



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *cucurbita spp.* USANDO MARCADORES
MOLECULARES**

GUILHERME DIAS ONORATO

Araras

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CUCURBITA SPP. USANDO MARCADORES
MOLECULARES**

GUILHERME DIAS ONORATO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2024

Dias Onorato, Guilherme

Diversidade genética de Cucurbita spp. usando marcadores moleculares / Guilherme Dias Onorato -- 2024.
70f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Monalisa Sampaio Carneiro

Banca Examinadora: Monalisa Sampaio Carneiro,
Rodrigo Gazaffi, André Boldrin Beltrame

Bibliografia

1. Microssatélites . 2. Melhoramento genético. 3. Resistência. I. Dias Onorato, Guilherme. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Guilherme Dias Onorato, realizada em 09/10/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro (UFSCar)

Prof. Dr. Rodrigo Gazaffi (UFSCar)

Prof. Dr. André Boldrin Beltrame (EPAGRI)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, a Professora Dra. Monalisa Sampaio Carneiro, pela orientação, paciência e incentivo, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sua expertise e dedicação foram essenciais para meu crescimento acadêmico.

Agradeço também ao Dr. Thiago William Balsalobre por todos os ensinamentos e pelo apoio inestimável durante minha jornada. Sua orientação na bancada e na análise dos dados foi crucial para meu aprendizado, e sou grato por ter contado com sua ajuda em diversos momentos. Sua disposição para compartilhar conhecimento e solucionar dúvidas fez toda a diferença e me proporcionou uma base sólida para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos, agradeço pelo apoio e pelas trocas de ideias que enriqueceram meu aprendizado.

Um agradecimento especial à minha família, que sempre acreditou em mim e me proporcionou um ambiente de amor e incentivo.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	04
REVISÃO DA LITERATURA	05
1 Importância econômica.....	05
2 Principais espécies de abóbora.....	06
3 Melhoramento genético de abóboras.....	08
4 Marcadores moleculares.....	09
LITERATURA CITADA	15
CAPÍTULO 1. Avaliação molecular de coleções de abóboras e abobrinhas utilizando marcadores moleculares ligados a doenças	18
1 Resumo.....	18
2 Introdução.....	19
3 Materiais e Métodos.....	21
3.1 Material vegetal e extração de DNA.....	21
3.2 Amplificação dos marcadores associados a doenças.....	21
4 Resultados e Discussão.....	24
5 Conclusões.....	32
6 Literatura citada.....	33
CAPÍTULO 2. Análise da diversidade genética em <i>Cucurbita spp</i> usando marcadores moleculares microsatélites	35
1 Resumo.....	36
2 Introdução.....	37
3 Materiais e Métodos.....	38
3.1 Material vegetal e extração de DNA.....	38
3.2 Amplificação de marcadores microsatélites.....	38
3.3 Análise de dados moleculares.....	39

4	Resultados e Discussão.....	40
5	Conclusões.....	51
6	Literatura citada.....	52
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
	APÊNDICE.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Capítulo 1	
Tabela 1. Todos os genótipos avaliados no estudo, seus respectivos códigos, espécies, e nome dos marcadores testados em cada um dos acessos.	25 26
Capítulo 2	
Tabela 1. Número de alelos gerados pelos marcadores listados na primeira coluna, na segunda coluna a faixa de leitura e nas demais colunas o número de alelos gerados pelas três espécies (<i>C. maxima</i> , <i>C. moschata</i> e <i>C. pepo</i>) e híbridos e seus valores de PIC.	41
Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) entre 92 acessos oriundos de 3 espécies de Cucurbita e híbridos.	43
Tabela 3. Distância genética média entre grupos (espécie e híbrido) segundo coeficiente de Jaccard.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Representação do cromossomo 10 de abóbora e mapeamento das regiões de amplificação dos marcadores próximos ao gene CpPM10.1. Os quadrados vermelhos no quadro indicam os marcadores que foram utilizados na pesquisa</p>	14
<p>Capítulo 2</p>	
<p>Figura 1. Componente de análise principal (PCA), gerado pelo software R, para avaliar o agrupamento entre as diferentes espécies da pesquisa.</p>	45
<p>Figura 2. Estrutura genética das variedades de Cucurbita conforme análise do Structure. A distribuição dos indivíduos em quatro clusters ($K = 4$) é mostrada, indicando a estrutura populacional e as relações genéticas entre as variedades</p>	45
<p>Figura 3. Gráfico A: Mediana dos clusters (MedMed K) por número de clusters (K). Mostra a saturação na variabilidade genética a partir de $K = 4$. Gráfico B: Valor médio da verossimilhança (Mean Ln $P(K)$) por número de clusters (K). Indica que $K = 4$ é o modelo ideal, com estabilização dos valores a partir deste ponto.</p>	46
<p>Figura 4. Dendrograma circular filogenético obtido para os diferentes genótipos de cucurbita spp. Os tons de lilás indicam a população de <i>C. pepo</i> avaliada, enquanto o verde escuro corresponde predominantemente à espécie <i>C. maxima</i>, o vermelho indica os <i>híbridos</i> e os tons de verde água representam <i>C. moschata</i>.</p>	48

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CUCURBITA SPP. USANDO MARCADORES MOLECULARES

Autor: GUILHERME DIAS ONORATO

Orientadora: Profa. Dra MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

RESUMO

A abóbora é uma cultura cultivada globalmente, apreciada por seu alto valor nutricional, sendo utilizada tanto na alimentação humana quanto animal, o que tem gerado uma demanda crescente ao longo do tempo. No entanto, algumas espécies enfrentam desafios relacionados à produtividade e resistência, influenciados por diversos fatores, como práticas de manejo inadequadas e a pressão de patógenos. Nesse contexto, a caracterização de acessos de bancos de germoplasma é fundamental para identificar variedades mais resistentes e produtivas. O objetivo deste estudo foi estimar a variabilidade genética de uma população de *Cucurbita* spp utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite e avaliar a resistência genética a doenças por meio de marcadores genéticos específicos associados a esses patógenos. Foram utilizados genótipos de *Cucurbita moschata*, *C. maxima* e *C. pepo*, obtidos do Banco de Germoplasma de *Cucurbita* spp. da UFSCar, Campus Araras. Os resultados mostraram a eficácia dos marcadores SSRs, resultando em uma alta diversidade de alelos polimórficos e permitindo a diferenciação genética entre as espécies estudadas. Além disso, os marcadores associados a genes de resistência a doenças se mostraram eficazes na caracterização genética das plantas, destacando-se como uma abordagem promissora para o avanço do melhoramento genético de abóboras.

Palavra-chave: variabilidade genética, microssatélites, melhoramento genético, resistência.

GENETIC DIVERSITY OF CUCURBITA SPP. USING MOLECULAR MARKERS

Author: GUILHERME DIAS ONORATO

Adviser: Profa. Dra. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

ABSTRACT

Pumpkin is a globally cultivated crop, valued for its high nutritional content, and is used both in human and animal feed, which has led to a growing demand over time. However, some species face challenges related to productivity and resistance, influenced by various factors such as inadequate management practices and pathogen pressure. In this context, the characterization of germplasm accessions is essential to identify more resistant and productive varieties. The objective of this study was to estimate the genetic variability of a *Cucurbita spp.* population using microsatellite molecular markers and to evaluate genetic resistance to diseases through specific genetic markers associated with these pathogens. Genotypes of *Cucurbita moschata*, *C. maxima*, and *C. pepo* were used, obtained from the *Cucurbita spp.* Germplasm Bank at UFSCar, Araras Campus. The results showed the effectiveness of SSR markers, resulting in high diversity of polymorphic alleles and allowing genetic differentiation between the studied species. Additionally, the markers associated with disease resistance genes proved effective in the genetic characterization of the plants, emerging as a promising approach for the advancement of pumpkin genetic improvement.

Key-words: genetic variability, microsatellites, plant breeding, resistance.

INTRODUÇÃO

As espécies da família Cucurbitaceae, do gênero *Cucurbita spp.* estão entre as primeiras cultivadas pelo homem, com evidências de que há mais de 13 mil anos A.C. já haviam sido domesticadas, sendo utilizadas na agricultura das comunidades Maias, Astecas e Incas, por sua qualidade nutricional e facilidade de cultivo. Este gênero é de grande importância econômica, a sua produção mundial é de aproximadamente 30 milhões de toneladas por ano, sendo a China a maior produtora (KESH; YADAV, 2022; ASAD *et al.*, 2019; FAOSTAT, 2023).

Dentro do gênero *Cucurbita spp.*, existem cerca de 27 espécies, mas, quando se trata de abóboras, as espécies de maior interesse comercial são *Cucurbita maxima* (abóbora moranga), *C. moschata* (abóbora-de-pescoço) e *C. pepo* (abobrinha italiana). Estas três espécies são diplóides, com 20 pares de cromossomos ($2n = 2x = 40$). A estrutura genética diferente dessas três espécies de abóbora resulta em uma expressiva diversidade genética, com variabilidade considerável em características como adaptação a ambientes contrastantes, ciclos fenológicos, hábitos de crescimento, morfologia, propriedades nutricionais e resistência a doenças (ZHANG *et al.*, 2021; LIRA-SAADE, 1995).

No Brasil, essas mesmas espécies são amplamente utilizadas comercialmente, com seus frutos consumidos em preparações doces ou salgadas, tanto na forma madura quanto imatura, além dos óleos extraídos de suas sementes (CELESTINO, 2021).

Entretanto, a produção de abóboras apresenta desafios devido a ocorrência de doenças que afetam essas culturas e são geralmente causadas por fungos e vírus e que comprometem o crescimento e a sanidade das plantas. Essas doenças podem se manifestar de diversas formas, incluindo manchas nas folhas, podridão de frutos, murcha das plantas, entre outros sintomas. Algumas das doenças mais comuns que afetam as abóboras incluem oídio, míldio, antracnose, murcha de fusarium e o vírus do mosaico amarelo.

O *Papaya ringspot virus –type watermelon (PRSV-W)* e o *Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)* representam cerca de 60% das perdas envolvendo doenças em *Cucurbita spp.* Em 2016 foi registrado um aumento de 77% de incidência de ZYMV no norte da Índia, que ocasionou no prejuízo de cerca de 75% da

produtividade de abóboras cultivadas na região naquele ano (HOLDSWORTH *et al.*, 2016; ASAD *et al.*, 2019).

O impacto do ZYMV na produção de abobrinha no Brasil em 2020, indicou que 15% da área cultivada foi afetada, ocasionando uma redução média de 20% na produção. Com isso, as variedades menos resistentes apresentaram uma média de 25% de redução na produção. Assim, a implementação de táticas como rotação de culturas, adoção de variedades resistentes e medidas de controle de pragas, são cruciais para mitigar os efeitos adversos do ZYMV na produção de abobrinha. (PEREIRA *et al.*, 2021; SIDRA *et al.*, 2024).

Além do ZYMV e o PRSV-W, o *Powdery Mildew* é outra doença causada por um fungo denominado *Podosphaera xanthii*, que é uma das principais doenças das cucurbitáceas e ocorre em praticamente todas as regiões onde essas plantas são cultivadas. Entretanto, as epidemias da doença são mais intensas em condições de temperaturas elevadas e baixa umidade no campo, ou sob cultivo protegido. A perda por essa doença pode comprometer até 80% da produtividade total por hectare (WANG *et al.*, 2021; CAPOUZZO *et al.*, 2017).

O controle dessas doenças geralmente envolve práticas de manejo cultural, como rotação de culturas, uso de sementes certificadas, controle de ervas daninhas e irrigação adequada, além do uso de controle químico quando necessário (ZHU *et al.*, 2020).

Neste contexto, foram desenvolvidos marcadores moleculares que representam ferramentas avançadas que possibilitam rastrear a presença de genes específicos ou variações em sequências de DNA, frequentemente associadas a características desejáveis. A aplicação desses marcadores no contexto do melhoramento genético de abóboras aceleram os ciclos de aprimoramento genético e a precisão na seleção de genótipos (JIANG *et al.*, 2012).

O melhoramento de plantas envolve a seleção de genótipos considerando-se a variabilidade genética disponível ou produção dela através de cruzamentos entre indivíduos selecionados, de tal forma que se obtenha uma população com genótipos melhorados (CELESTINO, 2021).

O emprego de marcadores moleculares no melhoramento genético de abóboras representa um marco significativo na busca por cultivares mais resistentes e produtivas. Ao mapear a diversidade genética e identificar loci genômicos relacionados à resistência a doenças, os pesquisadores podem direcionar suas

estratégias de melhoramento com maior precisão. Esse enfoque não apenas reduz o tempo de aprimoramento de uma cultura, mas otimiza a seleção de genótipos com características desejáveis. A aplicação de marcadores moleculares não se limita apenas à resistência a doenças, mas abrange características fenotípicas cruciais para o estado sanitário das plantas. Essa abordagem avançada não contribui apenas para a produção de abóboras de alta qualidade e rendimento, bem como desempenha um papel fundamental na construção de sistemas agrícolas mais sustentáveis, promovendo, assim, a segurança alimentar global (JIANG, 2012).

Sendo assim, essa pesquisa utiliza ferramentas da biologia molecular para fazer estimativas das relações alélicas entre os indivíduos, e encontrar variabilidade genética e tolerância a patógenos em variedades de *Cucurbita spp.* para que possam ser efetivamente utilizadas em etapas de um programa de melhoramento genético de abóboras.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estimar a variabilidade genética de uma população de *Cucurbita spp.* através do uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites e marcadores associados a doenças.

Objetivos específicos

- Avaliar a transferibilidade de microssatélites entre as espécies de *Cucurbita spp.*
- Analisar a eficiência de marcadores microssatélites na estimativa da distância genética entre as espécies de *Cucurbita spp.*
- Avaliar o uso de marcadores moleculares específicos associados a doenças em *Cucurbita spp.*

REVISÃO DA LITERATURA

1. Importância econômica

Entre as espécies mais comuns no Brasil, destacam-se a *C. maxima*, *C. moschata* e a *C. pepo*. A *C. maxima*, conhecida como abóbora moranga, é uma hortaliça de grande destaque no mercado, com produção contínua ao longo do ano e alta resistência pós-colheita, podendo ser armazenada em temperatura ambiente por meses (CELESTINO, 2021). Minas Gerais é o principal polo produtor de abóbora cabotiá, que é um híbrido interespecífico de *C. moschata* e *C. maxima*, responsável por aproximadamente 20% da produção nacional. Na região Nordeste, os estados da Bahia, Maranhão, Piauí e Pernambuco são os maiores produtores de abóbora moranga (*C. maxima*) e abóbora de pescoço (*C. moschata*), nessa região os híbridos não são comumente cultivados (CELESTINO, 2021).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), em 2023, com um intervalo de tempo de janeiro a dezembro, a quantidade de comercialização da *C. moschata* foi de 89.496,516 toneladas, da *C. pepo* foi 120.818,644 toneladas e *C. maxima* com 133.315,969 toneladas, sendo Baraúna (RN), Sumidouro (RJ) e Santana de Pirapama (MG) respectivamente, os principais municípios de comercialização dessa cultura.

