozida é utilizada no preparo de doces e sobremesas. Os poucos estudos realizados com os frutos desta espécie relatam sua eficiência no tratamento de diabetes. No Brasil, o cultivo ocorre em locais de colonização açoriana, hispânica ou portuguesa, em localidades isoladas no extremo Sul do Brasil e em municípios da rota dos antigos tropeiros. Os frutos são ocasionalmente comercializados em feiras de agricultura familiar, e em pequenos mercados de produtos hortifrutigranjeiros.

Palavras-chave: Cucurbitaceae, origem, evolução, cultivo, usos

Abstract

Gila (*Cucurbita ficifolia*), a neglected crop cultivated in Rio Grande do Sul State

Cucurbita ficifolia is a cucurbit sporadically cultivated in Southern Brazil, popularly known as fig-leaf gourd. It is the least known among the domesticated species of *Cucurbita*. This review aims to gather and disseminate information on the origin, morphology, cultivation and uses of fig-leaf gourd. There is no consensus on the exact location where *C. ficifolia* was domesticated. According to some authors, it is originally from Central America or Southern Mexico, but others suggest that their domestication took place in South America, specifically in the Andes. This species has the lowest genetic diversity amongst all *Cucurbita*, showing low variation in patterns of color and size of fruit. The fruits are oval or oblong, with shell design on lacy dark green on light green or white background. The white pulp has fibrous consistency and after cooked it is used in making sweets and desserts. The few studies related to the fruits of this species have reported its effectiveness in treating diabetes. In Brazil, the cultivation occurs at sites of colonization by Azores, Portuguese or Hispanic, in isolated localities in Southern Brazil and in cities located on the route of the old drovers. The fruits are occasionally sold in small farms, and in small organic.

Key words: Cucurbitaceae, origin, evolution, cultivation, uses

2.1 Introdução

O gênero *Cucurbita*, da família Cucurbitaceae, é composto por 24 espécies, sendo que cinco dessas espécies são domesticadas: *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. moschata* e *C. pepo* (LIRA-SAADE, 1995). Todas as cinco espécies de *Cucurbita* domesticadas são cultivadas no Brasil e apresentam grande importância para a agricultura familiar (HEIDEN et al., 2007). No país, o cultivo de *C. maxima* e *C. moschata* é bastante difundido e tem importância por fazer parte da alimentação das populações de várias regiões (RAMOS; QUEIROZ, 2005).

As espécies de *Cucurbita* são nativas das Américas, provavelmente algumas das mais antigas plantas cultivadas, e faziam parte da base alimentar da civilização olmeca, posteriormente incorporada pelas civilizações asteca, inca e maia. No Brasil, espécies do gênero *Cucurbita*, especialmente *C. moschata* e *C. maxima*, faziam parte da alimentação dos povos indígenas antes do descobrimento e da colonização (FERREIRA, 2008).

No Brasil, a maior variabilidade e diversidade genética em variedades locais de *Cucurbita* é observada na região Sul do País, em particular no Rio Grande do Sul, devido à presença de grupos étnicos bastante diferenciados, como indígenas, africanos, portugueses, açorianos, espanhóis, alemães, pomeranos e italianos (HEIDEN et al., 2007). Atualmente, as espécies cultivadas de *Cucurbita* apresentam uma grande variabilidade genética no que diz respeito à adaptação a condições ambientais contrastantes, ciclos fenológicos, hábitos de crescimento, caracteres morfológicos e nutricionais e grau de resistência a doenças (FERREIRA, 2008). Variedades locais são muito importantes devido à sua adaptação às condições ecológicas dos locais onde são selecionadas, cujo tempo em cultivo pode variar desde décadas até milênios. Historicamente, no país, o cultivo de *Cucurbita* esteve associado ao milho e à mandioca, constituindo a base alimentar das populações indígenas antes do período colonial e, após a chegada dos navegadores e a colonização, foi incorporada também à dieta dos escravos africanos (VERGER, 1987, citado por RAMOS; QUEIROZ, 2005).

Dentro do gênero *Cucurbita* todas as espécies são diplóides ($2n=40$), apesar de haver evidências de que o gênero é um antigo tetraplóide (LIRA-SAADE, 1995) que se comporta como diplóide.

Cucurbita ficifolia, conhecida no Brasil como gila ou abóbora gila, é a espécie menos conhecida entre todas as espécies cultivadas do gênero. Essa espécie foi descrita botanicamente pela primeira vez por Bouché, em 1837. No México e em algumas partes da América Central é chamada *chilacayote*, nome derivado da denominação *tzilacayotli* no idioma Nahuatl (NUEZ et al., 2000). Em Portugal é referida abreviadamente como *chila* e a denominação brasileira *gila* é, provavelmente, uma corruptela deste nome (HEIDEN et al., 2007). Em espanhol, a literatura se refere a ela como *calabaza de hojas de higuera* (abóbora de folhas de figueira), *calabaza de semilla negra* (abóbora de semente preta), *calabaza de cabello de angel* (abóbora de cabelo de anjo) e *calabaza Malabar* (NUEZ et al., 2000). Em inglês, é denominada *fig-leaf gourd*, *Malabar gourd* ou, genericamente, *pumpkin* ou *squash* (VAUGHAN; GEISSLER, 1997). É uma espécie tolerante a baixas temperaturas e apresenta escassa variabilidade morfológica e também genética quando comparada com as demais espécies de *Cucurbita* domesticadas (ANDRES, 1990, citado por NUEZ et al., 2000).

Esta revisão tem como objetivo reunir e divulgar informações sobre a origem, a morfologia, o cultivo e os usos de *Cucurbita ficifolia*.

2.2 Origem, variabilidade genética e relações filogenéticas

Apesar de ser um consenso que *C. ficifolia* seja originária das Américas, há controvérsias sobre a região onde essa espécie teve origem. Assim, conforme alguns autores, *C. ficifolia* é originada da América Central ou do sul do México, porém outros sugerem que sua origem foi a América do Sul, mais especificamente os Andes (NEE, 1990, 2008; NUEZ et al., 2000). Os registros arqueológicos mais antigos, datando de cerca de 4.000 a 3.000 a.C., foram encontrados no Peru (VAUGHAN, GEISSLER, 1997).

Existem grandes diferenças entre *C. ficifolia* e as outras espécies de *Cucurbita* cultivadas, especialmente no que se refere a cromossomos, isoenzimas e DNA de

cloroplasto. *C. ficifolia* apresenta menor variabilidade genética quando comparada às demais espécies cultivadas do gênero, apresentando poucas variações nos padrões de coloração da casca do fruto (brancos a verdes com diferentes padrões de manchas), das sementes (pardo-claras a pardo-escuras ou negras) e dimensões dos frutos. No entanto, do ponto de vista agrônomo, esta espécie se destaca por apresentar variabilidade em relação à resistência a viroses de importância para outras espécies do gênero. As variedades tradicionais de *C. ficifolia* têm sido pouco estudadas, sendo necessário que uma caracterização mais detalhada e sistemática seja realizada, a fim de aumentar o conhecimento sobre a variabilidade genética da espécie (LIRA-SAADE, 1995).

Alguns estudos de hibridização artificial e de biologia molecular têm contribuído no que diz respeito ao avanço do conhecimento das relações entre as espécies cultivadas e entre essas e as espécies silvestres de *Cucurbita* (WILSON; DOEBLEY; DUVALL, 1992; JOBST; KING; HEMLEBEN, 1998). Há evidências da existência de importantes barreiras genéticas entre as espécies. Na maioria dos casos, os frutos híbridos não contêm sementes, as sementes têm embriões anormais ou parcialmente desenvolvidos (FERREIRA, 2008).

Em *C. ficifolia* a delimitação de seu acervo genético é difícil, por conta da baixa ou nula compatibilidade dessa espécie com as demais do gênero. Entretanto, é possível definir que o acervo primário é formado por suas variedades locais ou crioulas, que por sua vez são cultivadas na América Latina. Os acervos secundários e terciários são formados, respectivamente, por duas espécies perenes, proximamente aparentadas (*C. foetidissima* e *C. pedatifolia*) e as anuais *C. maxima* e *C. lundelliana*. Estas são as únicas espécies com que se têm conseguido resultados relativamente positivos em experimentos de hibridização com *C. ficifolia* (LIRA-SAADE, 1995, citado por FERREIRA, 2008).

2.3 Características morfológicas

As espécies de *Cucurbita* domesticadas, coletivamente denominadas de abóboras, apresentam plantas de ciclo anual, com hábito de crescimento indeterminado (FIGUEIRA, 2003). Possuem caule herbáceo rastejante, pubescente, de coloração verde-escura e provido de gavinhas e raízes adventícias que auxiliam na fixação da planta. As folhas são em geral grandes, palmadas e pubescentes. As

flores são monóicas, de tamanho relativamente grande, coloração amarela e permanecem abertas apenas durante um dia. São plantas alógamas, sendo que a polinização é realizada por insetos (WHITAKER, ROBINSON, 1986).

Cucurbita ficifolia (Figura 2.1) apresenta como características específicas o caule duro e superficialmente anguloso; a folha lobulada, com ápice arredondado e esparsamente aculeada; o pedúnculo duro, ligeiramente anguloso e expandido na junção com o fruto; a polpa do fruto é branca, com textura acentuadamente fibrosa (Figura 2.2); a semente é normalmente negra (Figura 2.3), às vezes marrom escura, superfície lisa com leves ondulações, com cicatriz do funículo oblíqua (NUEZ et al., 2000; HEIDEN et al., 2007). As folhas apresentam diâmetro entre 18 e 25 cm, flores com cerca de 7,5 cm de diâmetro e frutos com 15 a 50 cm de comprimento (VAUGHAN; GEISSLER, 1997).



Foto: Gustavo Heiden

Figura 2.1 – Folhas e frutos de *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011.



Foto: Rosa Lía Barbieri

Figura 2.2 – Fruto aberto de *Cucurbita ficifolia* mostrando a casca espessa e a polpa fibrosa, Pelotas, 2011.



Foto: Gustavo Heiden

Figura 2.3 – Sementes de *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011.

O formato do fruto de *C. ficifolia* é oval ou oblongo com casca apresentando desenho rendilhado verde-escuro sobre fundo verde-claro ou branco, com estrias brancas próximas à cicatriz do botão floral (Figura 2.4). A casca apresenta consistência muito dura, o que dificulta a abertura do fruto. Geralmente, os frutos são abertos sendo jogados no chão ou com auxílio de facões ou machados (HEIDEN et al., 2007). Os frutos maduros podem ser conservados por períodos de tempo extremamente longos, até dois ou três anos (ANDRES, citado por NUEZ et al., 2000). Os frutos são armazenados em galpões. Após longos períodos armazenados apresentam sabor mais acentuado e menor concentração de água na polpa (HEIDEN et al., 2007).



Foto: Rosa Lía Barbieri

Figura 2.4 – Frutos de duas variedades locais de *Cucurbita ficifolia* cadastradas como acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2011.

2.4 Usos de *Cucurbita ficifolia*

As folhas jovens e os brotos de *C. ficifolia* são preparados como hortaliças. As flores masculinas e os botões florais, ricos em carotenos, são usados em sopas e saladas. Os frutos imaturos são utilizados em muitos pratos como o *locro de zambo* no Equador (ESTRELLA, 1990 citado por NUEZ et al, 2000). O fruto maduro é usado

também no preparo de um doce conhecido desde os tempos dos astecas como *cabello de angel* (NUEZ et al., 2000). Em Portugal, doces de gila fazem parte da tradição gastronômica do país. Na internet, vários sites portugueses de receitas apresentam variações de doces, tortas e bolos com *Cucurbita ficifolia* (BAÚ DA CONCEIÇÃO, 2010; CARAS, 2010; PORTUGAL ROTEIRO GASTRONÔMICO, 2010). No Brasil, especialmente na região Sul, a polpa cozida é utilizada no preparo de doces e sobremesas, como o tradicional doce-de-gila, que tem consistência semelhante ao doce de fios-de-ovos, mas com coloração branca e sabor característico (BARBIERI et al., 2006). A polpa também pode ser utilizada em outras sobremesas em substituição ao coco ralado como, por exemplo, panelinhas de coco, quindins e cocadas (Figura 2.5). Embora pouco comum, os frutos também são consumidos quando imaturos, na forma de saladas e no preparo de pratos salgados (HEIDEN et al., 2007).



Fotos: Ana Cristina Krolow

Figura 2.5 – Cozimento (a), separação da casca e da polpa (b), desfibramento da polpa (c) e polpa pronta para uso em doces (d) de *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011.

Por apresentarem polpa de cor branca, os frutos de *C. ficifolia* são deficientes em carotenóides. As fibras contêm bioflavonóides que bloqueiam os receptores de

hormônios estimulantes do câncer e esteróis, que são transformados em vitamina D no organismo e estimulam a diferenciação celular (FERREIRA, 2008).

A planta é usada para tratar feridas, hemorróidas e febre (HERNANDEZ, 1959 e ESTEYNEFFER, 1978, citados por ALARCON-AGUILAR et al., 2002). *Cucurbita ficifolia* é comumente utilizada como um agente anti-diabético e anti-hiperglicemiante na Ásia (XIA; WANG, 2007). No México, um macerado do fruto fresco em água também é usado para o tratamento de diabetes (AGUILLAR et al., 1994, citado por ALARCON-AGUILAR, et al., 2002). Conforme estudos realizados por Xia e Wang (2007), o consumo do extrato do fruto de *C. ficifolia* causa redução na hiperglicemia e aumenta os níveis de insulina plasmática em ratos. O óleo extraído da semente de *C. ficifolia* é um suplemento natural rico em ingredientes oxidantes e ácidos graxos poliinsaturados, os quais apresentam ação preventiva para várias doenças, principalmente, as cardiovasculares (BERNARDO-GIL, LOPES, 2004).

