

Diversidade genética de *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* empregando marcadores microssatélites

Daniela Priori¹; Rosa Lía Barbieri²; Caroline M Castro²; Antonio C de Oliveira¹; Juliana CB Vilela²; Claudete C Mistura¹

¹UFPEL, C. Postal 354, 96010-900 Pelotas-RS; dani_priori@yahoo.com.br; acosta@ufpel.edu.br; c.mistura@gmail.com; ²Embrapa Clima Temperado, C. Postal 403 96010-971 Pelotas-RS; lia.barbieri@cpact.embrapa.br, caroline.castro@cpact.embrapa.br, jcbrancov@gmail.com

RESUMO

No Sul do Brasil são cultivadas variedades locais das cinco espécies domesticadas de *Cucurbita*. Dentre elas, as menos estudadas são *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. Análises de microssatélites são importantes para a caracterização molecular dessas duas espécies, mas existe a necessidade de primers específicos, ainda não disponíveis. O objetivo desse trabalho foi avaliar a transferibilidade de primers e otimizar a amplificação de locos SSR de *C. pepo* em *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*, bem como averiguar a diversidade genética entre diferentes acessos de germoplasma destas espécies. Foram utilizados dez acessos de *C. pepo*, nove de *C. argyrosperma* e cinco de *C. ficifolia* do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. O DNA foi extraído em bulk das folhas de cinco indivíduos de cada acesso. Foram usados 40 primers SSR desenvolvidos para *C. pepo*. Em *C. pepo*, 35 primers (87,5%) amplificaram, em *C. argyrosperma*, 34 primers (85%) e em *C. ficifolia*, 32 primers (80%). Portanto a taxa de transferibilidade de locos SSR de *C. pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* foi alta, indicando que podem ser empregados na caracterização molecular destas espécies.

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

ABSTRACT

Genetic diversity of *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* accessions evaluated through microsatellite markers

Landraces of five domesticated species of *Cucurbita* are cultivated in southern Brazil. Among them *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* are the least studied. Microsatellite markers are important for the molecular characterization of these two species, but there is a need for specific primers, not yet available. The aim of this study was to evaluate the transferability of primers and optimize the amplification of SSR loci in *C. pepo*, *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* and also evaluate genetic diversity in different accessions of germplasm in these species. We used ten accessions of *C. pepo*, nine of *C. argyrosperma* and five of *C. ficifolia* from the Genebank of Cucurbitaceae from Embrapa Temperate Agriculture. DNA was extracted in bulk from the leaves of five individuals of each accession. 40 SSR primers developed for *C. pepo* were used. In *C. pepo* 35 primers (87.5%) amplified, in *C. argyrosperma*, 34 primers (85%), and in *C. ficifolia*, 32 primers (80%). The transferability of SSR loci in *C. pepo* to *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* was 85 and 80% respectively. The transferability of SSR loci from *C. pepo* to *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* was 85 and 80% respectively. Thus, the transferability rate of SSR loci developed for *C. pepo* to *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* was high, indicating that they can be used in molecular characterization of these species.

Keywords: Cucurbitaceae, squashes, molecular characterization, genetic resources, landraces.

(Recebido para publicação em 28 de julho de 2012; aceito em 14 de junho de 2013)

(Received on July 28, 2012; accepted on June 14, 2013)

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). *C. ficifolia* 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. 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). As 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 e baixo custo (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 (*Simple Sequence Repeats*) 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), *Pinus* (González-Martínez *et al.*, 2004), *Triticum* (Adonina *et al.*, 2005) e *Cucumis* (Ritschel *et al.*, 2004). Outro caso de sucesso na transferibilidade de primers microssatélites de *Eutrope edulis* para *E. oleracea* foi relatado por Oliveira *et al.* (2010), onde os sete loci testados apresentaram 100% de aproveitamento.