No Brasil, a agricultura familiar desempenha um papel fundamental, sendo responsável por boa parte dos alimentos que chegam às mesas dos brasileiros, empregando aproximadamente 77% das pessoas ligadas ao setor agrícola. Dentro dessa parcela, o cultivo de hortaliças, como a abóbora, é especialmente relevante devido à sua alta demanda por mão-de-obra em todas as etapas de produção, desde a semeadura até a comercialização. Essa relevância econômica é ressaltada, visto que diversas famílias dependem tanto do consumo quanto da venda dos produtos que cultivam para sua subsistência (OLIVEIRA, 2022).

Os lucros oriundos da produção podem variar de acordo com o período de colheita, sendo impactados pelo equilíbrio entre oferta e demanda. A demanda de mercado geralmente permanece satisfatória, especialmente devido ao aumento no consumo de alimentos mais substanciais e calóricos durante o inverno. Nesse contexto, a baixa temperatura estimula a ingestão desses alimentos, contribuindo

para o aumento da procura por abóboras principalmente da abóbora moranga e favorecendo o mercado durante essa estação do ano (PALMIERI *et al.*, 2018).

Ressaltando que, nos últimos anos, a busca por produtos saudáveis, devido às suas propriedades nutricionais aumentou, a abóbora tem a sua parcela dentro dessa demanda, devido ao seu alto teor em vitaminas A, B, E, K, carotenóides, carboidratos e minerais. Sendo assim, esta cultura tem conquistado consumidores preocupados com a saúde e a qualidade nutricional dos alimentos, esses fatores contribuem para ampliar sua importância econômica e reafirmando seu papel na segurança e nutrição alimentar do país (PALMIERI *et al.*, 2018).

2. Principais espécies de abóboras

A primeira espécie a ser pontuada é a *C. moschata*, que destaca-se por ter um curto ciclo de cultivo e uma alta tolerância a variações climáticas, resultando em uma boa adaptação em diferentes áreas garantindo ao agricultor um retorno rápido do capital investido, além de uma facilidade na colheita e pós-colheita, sem perder o seu valor nutricional (MORAIS, 2019; ALVES *et al.*, 2012). Uma das suas características é a presença de caules compridos, com folhas grandes e lóbulos arredondados. Ela possui pelos que recobrem todas as partes vegetativas das plantas que posteriormente se tornam espinhosas. Seu pedúnculo é sempre arredondado e sem quinas, uma das formas de diferenciá-la da *C. maxima* (FERREIRA *et al.*, 2017).

A segunda espécie é a *C. maxima*, que é comumente cultivada em pequenas propriedades rurais, possuindo uma alta produtividade anual e sendo utilizada na alimentação para o preparo de doces em calda ou em pasta, pratos salgados, ensopados ou cozidos. Desta maneira, é reconhecida como abóbora moranga, e também desfruta de aplicação na alimentação animal devido à suas sementes altamente nutritivas serem utilizadas no preparo de rações animais. Sendo uma espécie que apresenta ampla adaptação ao calor, à umidade, a doenças e insetos (MOUMNI *et al.*, 2022).

A terceira espécie é a *C. pepo* que, demonstra uma diversidade de frutos maior do que outras espécies cultivadas de abóbora, sendo popularmente conhecida como abobrinha ou abobrinha italiana, ademais essa diversidade resulta em uma multiplicidade de usos. Os frutos da *C. pepo* exibem considerável variabilidade

genética em características morfológicas externas da planta, como formato, cor, textura da casca e dureza (KAŽMIŃSKA *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2022). Além da sua relevância econômica, destaca-se como a espécie de maior valor monetário dentro do gênero Cucurbitaceae. A morfologia da superfície do fruto engloba uma ampla gama de características, como textura lisa, nervurada, lobada, sulcada, estriada, enrugada, e combinações destas. Quanto às cores dos frutos, estas variam entre tons de verde, laranja e amarelo, apresentando intensidades e listas nos frutos, que englobam um intervalo quase preto a quase branco. Os padrões de cores observados incluem listrado e bicolor (MARTÍN-HERNANDEZ *et al.* 2021).

Com o crescimento de estudos na área de genética, buscando melhorar as características sensoriais e de produtividade de abóboras, foram desenvolvidos híbridos conhecidos como abóbora cabotiá ou abóbora japonesa, proveniente do cruzamento entre *C. maxima* e *C. moschata*. Esses híbridos são dotados de boas características agronômicas e sensoriais, fazendo com que sua produção se difundisse no Brasil (LIMA *et al.*, 2019).

As características dos híbridos de *C. maxima* x *C. moschata*, são os frutos com casca cor verde escura brilhante e rugosa, formato globular, redondos, levemente achatados com gomos suaves, pesando em média 2,5 kg, sendo cultura de ciclo curto, com hábito de crescimento prostrado, rasteiro, com ramas muito vigorosas e boa cobertura de flores femininas. A floração desta espécie inicia-se, em média, aos 35 dias após o semeio, portanto umas das características marcantes desses híbridos é que as flores masculinas geralmente não produzem pólen viável, por isso necessitam de outras abóboras para funcionarem como polinizadoras. Entretanto, existem outras tecnologias alternativas para substituir a deficiência de pólen: como a polinização manual ou indução artificial por meio de fito-hormônios, visando à frutificação. Possuindo assim, uma conservação pós-colheita prolongada ao ser comparada com cultivares locais, em função das tecnologias utilizadas no plantio, colheita e as características de cada cultivar, pode-se obter uma produtividade média de 8 a 15 toneladas por hectares que contribui para economia de diferentes regiões do país (SANTOS *et al.*, 2017; AMARO *et al.*, 2021).

3. Melhoramento genético de abóboras

O melhoramento genético de abóboras tem como objetivo o alto rendimento de frutos, maturidade precoce, frutos amarelos ou verde escuros, alta concentração de caroteno e resistência contra insetos e doenças (KESH; YADAV 2022). Desta maneira, para obter esses objetivos, é necessário um conhecimento prévio sobre a capacidade de combinação geral e específica dos acessos, de forma que os genótipos sejam úteis para a seleção de genitores para hibridização, e entender como diferentes genes interagem e de que maneira essas interações influenciam nas características desejadas. Dessa forma, a escolha de genitores com características específicas para promover a transmissão desses traços desejáveis, pode envolver a seleção de genótipos que apresentam a combinação certa de alelos para as características alvo e assim projetar a estratégia de reprodução adequada (SHAFIN *et al.* 2021). É importante ressaltar que dentro das espécies de *Cucurbita spp.* existe uma alta heterose, causando a maturação precoce, o aumento do tamanho e número de sementes. Sendo assim, é relevante selecionar os pais mais distantes do germoplasma para o melhoramento híbrido (YULIN *et al.*, 2019).

Uma das principais características de qualidade da comercialização de sementes é a pureza genética, especialmente das sementes híbridas, uma vez que a autopolinização do genitor feminino é uma das principais causas de contaminação (SAWAZAKI *et al.*, 2018). A pureza é importante para alavancar a distribuição de sementes híbridas nacionais de abóbora cabotiá, para garantir uniformidade e estabilidade da produção, e como os critérios morfológicos podem ser influenciados pelas condições ambientais requerendo um alto grau de conhecimento para identificação fenotípica, fazendo com que as metodologias moleculares são altamente desejáveis nesse quesito (SAWAZAKI *et al.*, 2018).

Outro aspecto importante no melhoramento híbrido é a resistência a doenças, elas podem ser causadas por fungos e vírus, afetando diretamente a qualidade e a produtividade dos frutos (HOLDSWORTH *et al.* 2018). O ZYMV (Zucchini Yellow Mosaic Virus) ou simplesmente mosaico amarelo, como é conhecido, infecta todas as espécies agrícolas importantes da família *Cucurbitaceae*, incluindo a *Cucurbita spp.* Sendo assim, é considerado um dos vírus mais destrutivos da produção de cucurbitáceas em todo o mundo (SAWAZAKI *et al.* 2017). Este vírus pertence ao gênero *Potyvirus* e é transmitido de forma não persistente por várias espécies de

pulgões, como o *Aphis gossypii* Glover, além de ser facilmente transmitido mecanicamente, em áreas onde as culturas de cucurbitáceas não são cultivadas continuamente, o vírus sobrevive em hospedeiros alternativos. A infecção natural parece estar limitada a espécies de *Cucurbitaceae*, e quando infectadas com qualquer uma das cepas de ZYMV, reduzem sua capacidade fotossintética, apresentando crescimento atrofiado, com frutos deformados e mortalidade precoce (BURGOS *et al.*, 2018).

Outro vírus relevante, principalmente na produção de abobrinha é o *Papaya ringspot virus-watermelon* (PRSV-W), destacando-se que a cepa geralmente infecta a planta sozinha, mas pode ocorrer simultaneamente com o vírus ZYMV. Os sintomas deste vírus fazem com que as folhas apresentem o limbo foliar atrofiado, interferindo no crescimento das plantas de forma negativa, e apresentando deformidades dos frutos, podendo causar perdas de até 60% na produção, ou até mesmo interrompê-la, afetando seriamente a produtividade da abobrinha e a comercialização dos frutos. Um agente de controle eficiente para esses vírus é cultivar variedades resistentes a doenças por ser a medida mais econômica e eficaz para reduzir os danos (WANG *et al.*, 2021).

Entre as doenças transmitidas por fungos e que predominantemente afetam a *C. moschata* e a *C. pepo*, destacam-se as causadas pelo *Podosphaera xanthii* e *Golovi nomyces cichoracearum*, que causa lesões cloróticas que podem eventualmente levar à morte da planta inteira devido à inibição da fotossíntese. Nesse contexto, torna-se necessário criar medidas para um melhoramento genético efetivo no combate a essas doenças, para que as espécies *C. maxima*, *C. pepo* e *C. moschata* alcancem o seu máximo de produtividade (HOLDSWORTH *et al.*, 2016).

4. Marcadores moleculares

Os marcadores genéticos desempenham um papel crucial na identificação de alelos cuja expressão é difícil de identificar por métodos tradicionais, sendo aplicáveis em pesquisas sobre diversidade genética. Esses marcadores são empregados para diversos propósitos, como estudos evolutivos, testes de paternidade e identificação de genótipos. Uma característica fundamental dos marcadores é a hereditariedade, juntamente com a facilidade de avaliação por meio do fenótipo associado. O marcador deve estar estreitamente relacionado ao seu

alelo correspondente, de modo que a expressão fenotípica do marcador indique inequivocamente a presença do alelo de interesse no indivíduo (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em estudos recentes, destaca-se a relevância dos microssatélites como marcadores moleculares. Essas breves sequências de DNA, conhecidas como *SSR* (*Simple Sequence Repeats*), compreendem repetições de 2 a 6 pares de bases organizadas em sequência. Sua aplicação é fundamental na construção de mapas genéticos, graças à sua codominância, alto polimorfismo e natureza multi alélica. Além disso, os microssatélites desempenham um papel crucial na seleção assistida de retrocruzamentos, proporcionando descobertas valiosas sobre a variabilidade genética em populações (ZHU *et al.*, 2020).

A transferibilidade de marcadores microssatélites entre diferentes espécies de abóbora é um aspecto crucial no estudo da variabilidade genética e no melhoramento genético (VIERA *et al.*, 2016). Destaca-se, assim, a importância desses marcadores na análise da diversidade genética em *Cucurbita spp.*, ressaltando a possibilidade de aplicação em diferentes espécies dentro do gênero. Autores como Medeiros (2006) e Jiang (2012) contribuíram para o entendimento da transferibilidade destes marcadores em contextos mais amplos, indicando sua utilidade em estudos de melhoramento genético envolvendo diferentes variedades de abóboras. Entretanto, essa transferibilidade amplia as aplicações práticas dos microssatélites, permitindo uma abordagem mais abrangente na análise genética e no desenvolvimento de variedades mais resistentes e produtivas. Estudos de transferibilidade de *SSRs* têm revelado que alguns desses marcadores moleculares desenvolvidos para determinadas espécies de *Cucurbita spp.*, apresentam a capacidade de amplificar com sucesso o genoma de espécies diferentes de abóbora pertencentes ao gênero. Essa transferibilidade é muitas vezes associada à proximidade evolutiva entre as espécies, indicando relações genéticas entre diferentes membros da família Cucurbitaceae (MOUMNI *et al.*, 2022).

No contexto de marcadores microssatélites, os dados gerados por eles podem ser usados para calcular a dissimilaridade entre os acessos dentro de uma população que pode ser estimada pelo coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e a partir desses dados genotípicos, um dendrograma utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de Neighbor-Joining (NJ) pode ser utilizado para visualizar as

relações de similaridade genética entre as diferentes espécies analisadas (GARCIA-MAS et al., 2012; HONG et al., 2015).

Além de serem utilizados para obterem os valores de *Polymorphic Information Content* (PIC) e *Expected Heterozygosity* (HE) que são medidas fundamentais para avaliar a diversidade genética em populações utilizando marcadores moleculares como os microssatélites. O PIC quantifica a capacidade de um marcador em discriminar genótipos distintos, enquanto o HE expressa a probabilidade esperada de dois alelos escolhidos aleatoriamente em uma população serem diferentes. Valores mais altos tanto de PIC quanto de HE são desejáveis, indicando marcadores informativos e populações geneticamente mais diversas (BOTSTEIN et al., 1980; NEI, 1978).

A transferência de alelos entre espécies, especialmente os altamente polimórficos, desempenha um papel crucial na compreensão da evolução e na criação de variedades mais resistentes e adaptáveis. Os alelos polimórficos, ao exibirem variação em uma população, frequentemente indicam uma diversidade genética significativa, conferindo-lhes um maior potencial de transferibilidade entre espécies relacionadas (ÖZTÜRK et al., 2022). Esse processo é fundamental nos programas de melhoramento genético, permitindo a incorporação de características desejáveis de uma espécie para outra. Marcadores altamente polimórficos, como os mencionados anteriormente, demonstram eficácia na transferência entre *C. pepo*, *C. moschata* e *C. maxima*. A eficiente transmissão desses alelos pode conferir vantagens adaptativas, como resistência a doenças, tolerância a condições adversas e aprimoramento da qualidade dos frutos (MA et al., 2022).

O estudo realizado por KAZMINSKA et al., 2017 onde foram testados 27 marcadores *SSRs* baseados na região genômica em *C. pepo*, que podem comprovadamente serem usados nas outras duas espécies, *C. maxima* e *C. moschata*, para avaliar variabilidade genética.

Esses resultados reforçam a importância da utilização de marcadores *SSRs* como ferramentas eficazes na análise genética de *Cucurbita* spp., demonstrando a aplicabilidade desses marcadores em diferentes espécies do gênero. A capacidade de transferir esses marcadores entre *C. pepo*, *C. maxima* e *C. moschata* amplia as possibilidades para o melhoramento genético dessas plantas e contribui significativamente para o entendimento da sua diversidade genética (MOUMNI et al., 2022).