No Chile, alguns estudos têm demonstrado que enzimas proteolíticas extraídas da polpa de frutos de *C. ficifolia* são eficazes no tratamento de águas residuais resultantes de processos industriais (LIRA-SAADE, 1995, citado por FERREIRA, 2008).

As plantas de *C. ficifolia* têm sido utilizadas, também, como porta-enxerto na produção de inverno de pepino (*Cucumis sativus*), por sua alta compatibilidade, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, também por ser resistente a estresses abióticos como nematóides e *Fusarium* ssp (DAVIS et al., 2008; LEE; ODA, 2003).

2.5 O cultivo de *Cucurbita ficifolia*

Cucurbita ficifolia é cultivada atualmente nas terras altas de muitas regiões tropicais, incluindo o centro-sul da Ásia e as Filipinas. É bastante usada em sistemas agrícolas de subsistência na América Latina, onde se cultiva em altitudes de 1000 a 2800 m. Sua distribuição nesta zona supera a de todas as outras espécies cultivadas, estendendo-se desde as terras altas do norte do México, América Central e cordilheira dos Andes, passando pela Colômbia e Venezuela, chegando até o centro do Chile e noroeste da Argentina (NUEZ et al., 2000).

No Brasil, *Cucurbita ficifolia* é esporadicamente cultivada poucas plantas em quintais com cultivo consorciado com outras espécies no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (BARBIERI et al., 2007). Os frutos são ocasionalmente

comercializados em feiras de agricultura familiar e em mercados de hortifrutigranjeiros. O cultivo de variedades locais ocorre em comunidades de forte herança açoriana, hispânica ou portuguesa, em áreas isoladas no extremo sul do Brasil e em municípios da serra gaúcha localizados na antiga rota dos tropeiros (HEIDEN et al., 2007). São cultivadas variedades locais cujas sementes passam dos pais para os filhos. Provavelmente, a tradição de cultivo e uso do fruto na preparação de doces tenha sido trazida ao Brasil pelos imigrantes açorianos. No Rio Grande do Sul, a semeadura é realizada nas épocas de primavera e verão, e a colheita no outono e inverno (BARBIERI et al., 2007).

O Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado conserva seis acessos de *Cucurbita ficifolia*, os quais foram doados por agricultores familiares. Estes acessos são variedades locais provenientes dos municípios de Pelotas, Porto Alegre, Rio Grande, São Lourenço do Sul e Tavares.

2.6 Considerações finais

Variedades locais de *Cucurbita ficifolia* são cultivadas no Sul do Brasil por agricultores familiares. As propriedades funcionais da polpa do fruto justificam uma maior ação da pesquisa no sentido de desenvolvimento de cultivares e de melhoria do sistema de produção.

2.7 Referências

ALARCON-AGUILAR F.J.; HERNADES-GALICIA E.; CAMPOS-SEPULVEDA A.E.; XOLALPA-MOLINA S.; RIVAS-VILCHIS J.F.; VAZQUEZ-CARRILLO L.I.; ROMAN-RAMOS R. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.82, p.185-189, 2002.

BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G.; CORRÊA, L.B.; NEITZKE, R.S.; OLIVEIRA, C.S.; BÜTTOW, M.V. Cultivo e usos tradicionais de *Cucurbita argyrosperma* e *Cucurbita ficifolia* no Rio Grande do Sul. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.25, n.1 (CD Rom), 2007.

BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G.; NEITZKE, R.S.; GARRASTAZÚ, M.C.; SCHWENGBER, J.E. **Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado** - período de 2002 a 2006. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 30 p. (Documentos 176).

BAÚ DA CONCEIÇÃO. **Folhadinhos de chila**. Acessado em: 22 abr. 2010. Disponível em <<http://bau-receitas-conceicao Coelho.blogspot.com/2007/07/folhadinhos-de-chila.html>>.

BERNARDO-GIL, M.G.; LOPES, L. M. C.; Supercritical fluid extraction of *Cucurbita ficifolia* seed oil. **European Food Research & Technology**, Berlin, v.219, p.593-597, 2004.

CARAS. **Bolo de chila**. Acessado em: 22 abr. 2010. Disponível em <<http://aeiou.caras.pt/bolo-de-chila=f20746>>.

DAVIS A.R.; PERKINS-VEAZIE P.; SAKATA Y.; LOPEZ-GALARZA S.; MAROTO J.V.; LEE S.G.; HUH Y.C.; SUN Z.; MIGUEL A.; KING S.R.; COHEN R.; LEE J.M.; Cucurbit grafting. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v.27, n.1, p.50-74, 2008.

FERREIRA, M.A.J.F. Abóboras e Morangas: das Américas para o mundo. In: BARBIERI, R.I.; STUMPF, E.R.T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 59-88

FIGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2 ed., 2003. 412 p.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S. **Chave para identificação das espécies de abóboras (*Cucurbita*, Cucurbitaceae) cultivadas no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2007. 31p. (Documentos 197).

JOBST, J.; KING, K.; HEMLEBEN, V. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando v.9, n.2, p.204-219, 1998.

LEE J.M.; ODA M. Grafting of herbaceous vegetable and ornamental crops. **Horticultural Reviews**, New York v.28, p.61–124, 2003.

LIRA-SAADE, R. L. **Estudios taxonômicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importância económica**. Rome: IPGRI, 1995. 281 p.

NEE, M. The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). **Economic Botany**, Bronx, v. 44, p.56-68, 1990.

NUEZ, F.; RUIZ, J.J.; VALCÁRCEL, J.V.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, P. **Colección de semillas de calabaza del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana**. Madrid: INIA, 2000. 158 p. (INIA. Agrícola, 004).

PORTUGAL ROTEIRO GASTRONÔMICO. **Doce de abóbora chila** (gila). Acessado em: 22 abr. 2010. Disponível em <<http://www.gastronomias.com/doc/doc0327.htm>>.

RAMOS, S.R.R; QUEIROZ, M.A. Recursos genéticos de abóbora no Nordeste brasileiro. In: MOURA, M.C.C.L. **Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 2005. p. 99-116.

VAUGHAN, J.G.; GEISSLER, C. **The new oxford book of food plants**. New York: Oxford University Press, 1997. 240p.

XIA, T.; WANG, Q. Hypoglycaemic role of *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 9, p.1753-1757, 2007.

WILSON, H. D.; DOEBLEY, J.; DUVALL, M. Chloroplast DNA diversity among wild and cultivated members of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p.859-865, 1992.

WHITAKER, T. W.; ROBINSON, R. W. Squash Breeding. In: BASSET, M. J. **Breeding Vegetable Crops**. Italy, p.209-246, 1986.

3 Transferibilidade de marcadores microssatélites de *Cucurbita pepo* para *Cucurbita argyrosperma* e *Cucurbita ficifolia*

Resumo

No Sul do Brasil são cultivadas variedades locais das cinco espécies domesticadas de *Cucurbita*: *C. argyrosperma*, *C. maxima*, *C. moschata*, *C. ficifolia* e *C. pepo*. Dentre elas, as menos estudadas são *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*, não havendo, na literatura científica, nenhum trabalho de caracterização molecular com essas espécies. Uma ferramenta útil para se realizar a caracterização molecular é o uso de análises de Sequências Simples Repetidas (SSR) ou microssatélites, que necessita de primers específicos para cada espécie. Para algumas espécies dentro do mesmo gênero a taxa de transferibilidade de marcadores é elevada. O objetivo desse trabalho foi avaliar a transferibilidade de primers e otimizar a amplificação de locus SSR de *C. pepo* em *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. Foram utilizados dez acessos de *C. pepo*, nove de *C. argyrosperma* e cinco de *C. ficifolia* do acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. O DNA foi extraído em bulk das folhas jovens de cinco indivíduos de cada acesso. A transferibilidade de 40 primers SSR desenvolvidos para *C. pepo* foi testada para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. O peso molecular dos fragmentos formados variou de 85 pb a 303 pb, dos quais 70% apresentaram peso médio inferior a 200 pb. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,09 a 0,89, com média de 0,42. Para *C. argyrosperma*, dentre os 40 primers testados, 34 (85%) amplificaram, mostrando um total de 49 alelos, com frequências alélicas variando entre 11 e 100% no conjunto de nove acessos analisados. Destes, 20 primers foram monomórficos e 14 detectaram polimorfismo. Para *C. ficifolia*, dentre os 40 primers testados, 32 (80%) amplificaram. Destes, 20 foram monomórficos e 12 foram polimórficos, gerando um total de 47 alelos, com frequências alélicas variando de 0,2 a 1. Apenas para três primers, o padrão de amplificação foi de baixa qualidade e as bandas não ficaram nítidas em *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. A transferibilidade de locos SSR de *C. pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* foi de 85% e 80%, respectivamente. Para *C. pepo*, 35 primers amplificaram, o que equivale a 87,5% do total de primers avaliados. Destes, 27 primers foram polimórficos, gerando um total de 90 alelos. As frequências alélicas variaram entre 0,1 e 1 no conjunto de dez acessos analisados. É possível utilizar primers de microssatélites desenvolvidos para *Cucurbita pepo* na caracterização molecular de *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. Variedades locais de *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* apresentam pouca variabilidade genética, enquanto que *C. pepo* evidencia grande variabilidade genética.

Palavras-chave: Cucurbitaceae, abóboras, caracterização molecular, recursos genéticos, variedades locais.

Abstract

Transferability of microsatellite markers from *Cucurbita pepo* to *Cucurbita argyrosperma* and *Cucurbita ficifolia*

Landraces of the five domesticated species of *Cucurbita*: *C. argyrosperma*, *C. maxima*, *C. moschata*, *C. ficifolia* and *C. pepo* are cultivated in southern Brazil. Among them, *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* are the least studied, without molecular characterization with this species in the scientific literature. A useful tool to perform the molecular analysis is the use of simple sequence repeat (SSR) or microsatellites, which require specific primers for each species. For some species within the same genus the rate of transferability of markers is high. The aim of this study was to evaluate the transferability of primers and optimize the amplification of SSR loci in *C. pepo* to *C. argyrosperma* and *C. ficifolia*. Ten accessions of *C. pepo*, nine of *C. argyrosperma* and five of *C. ficifolia* from the Active Germplasm Bank of Cucurbitaceae from Embrapa Temperate Agriculture were used. DNA was extracted in bulk from young leaves of five individuals of each accession. The transferability of 40 SSR primers developed for *C. pepo* was tested in *C. argyrosperma* and *C. ficifolia*. The molecular weight of the fragments ranged from 85 bp to 303 bp, of which 70% had weight less than 200 bp. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.09 to 0.89, averaging 0.42. For *C. argyrosperma*, among the 40 primers tested, 34 (85%) amplified, showing a total of 49 alleles, with allele frequencies ranging from 11 to 100% in the group of nine accessions analyzed. Of these, 20 primers were monomorphic and 14 detected polymorphism. For *C. ficifolia*, among the 40 primers tested, 32 (80%) amplified. Of these, 20 were monomorphic and 12 were polymorphic, generating a total of 47 alleles, with allele frequencies ranging from 0.2 to 1. Only three primers showed low quality for the amplification pattern and the bands were not sharp in *C. argyrosperma* and *C. ficifolia*. The transferability of SSR loci from *C. pepo* to *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* was 85% and 80% respectively. For *C. pepo*, 35 primers amplified, which equates to 87.5% of total primers evaluated. Of these, 27 primers were polymorphic, generating a total of 90 alleles. Allele frequencies varied between 0.1 and 100% in the ten accessions analyzed. SSR primers developed for *Cucurbita pepo* can be used for molecular characterization of *C. argyrosperma* and *C. ficifolia*. Landraces of *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* show low genetic variability, while *C. pepo* shows great genetic variability.

Key-words: Cucurbitaceae, squashes, molecular characterization, genetic resources, landraces

3.1 Introdução

No país, o cultivo das abóboras é bastante difundido e tem importância por fazer parte da alimentação das populações de várias regiões (RAMOS, QUEIROZ, 2005). As abóboras pertencem ao gênero *Cucurbita* ($2n = 2x = 40$), da família Cucurbitaceae. O gênero *Cucurbita* é formado por 24 espécies, sendo que cinco dessas espécies são domesticadas: *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. moschata* e *C. pepo* (LIRA-SAADE, 1995, citado por FERREIRA, 2008).

No Brasil são cultivadas variedades locais das cinco espécies domesticadas de *Cucurbita* (PRIORI et al., 2010). Destas, as duas espécies mais cultivadas no território nacional são *C. maxima* e *C. moschata*.

Cucurbita ficifolia, conhecida popularmente como gila, é esporadicamente cultivada em quintais no Sul do Brasil. Os frutos são ocasionalmente comercializados em feiras de agricultura familiar e em mercados de hortifrutigranjeiros. O cultivo de variedades locais ocorre em localidades isoladas no extremo sul do Brasil e em municípios da serra gaúcha localizados na antiga rota dos tropeiros (HEIDEN et al., 2007). Apresenta menor variabilidade genética quando comparada às demais espécies cultivadas do gênero, com poucas variações nos padrões de coloração e dimensões dos frutos e sementes. Algumas variedades apresentam resistência a viroses de importância para outras espécies do gênero (FERREIRA, 2008). Os frutos são utilizados no preparo de um doce tradicional de herança portuguesa, denominado “doce de gila”.