A Embrapa Clima Temperado mantém o Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas do Sul do Brasil. São conservados 539 acessos de diferentes espécies domesticadas: *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Citrullus lanatus*, *Sicana odorifera*, *Momordica charantia*, *Lagenaria siceraria* e *Luffa cylindrica*. A quase totalidade destes acessos se caracteriza por ser variedades locais cultivadas na Região Sul do Brasil, por agricultores familiares. A caracterização de germoplasma tem grande importância porque estabelece uma identidade para cada acesso do banco, permitindo conhecer dados que possibilitam estudar a diversidade genética existente entre os acessos conservados, molecular, físico-química.

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 locus SSR de *C. pepo* em *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* bem como averiguar a diversidade genética entre diferentes acessos destas três espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma busca no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para selecionar primers

microssatélites já desenvolvidos para *Cucurbita*. Foram selecionados 40 pares de primers SSR (Tabela 1) 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 Austria. Os primers foram selecionados a partir de informações disponíveis como número de alelos e regiões conservadas.

Vinte e quatro acessos de germoplasma coletados na agricultura tradicional do Rio Grande do Sul foram utilizados, sendo nove de *C. argyrosperma*, cinco de *C. ficifolia* e dez de *C. pepo* (Tabela 2). 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 sacos plásticos de poliestireno preto preenchidos com substrato, em casa de vegetação. 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 & 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 volume final de reação 25 µL contendo, 10,2 µL de H₂O, 1,4 µL de 10x PCR Buffer, 1,6 µL de MgCl (50 mM), 1,05 µL de DNTPs (12,5 mM), 1,08 µL de BSA (10 mg/µL), 0,7 µL de cada primer (*Forward* e *Reverse*) 10 µM, 0,04 µL de Taq DNA Polimerase (5 u/µL) e 2,0 µL de DNA (5 ng/µL). 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 a 60°C, conforme a temperatura do primer utilizado. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e tampão TBE1X (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 avalia o 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 amplifica o. O tamanho das bandas foi estimado por meio do programa computacional Bio - 1D Advanced – Vilber Lourmat SAS, 2006 (software de análise).

Os marcadores obtidos foram analisados com o software NTSYS-PC (Rohlf, 2000). Os alelos amplificados foram identificados de acordo com o peso molecular das bandas geradas e convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi estimado: i) o cont do de informa o de polimorfismo (PIC) de cada marcador:

$PIC = 1 - \sum p_i^2 - 1 - \sum p_i^2$ onde, p_i   a frequência ao quadrado do alelo i ; ii) a similaridade genética entre os acessos com o emprego do coeficiente de similaridade de Dice (Dice, 1945) pelo software NTSYS-PC 2.1, conforme a equa o:

$$S_D = \frac{2V_{ij}}{2V_{ij} + W_{ij} + x_{ij}}$$

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

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 correla o cofenética (r), conforme Sokal & Rohlf (1962), por meio do programa computacional NTSYSpc 2.1. Esse coeficiente traduz a rela o momento produto, calculado entre os elementos da matriz original e os da matriz cofenética, resultante da simplifica o proporcionada pelo método de agrupamento, depois da constru o 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 replica es, com a utiliza o do programa computacional Winboot (Yap & Nelson, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar polimorfismo a partir da análise de marcadores microssatélites nas três espécies de *Cucurbita* avaliadas, utilizando primers desenhados para *C. pepo*. O produto das amplifica es foi satisfatório, permitindo verificar que diferentes níveis de transferibilidade foram obtidos (Figura 1). A análise de 24 acessos de *Cucurbita* por meio de 35 iniciadores gerou um total de 105 marcadores SSR, com varia o 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 microssatélites na quantifica o da variabilidade genética presente. Das três espécies analisadas, *C. pepo* apresentou a maior variabilidade.

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,   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 amplifica o 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 amplifica o são mostrados

na Figura 1.