Os marcadores associados a resistência genética de doenças também foram desenvolvidos para *Cucurbita spp.*, como é o caso do marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), que são sequências isoladas a partir de um DNA obtido por um marcador aleatório, onde um par de primers foi desenvolvido para flanquear a região que possui o fragmento de interesse, que faz parte de um gene responsável por conferir resistência ao ZYMV em *C. moschata* (KIM *et al.*, 2017). O trabalho de KIM *et al.* (2016) desenvolveu marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e transformou em um marcador SCAR com sucesso, usando linhagens de *C. moschata* resistentes (SP213) e suscetíveis (SP203) ao ZYMV. No total foram 100 primers aleatórios testados, desses primers foram selecionados 4 marcadores RAPD (OPF10, OPF19, OPF20, OPL19) relacionados à resistência ao ZYMV, devido à sua capacidade de discriminar entre linhas resistentes e suscetíveis na análise RAPD.

Com base nos resultados do RAPD foram calculadas similaridades genéticas, portanto a análise de agrupamento e as linhas de *C. moschata* foram segregadas em linhas resistentes e suscetíveis por análise de agrupamento. Assim, um dos marcadores RAPD foi convertido com sucesso em um marcador SCAR (VirSq-F19) e a amplificação do fragmento de 444 pb evidenciou o polimorfismo gerado do marcador dentro desta espécie, diferenciando os genótipos resistentes dos suscetíveis, com isto, este marcador pode ser usado como uma ferramenta para predição da resistência genética ao ZYMV de abóboras pertencentes à espécie *C. moschata*.

O trabalho de SAWAZAKI *et al.* (2018) também desenvolveu um marcador molecular específico para um gene de resistência da doença ZYMV, mas ele foi desenvolvido para populações de *C. pepo*. O marcador molecular, do tipo SCAR, foi concebido por meio da avaliação de marcadores RAPDs polimórficos. Durante a análise, observou-se que dois marcadores polimórficos, denominados 826R e 26F, estavam fortemente associados à região MG888015, região próxima ao gene de resistência. Esses marcadores foram capazes de amplificar um fragmento de 791 pb exclusivamente na cultivar resistente Px7051, não sendo detectado na cultivar suscetível La Belle.

O estudo conduzido por HOLDSWORTH *et al.* (2016) resultou no desenvolvimento de um marcador molecular, para a identificação de genótipos resistentes ao *Powdery Mildew* em *C. moschata* e *C. pepo*. O gene Pm0,

responsável pela resistência, foi identificado e mapeado em um intervalo genômico de 516.4 kb, com mais de 50.000 marcadores de *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*), que foram gerados por genotipagem e sequenciamento, e os marcadores *CAPS* (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) desenvolvidos facilitam a seleção assistida por marcadores. Contudo, a resistência ao *Powdery Mildew*, foi confirmada em diversas cultivares por mapeamento de associação em diferentes populações, destacando-se a relevância prática do gene Pm0. Além disso, o estudo forneceu informações sobre a herança do gene Pm0, descrevendo-a como dominância incompleta. As análises genéticas revelaram recombinações em torno do gene Pm0, indicando sua incorporação em novas cultivares, por isso, marcadores *CAPS*, como NBS_S9_1495924 e S9_1539675, destacaram-se como ferramentas práticas para a seleção de plantas resistentes ao *Powdery Mildew*. A aplicação do marcador molecular NBS_S9_1495924 nas populações de *C. moschata* e *C. pepo* permitiu a classificação mais precisa de plantas como suscetíveis ou resistentes geneticamente ao *Powdery Mildew*, devido a característica do marcador molecular ser co-dominante, conseguindo distinguir os genótipos heterozigotos e homozigotos, sendo o marcador S9_1539675 utilizado para fins de verificação e validação adicional na análise.

Além deste marcador, WANG *et al.* (2021) desenvolveu outro conjunto de marcadores para mapear o gene CpPM10.1, conhecido por conferir resistência genética ao *Powdery Mildew* em abóboras da espécie *C. pepo*. Este conjunto inclui dezenove marcadores *CAPS* e três marcadores *In-Dels* (*insertion-deletion*). Após testes, constatou-se que onze marcadores *CAPS* e um marcador *In-Del* foram polimórficos entre as linhagens parentais e sua prole F1. Posteriormente, dois marcadores M2333343 e M2716228, com um intervalo genômico de 51,6 kb entre eles, foram empregados na genotipagem de 1400 indivíduos da geração F2, resultando na identificação de sessenta e seis recombinantes nessa população, o estreitamento do intervalo candidato e a identificação de recombinações, ainda era necessário para contribuir para um melhor entendimento da localização precisa do gene em relação aos marcadores genéticos.

Nesse contexto, mais marcadores foram desenvolvidos dentro desse intervalo para diminuir a distância dos marcadores em relação a região do gene e tornar a análise mais precisa, e dentro desses marcadores desenvolvidos três deles se mostraram promissores para predizer a região onde se encontra o gene de

resistência ao *Powdery Mildew*, sendo eles o M2454200, M2475244 e M2467704 que foram escolhidos como candidatos para a análise molecular em *C. pepo*, devido à sua proximidade ao gene de resistência no cromossomo 10, conforme destaca a figura 1, e à característica de co-segregação desses marcadores com as linhagens F2 de *C. pepo* (WANG *et al.* 2021).

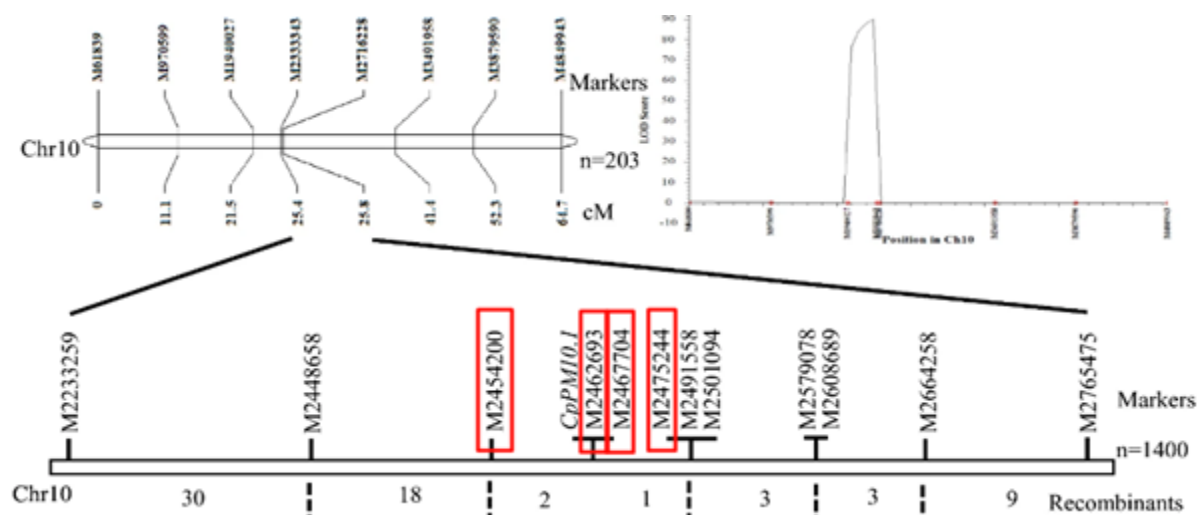


Figura 1: Representação do cromossomo 10 de abóbora e mapeamento das regiões de amplificação dos marcadores próximos ao gene CpPM10.1. Os quadrados vermelhos no quadro indicam os marcadores que foram utilizados na pesquisa.

LITERATURA CITADA

- ALVES, J. et al. Processed breads with pulp and pumpkin seed flour kabutia (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). **Revista de alimentação humana**, v. 18, n° 3, p. 71-72, 2012.
- AMARO, M. et al. Recomendações técnicas para o cultivo de abóboras e morangas. **Embrapa Hortaliças**, 2021.
- ASAD, A. et al. Characterization of *Cucurbita pepo* and *Cucurbita maxima* accessions based on morphological traits. **Horticulture Science**, v. 56, n. 4, p. 467-474, 2019.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 32, p. 314–331, 1980.
- BURGOS, J. et al. Inheritance of Resistance to Zucchini Yellow Mosaic Virus in Watermelon. **HORTSCIENCE**, v. 53, p. 1115–1118, 2018.
- CELESTINO, F. **Análise da produção de abóbora (*Cucurbita*) na região Nordeste: uma revisão bibliográfica**. Monografia, AGES, Paripiranga, 2021.
- FAOSTAT. **Área colhida, rendimento e produção nos principais países produtores de abóbora**. São Paulo, n° 230, p. 21–29, 2023.
- FERREIRA, E. et al. Análise de variância e de agrupamento de acessos de abóbora para uso em programas de melhoramento genético. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 106–111, 2017.
- GARCIA-MAS, J. et al. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(29), 11872–11877, 2012.
- HOLDSWORTH, A. et al. Cultivar-Based Introgression Mapping Reveals Wild Species-Derived Pm-0, the Major Powdery Mildew Resistance Locus in Squash. **Plus One**, v. 11, n. 2, 2016.
- HOLDSWORTH, A. et al. Breeding for resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita pepo*. **Horticultural Research**, v. 5, n. 3, 2018.
- JIANG, Y. Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. **In Plant Breeding from Laboratories to Fields**, Open Access, 2012.
- KESH, S. & YADAV, A. Recent advances in genetics and breeding of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 2022.
- KIM, H. et al. Development of RAPD and SCAR Markers Related to Watermelon Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus Resistance in *Cucurbita moschata*. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, v. 57, n° 1, p. 61–64, 2016.

KIM, H. et al. Discovery of molecular markers associated with resistance to the Cucurbita yellow mosaic virus. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 292, p. 165-178, 2017.

KAŹMIŃSKA, A. et al. Genetic diversity of squash (*Cucurbita maxima* Duchesne) genotypes. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 61, n° 5, p. 817-824, 2020.

LIMA, R. et al. Qualidade de abóbora: Definição, Características e Análise. **Embrapa**, 2019.

LIRA-SAADE, R. Genetic variability in *Cucurbita pepo*. **Plant Breeding**, v. 114, n. 4, p. 341-346, 1995.

MA, H. et al. Insights into genetic variations in *Cucurbita* species based on SNP analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

MARTÍN-HERNANDEZ, A. et al. Characterization of *Cucurbita* accessions for fruit quality traits. **Horticulturae**, v. 7, n. 3, p. 56, 2021.

MEDEIROS, J. A análise da diversidade genética em *Cucurbita pepo*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 29, p. 12-16, 2006.

MOUMNI, M. et al. Study of genetic diversity in local pumpkin cultivars using SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 69, p. 673-685, 2022.

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. **Columbia University Press**, New York, 1978.

OLIVEIRA, J. et al. Diversity of *Cucurbita pepo* accessions in Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 148, n. 3, p. 234-245, 2006.

OLIVEIRA, L. Genetic resources and breeding strategies for *Cucurbita moschata*. **Plant Science Today**, v. 9, p. 22-28, 2022.

ÖZTÜRK, E. et al. Genetic diversity and relationships among *Cucurbita* accessions using molecular markers. **Scientia Horticulturae**, v. 296, 2022.

PALMIERI, L. et al. Genetic mapping of disease resistance in *Cucurbita* species. **Molecular Breeding**, v. 38, n. 8, 2018.

PEREIRA, L. et al. Genetic variation in pumpkin species assessed through morphological traits. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 123-129, 2021.

SAWAZAKI, H. et al. Genetic analysis of disease resistance in *Cucurbita*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 9, p. 2053-2067, 2017.

SAWAZAKI, H. et al. The importance of genetic resources in breeding *Cucurbita*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 535-540, 2018.

SHAFIN, K. et al. Molecular characterization of Cucurbita accessions using SSR markers. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 200-208, 2021.

SIDRA, M. et al. Assessing the genetic diversity of pumpkin (Cucurbita pepo L.) populations in Turkey. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 12, n. 1, 2024.

SANTOS, A. et al. Morphological and molecular characterization of Cucurbita accessions. **Brazilian Journal of Plant Breeding**, v. 37, n. 4, p. 557-564, 2017.

VIERA, M. et al. Genetic structure of Cucurbita pepo populations in Brazil. **Plant Genetic Resources**, v. 14, n. 1, p. 18-28, 2016.

WANG, Y., Qi, C., Luo, Y. et al. Identification and mapping of CpPM10.1, a major gene involved in powdery mildew (race 2 France of Podosphaera xanthii) resistance in zucchini (Cucurbita pepo L.). **Theor Appl Genet** 134, p. 2531–2545, 2021.

YULIN, Z. et al. Genetic diversity and population structure of Cucurbita moschata in China. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 1, p. 15-25, 2019.

ZHANG, X. et al. Insights into the genetic diversity of Cucurbita pepo based on SSR markers. **Plant Breeding**, v. 140, n. 1, p. 34-42, 2021.

ZHU, H. et al. Analysis of genetic diversity in Cucurbita using SNP markers. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 3, p. 763-772, 2020.

ZHU, H. et al. The potential of molecular markers in Cucurbita breeding. **Plant Science Today**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2016.

CAPÍTULO 1. Avaliação molecular de coleções de abóboras e abobrinhas utilizando marcadores moleculares ligados a doenças

1. Resumo

Este estudo investigou a resistência a doenças em *Cucurbita spp.* por meio de marcadores moleculares específicos para doenças. Foram analisados 47 acessos de *Cucurbita moschata* e *C. pepo* para identificar regiões de resistência ao *Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV)*, ao *Papaya Ringspot Virus Watermelon (PRSV-W)* e ao *Powdery Mildew*. A presença do alelo de resistência ao *ZYMV* foi detectada em 83,3% dos genótipos de *C. pepo* e em 95,7% dos genótipos de *C. moschata*, utilizando marcadores *SCAR* e *CAPS*. Em relação à resistência ao *PRSV-W*, 62,5% da população apresentou o alelo correspondente. Para o *Powdery Mildew*, 52,2% dos genótipos de *C. pepo* foram classificados como resistentes, enquanto 62,5% dos genótipos de *C. moschata* mostraram a presença do alelo de resistência, com base em marcadores *In-del* e *CAPS*. As variações nas taxas de resistência observadas entre os marcadores sugerem um controle genético poligênico para ambas as doenças. Esses resultados enfatizam a importância de uma abordagem integrativa na seleção de marcadores para uma análise abrangente da resistência genética, o que é essencial para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes e eficientes.

Palavras chaves: Resistência; Genética; Seleção; ZYMV; PRSV; Powdery Mildew.