Cucurbita argyrosperma compreende variedades locais conhecidas popularmente como mogango-de-pescoço, mogango gringo ou abóbora-batata-doce. Os frutos de *C. argyrosperma* apresentam variações no tamanho e na curvatura do pescoço. A coloração externa do fruto é branca ou amarelada, com listras verde-escuras. A casca é dura, à semelhança dos mogangos tradicionais (*C. pepo*). Os frutos são utilizados na alimentação humana e animal (HEIDEN et al., 2007)

Cucurbita pepo é a espécie que apresenta a maior variabilidade genética entre as espécies do gênero (PARIS, 2001). Esta variação é responsável por uma multiplicidade de usos e por nomes populares (como mogango, abóbora-estrela, abóbora-de-coco, poronguinho, abóbora-ovo, abóbora-italiana e zuchetti). Os frutos são usados na alimentação humana e animal, e também na ornamentação de ambientes (HEIDEN et al., 2007).

Variedades locais dessas espécies de *Cucurbita* representam um patrimônio genético e cultural da agricultura familiar no Brasil. Estes recursos genéticos, devidamente caracterizados, constituem fontes de genes para os programas de melhoramento. A caracterização é uma atividade prioritária na estratégia de abordagens e manejo de coleções e bancos de germoplasma, pois consiste em obter dados para descrever, identificar e diferenciar os acessos (VALLS, 2001).

Para a caracterização molecular, os marcadores do tipo microssatélites têm elevada utilização por apresentarem abundância e uniformidade na sua distribuição no genoma, natureza multialélica e codominante, fácil detecção por reação de polimerização em cadeia, necessidade de baixa quantidade de DNA, alta reprodutibilidade, baixo custo e a possibilidade de semi-automatização da análise com uso de iniciadores marcados com fluorescência (SHARMA et al., 1995; SANTOS et al., 2007). Porém, para a amplificação de locos de microssatélites, o conhecimento de sua seqüência 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 *primers* microssatélites entre espécies aparentadas, o que reduz consideravelmente os custos e o tempo das investigações genéticas (LORIEUX et al., 2000). Por exemplo, sucesso na transferência de SSR entre espécies dentro de um mesmo gênero tem sido relatado em *Olea* (RALLO et al., 2003), *Limonium* (PALOP et al., 2000), *Prunus* (WUENSCH, HORMAZA, 2002), *Vitis* (DI GASPERO et al., 2000), *Pinus* (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2004), *Triticum* (ADONINA et al., 2005) e *Cucumis* (RITSCHER et al., 2004). Outro caso de sucesso na transferibilidade de primers microssatélites de *Euterpe edulis* para *E. oleracea* foi relatado por Oliveira et al. (2010), onde os sete loci testados apresentaram 100% de aproveitamento.

Como não existem primers de microssatélites desenvolvidos para *C. argyrosperma* e para *C. ficifolia*, os primers de microssatélites desenhados para *C.*

pepo podem ser usados como uma alternativa para encontrar regiões semelhantes no genoma, uma vez que pertencem ao mesmo gênero. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a transferibilidade de primers e otimizar a amplificação de loci SSR de *C. pepo* em *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*.

3.2 Material e Métodos

Foi realizada uma busca no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para selecionar primers microsátélites já desenvolvidos para *Cucurbita*. Foram selecionados 40 pares de primers SSR (Tabela 3.2) desenhados para *C. pepo*, desenvolvidos pelo *Applied Life Sciences the Institut of Biotechnology in Plant Production, Department for Agrobiotechnology* of the *BOKU-University of Natural Resources*, na Áustria. Os primers foram selecionados a partir de informações disponíveis como número de alelos e regiões conservadas.

Vinte e quatro acessos de variedades locais de *Cucurbita* do Rio Grande do Sul foram utilizados, sendo nove de *Cucurbita argyrosperma*, cinco de *Cucurbita ficifolia* e dez de *Cucurbita pepo* (Tabela 3.1). Os acessos fazem parte do acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. O trabalho foi desenvolvido em 2009 e 2010 no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS).

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação em sacos plásticos de poliestireno preto preenchidos com substrato composto por solo, vermiculita e adubo na formulação NPK, 5510. O DNA foi extraído em bulk das folhas jovens de cinco indivíduos de cada acesso. A extração foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Os testes de qualidade e a quantificação do DNA foram feitos em gel de agarose 0,8%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio. Foram aplicados 2 µL de cada amostra de DNA, com 3 µL de corante tipo TC (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%). O DNA foi quantificado no gel por comparação com os padrões de bandas do marcador λ DNA Hind III. Após a quantificação, o DNA foi diluído em TE para uma concentração de 25 ng/µL.

Tabela 3.1 – Acessos de variedades locais de *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita pepo* do Rio Grande do Sul submetidos à caracterização molecular, Pelotas, 2011.

Acesso	Espécie	Nome Popular	Município de Procedência	Coordenadas geográficas
C16	<i>C. argyrosperma</i>	abóbora menina	Santana da Boa Vista	30°52'23.56"S 53°08'03.72"O
C103	<i>C. argyrosperma</i>	mogango de pescoço	São Lourenço do Sul	31°21'44.17"S 51°58'46.36"O
C106	<i>C. argyrosperma</i>	mogango de pescoço	Rosário do Sul	30°14'43.12"S 54°55'15.76"O
C258	<i>C. argyrosperma</i>	abóbora	Santana da Boa Vista	30°52'23.56"S 53°08'03.72"O
C289	<i>C. argyrosperma</i>	mogango de pescoço	Cerro Grande do Sul	30°35'49.24"S 51°45'07.15"O
C334	<i>C. argyrosperma</i>	abóbora de pescoço	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C379	<i>C. argyrosperma</i>	moranga gringa	São Francisco de Assis	29°33'04.59"S 55°07'40.32"O
C395	<i>C. argyrosperma</i>	mogango de pescoço	Bagé	31°19'44.08"S 54°06'53.40"O
C401	<i>C. argyrosperma</i>	abóbora	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C151	<i>C. ficifolia</i>	abóbora gila	Rio Grande	32°01'59.39"S 52°05'53.40"O
C310	<i>C. ficifolia</i>	abóbora gila	São Lourenço do Sul	31°21'44.17"S 51°58'46.36"O
C312	<i>C. ficifolia</i>	abóbora gila	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C375	<i>C. ficifolia</i>	abóbora gila	São Lourenço do Sul	31°21'44.17"S 51°58'46.36"O
C453	<i>C. ficifolia</i>	abóbora gila	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C148	<i>C. pepo</i>	poronguinho	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C199	<i>C. pepo</i>	mogango amarelo	Encruzilhada do Sul	30°32'46.00"S 52°31'35.03"O
C222	<i>C. pepo</i>	abóbora-de-coco	Turuçu	31°25'19.48"S 52°10'39.00"O
C224	<i>C. pepo</i>	mogango verrucoso	Turuçu	31°25'19.48"S 52°10'39.00"O
C260	<i>C. pepo</i>	abóbora-ovo	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C276	<i>C. pepo</i>	abóbora	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C290	<i>C. pepo</i>	abóbora-estrela	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O
C299	<i>C. pepo</i>	moganguinho alongado	São Lourenço do Sul	31°21'44.17"S 51°58'46.36"O
C377	<i>C. pepo</i>	abobrinha ornamental	São Lourenço do Sul	31°21'44.17"S 51°58'46.36"O
C381	<i>C. pepo</i>	abóbora-estrela	Pelotas	31°46'18.18"S 52°20'32.63"O

As reações de amplificação de microssatélites (PCR-SSR) foram realizadas reações em volume final de 25 µL volume composto de Tampão PCR 10x, MgCl₂

1,5 mM, 2 mM de cada um dos deoxinucleotídeos DNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 µM de cada primer (*Forward e Reverse*), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Bio Systems Gene Amp PCR System 9700, programado para uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 4 min e 40 seg, seguido de 30 ciclos de 0,15 min a 94°C (desnaturação), 0,10 min a 60°C (anelamento) e 0,15 min a 72°C. Por fim, uma etapa de 5 min a 72°C. As temperaturas de anelamento variaram de 50°C a 60°C, conforme a temperatura do primer utilizado. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen) 3%, corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e tampão TBE 1X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM). Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV). As imagens foram capturadas em câmara digital e armazenadas em computador para avaliação dos padrões de bandas. O marcador 1 Kb Plus DNA ladder foi utilizado como referência de peso molecular para estimar os tamanhos dos produtos da amplificação.

Os marcadores obtidos foram analisados com o software NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers, Version 2.1, Applied Biostatistics, Inc.*). Os amplicons foram classificados em presença (1) e ausência (0) de bandas e convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi estimado: i) o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada primer por meio da equação: $PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência ao quadrado do alelo i . Posteriormente foi estimado o PIC médio de cada iniciador por meio da média aritmética dos PICs obtidos; ii) foi estimada a similaridade genética entre os acessos com o emprego do coeficiente de similaridade de Dice (DICE, 1945) pelo software NTSYS-pc 2,1 (ROHLF, 2000), conforme a equação:

$$S_D = \frac{2v_{ij}}{2v_{ij} + w_{ij} + x_{ij}}$$

onde v_{ij} refere-se às bandas em comum em i e j , w_{ij} é o número de bandas presentes em i e ausentes em j , x_{ij} é o número de bandas presentes em j e ausentes em i .

Tabela 3.2 – Primers desenhados para *Cucurbita pepo* utilizados para a transferibilidade em *Cucurbita argyrosperma* e *Cucurbita ficifolia*, Pelotas, 2011.

Nome	Forward	Reverse	pb	temp
CMTP46	TTCCCTTCTGCAGAGATGCT	CCATGCGCATAATTGTATCG	142	60
CMTP33	AATGCGTTTGAACAAAGCTG	GGCTGTAAAAATTCCTCGAT	171	58
CMTP48	TTTGCAGTACGCTGCAGAAC	GGATCCTTCTCGTGGTGGTA	228	60
CMTP61	TTTGCAGTACGCTGCAGAAC	GGATCCTTCTCGTGGTGGTA	118	60
CMTP86	GCTCTTGGACAAGAATGGTCA	ATGGCTTCTGGTGGTTTGTC	133	60
CMTP131	GCACTTGAATCTTCGTCAAC	CGAGAAAGAATTAACGAGCA	117	55
CMTP132	CCATTTCCATTTCCATTTCA	AGGTTAGAAAACAGGGGAATC	151	58
CMTP158	CCGTAGAGATGTCAGAGACAAGG	AGGGATGCTCATCACACCTC	134	60
CMTP174	GCCGGAACCAGACTTCTC	CCCTCCCTTCCCATTAAAC	176	58
CMTP141	ATTCATGTCATACTACCGACTTC	CGGATTTATAAGATGGCAAG	135	55
CMTP190	CGGGGAAGAGAGGTTTAGGT	CCCATACATTCCCATATAACACC	210	59
CMTP182	CACGAAGATTTGATGGCCTTA	GGATTGGGATGGTGAAGATG	138	60
CMTP204	AGAAGGAGGAGAGCGGAAAAG	ATAAGATCCCAACCCCAACC	357	60
CMTP210	GTGGAAGTTACTGCGATTGG	GCAAAGAATGTCCTCAGCAG	117	58
CMTP193	GGTGACGGCAAGAAAAGCTA	GCTGACCCTCTCTCCCTCTC	186	60
CMTP201	AGGAGTGGTGGGCTAATACG	TGAAATTGAGGGAGGGAGAG	110	59
CMTP247	GGGTGTGTTGAGGATTGGTT	ATCACATTTTCTCCCCACCA	123	60
CMTP17	ACTGCTCAATAAGGCAAGGA	AAACAAGAGTGCACAAACAGG	84	58
CMTP107	CGATGATGAACAGGAAGACG	TCACATCCATTCCCCTCTCT	109	59
CMTP62	GTGCCCCGTCAGTCGGAAT	TGTCGACGAAGATAGCAATAGCA	100	60
CMTP58	TCGGAGAACTCGACACTCC	TCCCAGCACCATCAGGATAC	102	60
CMTP66	ACGACATGAGGGAAGATTG	TTCAATGCCATTGCGCTAC	128	60
CMTP84	GCGGTAACAGGTTGTTTGGT	CCATCAGGATACCCTACAAAGG	150	60
CMTP97	CCACACACCAATCGTTGAAG	CGCAGAATCTCGAAACACAA	166	60
CMTP126	ACCTCAAACCCCTTTTG	GGAAGAAGAAGGAGGAGGAG	117	57
CMTP120	AACCGGAACACCTTTATGACC	TTCAAGAAGGTTCCGAAGGA	164	60
CMTP130	GCCCATTCTGGAGAGATAGTA	GAGGAGAGATGCAGAGCAAC	169	57
CMTP144	ATGGCTTCCAAGCTCCTCTT	GTCGGCCATGAGCTTGAG	105	60
CMTP133	TGCTCTCTTTGAATTCAGCAT	AGGGATCTTCCATTTCCAAT	113	57
CMTP187	AACAATCCTCGCCTCAAATC	ATGAAAATGGGAAGCCAGAG	189	60
CMTP219	TTCATCATCGTCAGCAAAGC	GCACATGCAGCACTCTGACT	117	60
CMTP207	GACGAACGAAGCATGTTGAG	GGTCAGCAAGGTCAGAAAGG	156	60
CMTP224	CACCGACGACTCCATCATC	CTTCTTGTCCCCAAAATCACA	151	60
CMTP261	AAATGCCAGCCCAATCAT	GATGGCTGCCACTTCCTCTA	187	60
CMTP68	CACACCCATTTTCAATTTGACC	ATTGATTGGGACGTGAGGAA	180	60
CMTP125	CTTGTTCCGCAGCATCAG	AGTGAGAGGGAGACGCAAAG	115	59
CMTP138	AAAGGTTTCCACATCCTTG	GAAAAGGAAAAAGTGTTCAAAG	103	55
CMTP209	TCACCTTACAACCAGAAGCTGA	CACCTTGTGCTCATCCAC	116	57
CMTP83	TGACCATTTTGCAGATTGAGA	CTTCCGGAGACGAAAGAGTC	112	59
CMTP127	TTCTCTGTTTCCGTCAATG	CACAAAAGGGGTTTGAGGTT	112	58

pb = pares de base, temp. = temperatura de anelamento

Com base na matriz de similaridade genética foi construído um dendrograma, por meio do método de agrupamento da distância média UPGMA, (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*). O ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal, Rohlf (1962), por meio do programa computacional NTSYS pc 2.1. Esse coeficiente traduz a relação momento-produto, calculado entre os elementos da

matriz original e os da matriz cofenética, resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento, depois da construção do dendograma. Valores de (r) acima de 0,8 indicam boa representatividade entre as distâncias (BUSSAD et al., 1990). A estabilidade dos agrupamentos foi computada por meio da análise de *Bootstrapping* com 1000 replicações, com a utilização do programa computacional Winboot (YAP, NELSON, 1996). O tamanho das bandas foi estimado por meio do programa computacional Bio - 1D Advanced - Vilber Lourmat SAS, 2006 (software de análise).