O cont do de informa o de polimorfismo (PIC) variou de 0,09 a 0,89, com média de 0,42, sendo que os iniciadores que evidenciaram maiores informa es 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). Pode-se inferir que os marcadores utilizados foram eficientes na discrimina o dos acessos. Essas observa es estão de acordo com resultados obtidos por Inan *et al.* (2012), os quais relataram um alto grau de polimorfismo avaliando 16 acessos de *C. pepo*, 4 de *C. moschata* e 4 de *C. maxima* com 8 locos ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e 8 locos SRAP (*Sequence Related Amplified Polymorphism*). Foram obtidas 60 bandas polimórficas por meio dos locos ISSR e 71 bandas com os locos SRAP, apresentando valores altos de PIC que variaram de 0,60 a 0,90 com média de 0,73.

Dentre os 40 primers testados para *C. argyrosperma*, verificou-se que 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, sendo que 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 amplifica o foi de baixa qualidade e as bandas não ficaram nítidas para tr s primers, CMTP190, CMTP138 e CMTP193.

A transferibilidade de locos SSR de *C. pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* encontrada no presente trabalho, de 85 e 80% respectivamente, foi menor do que aquela relatada por Yamamoto *et al.* (2001) para a transferência de primers SSR desenhados para maça (*Malus domestica*) e amplificados em p ra (*Pyrus communis*), com 100% de sucesso). No entanto, foi superior ao relatado para a transferibilidade de primers SSR entre diferentes espécies

Tabela 1. Primers desenhados para *Cucurbita pepo* e selecionados para a transferibilidade em *Cucurbita argyrosperma* e *C. ficifolia* (primers designed for *Cucurbita pepo* and selected to the transferability in *Cucurbita argyrosperma* and *C. ficifolia*). Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2011.

Nome	Forward	Reverse	pb	temp.
CMTP46	TTCCCTTCTGCAGAGATGCT	CCATGCGCATAATTGTATCG	142	60
CMTP33	AATGCGTTTGAACAAAGCTG	GGCTGTAAAATTCCTCGAT	171	58
CMTP48	TTTGCAGTACGCTGCAGAAC	GGATCCTTCTCGTGGTGGTA	228	60
CMTP61	TTTGCAGTACGCTGCAGAAC	GGATCCTTCTCGTGGTGGTA	118	60
CMTP86	GCTCTTGGACAAGAATGGTCA	ATGGCTTCTGGTGGTTTGTG	133	60
CMTP131	GCACTTGAATCTTCGTCAAC	CGAGAAAAGAATTAACGAGCA	117	55
CMTP132	CCATTTCCATTTCCATTTCA	AGGTTAGAAACAGGGGAAC	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	AGAAGGAGGAGAGCGGAAAG	ATAAGATCCCAACCCCAACC	357	60
CMTP210	GTGGAAGTTACTGCGATTGG	GCAAAGAATGTCTCAGCAG	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	GTGCCCGTCAGTCGGAAT	TGTCGACGAAGATAGCAATAGCA	100	60
CMTP58	TCGGAGAACTCGACACTCC	TCCCAGCACCATCAGGATAC	102	60
CMTP66	ACGACATGAGGGAAGATTCG	TTCAATGCCATTTCGCTAC	128	60
CMTP84	GCGGTAACAGGTTGTTTGGT	CCATCAGGATACCCTACAAAGG	150	60
CMTP97	CCACACACCAATCGTTGAAG	CGCAGAATCTCGAAACACAA	166	60
CMTP126	ACCTCAAACCCCTTTTGTG	GGAAGAAGAAGGAGGAGGAG	117	57
CMTP120	AACCGGAACACCTTTATGACC	TTCAAGAAGGTTCCGAAGGA	164	60
CMTP130	GCCCATTTCTGGAGAGATAGTA	GAGGAGAGATGCAGAGCAAC	169	57
CMTP144	ATGGCTTCCAAGCTCCTCTT	GTCGGCCATGAGCTTGAG	105	60
CMTP133	TGCTCTTTGAATTCAGCAT	AGGGATCTTCCATTTCCAAT	113	57
CMTP187	AACAATCCTCGCTCAAATC	ATGAAAATGGGAAGCCAGAG	189	60
CMTP219	TTCATCATCGTCAGCAAAGC	GCACATGCAGCACTCTGACT	117	60
CMTP207	GACGAACGAAGCATGTTGAG	GGTCAGCAAGGTCAGAAAGG	156	60
CMTP224	CACCGACGACTCCATCATC	CTTCTTGTCCTCCAAAATCACA	151	60
CMTP261	AAATGCCAGCCCAAATCAT	GATGGCTGCCACTTCTCTA	187	60
CMTP68	CACACCCATTTCAATTTGACC	ATTGATTGGGACGTGAGGAA	180	60
CMTP125	CTTGTTCCGCAGCATCAG	AGTGAGAGGGAGACGCAAAG	115	59
CMTP138	AAAGGTTTCCACATCCTTG	GAAAAGGAAAAAGTGTCAAAG	103	55
CMTP209	TCACTTTACAACCAGAAGCTGA	CACTTTGCTGCTCATCCAC	116	57
CMTP83	TGACCATTTTGAGATTGAGA	CTTCCGGAGACGAAAGAGTC	112	59
CMTP127	TTCCTCTGTTCCGTCAATG	CACAAAAGGGTTTGAGGTT	112	58