2. Introdução

As espécies de *Cucurbita spp.*, como *Cucurbita maxima*, *C. moschata* e *C. pepo*, têm grande importância econômica devido ao seu valor comercial e a ampla utilização alimentar, tanto humana quanto animal. Além disso, seu cultivo tem forte relevância no Brasil, onde os frutos são consumidos em diversas formas, como em preparações doces e salgadas, e os óleos extraídos das sementes também são apreciados (CELESTINO, 2021). No entanto, apesar de sua importância, essas espécies enfrentam sérias ameaças relacionadas a patógenos como o *Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV)*, *Papaya Ringspot Virus - Watermelon (PRSV-W)* e o *Powdery Mildew*, que comprometem a produtividade e a qualidade dos cultivos, afetando diretamente a agricultura no Brasil e no mundo.

O melhoramento genético de abóboras, tem como objetivo aumentar a resistência a essas doenças e melhorar outras características agrônomicas, como a produtividade e a adaptação a diferentes condições ambientais. As cultivares de *C. moschata* e *C. pepo*, especialmente, têm sido alvo de estratégias de melhoramento que visam a identificação de genes de resistência por meio do uso de marcadores moleculares, a diversidade genética dessas espécies, observada nas variações morfológicas, ciclos fenológicos e resistência a doenças, é uma característica fundamental no desenvolvimento de cultivares mais adaptáveis (ZHANG et al., 2021; KOUAGO et al., 2024; GOMES et al., 2024).

Além disso, como essas espécies são diplóides, com 20 pares de cromossomos ($2n=2x=40$), elas apresentam uma base genética que permite a exploração de diferentes estratégias de melhoramento, visando o aumento da resistência, a aplicação de marcadores moleculares do tipo *SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)*, *CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)*, *SNP (Simple Sequence Repeats)* e *In-dels (insertion-deletion)* tem o potencial de revolução dentro do melhoramento genético de *Cucurbita spp.* já que esses marcadores permitem a identificação de genes associados à resistência genética a doenças e outras características agrônomicas importantes para os melhoristas, em estágios iniciais das plantas, acelerando o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a condições ambientais variadas e mais resistentes a doenças. Além de melhorar a eficiência do melhoramento de culturas, esses avanços contribuem para

a sustentabilidade da produção agrícola e para a segurança alimentar global (ZHONG *et al.*, 2023; HOSEN *et al.*, 2021).

O processo de introgressão de resistência a patógenos em plantas do gênero *Cucurbita spp.*, especialmente aquelas que estão sob controle complexo (poligenia), pode ser demorado e nem sempre resulta em resistência efetiva no campo. Uma abordagem mais eficaz para introduzir diferentes genes de resistência em um genótipo é combinar a seleção fenotípica com a seleção assistida por marcadores, de forma sistemática, a fim de estimar a resistência ou os diversos níveis de resistência das plantas (CAPUOZZO *et al.*, 2017). O uso de marcadores moleculares na associação com esses genes têm se mostrado uma estratégia viável, rápida e economicamente sustentável (SHRESTHA *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021; VERMA *et al.*, 2023).

No entanto, a eficácia dessa abordagem pode variar, pois a expressão dos genes de resistência é influenciada por fatores alélicos (as diferentes versões de um gene) e condições ambientais, que podem afetar a análise de ligação. Esta análise permite avaliar como genes relacionados estão agrupados no cromossomo e como a interação entre eles e o ambiente pode influenciar a resistência das plantas a patógenos (OTT *et al.*, 2015). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o polimorfismo molecular em genótipos de *C. pepo* e *C. moschata* por meio do uso de marcadores moleculares específicos associados a doenças.

3. Material e Métodos

3.1 Material vegetal e extração de DNA

No presente estudo foram utilizados 47 acessos de *Cucurbita* spp., sendo 23 genótipos de *C. moschata* e 24 de *C. pepo*. Todos os acessos foram oriundos do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA UFSCar) em Araras - SP, essa coleção é um material melhorado e pertence a linhas avançadas de um programa de melhoramento. As plantas foram cultivadas em vasos na casa de vegetação por cerca de 30 dias. Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foliar congelado foi utilizado na extração de DNA total de acordo com Aljanabi (1997). A quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® One (Thermo Scientific), e as amostras foram armazenadas posteriormente a -20°C até a sua utilização.

3.2 Amplificação dos marcadores associados a doenças

Para análise da região genômica associada a resistência ao ZYMV em *C. pepo* foram utilizados marcadores do tipo SCAR propostos por CAPOUZZO *et al.*, (2017) e SAWAZAKI *et al.*, (2018), e um marcador do tipo CAPS proposto por KIM *et al.*, (2017) foi usado em genótipos de *C. moschata*. Para avaliar a resistência genética ao PRSV-W em *C. pepo* foi utilizado o marcador do tipo SCAR de SAWAZAKI *et al.*, (2018). A presença da região associada à resistência ao Powdery Mildew foi avaliada com os marcadores de *In-del* e CAPS propostos por WANG *et al.*, (2021) em *C. pepo* e por um marcador do tipo CAPS que pode ser utilizado para de *C. pepo* e *C. moschata* de HOLDSWORTH *et al.*, (2016).

As condições de reação de PCR (*polymerase chain reaction*) do marcador SC522₉₄₅, desenvolvido por SAWAZAKI *et al.*, (2018), seguirão a metodologia descrita pelo próprio autor. A reação foi composta por 4 µL de DNA genômico (50 ng/µL⁻¹), 1,5 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,2 µL de dNTPs (2,5 mM), Taq DNA polymerase (5u/µL⁻¹) e 1,5 µL de cada primer, com volume final de 15 µL. A reação foi realizada no termociclador Thermo Fisher Scientific SimpliAmp™. A programação de ciclo inicial foi de 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min para anelamento dos primers e 72°C por 1 min e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Para

marcador 408PRSV/552PRSV de SAWAZAKI *et al.*, (2018) as condições de amplificação e volume da reação, por serem desenvolvidas pelo mesmo autor, foram idênticas às do marcador SC522₉₄₅, exceto pela temperatura de anelamento que foi de 44°C para esses primers. O resultado dos produtos amplificados por PCR foram analisados em gel de agarose 2% com uso de DNA ladder de 100pb e 1kb (Invitrogen), corados com brometo de etídio 1% e visualizados em luz ultravioleta.

Para o marcador SNP1/CAPS desenvolvido por CAPUOZZO *et al.*, (2017), as condições de amplificação seguiram conforme as de SAWAZAKI *et al.*, (2018). Os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease *BglII*, com as seguintes condições: 15 uL do produto de PCR, 2 uL de *Cutsmart buffer* e 0,5 uL de enzima *BglII* com o volume final de 20 uL e incubada a 37 °C por 2 horas. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% com uso de DNA ladder de 100pb (Invitrogen), corados com brometo de etídio 1% e visualizados em luz ultravioleta.

As condições de amplificação do marcador M2467704 de WANG *et al.* (2021) foi realizada com 4 µL de DNA genômico (50 ng/µL⁻¹), 1,5 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,2 µL de dNTPs (2,5 mM), Taq DNA polymerase (5u/µL⁻¹) e 1,5 µL de cada primer, totalizando um volume final de 15 µL. O termociclador Thermo Fisher Scientific SimpliAmp™ foi utilizado com uma programação de ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, com um ciclo de extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *HindIII* a 37 °C por 2 horas. Em seguida, os produtos de restrição foram revelados através do gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio 1%, e visualizados sob luz ultravioleta. Foram utilizados marcadores de peso molecular (ladder) de 1kb e 100 pb (Invitrogen) na análise do gel.

Para os marcadores M2454200 e M2475244 propostos por WANG *et al.* (2021) a reação de PCR foi realizada com volume final de 15 uL, composto por 3 uL de DNA genômico (50 ng/uL⁻¹), tampão 1X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq DNA polimerase (5u/µL⁻¹) e 0,26 uM de cada primer. A programação de PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos, de 95°C por 40 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 45 seg, com uma extensão final de 72°C por 6 min. Os produtos obtidos pelos marcadores foram analisados em gel de poliacrilamida 6%, e corados com prata,

com o uso de DNA ladder de 50 pb e 10 pb (Invitrogen) sob as condições de CRESTE *et al.* (2001) com algumas modificações.

O marcador NBS_S9_1495924 desenvolvido por HOLDSWORTH *et al.* (2016), teve a reação de PCR realizada com 4 μL de DNA genômico ($50 \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$), 1,5 μL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,5 μL de MgCl_2 (25 mM), 1,2 μL de dNTPs (2,5 mM), Taq DNA polymerase ($5 \text{ u}/\mu\text{L}^{-1}$) e 1,5 μL de cada primer, totalizando um volume final de 15 μL . O termociclador (Thermo Fisher Scientific SimpliAmp™) foi utilizado com uma programação de ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, com um ciclo de extensão final a 72°C por 7 min. A digestão dos produtos amplificados foi realizada com a enzima de restrição *HaeIII* a 37°C por 2 horas. Os fragmentos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando tampão TBE 1X e ladder de 1Kb (Invitrogen), seguida da coloração com brometo de etídio 1% e visualização em luz ultravioleta.

4. Resultados e Discussão

As análises moleculares das regiões genômicas associadas à resistência ao ZYMV foram realizadas usando os marcadores SCAR SC522₉₄₅ de SAWAZAKI *et al.* (2018) e SNP1/CAPS de CAPUOZZO *et al.*, (2017). A tabela 1 apresenta os resultados obtidos desses marcadores e os demais resultados obtidos neste estudo através do uso dos marcadores moleculares.

Tabela 1 : Todos os genótipos avaliados no estudo, seus respectivos códigos, espécies, e nome dos marcadores testados em cada um dos acessos.

Nome do Genótipo	Espécie	VirSq-F19	SNP1/CAPS	SC522945	NBS_S9_1495924	M2475244	M2467704	M2454200	408PRSV/552PRSV
CCA001	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA002	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA003	C. moschata	R	-	-	S	-	-	-	-
CCA004	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA005	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA006	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA007	C. moschata	R	-	-	S	-	-	-	-
CCA008	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA009	C. moschata	R	-	-	S	-	-	-	-
CCA010	C. moschata	R	-	-	S	-	-	-	-
CCA011	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA012	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA013	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA014	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA015	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA016	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA017	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA018	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA019	C. moschata	R	-	-	S	-	-	-	-
CCA020	C. moschata	R	-	-	S	-	-	-	-
CCA021	C. moschata	R	-	-	S	-	-	-	-
CCA022	C. moschata	S	-	-	S	-	-	-	-
CCA023	C. moschata	R	-	-	R	-	-	-	-
CCA024	C. moschata	R	R	R	S	1	0	1	S
CCA025	C. pepo	-	R	S	S	1	1	1	R
CCA026	C. pepo	-	R	R	S	1	1	1	R
CCA027	C. pepo	-	R	R	R	1	1	1	S
CCA028	C. pepo	-	R	R	S	0	1	1	R
CCA029	C. pepo	-	R	R	R	0	1	1	R

CCA030	C. pepo	-	R	R	S	0	1	0	S
CCA031	C. pepo	-	R	S	R	0	1	1	S
CCA032	C. pepo	-	R	S	R	1	1	0	R
CCA033	C. pepo	-	R	R	S	0	1	0	S
CCA034	C. pepo	-	R	R	S	1	1	1	S
CCA035	C. pepo	-	R	R	R	1	0	0	R
CCA036	C. pepo	-	R	R	S	1	1	1	R
CCA037	C. pepo	-	R	R	R	1	1	0	S
CCA038	C. pepo	-	R	R	S	1	1	0	S
CCA039	C. pepo	-	R	R	R	1	1	1	R
CCA040	C. pepo	-	R	R	S	1	1	1	R
CCA041	C. pepo	-	R	R	R	1	1	1	R
CCA042	C. pepo	-	R	R	R	0	1	1	R
CCA043	C. pepo	-	R	S	S	-	-	-	S
CCA044	C. pepo	-	R	R	S	1	0	0	R
CCA045	C. pepo	-	R	R	S	0	0	0	R
CCA046	C. pepo	-	R	R	R	1	1	1	R
CCA047	C. pepo	-	R	R	R	1	1	1	R
% de indivíduos R	-	95,70%	100%	83,30%	55,3 %	-	-	-	62,50%

VirSq-F19 (Kim *et al.*, 2016). SCAR SC522945, 408PRSV/552PRSV (Sawazaki *et al.*, 2018). NBS_S9_1495924 (Holdsworth *et al.*, 2016). SNP1/CAPS (Cappozzo *et al.*, 2017). M2475244, M2467704, M2454200 (Wang *et al.*, 2021).

A avaliação do polimorfismo usando o marcador SCAR SC522₉₄₅ revelou que dos 24 acessos de *C. pepo*, 83,3% apresentaram o fragmento do marcador. Os resultados obtidos por meio do marcador SNP1/CAPS mostram que 100% dos genótipos de *C. pepo* apresentam o alelo de resistência à doença (Tabela 1). O marcador SCAR SC522₉₄₅ é do tipo SCAR, portanto com herança dominante, que foi obtido a partir de estudo que realizou cruzamento entre Px7051 (resistente) e La Belle (suscetível). O marcador SNP1/CAPS foi desenvolvido a partir da conversão de um SNP (SNP1), identificado a partir da genotipagem de uma progênie oriunda do cruzamento entre o acesso 381 (resistente) e True French (suscetível). Desta forma, o marcador SNP1/CAPS permitiu a distinção, na população amostral, de genótipos homozigotos resistentes, homozigotos suscetíveis e heterozigotos, devido a herança co-dominante. Na região genômica contendo o SNP1 foram identificadas proteínas da classe CNL (*coiled coil*, sítios de ligação de nucleotídeos *leucine-rich_repeats*) e helicase RNA-dependente de ATP. Também nesta região foi observado a co-segregação com o gene *Zym-1* que é essencial para expressão da resistência ao ZYMV (CAPUOZZO *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com as descobertas de AMOROSO *et al.* (2022) que utilizou esse mesmo marcador para avaliar a resistência genética ao ZYMV na sua população de *C. pepo*, e os dados demonstram que cerca de 87% dos indivíduos resistentes efetivamente no campo, apresentaram o marcador SNP1 junto a reação fenotípica da resistência à doença.

A alta frequência dos alelos de resistência em *C. pepo* pode ser explicada pela abordagem clássica adotada nos programas de melhoramento para o desenvolvimento de novas cultivares de abóboras, onde a maior parte das variedades comerciais modernas consiste em linhagens puras, onde ocorre uma seleção a favor dos genótipos resistentes. Além de que o material utilizado nessa pesquisa já é melhorado e vem de linhas avançadas de programa de melhoramento em andamento. Sendo assim, a espécie mantém um alto nível de pureza, com os mesmos genitores predominando uma base genética a favor dos resistentes na maioria dos cultivares da mesma espécie. Assim, os alelos identificados exibem alta homozigose, porque os genitores escolhidos, devido à sua resistência e produtividade, são recorrentemente utilizados nos cruzamentos. Por isso, esses alelos têm maior probabilidade de ocorrer em frequências mais altas entre os

descendentes (ANDOLFO *et al.*, 2021). No entanto, não se descarta a possibilidade de estarem presentes, embora em menor frequência, em outros genótipos silvestres (AMOROSO *et al.*, 2022).