3.3 Resultados e Discussão

Foi possível observar polimorfismo a partir da análise de marcadores microsatélites nas três espécies de *Cucurbita* avaliadas, utilizando primers desenhados para *C. pepo*. O produto das amplificações foi satisfatório, permitindo verificar que diferentes níveis de transferibilidade foram obtidos (Figura 3.1).

A análise de 24 acessos de *Cucurbita* por meio de 35 iniciadores gerou um total de 105 marcadores SSR, com variação de um a quatro alelos por loco, dos quais 56 (53,33%) foram polimórficos, evidenciando que há variabilidade genética entre os acessos analisados. Demonstra, também, a eficiência dos marcadores microsatélites na quantificação da variabilidade genética presente. Das três espécies analisadas, *C. pepo* apresentou a maior variabilidade. Estes marcadores foram utilizados para gerar uma matriz de similaridade genética, calculada a partir do coeficiente de similaridade de Dice.

As frequências alélicas variaram de 1 a 0,04 entre as três espécies, sendo que a média geral dessas frequências foi de 0,35. Segundo Schuster et al. (2006), se as frequências alélicas são conhecidas, é possível estimar as probabilidades de identidade de um determinado acesso com qualquer outro, com base na análise de DNA.

O peso molecular dos fragmentos de amplificação gerados variou de 85 pb a 303 pb, dos quais 70% apresentaram peso médio inferior a 200 pb. O padrão de bandas e a qualidade dos produtos da amplificação são mostrados na Figura 3.1.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,09 a 0,89, com média de 0,42, sendo que os iniciadores que evidenciaram maiores informações de polimorfismo foram CMTP204, CMTP46, CMTP193, CMTP187, CMTP62, CMTP68, com respectivamente 0,89, 0,86, 0,84, 0,83, 0,80 e 0,74. O PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório de um marcador (WEIR,1996), contudo, pode-se inferir que os marcadores utilizados foram eficientes na discriminação dos acessos.

Para *C. argyrosperma*, dentre os 40 primers testados, 34 (85%) amplificaram, mostrando um total de 49 alelos com frequências alélicas variando entre 11 e 100% no conjunto de nove acessos analisados. Destes, 20 primers foram monomórficos e 14 detectaram polimorfismo.

Para *C. ficifolia*, 32 (80%) primers amplificaram. Dos 32 primers que amplificaram para *C. ficifolia*, 20 foram monomórficos e 12 foram polimórficos, gerando um total de 47 alelos, com frequências alélicas variando de 0,2 a 1. Em *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* o padrão de amplificação foi de baixa qualidade e as bandas não ficaram nítidas para três primers, CMTP190, CMTP138 e CMTP193.

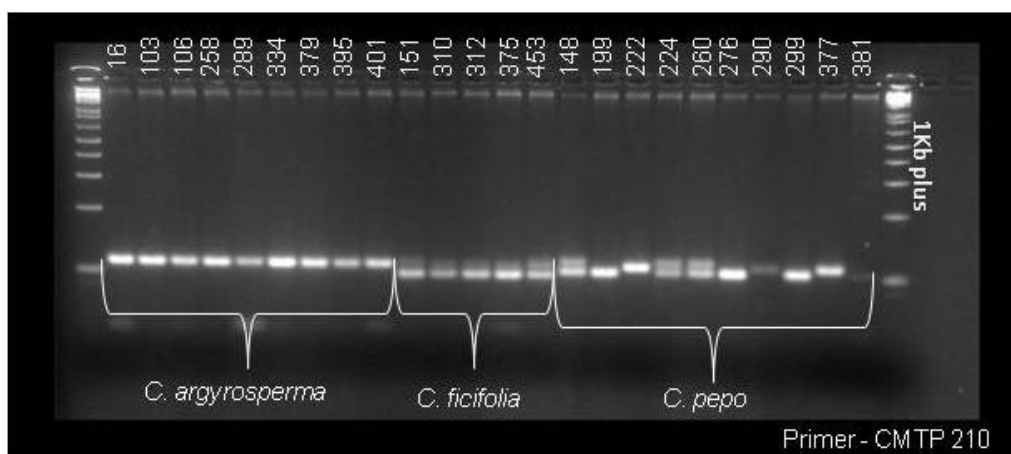


Figura 3.1 – Perfil de amplificação de acessos de *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita pepo* do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. Os produtos da PCR foram amplificados com o Primer SSR – CMTP210 e revelados em gel de agarose 3,5%. Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), Pelotas, 2011.

A transferibilidade de locos SSR de *C. pepo* para *C. argyrosperma* 85% e *C. ficifolia* 80% encontrada no presente trabalho foi menor do que os resultados para a transferência de primers SSR de maçã (*Malus domestica*) amplificados em pêra (*Pyrus communis*), duas espécies da mesma família botânica (Rosaceae), que foi de 100% (YAMAMOTO et al., 2001). No entanto, foi superior ao relatado para a transferibilidade de primers SSR entre diferentes espécies da família Poaceae, como de arroz (*Oryza sativa*) para espécies de bambu (*Bambusa spp.*), que foi de 68,3% (CHEN et al. 2010), e de milho (*Zea mays*) para espécies de *Miscanthus*, que foi de 74,5% (HERNANDEZ et al. 2001). Os resultados obtidos foram superiores também aos estudos realizados com outras espécies de cucurbitáceas, onde um conjunto de primers de melão (*Cucumis melo*), otimizados e testados em abóbora (*Cucurbita*

moschata) e bucha (*Luffa cylindrica*), teve 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).

Os resultados encontrados neste estudo apresentaram valores quase iguais aos encontrados por Gong et al., (2008), ao transferir primers SSR de *C. pepo* para *C. moschata* (88,1%). Destes 88,1% locos que foram transferidos, 30,1% originaram alelos múltiplos em três genótipos de *C. moschata*.

Para *C. pepo*, 35 primers amplificaram, o que equivale a 87,5% do total de primers avaliado. Destes, 27 primers foram polimórficos, gerando um total de 90 alelos. As freqüências alélicas variaram entre 0,1 e 1 no conjunto de dez acessos analisados. A elevada variabilidade genética detectada nesta espécie já era esperada, pois condiz com dados de caracterização morfológica. De acordo com Paris (2001), *C. pepo* apresenta a maior variabilidade genética para características morfológicas de fruto no reino vegetal. Esta variação, por conseguinte, é responsável pela maior multiplicidade de usos entre as espécies cultivadas de *Cucurbita*, que incluem desde a alimentação até o uso ornamental (HEIDEN et al., 2007)

Na matriz de similaridade genética formada pelos 24 acessos foram obtidos valores altamente variáveis, indo desde quase dissimilares (0,2), C258 (*C. argyrosperma*) e C299 (*C. pepo*), a quase similares (0,97), C16 e C334 (*C. argyrosperma*) com similaridade genética média entre todos os acessos de 0,56. Em *C. argyrosperma* a similaridade média entre os acessos foi de 0,89, sendo a similaridade máxima de 0,97 e a mínima de 0,80, o que evidencia que, nesta espécie, as diferentes variedades locais analisadas são bastante similares entre si. Para as variedades locais de *C. ficifolia* a similaridade média foi 0,86 sendo a máxima similaridade com valor de 0,89 e a mínima 0,72. Já em *C. pepo*, a espécie com maior variabilidade genética, foi observada a maior dissimilaridade genética, com valor médio de 0,48, apresentando similaridade máxima de 0,72 e mínima 0,20, respectivamente. É importante ressaltar que o valor da similaridade máxima entre dois acessos de *C. pepo* (C148 e C276) foi igual ao valor da similaridade mínima encontrada entre os acessos mais dissimilares de *C. ficifolia* (C151 e C453).

A análise da matriz de similaridade genética evidenciou que os acessos mais similares geneticamente foram C16 e C334, com valor de 0,97. Estes acessos são de *C. argyrosperma*, coletados nos municípios de Santana da Boa Vista e São

Lourenço do Sul, respectivamente. Essa espécie possui baixa variabilidade genética para caracteres morfológicos quando comparada às demais do gênero *Cucurbita*. Os frutos apresentam variações apenas no tamanho e na curvatura do pescoço (HEIDEN et al., 2007). Como há poucos relatos na literatura sobre caracterização de *C. argyrosperma*, e nenhum estudo de análise molecular, os dados apresentados neste trabalho poderão servir como referência para futuros trabalhos com a espécie.

Considerando a espécie *C. ficifolia*, os acessos C375 e C453 foram os mais similares entre si, com similaridade genética de 0,89. Os acessos mais divergentes entre os cinco analisados nesta espécie foram C151 e C453, com valor de 0,72. Esses dados reforçam a baixa variabilidade relatada quando são considerados caracteres morfológicos em frutos de *C. ficifolia* (HEIDEN et al., 2007).

Para *C. pepo*, o acesso C222 é o mais divergente dos demais da mesma espécie, apresentando valor de 0,4. Os acessos C276 e C148 foram os mais similares em *C. pepo*, com similaridade genética de 0,74. Ambos os acessos são variedades locais de abóboras ornamentais cultivadas em Pelotas, com formato de fruto e coloração da casca bastante parecidos.

O dendrograma gerado pode ser visto na Figura 3.2. Foi evidenciada a formação de cinco grupos distintos, gerados a partir dos marcadores de SSR, com o emprego da similaridade média (0,56) como critério para a separação. As diferentes espécies ficaram em distintos grupos, com os acessos de *C. pepo* distribuídos nos grupos I, II e III; todos os acessos de *C. ficifolia* no grupo IV; e todos os acessos de *C. argyrosperma* no grupo V. O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ($r = 0,92$) revelou elevado ajuste entre a representação gráfica da similaridade genética e a matriz de similaridade original, o que permite a realização de inferências por meio da avaliação visual da Figura 3.2.

No grupo I, ficou apenas o acesso C299 (*C. pepo*). No grupo II ficaram dois acessos de *Cucurbita pepo*, C199 e C224, com uma percentagem de agrupamento coincidente de 73%. No terceiro grupo ficaram os acessos C148, C222, C260, C276 C290, C377, e C381 todos da espécie *C. pepo*, sendo que estes acessos apresentaram uma percentagem de 70% de agrupamento coincidente. A separação de diferentes acessos de *C. pepo* em grupos distintos reforça o que tem sido observado em estudos de caracterização morfológica dessa espécie, que relatam a grande variabilidade genética existente (PARIS, 2001; HEIDEN et al., 2007).

O quarto grupo foi formado pelos acessos C151, C310, C312, C375 e C453, de *Cucurbita ficifolia*. Neste grupo os acessos apresentaram uma percentagem de agrupamentos coincidentes de 100% mostrando que esses acessos são altamente similares diante da análise, o que era esperado, pois, representam uma espécie com pouca variabilidade genética (HEIDEN et al., 2007; FERREIRA, 2008).

O quinto grupo foi formado pelos acessos de *C. argyrosperma*, C16, C103, C106, C258, C289, C334, C379, C395 e C401. Neste grupo os acessos apresentaram uma percentagem de agrupamentos coincidentes de 100%, mostrando que são altamente similares diante da análise. Os acessos deste grupo expressam elevada semelhança fenotípica, e os resultados aqui obtidos também reforçam os relatos de baixa variabilidade genética para características morfológicas (HEIDEN et al., 2007; FERREIRA, 2008).