pb= pares de base (base pairs), temp. = temperatura de anelamento (annealing temperature).

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

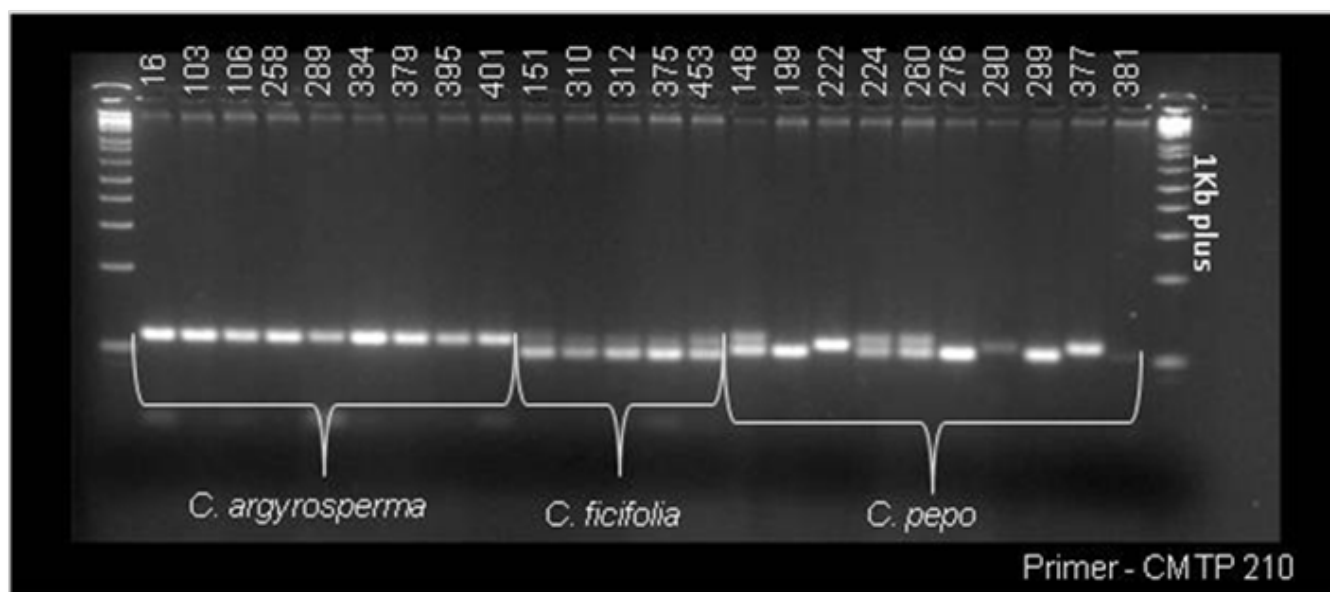
também aos estudos realizados com outras espécies de cucurbitáceas, onde um conjunto de primers de melão (*Cucumis melo*), otimizados e testados em abóbora (*Cucurbita moschata*) e bucha (*Luffa cylindrica*), teve 31,25% de transferibilidade (Leite *et al.*,