A concordância entre os marcadores genéticos de SAWAZAKI *et al.*, (2018) e CAPUOZZO *et al.*, (2017) revela uma consistência de 82% entre os dados gerados pelos marcadores destes autores, indicando que a maioria dos dados dos marcadores são idênticas. Essa concordância ressalta a complexa genética aplicada nos mecanismos de resistência ao ZYMV em *C. pepo*, que podem ser controlados por múltiplos genes envolvidos na determinação dessa característica, cada um contribuindo com um efeito aditivo. A maioria das variedades comerciais de *C. pepo* apresenta resistência a essa doença, devido a diversos fatores como a pressão de seleção ao longo do tempo, linhagens avançadas em programas de melhoramento e retrocruzamentos. Sendo assim, o genótipo sugere que essas regiões dos marcadores podem estar associadas e estar sendo transmitidas conjuntamente. Em outras palavras, genótipos identificados como resistentes por um marcador tendem a ser consistentemente identificados como resistentes por outro marcador para a mesma doença, mesmo que eles estejam em posições diferentes no genoma que pode servir como uma validação adicional na avaliação da resistência ao ZYMV, usando marcadores moleculares (KAUR *et al.*, 2022).

A resistência genética ao ZYMV também foi avaliada em genótipos de *C. moschata* através do marcador VirSq-F19. Os resultados mostraram que 95,7% dos indivíduos de *C. moschata* apresentaram o alelo associado à resistência. O marcador VirSq-F19 foi desenvolvido a partir de uma população segregante coreana (SP213 x SP203) através da conversão de marcador RAPD em SCAR, cuja herança é dominante conforme descrito em (KIM *et al.* 2016).

Os genes de resistência encontrados em *C. moschata* são extremamente importantes para o cruzamento interespecífico entre *C. maxima* x *C. moschata*, pois ela é a fonte de resistência à doença nos híbridos. Os genótipos resistentes identificados pelo marcador de herança dominante de KIM *et al.* (2016) podem ser candidatos promissores para avaliar os cultivares adequados para esse cruzamento (KAUR *et al.*, 2020).

No presente estudo, a avaliação molecular da resistência ao PRSV-W foi realizada em 24 genótipos de *C. pepo*, utilizando os primers 408 PRSV / 552

PRSV os resultados mostram que 62,5% dos indivíduos apresentaram a presença do alelo de resistência (Tabela 1).

Considerando os genótipos de *C. pepo* avaliados, 58,82% apresentaram simultaneamente os dois marcadores associados com a resistência ao ZYMV e PRSV-W desenvolvidos por SAWAZAKI *et al.*, (2018). As resistências ao ZYMV e PRSV-W conjuntamente, vem sendo desenvolvidas a partir das linhagens de *C. moschata* 'Nigerian Local' e 'Menina' combinadas, e a exploração de novos *backgrounds* genéticos que possibilitam que essa característica seja incorporada em cultivares de *C. pepo*, é vantajoso para o melhoramento, visto que as taxas moderadas da presença simultânea desses alelos, já vem ocorrendo naturalmente dentro dessa espécie, mas ao utilizar marcadores para prever essa condição é valioso, já que poderá ampliar as estratégias nas buscas de novas cultivares resistentes geneticamente a esses vírus (GRUMET *et al.*, 2021).

Em última análise, a convergência desses marcadores sugere uma abordagem integrada e abrangente para a análise genética em populações de abóboras, onde diferentes conjuntos de marcadores podem ser utilizados de maneira combinada para fornecer informações mais completas sobre a diversidade genética, pureza de cultivares e o potencial para o desenvolvimento de novas linhagens mais resistentes e produtivas (MARTÍN-HERNANDEZ *et al.*, 2021).

A resistência ao *Powdery Mildew* foi avaliada em 23 genótipos de *C. moschata* e 24 de *C. pepo* utilizando o marcador molecular NBS_S9_1495924 proposto por HOLDSWORTH *et al.*, (2016). Para *C. moschata*, aproximadamente 62,5% da população foi identificada como geneticamente resistente ao *Powdery Mildew*, enquanto em *C. pepo* a resistência foi observada em cerca de 52,2% dos indivíduos. A semelhança nas porcentagens de resistência entre as duas espécies sugere uma distribuição equilibrada de alelos de suscetibilidade e resistência em ambas as populações, possivelmente resultante de fluxo gênico que possibilitou a troca de alelos relacionados à resistência ao *Powdery Mildew* entre *C. moschata* e *C. pepo*.

A região do cromossomo 9, onde está localizado o marcador NBS_S9_1495924, revelou que tanto *C. moschata* quanto *C. pepo* compartilham alelos semelhantes que conferem resistência ao *Powdery Mildew*. Este padrão pode ser explicado pela natureza poligênica que a resistência genética ao *Powdery Mildew* tem, sendo influenciada por múltiplos genes e interações genéticas que

resultam em variados fenótipos com graus diferentes de tolerância a essa doença (KAUR *et al.*, 2023).

Esses dados estão em concordância com as conclusões de ALAVILLI *et al.*, (2022), que desenvolveu um marcador que co-segrega com as populações no estudo dele e está localizado próximo à região do marcador NBS_S9_1495924. O marcador em questão concentra-se no gene CmoAP2/ERF, outro gene responsável por ter um carácter quantitativo na resistência genética ao *Powdery Mildew*. Além disso, é importante destacar que ALAVILLI *et al.*, (2022) também testou o marcador de NBS_S9_1495924 em conjunto com o desenvolvido por ele mesmo e verificou que não havia desequilíbrio de ligação entre os marcadores, ou seja, quando um estava presente, o outro também estava. A associação entre a identificação de marcadores moleculares desenvolvidos para a mesma doença e que estão localizados fisicamente em regiões próximas contribui para uma abordagem mais completa e confiável no desenvolvimento de linhagens de *C. moschata* e *C. pepo* resistentes ao *Powdery Mildew*.

Outros marcadores testados para o *Powdery Mildew* foram os M2454200, M2475244 e M2467704, desenvolvidos por WANG *et al.* (2021), para a verificação da presença do alelo de resistência em *C. pepo*. Esses marcadores moleculares são do tipo *CAPS* e *In-del*, e flanqueiam a área do gene CpPM10.1, região onde o gene de resistência se encontra.

Os dados dos marcadores próximos ao gene CpPM10.1 foram analisados com base no método desenvolvido por WANG *et al.* (2021) sendo constatado que a presença de apenas um dos três marcadores era um forte indicativo da resistência ao *Powdery Mildew*, sendo essa resistência validada em condições de campo, pois esse método identificou corretamente fenótipos resistentes em 98% dos testes realizados em campo. No entanto, para essa pesquisa, como os dados de campo não foram coletados para os genótipos testados, optou-se por um critério mais rigoroso, sendo um genótipo classificado como geneticamente resistente apenas se apresentasse todos os três marcadores analisados, e como suscetível se não apresentasse nenhum dos três marcadores. Com base nesses critérios, os resultados indicam que 47,8% da população de *C. pepo* é resistente ao *Powdery Mildew*.

É possível observar também uma pequena variação nas taxas de resistência utilizando os marcadores de autores diferentes testados para a mesma doença

52,2% com o marcador de HOLDSWORTH *et al.*, (2016) e 47,8% com os marcadores de WANG *et al.*, (2021), embora não seja possível a associação entre esses marcadores localizados respectivamente nos cromossomos 9 e 10, essa aproximação nas taxas de indivíduos que apresentam o gene de resistência pelos dois marcadores, pode ser explicada por diferentes mecanismos genéticos. Como os loci não estão fisicamente próximos, a associação observada pode ser resultado de efeitos aditivos de genes independentes. Por outro lado, se houver interação gênica (efeito epistático) ou ligação genética entre esses loci, é possível que haja transmissão conjunta dos alelos. Para esclarecer essa questão, são necessários estudos adicionais, como mapeamento de QTLs e análise de segregação, a fim de confirmar se esses loci realmente interagem ou se a resistência resulta da acumulação de efeitos de genes localizados em cromossomos distintos. De maneira geral é possível afirmar que a presença dos três marcadores como critério de resistência genética oferece uma abordagem mais precisa para a seleção de genótipos resistentes geneticamente, pois proporciona uma validação adicional ao aplicar esse tipo de estratégia.

5. Conclusões

De maneira geral, há um grande número de alelos de resistência dentro da população avaliada neste estudo. A abordagem dos marcadores de Wang *et al.*, (2021) é mais adequada para diagnosticar resistência ao *Powdery Mildew* em *C. pepo*, enquanto o marcador de Kim *et al.*, (2016) possui uma alta taxa de alelos de resistência em *C. moschata*, mas ainda necessita de validação em campo para comprovar essa alta taxa de eficácia. O marcador de Sawazaki *et al.*, (2017) é eficaz na detecção de alelos resistentes ao *PRSV-W* em *C. pepo*, e seu uso conjunto com o marcador molecular, desenvolvido pelo mesmo autor, para *ZYMV* permite uma avaliação molecular com mais confiança.

6. Literatura citada

- ALJANABI, S. M.; Martinez, I. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, Nova Iorque, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.
- AMOROSO, S. et al. Transcriptomic and genomic analysis provides new insights into molecular and genetic processes involved in zucchini ZYMV tolerance. **BMC Genomics**, v. 23, p. 371, 2022.
- ASAD, M. et al. Incidence and distribution of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infecting Cucumber (*Cucumis sativus* L) crop in Pothowar, Pakistan. **Pure and Applied Biology**, v. 8, n° 3, p. 2036-2043, 2019.
- BERALDO-HOISCHEN, P.; Hoefle, C.; López-Sesé, A. I. Fungal Development and Callose Deposition in Compatible and Incompatible Interactions in Melon Infected with Powdery Mildew. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 873, 2021.
- CRESTE, S.; Neto, A. T.; Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299–306, 2001.
- FERRIOL, M.; Picó, B. Pumpkin and winter squash. In: **Handbook of Plant Breeding** (Berlin: Springer New York), p. 317–349, 2008.
- GBEMENOU, U. H., Ezin, V., & Ahanchede, A. Current state of knowledge on the potential and production of *Cucurbita moschata* (pumpkin) in Africa: A review. **African Journal of Plant Science**, v. 16, n.1, p. 8-21, 2022.
- GRUMET, R.; McCreight, J. D.; McGregor, C.; Weng, Y.; Mazourek, M.; Reitsma, K.; Labate, J.; Davis, A.; Fei, Z. Genetic Resources and Vulnerabilities of Major Cucurbit Crops. **Genes**, v. 12, p. 1222, 2021.
- HOLDSWORTH, W. et al. Cultivar-Based Introgression Mapping Reveals Wild Species-Derived Pm-0, the Major Powdery Mildew Resistance Locus in Squash. **PLOS ONE**, USA, p. 2–18, 2016.
- KAUR, B.; Garcha, K. S.; Sandhu, J. S. et al. Interspecific hybridization for transfer of hull-less seed trait from *Cucurbita pepo* to *C. moschata*. **Scientific Reports**, v. 13, p. 4627, 2023.
- KIM, D. K.; Park, Y. J.; Lim, H. S. et al. Development of RAPD and SCAR Markers Related to Watermelon Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus Resistance in *Cucurbita moschata*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 57, n° 1, p. 61–64, 2016.
- KESH, H.; Yadav, S. Recent advances in genetics and breeding of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Índia, p. 1-12, 2022.

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

LEBEDA, A.; Křístková, E.; Mieslerová, B.; Dhillon, P. S.; McCreight, J. D. Status, Gaps and Perspectives of Powdery Mildew Resistance Research and Breeding in Cucurbits. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 43, n. 4, p. 211–290, 2024.

MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; Picó, B. Natural Resistances to Viruses in Cucurbits. **Agronomy**, v. 11, n. 1, p. 23, 2021.

OTT, J.; Wang, J.; Leal, S. M. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 5, p. 275–284, 2015.

PARK, J. H.; Kim, Y. S.; Choi, H. W. Development of SNP Markers for Identification of Squash F1 Hybrid Cultivars Using Fluidigm-Based Genotyping. **Plant Breeding and Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 163-173, 2022.

PENG, B.; Liu, L.; Wu, H. et al. Evaluation of disease resistance, specific molecular markers, genetic control of diseases, and marker selection for genetic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

SAWAZAKI, H.; Mitsui, T.; Yoshida, N. et al. Markers for Rapid Evaluation of Virus Resistance for TYLCV in Tomato, ZYMV and PRSV-W in Zucchini and LMV in Lettuce and Hybrid Seeds in Pumpkin. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 11, p. 2205–2209, 2018.

WANG, H.; Liu, Y.; Liu, J. et al. Characterization and Inheritance of Resistance to PRSV-W (Papaya Ringspot Virus-Watermelon Strain) in Squash (*Cucurbita pepo* L.). **Journal of Nuclear Agricultural Sciences**, v. 35, n° 2, p. 298-305, 2021.

WANG, Y.; Qi, C.; Luo, Y. et al. Identification and mapping of CpPM10.1, a major gene involved in powdery mildew (race 2 France of *Podosphaera xanthii*) resistance in zucchini (*Cucurbita pepo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, p. 2531–2545, 2021.

ZHANG, X.; Wu, C.; Zhang, X. et al. Differential Responses of *Cucurbita pepo* to *Podosphaera xanthii* Reveal the Mechanism of Powdery Mildew Disease Resistance in Pumpkin. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 633221, 2021.

ZHONG, H.; Liu, X.; Xu, J. et al. Development of high-throughput SNP markers for *Cucurbita* species discrimination. **Scientia Horticulturae**, v. 318, n°, 112089, 2023.

CAPÍTULO 2. Análise da diversidade genética em *Cucurbita spp* usando marcadores moleculares microssatélites

1. Resumo

A abóbora, cultivada por seu alto valor nutricional tanto na alimentação humana quanto animal, tem visto uma crescente demanda no cenário atual. No entanto, a produtividade e a resistência de algumas variedades estão sendo prejudicadas por condições ambientais desfavoráveis e pela adaptação de patógenos. Nesse contexto, o melhoramento genético surge como uma solução promissora para desenvolver variedades mais resistentes e produtivas. Este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética em três espécies de abóbora: *Cucurbita moschata*, *C. maxima* e *C. pepo* utilizando marcadores microssatélites (SSRs). Foram testados 22 primers SSRs, que identificaram 122 alelos, com destaque para os marcadores CMTm239 e CMTm118, que apresentaram alto polimorfismo. A análise revelou uma alta diversidade genética, além de permitir a diferenciação entre as espécies estudadas. Os resultados mostram a eficácia dos marcadores SSRs na caracterização da variabilidade genética, oferecendo dados importantes para programas de melhoramento genético, que visam a seleção de genótipos com características desejáveis.

Palavras chaves: Diversidade genética, SSR, Variabilidade, Melhoramento genético, Marcadores moleculares.