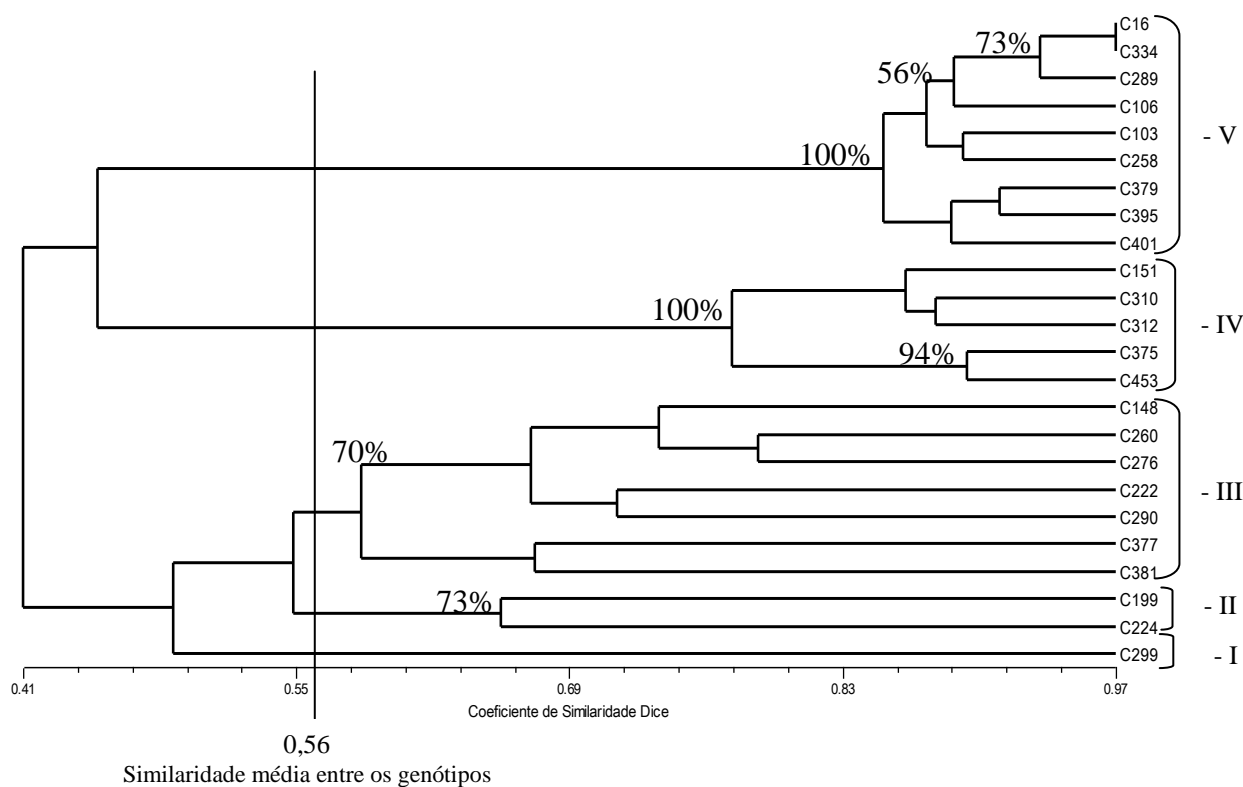


Figura 3.2 - Dendrograma resultante da análise de 24 genótipos de *C. argyrosperma*, *C. ficifolia* e *C. pepo* obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio do coeficiente de Dice, utilizando 35 marcadores SSR. Os valores encontrados nos grupos indicam o percentual de vezes que os genótipos agrupam juntos em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,92. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011.

Os resultados obtidos confirmaram o sucesso da transferibilidade de locos SSR de *C. pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. Considerando que o processo

para o isolamento e desenvolvimento de primers específicos para análise de microssatélites é bastante demorado e apresenta custo elevado, os resultados obtidos nesse trabalho permitem tornar mais eficiente o processo de caracterização molecular dos recursos genéticos dessas espécies.

3.4 Conclusão

É possível utilizar primers de microssatélites desenvolvidos para *Cucurbita pepo* na caracterização molecular de *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. As análises realizadas indicam que as variedades locais de *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* cultivadas no Rio Grande do Sul apresentam pouca variabilidade genética, enquanto que *C. pepo* evidencia grande variabilidade genética.

3.5 Referências

ADONINA, I.G.; SALINA, E.A; PESTSOVA, E.G; RÖDER, M.S. Transferability of wheat microsatellites to diploid *Aegilops* species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome. **Genome**, Ottawa, v.48, p.959–970, 2005.

BUSSAD, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1990. 105p.

CHEN, S.Y.; LIN, Y.T.; LIN, C.W.; CHEN, W.Y.; YANG, C.H.; KU, H.M. Transferability of rice SSR markers to bamboo. **Euphytica**, Wageningen, v.175, p.23-33, 2010.

DANIN-POLEG, Y; REIS, N.; TZURI, G.; KATZIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, p.61-72, 2001.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association because d between species. **Ecology**, Ecological Society of America – Washington, v. 26, p.297-302, 1945.

DI GASPERO, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R.; EDWARDS, K.J.; CIPRIANI, G. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.101, p.301–308, 2000.

FERREIRA, M.A.J.F. Abóboras e morangas: das Américas para o mundo. In: BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 59-88.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1998, 220p.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S.C.; ROBLEDO-ARNUNCIO J.J.; COLLADA C.; DIAZ, A.; WILLIAMS, C.G.; ALÍA, R.; CERVERA, M.T. Cross-amplification and sequence

variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, p.103–111, 2004.

GONG, L. ; STIFT, G.; KOFLER, R.; PACHNER, M.; LELLEY, T. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.117 p.37–48, 2008.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S. **Chave para identificação das espécies de abóboras (*Cucurbita*, *Cucurbitaceae*) cultivadas no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2007. 31p.

HERNANDEZ, P.; DORADO, G.; LAURIE D.A.; MARTIN, A.; SNAPE, J.W. Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop *Miscanthus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin v.102, p.616–622, 2001.

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

LORIEUX, M.; NDJIONDJOP, M-N; GHESQUIÈRE, A. A first interespecific *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.593-601, 2000.

OLIVEIRA, M.S.P.; SANTOS, J.B.; AMORIM, E.P.; FERREIRA, D.F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, p.1253-1260, 2010.

PALOP, M.; PALACIOS, C.; GONZALEZ-CANDELAS, F. Development and across-species transferability of microsatellite markers in the genus *Limonium* (Plumbaginaceae). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v.1 p.177–179, 2000.

PARIS, H.S. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. **Horticultural Reviews**, New York v. 25, p.71-170, 2001.

PRIORI, D.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S.; VASCONCELOS, C.S.; OLIVEIRA, C.S.; MISTURA, C.C.; COSTA, F.A. **Acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado – 2002 a 2010**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 37p.

RALLO, P.; TENZER, I.; GESSLER, C.; BALDONI, L.; DORADO, G.; MARTIN, A. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.107, p.940–946, 2003.

RAMOS, S.R.R.; QUEIROZ, M.A, de. Recursos genéticos de abóbora no Nordeste brasileiro. In: LIMA, C. L. M. **Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 2005. p.99-116.

RITSCHER, P.S.; LINS, T.C.; TRISTAN, R.L.; BUSO, G.S.; 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**, Londres, v.18 p.4–9, 2004.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Software, 2000. 98p.

SANTOS, K.L.; WELTER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p.73-79, 2007.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Austria, v.11, p.33-40, 1962.

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

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.205-230, 2006.

VALLS, J.F.M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L. (Editor técnico). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. p.281-305.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II - Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sinauer Associates, Sunderland, 1996. 377 p.

WUENSCH, A.; HORMAZA, J.I. Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [(*Prunus persica* L.) Batsch] SSR sequences. **Heredity**, Londres, v.89, p.56–63, 2002.

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

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUATA, N. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, p.865–870, 2001.

YAP, I.V.; NELSON, R.J. **Winboot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Manila: IRRI, 1996. 22p.

4 Avaliação da variabilidade genética em variedades locais de *Cucurbita pepo* por meio de marcadores microssatélites

Resumo

Dentre as espécies cultivadas no gênero *Cucurbita*, *C. pepo* apresenta a maior variabilidade para características de fruto, como cor, formato e tamanho. O Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado conta com 61 acessos desta espécie, todos variedades locais que são cultivadas na Região Sul do país e fazem parte da cultura regional, conforme o nome que lhes é atribuído, no preparo de diferentes pratos tradicionais e no uso para artesanato e ornamentação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre e dentro de variedades locais de *C. pepo* cultivadas no Rio Grande do Sul por meio da análise de marcadores microssatélites. Foi realizada a análise molecular de 10 acessos. O DNA genômico foi extraído individualmente de cinco plantas de cada acesso. Através dos dados de presença e ausência de marcadores obtidos com 40 combinações de *primers*, foram encontrados 100 alelos com variação de um a cinco alelos por loco, com média geral de três alelos por locus analisados. Dentre os 34 locos analisados, 29 (85,3%) foram polimórficos, evidenciando que há variabilidade genética entre os acessos de *C. pepo* analisados. Na matriz de distâncias genéticas formada pelos 50 indivíduos de *C. pepo*, foram obtidos valores altamente variáveis, apresentando distância mínima de 0,29 e distância máxima de 0,88. A distância genética média entre todos os acessos foi de 0,63. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,20 a 0,88, com média geral de 0,52 entre todos os acessos analisados. A avaliação dos dados moleculares foi feita pela análise molecular da variância (AMOVA). Deste modo, foi possível verificar que 54,60% da variabilidade genética é atribuída à variação entre acessos e 45,39% é atribuída a diferenças dentro dos acessos. Foi feita a análise comparativa entre os dez acessos estudados, analisados dois a dois pela análise da AMOVA. Das 45 comparações entre os dez acessos, foram significativas as diferenças entre 35 delas, com média de 57,10% da variação molecular atribuída às diferenças entre acessos. A variação genética entre as regiões onde os acessos foram coletados não foi significativa, indicando que não ocorre subdivisão de acessos em função do município de origem. Os resultados obtidos indicam que os microssatélites foram eficientes para a caracterização molecular e análise da divergência genética. A maior proporção da variabilidade em *C. pepo* encontra-se distribuída entre os acessos.

Palavras-chave: Cucurbitáceas, divergência genética, recursos genéticos, marcadores moleculares.

Abstract

Evaluation of genetic variability by microsatellite markers in *Cucurbita pepo* landraces

Among the cultivated species in the genus *Cucurbita*, *C. pepo* has the highest variability for fruit characteristics, such as color, shape and size. The Active Germplasm Bank of Cucurbitaceae from Embrapa Temperate Agriculture has 61 accessions of this species, all of them landraces being grown in southern Brazil. They are part of regional culture, which manifests itself in the name assigned to them and in the preparation of different traditional dishes and use for crafts and ornaments. The aim of this study was to evaluate genetic variability within and among landraces of *C. pepo* cultivated in Rio Grande do Sul state, through analysis of microsatellite markers. Molecular analysis was in 10 accessions. Genomic DNA was extracted individually from five plants of each accession. Through the data of presence and absence of markers obtained with 34 primer combinations, 100 loci were found, which varied from one to five alleles per locus, with overall average of three alleles per marker analyzed. Among the 40 loci tested, 29 (85.3%) were polymorphic, showing that there is genetic variability among the analyzed accessions of *C. pepo*. In the genetic distance matrix composed by 50 individuals of *C. pepo*, values obtained were highly variable, presenting a minimum distance of 0.29 and 0.88. The average genetic distance among all accessions was 0.63. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.20 to 0.88, with a general average of 0.52 among all the accessions analyzed. Data evaluation was done by analysis of molecular variance (AMOVA). Thus, 54.60% of genetic variability is attributable to variation among accessions and 45.39% is attributed to differences inside the accessions. It was made a comparative analysis between the ten accessions studied, analyzed two by two by AMOVA analysis. From the 45 comparisons between the ten accessions were significant differences were found between 35 them, with average of molecular variation of 57.10% attributed to differences between. Genetic variation among counties where the accessions were collected was not significant, indicating that there is not accessions subdivision according to geographic region. Results indicate that microsatellites were efficient for the molecular characterization and analysis of genetic divergence. The great genetic variability in *C. pepo* is among accessions.

Keywords: Cucurbits, genetic diversity, genetic resources, molecular markers.

4.1 Introdução

No Brasil, a maior diversidade genética de *Cucurbita* sob cultivo é encontrada na Região Sul, em particular no Rio Grande do Sul. Neste Estado, a influência da colonização por grupos étnicos bastante diferenciados, como africanos, alemães, espanhóis, italianos, japoneses, poloneses e portugueses, promove a manutenção da diversidade genética e a ampliação da variabilidade genética em cada espécie. As cinco espécies domesticadas do gênero *Cucurbita* são cultivadas no Brasil, sendo estas conhecidas por uma grande diversidade de nomes populares, particulares ou em comum (HEIDEN et al., 2007). A maioria das variedades locais de *Cucurbita* é cultivada em pequenas áreas, para o consumo na propriedade e comercialização em mercados locais.

Dentre as espécies cultivadas do gênero *Cucurbita*, *C. pepo* apresenta a maior variabilidade para características de fruto, como cor da casca, formato e tamanho. *Cucurbita pepo*, inclui formas de frutos comestíveis, conhecida como mogangos ou abóboras, e formas não-comestíveis, conhecidos como abóboras ornamentais. Hoje, *C. pepo* está entre as hortaliças mais importantes economicamente em todo o mundo e é cultivada em quase todas as regiões de clima temperado e subtropical (PARIS, 2001). No Brasil, essa espécie tem sido cultivada há várias gerações, sob a forma de variedades locais. Ao longo dos anos, estas variedades têm sido selecionadas pelos agricultores, resultando em populações adaptadas às condições locais de cultivo.

O Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado conta com 61 acessos desta espécie. Todos esses acessos são variedades locais, que são cultivadas na Região Sul do país e fazem parte da cultura étnica regional, conforme o nome que lhes é atribuído, no preparo de diferentes pratos tradicionais e no uso para artesanato e ornamentação (PRIORI et al., 2010). Embora o cultivo de Cucurbitáceas seja amplamente difundido em todo o mundo, grande parte da produção é realizada em pequenas propriedades, para subsistência ou destinada aos mercados locais, por esses motivos as estatísticas publicadas

subestimam a produção real (NUEZ et al., 2000). As variedades locais são cultivadas pelos agricultores familiares ao longo das gerações e, como as espécies de *Cucurbita* são de fecundação cruzada, e os agricultores geralmente cultivam mais de uma variedade local na mesma propriedade, próximas umas das outras, há facilidade para o cruzamento entre estas variedades, incrementando assim a variabilidade genética entre e dentro das espécies.

No Brasil, muitas variedades de *Cucurbita* são mantidas como variedades tradicionais ou locais. Os agricultores cultivam as variedades locais de *Cucurbita* e realizam a própria seleção de frutos, utilizando sementes próprias para o cultivo do ano seguinte. Por usarem suas próprias sementes, as quais são resultantes de uma seleção continuada, os agricultores obtêm tipos muito diversos, que podem ser considerados recursos genéticos de grande valor e que são manejados desde que começam a cultivar as plantas dentro de seus sistemas de produção agrícola (RAMOS, QUEIROZ, 2005).

A avaliação e a caracterização dessas variedades locais são de extrema importância e podem ser incrementadas com o desenvolvimento de programas de melhoramento que visem a identificação de genes de interesse como, por exemplo, para características de fruto e também para o desenvolvimento de novas cultivares que atendam às necessidades de produtores e consumidores. Contudo, os programas de melhoramento genético têm utilizado a associação de técnicas clássicas às ferramentas biotecnológicas, como o uso de marcadores moleculares. Uma das principais vantagens da utilização destes é propiciar a redução do tempo para identificação da variabilidade genética entre os indivíduos trabalhados (XAVIER et al., 2005).

Os marcadores moleculares permitem acessar uma ampla cobertura genômica, não dependem de condições ambientais e são extremamente úteis para estudos de genética populacional (SALLA et al., 2002). Dentre eles os marcadores microsatélites ou SSR se destacam e são amplamente aplicados em estudos genéticos e extensivamente utilizados para a caracterização de espécies devido ao fato de ser de natureza codominante, de fácil reprodução e interpretação dos dados (CRESTE, et al., 2003). Entre as aplicações desses marcadores, está estimar as distâncias genéticas entre indivíduos de uma mesma população e de populações diferentes e, a partir da matriz de distâncias, analisar a dispersão dos indivíduos, identificando a formação de grupos e a estrutura da população. Marcadores

moleculares podem fornecer uma quantidade muito grande de informações a respeito da variabilidade e grau de relacionamento genético, tanto em populações naturais como em espécies sob cultivo (CAVALLI, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre e dentro de variedades locais de *C. pepo* cultivadas no Rio Grande do Sul por meio da análise de marcadores de microssatélites.

4.2 Material e Métodos

Foi realizada uma busca no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para selecionar primers microsátélites já desenvolvidos para *Cucurbita*. Foram selecionados 40 pares de primers SSR desenhados para *C. pepo*, desenvolvidos pelo *Applied Life Sciences the Institut of Biotechnology in Plant Production, Department for Agrobiotechnology* of the *BOKU-University of Natural Resources*, na Áustria.

Dez acessos de variedades locais de *Cucurbita pepo* coletadas no Rio Grande do Sul foram analisados (Tabela 4.1). Os acessos fazem parte do acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS).

Tabela 4.1 – Acessos de variedades locais de *Cucurbita pepo* coletadas no Rio Grande do Sul, submetidos à caracterização molecular, Pelotas, 2011.

Acesso*	Espécie	Nome Popular	Município de Procedência
C148	<i>C. pepo</i>	poronguinho	Pelotas
C199	<i>C. pepo</i>	mogango amarelo	Encruzilhada do Sul
C222	<i>C. pepo</i>	abóbora-de-coco	Turuçu
C224	<i>C. pepo</i>	mogango verrucoso	Turuçu
C260	<i>C. pepo</i>	abóbora-ovo	Pelotas
C276	<i>C. pepo</i>	abóbora	Pelotas
C290	<i>C. pepo</i>	abóbora-estrela	Pelotas
C299	<i>C. pepo</i>	moganguinho alongado	São Lourenço do Sul
C377	<i>C. pepo</i>	abobrinha ornamental	São Lourenço do Sul
C381	<i>C. pepo</i>	abóbora-estrela	Pelotas

*Os acessos utilizados fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado

O DNA foi extraído das folhas jovens coletadas separadamente de cinco indivíduos de cada acesso. A extração foi realizada de acordo com o protocolo

descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Os testes de qualidade e a quantificação do DNA foram feitos em gel de agarose 0,8%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio. Foram aplicados 2 µL de cada amostra de DNA, com 3 µL de corante tipo TC (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%). O DNA foi quantificado no gel por comparação com os padrões de bandas do marcador λ DNA Hind III. Após a quantificação, o DNA foi diluído em TE para uma concentração de 25 ng/µL.

As reações de amplificação de microssatélites (PCR-SSR) foram realizadas em placas de 96 poços contendo uma reação 25 µL volume composto de Tampão PCR 10x, MgCl₂ 1,5 mM, 2 mM de cada um dos deoxinucleotídeos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 µM de cada primer (*Forward e Reverse*), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Bio Systems Gene Amp PCR System 9700, programado para uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 4 min e 40 seg, seguido de 30 ciclos de 0,15 min a 94°C (desnaturação), 0,10 min a 60°C (anelamento) e 0,15 min a 72°C. Por fim, uma etapa de 5 min a 72°C. As temperaturas de anelamento variaram de 50°C a 60°C, conforme a temperatura do primer utilizado. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen) 3%, corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e tampão TBE 1X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM). Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV). As imagens foram capturadas em câmara digital e armazenadas em computador para avaliação dos padrões de bandas. O marcador 1 Kb Plus DNA ladder foi utilizado como referência de peso molecular para estimar os tamanhos dos produtos da amplificação.

Os marcadores obtidos foram analisados com o software NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers, Version 2.1, Applied Biostatistics, Inc.*). Os amplicons foram classificados em presença (1) e ausência (0) de bandas e convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi estimado: i) o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada marcador foi estimado por meio da equação: $PIC = 1 - \sum p_i^2$ onde, p_i é a frequência ao quadrado do alelo i , e posteriormente foi estimado o PIC médio de cada iniciador por meio da média aritmética dos PICs obtidos; ii) a distância genética entre os acessos, por meio da distância Rogers Modificado (WRIGHT, 1978; GOODMAN, STUBER, 1983) conforme a equação

$$D_w = \frac{1}{\sqrt{2m}} \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (p_{ij} - q_{ij})^2}$$

onde, p_{ij} e q_{ij} correspondem às frequências do alelo i no loco j , n_i é o número de alelos do loco i , e m se refere ao número de locos contendo os alelos i estudados.

A partir da matriz original gerada com os dados de presença e ausência de marcadores em locos polimórficos, foi estimada a distância euclidiana entre os indivíduos. Com base no quadrado da distância euclidiana foram calculadas as estimativas da variabilidade genética, entre populações e dentro de populações por meio da análise molecular da variância (AMOVA). O valor F_{st} , que representa a distância genética entre duas populações, foi utilizado para comparar a variação genética entre as dez populações avaliadas (EXCOFFIER et al., 1992; HUFF et al., 1993). Para testar a significância dos resultados da AMOVA foi utilizado o método não-paramétrico de permutações (EXCOFFIER et al., 1992).

Com base na matriz de distância genética foi construído um dendrograma, por meio do método de agrupamento da distância média UPGMA, (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal, Rohlf (1962), utilizando o programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000). Esse coeficiente traduz a relação momento-produto, calculado entre os elementos da matriz original e os da matriz cofenética, resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento, depois da construção do dendrograma. Valores de (r) acima de 0,8 indicam boa representatividade entre as distâncias (BUSSAD et al., 1990). A estabilidade dos agrupamentos foi computada por meio da análise de *Bootstrapping* com 1000 replicações, com a utilização do programa computacional Winboot (YAP, NELSON, 1996). O tamanho das bandas foi estimado através do programa computacional Bio - 1D Advanced - Vilber Lourmat SAS, 2006 (software de análise).

4.3 Resultados e Discussão

Entre os 40 primers SSR testados para os 50 indivíduos amostrados de *Cucurbita pepo*, 34 amplificaram (Tabela 4.2). A análise de 50 indivíduos por meio de 34 iniciadores gerou um total de 100 marcadores, com variação de um a cinco alelos por loco e com média geral de três alelos por marcador analisado. Os 100 locos gerados a partir dos 34 primers SSR foram suficientes para separar os cinquenta indivíduos das dez variedades locais de *C. pepo*. Um estudo realizado por Decker Walters et al. (1993) mostrou uma alta diversidade alélica em *Cucurbita pepo*. Dentre os 34 locos analisados 29 (85,2%) foram polimórficos, evidenciando variabilidade genética entre os acessos de *C. pepo* analisados, confirmando com dados de caracterização morfológica já realizada com a espécie. Conforme trabalho realizado por Paris (2001), há uma grande variabilidade genética expressa em características vegetativas, reprodutivas e de frutos em cultivares de polinização aberta de *C. pepo*. O mesmo trabalho mostra também que os marcadores microsatélites são eficazes na quantificação da variabilidade genética de *C. pepo*.

O padrão de bandas obtido através dos primers SSR pode ser visualizado na Figura 4.1. As frequências alélicas variaram de 0,04 a 1,0 com média geral de 0,35. O peso molecular dos fragmentos formados variou de 97 a 329 pb. A frequência de heterozigotos representa a existência de variabilidade genética, pois cada indivíduo diplóide pode ter até dois alelos por loco (WEIR, 1996), como é o caso das Cucurbitáceas, em que a variabilidade é maior com a maior frequência de heterozigotos.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,20 a 0,88 (Tabela 4.2) com média geral de 0,52 entre todos os acessos analisados, sendo que os locos que apresentaram maior informação de polimorfismo foram CMTP204, CMTP84, CMTP132, CMTP107 e CMTP120, com valores respectivamente de 0,88; 0,83; 0,82; 0,75 e 0,71.

Tabela 4.2 - Características dos locos de microssatélites validados em 50 indivíduos de *Cucurbita pepo*. Pelotas, 2011.

Nome	Motif	Forward / Reverse	pb	temp	A	Amplitude	PIC
CMTP46	ag	ttccctctgcagagatgct/ ccatgcgcataattgtatcg	142	60	2	141-148	0,67
CMTP33	gaa	aatgcgtttgaacaaagctg/ggatcgttaaaatttcctcgat	171	58	3	173-183	0,21
CMTP48	ga	ttgcagtagcgtgcagaac/ggatccttctcgtggtgta	228	60	na	na	na
CMTP61	tc	ttgcagtagcgtgcagaac/ ggatccttctcgtggtgta	118	60	2	113-108	0,28
CMTP86	cca	gctcttgacaagaatggtca/atggcttctggtggtgtc	133	60	2	152-135	0,71
CMTP131	ccg	gcactgaatctctgcaac/cgagaaagaattaacgagca	117	55	5	133-0,97	0,53
CMTP132	gat	ccatttccatttccatttca/ aggttagaaacagggggaatc	151	58	2	151-143	0,82
CMTP158	gcag	ccgtagagatgtcagagacaagg/ agggatgctcatcacacctc	134	60	3	140-121	0,49
CMTP174	tc+t	gccggaaccagacttctc/ ccctccctcccatataac	176	58	2	186-175	0,62
CMTP141	tc	attcatgtcactaccgacttc/ cggattataagatggcaag	135	55	3	169-118	0,49
CMTP190	ga	cggggaagagaggtttaggt/ cccatacattcccataacacc	210	59	5	293-173	0,64
CMTP182	CGT	cacgaagatttgatggcctta/ ggattgggatggatgaagatg	138	60	na	na	na
CMTP204	ag	agaaggaggagagcgaaag/ataagatcccaacccaaccc	357	60	2	329-311	0,88
CMTP210	gtgtgc	gtggaagtactcgcattgg/ gcaagaatgtcctcagcag	117	58	3	125-107	0,68
CMTP193	ga	ggtgacggcaagaaaagcta/ gctgacctctctccctctc	186	60	na	na	na
CMTP201	ct	aggagtgggtgggctaatacg/ tgaattgaggaggaggagag	110	59	4	121-0,97	0,65
CMTP247	ga	gggtgtgttgaggattggt/ atcacatttctcccacca	123	60	3	137-119	0,53
CMTP17	ct	actgctcaataaggcaagga/ aaacaagatgcacaacacagg	84	58	2	113-103	0,39
CMTP107	ttgga	cgatgatgaacaggaagacg/ tcacatccattcccctctc	109	59	4	153-117	0,75
CMTP62	gt	gtgcccgtcagtcggaat /gtgcagcaagatagcaatagca	100	60	4	115-100	0,42
CMTP58	ga+t	tcggagaaactgcactcc/ tccagcaccatcaggatac	102	60	2	118-109	0,40
CMTP66	gaa	acgacatgagggaagattcg/ ttcaatgccattcgctac	128	60	2	170-130	0,52
CMTP84	tc+t	gcggaacaggtgtgtgtg/ ccatcaggataccctacaag	150	60	3	142-118	0,83
CMTP97	aag	ccacacaccaatcgttgaag /cgcagaatctcgaacacaa	166	60	3	166-150	0,70
CMTP126	ttc	acctcaaacctttgtg/ ggaagaagaaggaggaggag	117	57	na	na	na
CMTP120	gaa	aaccggaacaccttatgacc /ttcaagaaggttccaagga	164	60	4	166-131	0,71
CMTP130	cgt	gcccatttctggagagatagta /gaggagagatgcagagcaac	169	57	na	na	na
CMTP144	cct	atggctccaagctcctctt /gtcgccatgagcttgag	105	60	3	117-105	0,50
CMTP133	tc	tagagttcgatcaatgcaa /gttgatactcaaccagtt	113	57	4	152-112	0,50
CMTP187	cag+caa	aacaatcctcgctcaaatac/atgaaaaatgggaagccagag	189	60	3	189-131	0,37
CMTP219	tc	ttcatcatcgtcagcaaagc /gcacatgcagcactctgact	117	60	na	na	na
CMTP207	cg	gacgaacgaagcatgttgag /ggtcagcaaggtcagaaaagg	156	60	3	132-105	0,31
CMTP224	caa	caccgacgactccatcatc /cttctgtccccaaaatcaca	151	60	3	163-122	0,49
CMTP261	gaa+cat	aaatgccagcccaaatcat /gatggctgccacttctcta	187	60	2	231-187	0,42
CMTP68	tc+ggcttc	cacacccatttcatttgacc/ attgattgggacgtgaggaa	180	60	4	195-171	0,20
CMTP125	tc	ctgttccgagcatcag/ agtgagaggagagacgcaaag	115	59	3	122-109	0,64
CMTP138	T	aaaggtttccacatccttg/ gaaaaggaaaaagtgttcaaag	103	55	2	110-103	0,67
CMTP209	gtt	tcactttacaaccagaagctga/ cactttgctgctcatccac	116	57	3	124-110	0,42
CMTP83	tc	tgaccattttgcagattgaga /cttcggagacgaagagatc	112	59	2	119-111	0,45
CMTP127	cacgcc	ttcctctgtttcgtaaatg/ cacaaaagggtttgaggtt	112	58	3	125-110	0,55