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.*

Tabela 2. Acessos de variedades locais de *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* e *C. pepo* do Rio Grande do Sul submetidos à caracterização molecular (accessions of *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* and *C. pepo* landraces from Rio Grande do Sul submitted to molecular characterization). Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 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-estrela	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

**Figura 1.** Perfil de amplificação de acessos de *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* e *C. 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) [profile of amplification for *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* and *C. pepo* accessions from the Genebank of Cucurbitaceae of Embrapa Temperate Agriculture. The PCR products were amplified with the primer SSR - CMTP210 and disclosed in 3.5% agarose gel. Marker: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)]. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2011.

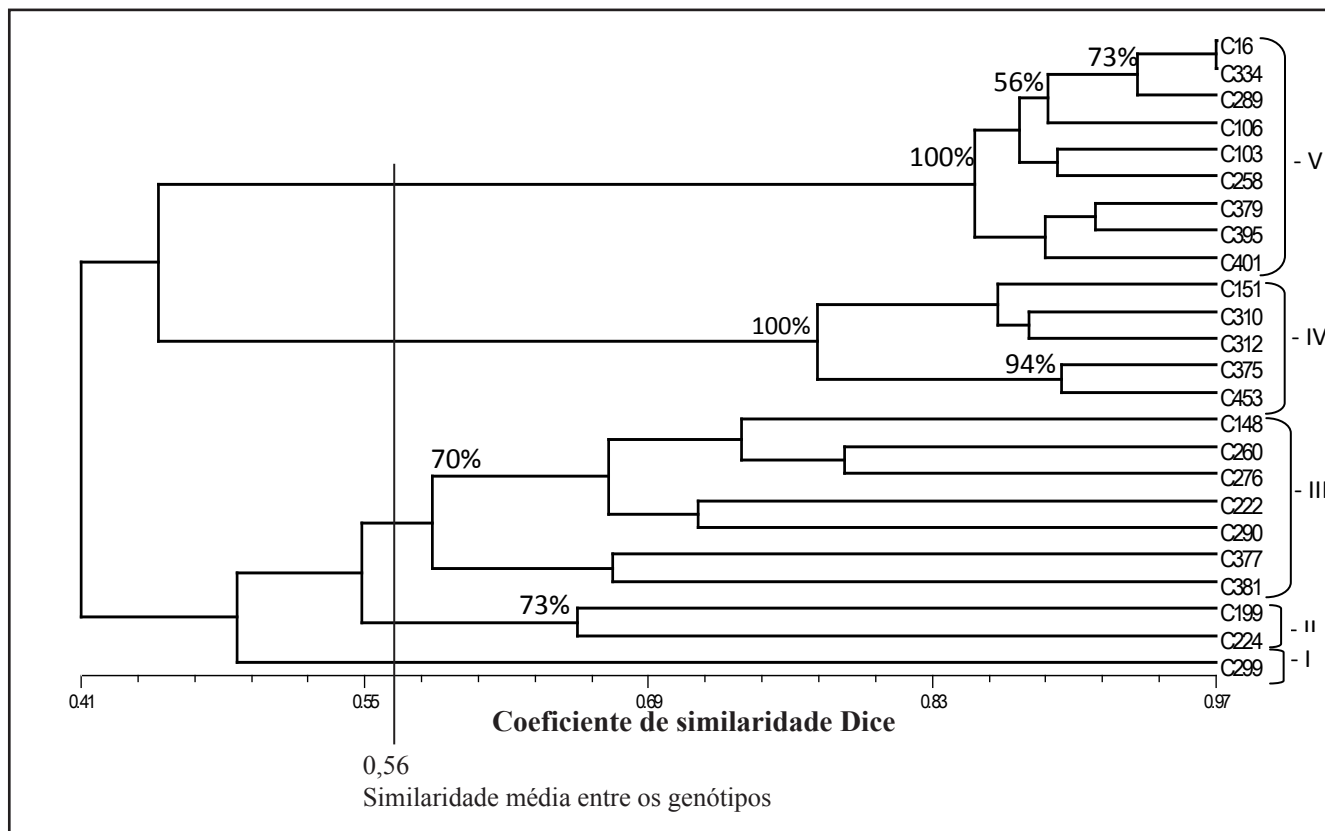


Figura 2. Dendrograma resultante da análise de 24 acessos de *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* e *C. pepo* obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio do coeficiente de Dice, utilizando 35 marcadores SSR. Os valores encontrados nos grupos 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 [dendrogram resulting from analysis of 24 *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia* and *C. pepo* accessions obtained by the UPGMA method of grouping, on the basis of genetic similarity matrix obtained by Dice coefficient using 35 SSR markers. The values found for groups indicate the percentage of times when genotypes grouped together in 1000 cycles of *bootstrapping* analysis. The value of cophenetic correlation coefficient (r) is 0.92]. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2011.

(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 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. 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 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 2.

No grupo I, ficou apenas o acesso C299 (*C. pepo*). No grupo II ficaram dois acessos de *Cucurbita pepo*, C199 e C224, com um agrupamento coincidente de 73%. No terceiro grupo ficaram os acessos C148, C260, C276, C222, C290, C377, e C381 todos da espécie *C. pepo*, sendo que estes acessos apresentaram 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 *C. ficifolia*. Neste grupo os acessos apresentaram 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, C334, C289, C106, C103, C258, C379, C395 e C401. Neste grupo os acessos apresentaram 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.

Os resultados obtidos confirmaram o sucesso da transferibilidade de locos SSR de *C. pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*; portanto, é possível utilizar estes primers de microssatélites na caracterização molecular dessas duas espécies. 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.

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.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

ADONINA IG; SALINA EA; PESTSOVA EG; RÖDER MS. 2005. Transferability of wheat microsatellites to diploid Aegilops species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome. *Genome* 48: 959-970.
BUSSAD WO; MIAZAKI ES; ANDRADE DF.