2. Introdução

A etapa de melhoramento de plantas envolve a seleção de genótipos com base na variabilidade genética existente ou gerada por cruzamentos, com o objetivo de criar populações mais vigorosas, especialmente em espécies alogâmicas, como a abóbora. Em tais populações, o cruzamento entre indivíduos geneticamente distintos pode resultar em heterose, ou vigor híbrido, no qual os descendentes apresentam desempenho superior. Por outro lado, em populações autógamas, o foco do melhoramento tende a ser na estabilidade genética e na resistência a doenças, uma vez que a heterose tem um papel mais limitado.

Nesse contexto, ferramentas de biologia molecular, como os marcadores microsatélites (SSRs), são fundamentais para estimar relações alélicas, identificar a diversidade genética entre os indivíduos e mapear a variabilidade genética em uma população. Esses dados podem ser aplicados diretamente em programas de melhoramento para otimizar a seleção de genótipos com características desejáveis, como resistência e qualidade, promovendo sistemas agrícolas mais sustentáveis (CELESTINO, 2021).

O uso de marcadores moleculares no melhoramento de abóboras é um avanço importante, pois possibilita a identificação de loci relacionados à resistência dentro do genoma. Isso permite uma abordagem mais direcionada e eficiente, melhorando a seleção de genótipos resistentes e produtivos. Além disso, o estudo da diversidade genética também contribui para a sanidade das plantas, reduzindo a necessidade de tratamentos químicos e promovendo a produção de abóboras de alta qualidade (JIANG, 2012).

A transferência de alelos entre espécies, especialmente alelos polimórficos, é um processo crucial para o desenvolvimento de variedades mais adaptadas a condições ambientais diversas. Essa transferência pode ocorrer por hibridação ou outros processos naturais, introduzindo novas características genéticas que oferecem vantagens adaptativas, como resistência a doenças e tolerância a estresses ambientais. A troca de alelos entre espécies como *C. pepo*, *C. moschata* e *C. maxima* tem mostrado ser eficaz na introdução de genes favoráveis à resistência e à adaptação das culturas em linhagens puras e híbridos, ampliando as possibilidades de melhoramento (ÖZTÜRK *et al.*, 2022; MA *et al.*, 2022).

Estudos como o de KAZMINSKA *et al.*, (2017) testaram 27 marcadores SSRs desenvolvidos para *C. maxima*, que também podem ser utilizados em *C. pepo* e *C. moschata*, ampliando o potencial prático dos microssatélites para análises genéticas e estimativas de diversidade genética em diferentes populações.

A variabilidade genética é essencial para garantir que as culturas se mantenham robustas diante das mudanças climáticas e ameaças fitossanitárias. Os marcadores moleculares permitem o mapeamento de loci associados à resistência, conhecidos como QTLs (*Quantitative Trait Loci*), que contêm genes que conferem resistência a doenças e estresses ambientais. Além disso, esses avanços reduzem a dependência de intervenções químicas e aceleram o desenvolvimento de cultivares comerciais, altamente produtivas e resistentes (VIEIRA *et al.*, 2016).

Nesse contexto, estudos de estrutura genética, como o realizado por Naegele e Mitchell (2020) em *Capsicum annuum*, utilizando o software STRUCTURE, foram capazes de estimar a variação genética dentro das populações e sua relação com características agronômicas. Neste estudo, os autores analisaram a diversidade genética de diferentes acessos de pimenta, identificando clusters genéticos associados a características como a espessura do pericarpo e a resistência a doenças. Abordagens semelhantes podem ser aplicadas em abóbora, permitindo a identificação de padrões genéticos que auxiliam na seleção de cultivares. Dessa forma, a combinação de marcadores moleculares e estudos de estrutura genética podem acelerar o desenvolvimento de cultivares resistentes e sustentáveis, fundamentais para a agricultura moderna.

3. Material e Métodos

3.1 Material vegetal e extração de DNA

Foram utilizados 92 acessos de *Cucurbita spp.*, sendo 23 genótipos de *C. moschata*, 24 de *C. pepo*, 10 de *C. maxima* e 35 híbridos (*C. moschata* x *C. maxima*) (Tabela Suplementar 1). Os acessos pertencem ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA UFSCar) em Araras - SP (latitude 22°18'S, longitude 47°23'W e altitude de 687 m). E fazem parte de linhagens avançadas de programa de melhoramento da UFSCAR. Os acessos foram cultivados em campo e na casa de vegetação por cerca de 30 dias, e após esse período foram realizadas as coletas das folhas.

Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foliar congelado (freezer em -80°C) foi macerado em um almofariz, e a extração de DNA total foi realizada de acordo com Aljanabi (1997). A quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® One (Thermo Scientific).

3.2 Amplificação de marcadores microssatélites.

Foram utilizados 22 marcadores microssatélites genômicos desenvolvidos por KAZMINSKA *et al.*, (2017); KONG *et al.*, (2014) e SIM *et al.*, (2015) para a análise da diversidade genética dos acessos de *Cucurbita spp.*. A reação de amplificação padrão, seguiu um volume final de 15 uL, composto por 3 uL de DNA genômico (50 ng/uL⁻¹), tampão 1 X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq DNA polymerase (5u/μL⁻¹) e 0,26 uM de cada primer. A programação do termociclador baseou-se num *touchdown*: desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguido por 10 ciclos, de 95°C por 40 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 45 seg, diminuindo a temperatura de anelamento dos primers em 1°C por ciclo e 30 ciclos de 95°C por 50 seg, 50°C por 30 seg e 72°C por 45 seg com uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (Creste *et al.*, 2001), corados com cloreto de prata, e foi usado um marcador de peso molecular DNA – ladder de 50 pb (Invitrogen).

3.3 Análise de dados moleculares

As bandas polimórficas de cada marcador microssatélite foram genotipadas como presença (1) ou ausência (0), sendo gerada uma tabela com uma matriz binária. Para cada marcador microssatélite foram estimados o número de alelos por locos e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) conforme Botstein *et al.* (1980). A análise de agrupamento foi realizada a partir da matriz de distância genética utilizando o método neighbor-joining (NJ) para gerar um dendrograma. As relações entre acessos de *Cucurbita spp.* foram obtidas através do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard usando o software R. E foi construída uma árvore filogenética de acordo com o método neighbor-joining (NJ), com 1.000 *bootstraps* utilizando os pacotes ggtree e ape (YUG *et al.*, 2017; PARADIS *et al.*, 2018).

A estrutura genética dos acessos de *Cucurbita spp.* foi investigada utilizando diferentes métodos: análise de variância molecular (AMOVA); análise de componentes principais (PCA); identificação da estrutura populacional, a partir de abordagem bayesiana, usando o software STRUCTURE e análise de dissimilaridade genética e filogenética. A AMOVA foi realizada com o software GenAlEx para quantificar o grau de diferenciação e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das espécies PEAKALL *et al.*, (2012). O PCA foi executado no software R através dos pacotes FactoMineR e factoextra, utilizando as funções PCA e fviz_pca_ind, com base nos dados brutos de genotipagem dos marcadores SSR. A análise com o software STRUCTURE foi realizada para verificar o número de subpopulações (k) e a proporção de pertencimento (Q). Considerando o modelo com misturas e a frequência de alelos independentes, o valor de K foi variado de 1 a 10, com 20 iterações, em um período de "burn-in" de 100.000 "steps" e 200.000 repetições de Monte Carlo Markov Chain (MCMC). O software STRUCTURE SELECTOR foi utilizado para encontrar os melhores valores de K e Δk (PRITCHARD *et al.*, 2000; KAZMINISKA *et al.* 2017).

4. Resultados e Discussão

Para a avaliação dos 92 genótipos de *Cucurbita spp.*, foram escolhidos 22 marcadores microssatélites com base nos altos valores de PIC reportados por KAZMINSKA *et al.*, (2017), KONG *et al.*, (2014) e SIM *et al.*, (2015). Esses marcadores foram selecionados por sua eficácia na detecção da variabilidade genética, com o entendimento de que, embora possam se comportar de maneira diferente em populações distintas, devido aos seus *backgrounds* genéticos específicos, já haviam demonstrado alta capacidade de discriminação genética em estudos prévios.

A partir dos 22 pares de primers SSRs, foram gerados 122 fragmentos polimórficos amplificados. Os marcadores CMTm259 e CMTp252 foram os que mais geraram alelos nos acessos de *C. pepo*, com 10 e 7 alelos, respectivamente. Nos acessos de *C. moschata* e *C. maxima*, o marcador que mais gerou alelos foi o CMTp201 com 7 alelos nas duas populações. Para os híbridos, os marcadores CMTm259, CMTm52 e CMTp217 geraram o maior número de alelos polimórficos. Considerando todos os acessos avaliados, os marcadores CMTm259 e CMTm29 foram os que mais geraram alelos polimórficos, com pelo menos 5 alelos em cada população. Os resultados de PIC e o número total de fragmentos amplificados por espécie e híbridos estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Número de alelos gerados pelos marcadores listados na primeira coluna, na segunda coluna a faixa de leitura e nas demais colunas o número de alelos gerados pelas três espécies (*C. maxima*, *C. moschata* e *C. pepo*) e híbridos e seus valores de PIC.

Marcador	<i>C. pepo</i>	<i>C. moschata</i>	<i>C. maxima</i>	Híbridos	PIC
CMTm232	4	2	5	6	0,191
CMTp17	6	4	5	7	0,197
CMTp138	2	2	1	2	0,201
CMTm7	4	3	2	4	0,203
CMTm229	2	2	1	4	0,205
CMTmC62	4	4	3	6	0,215
CMTp217	6	6	3	9	0,226
CMTp142	2	1	2	4	0,233
CMTm52	2	4	3	8	0,238
CMTm259	10	5	5	8	0,253
CMTp252	7	3	5	6	0,259
CMTm18	5	1	3	3	0,268
CMTm107	4	3	1	4	0,276
CMTp254	6	3	2	5	0,288
CMTp201	4	7	7	7	0,292
CMTp257	4	2	2	2	0,294
CMTp249	3	2	2	3	0,300
CMTm29	6	6	5	7	0,329
CMTmC21	3	2	3	3	0,335
CMTm239	1	3	3	4	0,374
CMTm118	2	4	2	5	0,406
CMTm48	5	4	6	7	0,446

Os dados apresentados indicam que os marcadores utilizados foram transferíveis entre as espécies de *Cucurbita spp.*, com pelo menos um alelo sendo compartilhado entre elas. Isso demonstra que esses marcadores têm um bom potencial para diferenciação das espécies, podendo ser utilizados como um "fingerprint" genético para cada uma das espécies. Os marcadores CMTm259 e CMTm29 foram os mais eficientes em gerar alelos polimórficos, com pelo menos 5 alelos detectados em cada população (PONTE *et al.*, 2023).

O cálculo de PIC pela fórmula proposta por BOTSTEIN *et al.*, (1980) considerou os marcadores microssatélites, como marcadores de herança dominante, visando uma interpretação mais precisa dos resultados, sem a categorização específica de homozigotos e heterozigotos para cada uma das espécies (*C. pepo*, *C. maxima* e *C. moschata*) todos os dados foram tratados como alelos individuais, onde a presença ou ausência do alelo indicava as diferentes variações moleculares, essa metodologia implica em valores de PIC entre 0 a 0,5 (SERROTE *et al.*, 2020).

A abordagem foi considerada válida para essa população, devido à presença de espécies distintas e a interpretação direta de homozigotos e heterozigotos poderia ser imprecisa para o mesmo locus do marcador, pois este poderia se manifestar em diferentes tamanhos de fragmentos em cada espécie. O tratamento dos marcadores microssatélites como dominantes é respaldado por estudos anteriores, como o de ÖZTÜRK *et al.* (2022), que utilizou uma abordagem similar na análise de *Cucurbita spp.* utilizando marcadores microssatélites. Esse método proporciona uma interpretação mais precisa da variabilidade genética, especialmente quando se trabalha com espécies distintas dentro de uma população, levando em conta as variações nas alturas dos fragmentos entre homozigotos e heterozigotos (BULUT *et al.*, 2022).

Nos dados observados na Tabela 1, o marcador CMTm48 teve o maior valor de PIC (0.446), enquanto o marcador CMTp232 apresentou o menor valor de PIC (0.191). Isso indica que o marcador CMTm48 possui uma maior capacidade de detectar polimorfismos na população, em comparação com o marcador CMTp232, que demonstra menor capacidade nesse contexto. A média dos valores de PIC foi de aproximadamente 0.280, indicando que os marcadores utilizados neste estudo, em sua grande maioria, foram capazes de detectar polimorfismos, com alguns sendo mais eficazes na diferenciação genética do que outros (KESH *et al.*, 2022).

Marcadores com maior valor de PIC, como CMTp118 e CMTm48, indicam uma maior diversidade alélica nas regiões genômicas que delimitam dentro dessas espécies. Isso os torna altamente informativos para estudos de seleção e melhoramento genético, pois, devido à maior variação alélica nessas regiões, têm uma maior capacidade de distinguir entre diferentes indivíduos ou populações. Por outro lado, marcadores com valores de PIC mais baixos, como CMTm232 e

CMTp138, indicam menor variabilidade alélica, o que pode limitar sua capacidade de diferenciação genética. Embora esses marcadores com valores menores de PIC, possam ser úteis para aplicações específicas, como rastreamento de linhagens (ZHANG *et al.*, 2021).

A AMOVA realizada com os dados dos 22 marcadores microssatélites revelou que 50% da variação total nos acessos estudados foi explicada pelas diferenças entre as populações, enquanto os outros 50% foram explicados pelas diferenças dentro das populações (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) entre 92 acessos oriundos de 3 espécies de Cucurbita e híbridos.

Fonte de variação	df	Soma de Quadrados (SS)	Quadrado Médio (MS)	Variância Estimada	Porcentagem da variação
Entre Pops	3	969,818	323,273	14,197	50%
Dentro Pops	88	1252,421	14,232	14,232	50%
Total	91	2222,239		28,429	100%

$p = 0,001$

Os dados da AMOVA indicam que a variabilidade genética está igualmente dividida entre e dentro das populações analisadas, com 50% da variação genética atribuída a cada componente. A divisão de 50% da variabilidade genética entre populações pode indicar a presença de características distintas atribuíveis a diferentes linhagens, práticas de cultivo, ou adaptações ambientais. Tal variação genética entre populações é valiosa para programas de melhoramento, já que permite a identificação de características essenciais para a seleção e desenvolvimento de cultivares com maior tolerância a patógenos. Ao mesmo tempo, a variabilidade de 50% dentro das populações pode resultar de hibridações ou de uma ampla gama de características fenotípicas não refletidas claramente entre grupos. A análise reforça a importância de considerar tanto a diversidade genética

entre as linhagens quanto a variabilidade interna ao elaborar estratégias de conservação e utilização de germoplasma (HERNANDEZ *et al.*, 2023).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com base em 122 fragmentos de marcadores microsatélites avaliados a partir de 92 acessos de *Cucurbita spp.*, considerando os dois primeiros componentes principais, PC1 e PC2, foi explicado 41,6% da variabilidade total expressa entre os acessos de abóboras (Figura 1). Os acessos de *C. moschata*, híbrido e parte dos de *C. maxima* foram espalhados pelo PC1, sendo os acessos de *C. moschata* estão largamente posicionados com os acessos dos híbridos e *C. maxima*.