pb = pares de base, temp. = temperatura de anelamento, A = número de alelos, na= não amplificou

Na matriz de distâncias genéticas formada pelos 50 indivíduos de *C. pepo*, foram obtidos valores altamente variáveis, apresentando distância mínima de 0,29 e

distância máxima de 0,88, sendo que a distância genética média entre todos os acessos foi de 0,63. A similaridade genética evidenciou que os acessos mais distantes geneticamente foram C276 e C381, apresentando distância genética de 0,8. O acesso C276 é uma variedade local de abóboras ornamentais e o acesso C381 é uma variedade local de abóbora-estrela. Ambos foram coletados em Pelotas e fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. Conforme caracterização morfológica realizada por Heiden et al. (2007), as variedades ornamentais, na maioria das vezes, apresentam polpa insípida ou muito amarga. Muitas se conservam por longos períodos de tempo após a colheita. As características dos frutos das variedades ornamentais são extremamente variáveis, existindo variedades bicolores com frutos cuja casca é metade verde e metade amarela, como a variedade 276 (Figura 4.2). As variedades conhecidas como abóbora-estrela C381 (Figura 4.2) são caracterizadas por apresentar proeminências ao redor do fruto, casca lisa de cor branca ou amarela e polpa de coloração clara. O cultivo destas variedades, cujo fruto é bastante ornamental e a polpa é usada no preparo de doces em calda, parece estar restrito às localidades de colonização alemã.

A distância genética mínima observada foi 0,29, dentro do acesso C199, uma variedade local de mogango, cujo fruto de casca bastante dura e polpa fibrosa é usado na alimentação humana. O acesso C377 apresentou a maior distância genética dentro da população analisada, com valor de 0,58. Este acesso é uma variedade local de uso exclusivamente ornamental, cuja polpa é extremamente fibrosa e, por isso, não pode ser consumida na alimentação.

A distância média geral dentro dos acessos foi de 0,44. Esse resultado mostra que há variabilidade genética dentro das populações de variedades locais de *C. pepo* analisadas. Isso se explica pelo fato de que os agricultores geralmente cultivam mais de uma variedade local de *Cucurbita* na propriedade e, como são plantas alógamas, acaba havendo troca de genes entre essas variedades locais. O agricultor pratica seleção recorrente, sempre buscando um formato de fruto que considera ideal, e isso mantém alta variabilidade genética dentro dos acessos das variedades locais, pois a cada ciclo de seleção realizada novos formatos são encontrados.

Considerando um tempo mais remoto, durante o processo de domesticação, foi realizada seleção para formato de fruto, redução de gosto amargo na polpa,

aumento de tamanho e redução do número de sementes e aumento do tamanho de frutos. Esta seleção permitiu a manutenção de grande variabilidade genética entre e dentro das espécies cultivadas, a qual está associada a uma diversidade de usos que requer diferentes formatos, tamanhos e uma constante relação entre comprimento e diâmetro de fruto (BISOGNIN, 2002).

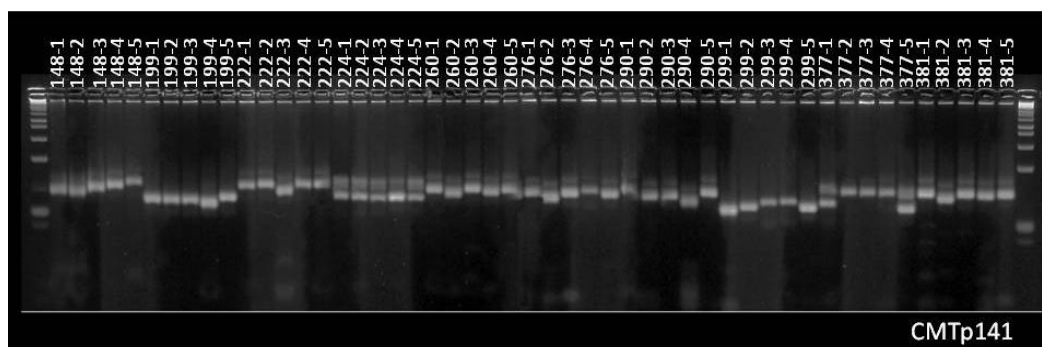


Figura 4.1 – Perfil de amplificação de acessos de *C. pepo* do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. Os produtos da PCR foram amplificados com o Primer SSR – CMTp141 e revelados em gel de agarose 3,5%. Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), Pelotas, 2011.

A partir dos dados de presença e ausência das bandas geradas pelos marcadores polimórficos, foi estimada a variabilidade genética entre os acessos dentro de municípios e dentro de acessos pela análise molecular da variância, AMOVA (Tabela 4.3). A variação genética entre as regiões onde os acessos foram coletados não foi significativa, indicando que não ocorre subdivisão de populações em função da região geográfica. Por outro lado, as diferenças entre acessos e dentro de acessos foram significativas (Tabela 4.3).

O padrão de variabilidade genética encontrado indica que a maior parte da variação molecular (54,60%) ocorre entre os acessos. No entanto, uma quantidade significativa (45,39%) também foi atribuída a diferenças dentro dos acessos. A variabilidade encontrada dentro dos acessos avaliadas neste trabalho (45,39%), por apresentar um valor alto e próximo ao encontrado entre os acessos, está de acordo com a afirmação de Loveless e Hamrick (1984) de que uma alta variabilidade dentro das populações é típica de espécies que apresentam mecanismos eficientes de dispersão de pólen. Desse modo, as Cucurbitáceas, por serem alógamas, apresentam essa grande variação dentro dos acessos. Os acessos utilizados neste trabalho são variedades locais cultivadas pelos agricultores familiares ao longo das gerações e, como as espécies de *Cucurbita* são de fecundação cruzada, e os

agricultores geralmente cultivam mais de uma variedade local na mesma propriedade, próximas umas das outras, permitem que as variedades cruzem entre si, incrementando assim a variabilidade genética entre e dentro das populações.

Tabela 4.3 – Distribuição da variabilidade genética dentro e entre acessos e entre regiões de *Cucurbita pepo* com base na análise molecular da variância (AMOVA). Pelotas, 2011.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Percentagem da variação total
Entre acessos	9	575,78	10,97	54,60*
Dentro dos acessos	40	364,8	9,12	45,39*
Entre regiões	3	231,34	5,60	26,67
Total	51	940,58	20,09	100

*Valores significativos ao nível de 1% de probabilidade; SQ= soma de quadrados; GL= grau de liberdade

Um trabalho realizado com a palmeira *Butia capitata*, que também é de fecundação cruzada como as Cucurbitáceas evidenciou através desta mesma análise (AMOVA) que a maior parte da variação molecular (83,68%) ocorreu dentro das populações, mas, uma quantidade significativa (13,67%) também foi atribuída a diferenças entre as populações (BÜTTOW et al., 2010). Os resultados encontrados neste trabalho são parecidos com os encontrados para *Butia capitata*, já que a variabilidade encontrada dentro dos acessos teve um valor alto e bastante significativo.

A distância entre os dez acessos também foi estimado e das 45 comparações realizadas verificou-se diferenças significativas entre 35 delas com média de 57,10% da variação molecular atribuída às diferenças entre acessos (Tabela 4.4).

A comparação entre os acessos, dois a dois, mostra que entre os acessos C381 e C199 houve uma diferença bastante significativa com uma amplitude de divergência de 65,31%, mostrando a variabilidade genética existente. No dendrograma (Figura 4.3), que apresentou coeficiente de correlação cofenética de 0,86 com a matriz de similaridade entre os 50 indivíduos, é nítida a formação de grupos entre as populações não havendo influência do local de coleta, pois a análise entre os municípios de origem dos acessos não foi significativa. Nesse sentido, por meio de marcadores AFLP, também foi detectado em *C. moschata* ausência de diferenciação entre diversidade e procedência (RAMOS, 2003). Esta tendência de indivíduos de uma mesma população não ficarem agrupados com os demais

indivíduos da região, mostra a presença de variabilidade entre as populações. Segundo Linhart et al. (1981), a diferenciação genética dentro de uma população ou mesmo entre populações de uma espécie pode ocorrer a distâncias relativamente pequenas, e a ocorrência desta diferenciação significa que a variabilidade genética é estruturada no espaço.

Tabela 4.4 – Análise comparativa 2x2 entre acessos de *Cucurbita pepo* obtidas por meio da AMOVA. A porcentagem da variação molecular total existente entre os acessos (F_{st}) é a medida da distância genética entre os acessos. Pelotas, 2011.

Acessos	C148	C260	C276	C290	C381	C199	C222	C224	C299	C377
C148	-	55,99**	56,48**	51,53**	59,81**	47,93 ^{ns}	42,69 ^{ns}	49,86 ^{ns}	60,91**	54,82**
C260		-	54,75**	58,25**	62,89**	52,51**	46,49 ^{ns}	36,23 ^{ns}	63,56**	55,99**
C276			-	58,32**	58,84**	58,76**	58,76**	52,33**	52,90**	53,59**
C290				-	50,23**	64,48**	55,10**	52,63**	47,91 ^{ns}	53,18**
C381					-	65,31**	60,16**	55,70**	57,73**	53,20**
C199						-	51,82**	41,65 ^{ns}	63,16**	61,66**
C222							-	35,13 ^{ns}	64,77**	56,07**
C224								-	52,50**	49,53 ^{ns}
C299									-	47,32 ^{ns}
C377										-

* valores significativos ao nível de 5% de probabilidade; ** valores significativos ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} valores não significativos

Foi evidenciada a formação de cinco grupos distintos gerados a partir da análise dos marcadores SSR, com o emprego da distância média (0,63) como critério para a separação. O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma foi alto, ($r= 0,86$) revelando elevado ajuste entre a representação gráfica da distância genética e a matriz de similaridade original, o que permite que sejam realizadas inferências por meio da avaliação visual da Figura 4.3. A separação de diferentes acessos de *C. pepo* em grupos distintos reforça o que tem sido observado em estudos de caracterização morfológica dessa espécie, que relatam a grande variabilidade genética existente (PARIS, 2001; HEIDEN et al., 2007).

No grupo I ficou a população composta pelo acesso C381. Este grupo apresentou uma porcentagem de agrupamento coincidente de 89%, sendo que dentro da população composta por este grupo ocorreu um agrupamento coincidente

com percentagem de 100% evidenciando a similaridade genética dentro do acesso. O grupo II foi formado pelos acessos C299 e C377, apresentando uma percentagem de agrupamento coincidente em 89%. Na análise dos acessos de dois a dois, este grupo não apresentou significância nem para variação entre e nem dentro dos acessos, o que justifica o fato de permanecerem agrupados no dendrograma. No grupo III ficaram os acessos C276 e C290, com uma percentagem de 77% de agrupamento coincidente, e entre os indivíduos da população C276 ocorreu uma percentagem de agrupamento de 96%.

O grupo IV foi formado por quatro populações, os acessos C199, C222, C224 e C260. A percentagem de agrupamento entre essas populações foi de 85% entre os indivíduos de C260, 47% entre os indivíduos de C224, 79% entre os indivíduos de C222. Este grupo ficou bastante diversificado, compreendendo vários tipos de fruto de *C. pepo*. Um tipo curioso é a abóbora-ovo, C260 (Figura 4.2), semelhante em cor, tamanho e formato a um ovo de galinha, sendo usada pelo agricultor doador do acesso como ovo-indês, ou seja, aquele que é mantido no ninho para que a galinha caipira mantenha a postura sempre no mesmo local. Os acessos C199 e C224 (Figura 4.2) compreendem dois tipos diferentes de mogangos. As variedades locais de *C. pepo* conhecidas como mogango são muito comuns no Sul do Rio Grande do Sul. Os mogangos apresentam frutos de casca dura e diversos formatos, cores e tipos de superfície da casca. Quanto ao formato, são achatados, arredondados, oblongos ou alongados. Quanto à coloração, podem ser brancos, amarelos, alaranjados, verdes ou amarelos com listras verdes (HEIDEN et al., 2007).