1990. *Introdução à análise de agrupamentos*. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 105p.
CHEN SY; LIN YT; LIN CW; CHEN WY; YANG CH; KU HM. 2010. Transferability of rice SSR markers to bamboo. *Euphytica* 175: 23-33.
DANIN-POLEG Y; REIS N; TZURI G; KATZIR N. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 61-72.
DICE LR. 1945. Measures of the amount of ecologic association because between species. *Ecological Society of America* 26: 297-302.
FERREIRA MAJF. 2008. Abóboras e morangas: das Américas para o mundo. In: BARBIERI RL; STUMPF ERT. (eds). *Origem e evolução de plantas cultivadas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 59-88.
FERREIRA M; GRATTAPAGLIA D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 220p.
GONG L; STIFT G; KOFLER R; PACHNER M; LELLEY T. 2008. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 37-48.
GONZÁLEZ-MARTÍNEZ SC; ROBLEDO-ARNUNCIÓ JJ; COLLADA C; DIAZ A; WILLIAMS CG; ALÍA R; CERVERA MT. 2004. Cross-amplification and sequence variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 103-111.
HEIDEN G; BARBIERI RL; NEITZKE RS. 2007. *Chave para identificação das espécies de abóboras (Cucurbita, Cucurbitaceae) cultivadas no Brasil*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 31p.
HERNANDEZ P; DORADO G; LAURIE DA; MARTINA; SNAPE JW. 2001. Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop *Miscanthus*. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 616-622.
INAN N; YILDIZ M; SENSOY S; KAFKAS S; ABAK K. 2012. Efficacy of ISSR and SRAP techniques for molecular characterization of some *Cucurbita* genotypes including naked (hull-less) seed pumpkin. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 22: 126-136.
LEITE TL; FERREIRA MA; TARCHETTI BD; FERREIRA MAJF; AMARALZPS; BUSO GSC. 2007. *Análise de transferibilidade de primers microssatélites de Cucumis melo para Cucurbita moschata e Luffa cylindrica*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 10p.
LORIEUX M; NDJONDJOPMN; GHESQUIÈRE A. 2000. A first interspecific *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetical linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 593-601.
OLIVEIRA MSP; SANTOS JB; AMORIM EP; FERREIRA DF. 2010. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. *Ciência e Agrotecnologia* 34: 1253-1260.
PALOP M; PALACIOS C; GONZÁLEZ-CANDELAS F. 2000. Development

- and across-species transferability of microsatellite markers in the genus *Limonium* (Plumbaginaceae). *Conservation Genetics* 1: 177-179.
- PARIS HS. 2001. History of the cultivar-groups of Cucurbita pepo. *Horticultural Reviews* 25: 71-170.
- PRIORI D; BARBIERI RL; NEITZKE RS; VASCONCELOS CS; OLIVEIRA CS; MISTURA CC; COSTA FA. 2010. *Acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado – 2002 a 2010*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 37p.
- RALLO P; TENZER I; GESSLER C; BALDONI L; DORADO G; MARTIN A. 2003. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 940-946.
- RAMOS SRR; QUEIROZ MA. 2005. Recursos genéticos de abóbora no Nordeste brasileiro. In: LIMA CLM. *Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais*. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 99-116.
- RITSCHHEL PS; LINS TC; TRISTAN RL; BUSO GS; BUSO JA; FERREIRA ME. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology* 18: 4-9.
- ROHLF FJ. 2000. *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*, version 2.1. New York: Exeter Software, 98p.
- SANTOS KL; WELTER LJ; DANTAS ACM; GUERRAM.; DUCROQUET JPHJ; NODARI RO. 2007. Transference of microsatellite markers from Eucalyptus spp. to Accasellowiana and the successful use of this technique in genetic characterization. *Genetics and Molecular Biology* 30: 73-79.
- SCHUSTER I; VIEIRA ESN; PADILHA L. 2006. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: BORÉM A; CAIXETA ET. *Marcadores moleculares*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 205-230.
- SHARMA PC; WINTER P; BUNGER T; HUTTEL B; WEINGAND F; WEISING K; KAHLG. 1995. Abundance and polymorphism of di, tri and tetranucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicerari etinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 90: 90-96.
- SOKAL RR; ROHLF FJ. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33-40.
- VALLS JFM. 2001. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS LL. *Recursos genéticos vegetais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 281-305.
- WEIR BS. 1996. Genetic data analysis II - Methods for Discrete Population Genetic Data. *Sinauer Associates* 377 p.
- WUENSCH A; HORMAZA JI. 2002. Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity* 89: 56-63.
- YAMAMOTO T; KIMURA T; SAWAMURA Y; KOTOBUKI K; BAN Y; HAYASHI T; MATSUATA N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 865-870.
- YAPIV; NELSON RJ. 1996. *Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms*. Manila: IRRRI, 22p.
- ZUCCHI MI; BRONDANI RPV; PINHEIRO JB; CHAVES LJ; COELHO ASG; VENCOSKY R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology* 26: 449-457.