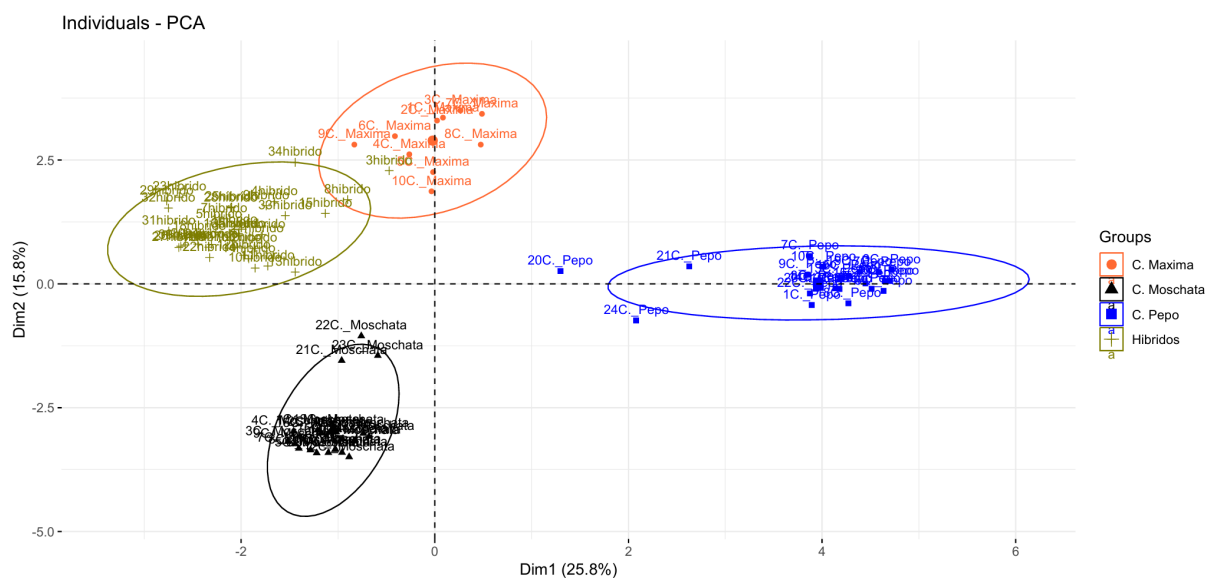


Figura 1: Componente de análise principal (PCA), gerado pelo software R, para avaliar o agrupamento entre as diferentes espécies da pesquisa.

A análise de estrutura populacional também foi realizada com o STRUCTURE e o melhor valor que explicou esse conjunto de dados foi 4, sugerindo que os 92 acessos *Cucurbita spp.* podem ser divididos em quatro subpopulações P1, P2, P3 e P4 contendo 23, 10, 35 e 24 acessos, respectivamente. A Figura 2 ilustra essa distribuição.



Figura 2: **Estrutura genética das variedades de Cucurbita conforme análise do Structure.** A distribuição dos indivíduos em quatro clusters ($K = 4$) é mostrada, indicando a estrutura populacional e as relações genéticas entre as variedades.

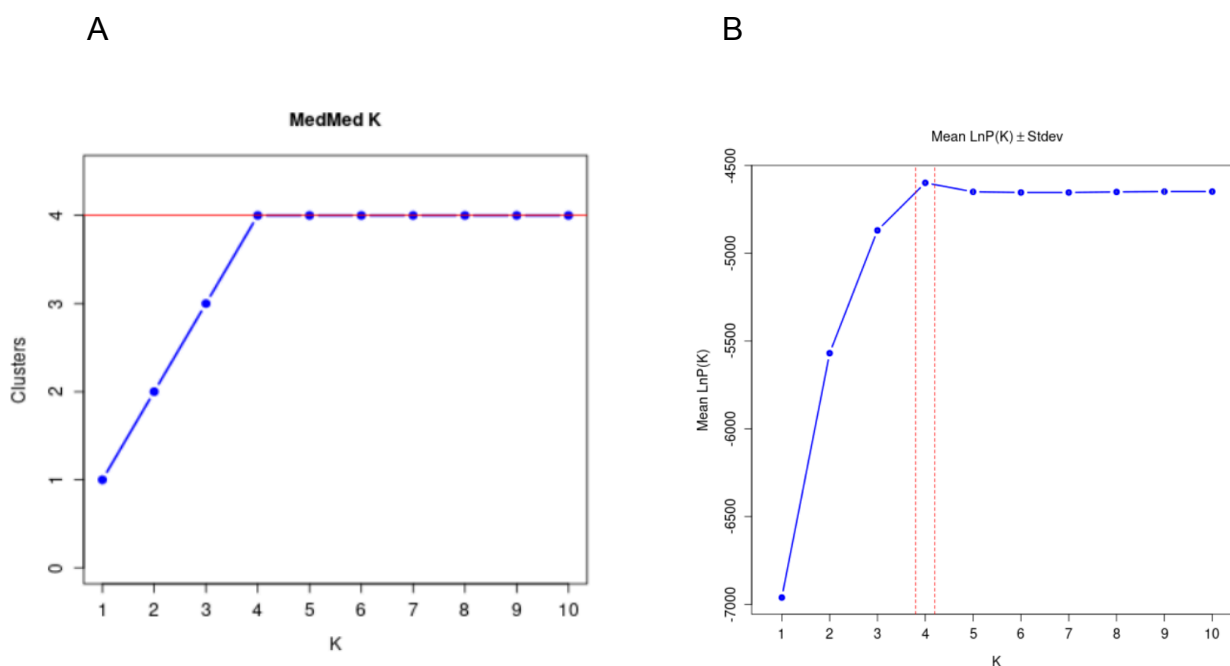


Figura 3 : **Gráfico A:** Mediana dos clusters (MedMed K) por número de clusters (K). Mostra a saturação na variabilidade genética a partir de $K = 4$. **Gráfico B:** Valor médio da verossimilhança (Mean Ln P(K)) por número de clusters (K). Indica que $K = 4$ é o modelo ideal, com estabilização dos valores a partir deste ponto.

O gráfico (A) da mediana dos clusters (MedMed K) indica que a escolha do número ideal de clusters (K) é de $K = 4$, pois observa-se um aumento significativo na mediana, sugerindo que quatro clusters podem representar um ponto de saturação,

onde a adição de mais clusters não melhora substancialmente a discriminação genética (XANTHOPOULOU, A. *et al.* 2019; CHOMICKI *et al.*, 2020).

O gráfico (B) que ilustra o valor médio da verossimilhança (Mean Ln P(K)) mostra que a partir de $K = 4$, a verossimilhança não aumenta consideravelmente. Os valores de Ln P(K) estabilizam-se, indicando que $K = 4$ é um modelo adequado para descrever a estrutura populacional das espécies analisadas. A queda e estabilização dos valores médios a partir de $K = 3$ ou 4 reforçam que, a ideia de que subdividir as populações em mais grupos não é necessariamente justificável, como corroborado pelo gráfico de MedMed K (XANTHOPOULOU, A. *et al.* 2019; CHOMICKI *et al.*, 2020).

Os dados do Structure indicam que a proximidade genética entre clusters pode refletir uma interação evolutiva comum ou ancestrais próximos. Por exemplo, a proximidade entre *C. maxima* e *C. moschata* e seus híbridos sugere uma interação genética significativa, corroborando a hipótese de hibridizações, que podem ocorrer tanto naturalmente quanto de forma induzida em programas de melhoramento. A possibilidade de hibridação natural entre essas espécies é bem documentada, já que ambas pertencem ao mesmo gênero *Cucurbita*. No entanto, híbridos de linhagens avançadas também podem ser criados artificialmente com o objetivo de combinar características específicas. A presença de indivíduos com características de múltiplos clusters também indica mistura genética e possíveis hibridações. Esse fenômeno reforça a complexidade genética dessas espécies e suas variedades (GRUMET *et al.*, 2021).

Esse padrão sugere que alguns indivíduos resultam de hibridizações, como evidenciado pela representação de cores misturadas nos clusters, que destacam interações genéticas e potenciais processos de introgressão, relevantes para a adaptação às condições ambientais. Além disso, a estrutura observada sugere que certas populações podem estar mais isoladas geneticamente, com a ausência de cores específicas em clusters indicando distintividade genética, possivelmente devido a práticas agrícolas, barreiras geográficas e incompatibilidade (DING *et al.* 2021).

Esses resultados sugerem que as variedades de *Cucurbita* podem ser efetivamente agrupadas em quatro clusters, o que já era esperado, a escolha de $K = 4$ está alinhada com dados de discriminação genética obtidos nas análises de PCA.

O número de fragmentos de microssatélites empregados neste estudo foi adequado para estimar a dissimilaridade genética entre os acessos, conforme mostrado na Tabela 3. As maiores dissimilaridades observadas ocorreram entre os indivíduos de *C. pepo* e *C. maxima* (0,84), *C. moschata* (0,82) e híbridos (0,82), além da comparação entre os indivíduos de *C. maxima* e *C. moschata* (0,86). Por outro lado, a menor dissimilaridade foi registrada entre os indivíduos de *C. moschata* (0,38). Os híbridos apresentaram uma dissimilaridade similar de 0,65 em relação a *C. maxima* e *C. moschata*

Tabela 03: Distância genética média entre grupos (espécie e híbrido) segundo coeficiente de Jaccard.

Grupos	<i>C. moschata</i>	<i>C. maxima</i>	Híbridos	<i>C. pepo</i>
<i>C. moschata</i>	0,38			
<i>C. maxima</i>	0,86	0,49		
Híbridos	0,63	0,65	0,45	
<i>C. pepo</i>	0,82	0,84	0,82	0,51

Um dendrograma foi construído a partir dos dados de genotipagem dos marcadores e a análise filogenética revelou padrões de agrupamento (Figura 4), evidenciando a distribuição entre as espécies e híbridos.

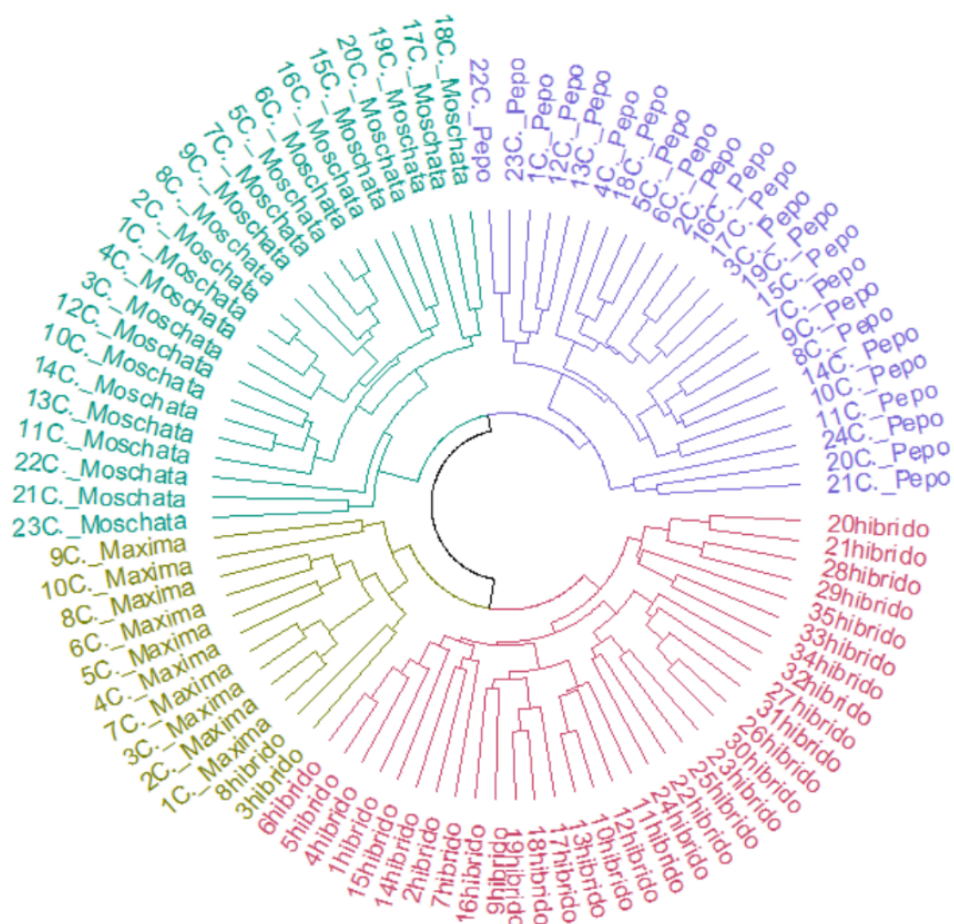


Figura 4: Dendrograma circular filogenético obtido para os diferentes genótipos de cucurbita spp. Os tons de lilás indicam a população de *C. pepo* avaliada, enquanto o verde escuro corresponde predominantemente à espécie *C. maxima*, o vermelho indica os híbridos e os tons de verde água representam *C. moschata*.

A *C. pepo* está mais distante de *C. maxima* e dos híbridos, enquanto *C. moschata* ocupa uma posição intermediária, estando mais próxima de *C. pepo*, mas ainda sim com características genéticas que fazem com que ela se aproxime tanto de *C. pepo* quanto dos híbridos. Além disso, *C. maxima* e os híbridos formam um agrupamento muito próximo dentro do dendrograma o que é evidenciado com alguns dos híbridos ligeiramente deslocados nas laterais dentro do grupo de *C. maxima*, o que indica uma relação genética muito próxima entre eles. Esse posicionamento sugere que os híbridos, mesmo que pertencem a espécies diferentes (*C. moschata* x *C. maxima*), geneticamente se parecem mais com *C. maxima* (NYABERA *et al.*, 2021).

A distância genética entre a *C. pepo* e as demais variedades (Figura 4) é observada em outros estudos como o de SHAFIN *et al.*, (2021), que sugerem um

afastamento evolutivo, indicando trajetórias evolutivas distintas e uma possível adaptação a diferentes ambientes e condições.

A posição intermediária ocupada pelas *C. moschata* mostra uma complexidade na interação genética entre essa espécie com as demais (*C. pepo* e os híbridos), podendo indicar possíveis acessos para processos de hibridização e introgressão genética ao longo do tempo (MOUMNI *et al.*, 2022).