No grupo V ficou o acesso C148, com uma percentagem de agrupamento coincidente de 67%. Este acesso é uma variedade local com frutos ornamentais.



Figura 4.2 – Variabilidade genética dos frutos das variedades locais de *Cucurbita pepo* (C148-poronguinho, C199-mogango amarelo, C222-abóbora-de-coco, C224-mogango verrucoso, C260-abóbora-ovo, C276-abóbora, C290-abóbora-estrela, C299-moganguinho alongado, C377-abobrinha ornamental, C381-abóbora-estrela) avaliadas no presente trabalho, acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011.

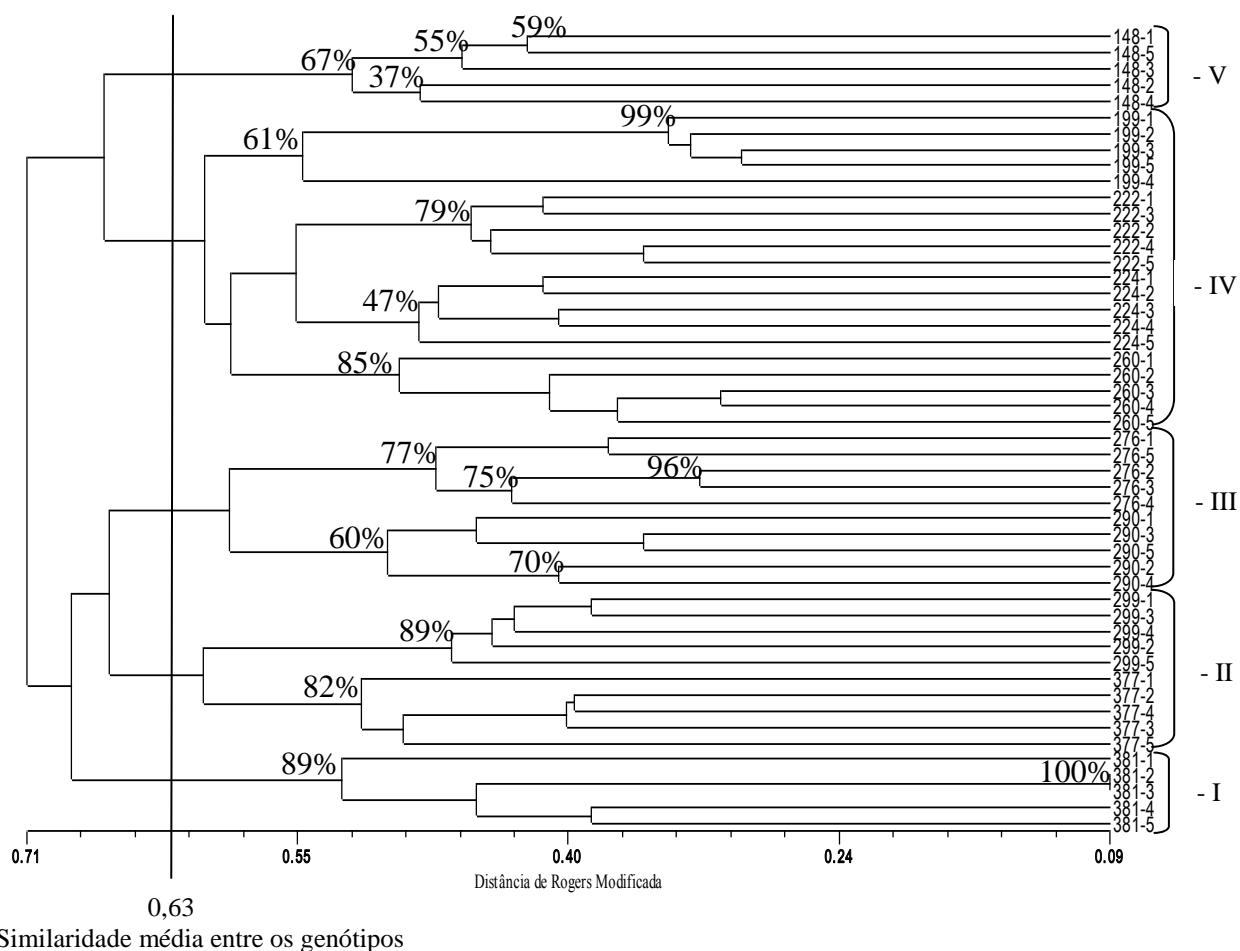


Figura 4.3 – Dendrograma resultante da análise de 50 indivíduos de *Cucurbita pepo*, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio da Distância de Rogers modificado, utilizando 34 marcadores SSR. Os valores encontrados nos grupos indicam o percentual de vezes que os genótipos agrupam juntos em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,86. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011.

4.4 Conclusão

Os marcadores microsatélites foram eficientes para caracterizar a variabilidade genética em acessos de *Cucurbita pepo*. A maior proporção da variabilidade em *C. pepo* encontra-se distribuída entre os acessos. Não foi detectada grande variabilidade genética entre os municípios de origem dos acessos, não havendo subdivisão dos acessos em função do local de cultivo.

4.5 Referências

BISOGNIN, D. A. Origin and evolution of cultivated Cucurbits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.715-723, 2002.

BUSSAD, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1990. 105p.

BÜTTOW, M. V.; CASTRO, C.M.; SCHWARTZ, E.; TONIETTO, A.; BARBIERI, R.L. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, p.230-239, 2010

CAVALLI, S. S. Polimorfismos moleculares. In: **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, p.311-332, 2003.

CRESTE, S.J.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S.O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* ssp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v.132, p. 259-268, 2003

DECKER-WALTERS, D.S.; WALTERS, T.W.; COWAN, C.W.; SMITH, B.D. Isozymic characterization of wild populations of *Cucurbita pepo*. **Journal of Ethnobiology**, Texas, v.13, p.55-72, 1993.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Pittsburgh, n.131, p479-491, 1992.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1998, 220p.

GOODMAN, M.M., STUBER, C.W. Races of maize: VI. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. **Maydica**, Bergamo, v.28 p.169–187, 1983.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S. **Chave para identificação das espécies de abóboras (*Cucurbita*, Cucurbitaceae) cultivadas no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2007. 31p.

HUFF, D.R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. RAPD variation within and among a natural populations of outcrossing buffalo grass [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.927-934, 1993.

LINHART, Y.B.; MITTON, J.B.; STURGEON, K.B., DAVIS, M.L. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. **Heredity**, Oxford, v.46, p.407-426, 1981.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematic**, Palo Alto, v.15, p.68-95, 1984.

NUEZ, F.; RUIZ, J.J.; VALCÁRCEL, J.V.; CÓRDOVA, P.F. **Colección of de semillas de calabaza Del centro de conservación y mejora de la agrobiodiversidad valenciana**. Madrid: INIA, 2000. 158p.

PARIS, H.S. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. **Horticultural Reviews**, New York, v. 25, p.71-170, 2001.

PRIORI, D.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S.; VASCONCELOS, C.S.; OLIVEIRA, C.S.; MISTURA, C.C.; COSTA, F.A. **Acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado – 2002 a 2010**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 37p.

RAMOS, S.R.R. Divergência genética baseada em marcadores moleculares AFLP e indicação de coleção nuclear de *Cucurbita moschata* para o Nordeste do Brasil. 2003.102f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003.

RAMOS, S.R.R; QUEIROZ, M.A. de Recursos genéticos de abóbora no Nordeste brasileiro. In: MOURA, M.C.C.L. **Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, p. 99-116, 2005.

ROHLF, J. NTSYS-pc. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter, 2000. Software.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p.15-22, 2002.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Austria, v.11, p.33-40, 1962.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II** - Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Associates, Sunderland, 1996. 377 p.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. The University of Chicago Press. v. 4, 1978

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; FREIRE FILHO, F.R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.353-359, 2005.

YAP, I.V.; NELSON, R.J. **Winboot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Manila: IRRI, 1996. 22p.

5 Considerações finais

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuíram significativamente para o aumento do conhecimento relacionado ao germoplasma conservado no Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, por meio da caracterização molecular e da estimativa da distância genética entre os acessos de *Cucurbita* estudados.

Para fazer um bom uso dos acessos conservados em Bancos de Germoplasma é essencial a caracterização dos mesmos para que se conheça a diversidade existente entre as espécies conservadas e também a variabilidade entre os acessos. Essa caracterização é parte inicial para a realização de trabalhos futuros de melhoramento genético com as espécies de *Cucurbita*.

Neste trabalho, a técnica de SSR foi utilizada na caracterização molecular de variedades locais de *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita pepo* cultivadas no Rio Grande do Sul. O número de locos analisados foi suficiente para a análise das variedades locais, permitindo a avaliação do nível de polimorfismo entre as variedades. Esta técnica provou ser um método confiável e eficiente para a caracterização genética de acessos de Cucurbitáceas.

O capítulo I desta dissertação teve por objetivo fazer uma revisão bibliográfica de *C. ficifolia*, pois dentre as cinco espécies cultivadas esta é a menos conhecida e cultivada somente em algumas regiões do Rio Grande do Sul. *C. ficifolia* apresenta a menor variabilidade genética dentre as espécies cultivadas de *Cucurbita*. O segundo capítulo contribuiu para o conhecimento mais aprofundado e relacionado à transferibilidade de primers de *C. pepo* para *C. ficifolia* e *C. argyrosperma*, e também através da estimativa da variabilidade entre e dentro dessas espécies.

O terceiro capítulo evidenciou a variabilidade existente dentro e entre populações de *C. pepo* através de marcadores microssatélites. Por meio das análises foi possível visualizar que há uma maior variabilidade entre as populações estudadas do que dentro das mesmas. A partir da análise dos agrupamentos e da

estimativa da distância genética foi possível verificar quais acessos são mais similares e quais são mais distantes geneticamente.

Além dos dados moleculares é interessante comparar os resultados obtidos neste trabalho com dados de caracterização morfológica e, desse modo, procurar estabelecer relação entre as características fenotípicas e genotípicas. Assim este trabalho evidenciou a necessidade de estudos morfológicos considerando os acessos de *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. Os três capítulos da dissertação evidenciaram a importância do acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, pela presença de acessos de variedades locais cultivadas no Rio Grande do Sul, as quais apresentam grande diversidade genética. Esses recursos genéticos podem tornar-se uma importante referência para futuros trabalhos de melhoramento genético de espécies de *Cucurbita*.

6 Referências (Introdução geral)

BOEF, W. S. Tales of the unpredictable. Learning about institutional frameworks that support farmer management of agro-biodiversity. 2000. PhD-Thesis, Wageningen, Wageningen University, p. 49-60, 2000.

BELLON, M.R. The ethnoecology of maize variety management: a case study from Mexico. **Human Ecology**, New York, v.19, p.389-417, 1991.

CAVALLI, S. S. Polimorfismos moleculares. In: **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, p.311-332, 2003.

CIAMPI, A.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microsatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (Copaíba). **Boletim Técnico**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v.16, p.5-40, 2002.

EYZAGUIRRE, P.; IWANAGA, M. Farmers' contribution to maintaining genetic diversity in crops, and its role within the total genetic resources system. In: **Participatory plant breeding**. Proceedings of a workshop on participatory plant breeding, Wageningen, p.9-18, 1995.

FERREIRA, M.A.J.F. Abóboras e Morangas: das Américas para o mundo. In: Barbieri, R.L.; STUMPF, E.R.T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 909 p.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S. **Chave para identificação das espécies de abóboras (*Cucurbita*, *Cucurbitaceae*) cultivadas no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2007. 31p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 197).

LIRA-SAADE, R. L. **Estudios taxonômicos y ecogeográficos de las *Cucurbitaceae* latinoamericanas de importância econômica**. Rome: IPGRI, 1995. 281 p.

NUEZ, F.; RUIZ, J.J.; VALCÁRCEL, J.V.; CÓRDOVA, P.F. **Colección de semillas de calabaza del Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana**. Madrid, INIA, 2000. 158 p.

PARIS, H.S.; DAUNAY, M. C.; PITRAT, M.; JANICK, J. First known image of *Cucurbita* in Europe, 1503–1508. **Annals of Botany**, Oxford, v.98, p.41–47. 2006.

RAMOS, S.R.R; QUEIROZ, M.A. Recursos genéticos de abóbora no Nordeste brasileiro. 99-116 In: LIMA, M.C. **Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura 2005, 190p.

RERKASEM, K.; PIÑEDO-VASQUEZ, M. Diversity and innovation in Smallholder systems in response to enviromental and economics changes. In: JARVIS, D.I.; PADOCH, C.; COOPER. H.D. **Managing biodiversity in agricultural ecosystems**. New York: Columbia University Press, p.13-33, 2007.

SANTOS, K. L.; WELTER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p.73-79, 2007.

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

TUXILL, J.; NABHAN, G.P. **People, plants and protected areas**. A guide to in situ management. London: Earehscan Publications, 2001. 277p.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B.; BIANCHETTI, L. B.; VALLS, J. F. M. Coleta de germoplasma vegetal: relevância e conceitos básicos. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.27-55, 2005.