O distanciamento genético observado entre os híbridos e as espécies parentais pode ser atribuído a diversos fatores genéticos. Os híbridos analisados são o produto de cruzamentos entre *C. maxima* e *C. moschata*, realizados com o objetivo de combinar características desejáveis de ambos os genitores. Esse processo de hibridação introduz novos alelos e gera combinações genéticas únicas, que resultam em uma diversidade genética distinta nos híbridos. Durante a hibridação, a recombinação genética ocorre tanto de forma intracromossômica (troca de segmentos de cromossomos homólogos, ou *crossing over*) quanto intercromossômica (segundo a segunda lei de Mendel), o que gera rearranjos alélicos e novas combinações genéticas nos híbridos, contribuindo para sua divergência em relação às populações parentais.

Além disso, as interações genéticas nos híbridos podem resultar em padrões de dominância e expressão gênica diferentes dos observados nas espécies parentais. Contudo, é importante destacar que a dominância não é observada diretamente no DNA, mas se reflete nos fenótipos dos indivíduos. Por isso, a avaliação do valor genético dos híbridos deve considerar também esses aspectos fenotípicos, além das informações genéticas.

Outro fator relevante são os efeitos de heterose, ou vigor híbrido, que podem se manifestar em características como maior vigor de crescimento, aumento da produção e resistência a doenças. A combinação favorável de alelos complementares dos genitores pode levar a uma expressão superior de certas características, o que contribui ainda mais para o distanciamento genético entre os híbridos e as espécies parentais.

Vale ressaltar que os acessos utilizados nesta pesquisa fazem parte de uma etapa avançada de um programa de melhoramento genético, consistindo em linhagens já altamente selecionadas. Não houve caracterização do germoplasma

além da análise molecular realizada com marcadores microssatélites. Isso implica que, embora o material tenha sido melhorado, a falta de uma caracterização mais ampla do germoplasma limita o entendimento completo das variações genéticas das populações analisadas. Além disso, alguns dos acessos são frutos de retrocruzamentos, o que resulta em uma maior homogeneidade genética entre as linhagens e, conseqüentemente, em uma menor segregação. Esse fator reduz a variabilidade genética observada entre os indivíduos, o que é esperado em populações avançadas de um programa de melhoramento.

Todos esses fatores — a introdução de alelos dos genitores, a recombinação genética, os efeitos de heterose e a estrutura avançada das linhagens — contribuem para o distanciamento genético observado entre os híbridos e as espécies parentais. Isso resulta em uma divergência genética significativa, o que pode estar relacionado à expressão de características fenotípicas únicas nos híbridos. Esse padrão genético mais uniforme também é reflexo do estágio avançado das linhagens estudadas, onde a segregação genética é limitada e a seleção de características específicas tem sido intensificada ao longo das gerações (ARBIZU *et al.*, 2022; MOUMNI *et al.*, 2022).

Ao comparar o dendrograma gerado nesta pesquisa com outro desenvolvido por NYABERA *et al.*, (2021), um estudo com abóboras do oeste do Quênia, observam-se semelhanças e diferenças nas estruturas genéticas das populações de abóboras. No estudo do oeste do Quênia, a análise genética revelou a formação de clusters distintos, indicando relações genéticas entre as populações de abóboras nos diferentes condados. A formação de um maior número de subclusters, sugeriu padrões genéticos mais detalhados, enquanto que, neste estudo, a figura mostra um agrupamento maior em relação a *C. moschata* e *C. pepo* (MA *et al.*, 2022).

A disposição dentro do dendrograma de *C. pepo* sugere uma possível afinidade entre os genótipos da mesma espécie, já que é possível observar um agrupamento. No entanto, é crucial destacar que a presença de anomalias, relacionadas à funcionalidade dos marcadores específicos de determinadas espécies, não respalda conclusivamente essa afirmação (KESH *et al.*, 2022; SHAFIN *et al.*, 2021; NYABERA *et al.*, 2021).

5. Conclusões

Os marcadores microssatélites utilizados neste estudo foram altamente polimórficos e permitiram estimar a diversidade genética dentro da população de *Cucurbita spp.* estudada. As conclusões obtidas pelas análises de AMOVA e PCA indicaram uma distribuição da variabilidade genética entre as populações. A análise estrutural revelou quatro clusters principais, que agrupou as diferentes espécies estudadas com precisão e proporcionou uma visão clara das relações genéticas entre os grupos estudados.

6. Literatura citada

- ARBIZU, Y. et al. (2022). Genetic divergence among Cucurbita hybrids and their parental species. **Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 2, p. 85-95.
- BOTSTEIN, D. et al. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 32, p. 314–331.
- BRZOZOWSKI, L. J. et al. (2020). Divergence of defensive cucurbitacins in independent domestication events leads to differences in specialist herbivore preference. **Plant Cell Environ.**, 43, 2812–2825.
- CERIOLO, T. et al. (2022). Development and validation of an optimized marker set for genomic selection in southern U.S. rice breeding programs. **Plant Genome**, 15, e20219.
- CELESTINO, M. (2021). **Análise da produção de abóbora (Cucurbita) na região Nordeste: uma revisão bibliográfica**. Monografia, AGES.
- CHOMICKI, G. et al. (2020). Origin and domestication of cucurbitaceae crops: insights from phylogenies, genomics and archaeology. **New Phytol.**, 226, 1240–1255.
- COBB, J. N. et al. (2019). Back to the future: revisiting MAS as a tool for modern plant breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 132, 647–667.
- CRESTE, S. et al. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306.
- DANECEK, P. et al. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. **GigaScience**, 10, giab008.
- DING, W. et al. (2021). Fine mapping identified the gibberellin 2-oxidase gene CpDw leading to a dwarf phenotype in squash (*Cucurbita pepo* L.). **Plant Sci.**, 306, 110857.
- DUARTE, A. et al. (2022). Morphological and molecular diversity of Cucurbita in a traditional agroecosystem. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 69(3), 851-865.
- ENDLEMAN, J. B. (2011). Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. **Plant Genome**, 4, 250–255.
- FERRIOL, M., & PICÓ, B. (2008). Pumpkin and winter squash. In Handbook of plant breeding. **Berlin: Springer New York**, 317–349.
- GLAUBITZ, J. C. et al. (2014). TASSEL-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. **PLoS One**, 9, e90346.
- GOGARTEN, S. M. et al. (2019). Genetic association testing using the GENESIS R/Bioconductor package. **Bioinformatics**, 35, 5346–5348.
- GRUMET, R. et al. (2021). Genetic resources and vulnerabilities of major cucurbit crops. *Genes*, 12, 1222.

- HERNANDEZ, C. O. et al. (2020). Genomic prediction and selection for fruit traits in winter squash. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 10, 3601–3610.
- HERNANDEZ, C. O. et al. (2023). Characterization of the USDA Cucurbita pepo, C. moschata, and C. maxima germplasm collections. *Front. Plant Sci*, 14113, p.08 - 14.
- KESH, S. et al. (2022). Challenges in the use of molecular markers for species identification in Cucurbita. *Molecular Genetics and Genomics*, 297, p. 425-432.
- KONG, F. et al. (2014). Genetic diversity and population structure of Cucurbita pepo L. determined by SSR markers. *Horticulture Research*, 1, p. 14023.
- MA, X. et al. (2022). Genetic structure and diversity of Cucurbita populations in West Kenya. *Horticulture Research*, 9, n. 1, p. 74.
- MEUWISSEN, T. H. E. et al. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157, 1819–1829.
- MOUMNI, M. et al. (2022). Genetic interactions and hybridization in Cucurbita species: Implications for breeding. *Plant Breeding Journal*, 140, n. 1, p. 101-110.
- NYABERA, M. et al. (2021). Genetic diversity and relationship among pumpkin cultivars in western Kenya. *African Journal of Biotechnology*, 20, n. 3, p. 145-156.
- ÖZTÜRK, H. et al. (2022). Morphological and molecular characterization of some pumpkin (Cucurbita pepo L.) genotypes collected from Erzincan province of Turkey. *Sci Rep*, 12, p. 6814.
- PARIS, H. S. (2015). Germplasm enhancement of Cucurbita pepo (pumpkin, squash, gourd: Cucurbitaceae): progress and challenges. *Euphytica*, 208, 415–438.
- PRITCHARD, J. K. et al. (2000). Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*, 67(1), 170–181.
- SHAFIN, A. et al. (2021). Evolutionary genetic divergence among Cucurbita species. *Plant Molecular Biology*, 106, p. 123-134.
- SIM, S. C. et al. (2015). Molecular characterization of Cucurbita pepo varieties. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 140, p. 599-607.
- VIEIRA, M. L. C. et al. (2016). Markers for molecular breeding in Cucurbita. *Molecular Breeding*, 36, p. 665-679.
- WANG, S. et al. (2022). Architecture design of cucurbit crops for enhanced productivity by a natural allele. *Nat. Plants*, 8, 1394–1407.
- WU, P.-Y. et al. (2019). Genomic prediction of pumpkin hybrid performance. *Plant Genome*, 12, 082 - 180.
- XANTHOPOULOU, A. et al. (2019). Whole-genome resequencing of Cucurbita pepo morphotypes to discover genomic variants associated with morphology and horticulturally valuable traits. *Horticult. Res*, p. 6, v. 94.
- ZHANG, G. et al. (2015). A high-density genetic map for anchoring genome sequences and identifying QTLs associated with dwarf vine in pumpkin (Cucurbita maxima Duch.). *BMC Genomics*, p. 16, v. 1101.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram a eficácia dos marcadores microssatélites na estimativa da variabilidade genética em cucurbitáceas, evidenciando uma diversidade significativa entre os acessos analisados. Além disso, a utilização de marcadores adicionais para verificar a resistência a doenças revelou-se igualmente eficaz, permitindo a identificação de genótipos promissores com potencial para resistência a patógenos. Esses achados ressaltam a importância da combinação de diferentes tipos de marcadores moleculares na caracterização de recursos genéticos, contribuindo para estratégias de melhoramento mais direcionadas e eficientes. A variação genética identificada pode servir como base para programas de melhoramento, visando aumentar a resistência a doenças e a adaptabilidade das cucurbitáceas a diferentes condições ambientais.

APÊNDICE

Tabela 1: Valores médios em ng/uL das extrações de DNA obtidas das folhas de *C. pepo*, *C. moschata*, *C. maxima* e híbridos contidos nessa pesquisa e seus respectivos códigos para identificação nas figuras abaixo.

Genótipo	Quantificação ng/ uL	Genótipo	Quantificação ng/ uL	Genótipo	Quantificação ng/ uL
1 - Híbrido	3543,6	32 - Híbrido	1514,2	63 - C. pepo	3811,6
2 - Híbrido	4579,7	33 - Híbrido	1255,9	64 - C. pepo	2558,7
3 - Híbrido	4236,2	34 - Híbrido	1393,1	65 - C. pepo	5420,3
4 - C. moschata	2853,5	35 - Híbrido	1283,6	66 - C. pepo	4876,8
5 - C. maxima	4379,1	36 - Híbrido	1358,2	67 - C. moschata	4161,5
6 - C. moschata	2293,1	37 - Híbrido	1101,8	68 - Híbrido	1195,5
7 - C. moschata	3436,4	38 - Híbrido	2324,6	69 - Híbrido	2546,2
8 - C. moschata	2567,2	39 - C. pepo	1893,1	70 - Híbrido	3869,8
9 - C. moschata	3006,2	40 - C. pepo	3145,5	71- C. moschata	1685,6
10 - C. moschata	4738,1	41 - C. pepo	2160,8	72- C. moschata	2179,4
11-C. moschata	4651,7	42 - C. pepo	2414,4	73 - Híbrido	2640,3
12-C. moschata	4349,3	43 - C. pepo	1908,1	74 - C. maxima	1453,8
13-C. moschata	4236,4	44 - C. pepo	3932,3	75- C. moschata	1486,8
14 - C. maxima	2112,2	45- C. moschata	2394,6	76 - Híbrido	1762,6
15 - C. maxima	2108,6	46- C. moschata	2158,1	77 - Híbrido	2055,3
16 - C. maxima	3420,8	47 - C. pepo	894,4	78 - Híbrido	5105,3
17 - C. maxima	1834,3	48 - C. moschata	300,4	79 - Híbrido	4281,4
18 - C. maxima	2832,2	49 - C. moschata	1088,3	80 - C. maxima	3387,1
19 - C. maxima	2507,1	50 - C. pepo	4211,6	81- C. moschata	3222,4
20 - Híbrido	2094,4	51 - C. pepo	2459,3	82 - Híbrido	1899,6
21 - Híbrido	1704,5	52 - C. pepo	3406,8	83 - Híbrido	888,1
22 - C. maxima	3254,9	53 - C. moschata	4600,5	84 - Híbrido	2026,7
23 - Híbrido	5476,5	54 - C. moschata	1527,6	85 - Híbrido	2052,4
24 - Híbrido	3748,9	55 - C. moschata	2121,5	86 - Híbrido	1924,4
25 - Híbrido	4158,8	56 - C. pepo	2034,9	87 - Híbrido	1265,6
26 - Híbrido	4388,6	57 - C. pepo	2595,2	88 - Híbrido	2530,7
27 - Híbrido	2613,7	58 - C. pepo	1631,4	89 - Híbrido	2146,8
28 - Híbrido	2622,1	59 - C. pepo	2653,1	90 - Híbrido	626,8
29 - Híbrido	3891,6	60 - C. pepo	2300,7	91 - Híbrido	2228,3
30 - Híbrido	2749,8	61 - C. pepo	1539,6	92 - C. pepo	1777,1
31 - Híbrido	1828,4	62 - C. pepo	3998,8	93 - C. pepo	1532,7

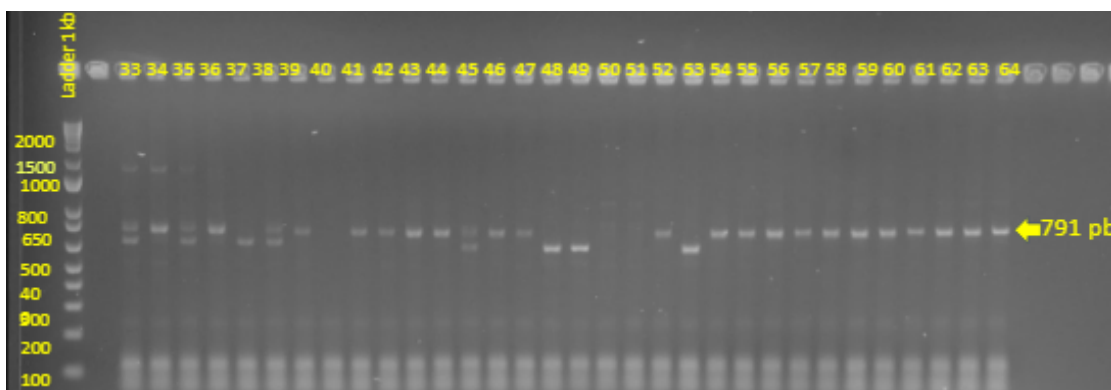


Figura 1- Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio 1%, com a amplificação do fragmento de 791 pb (indicado pela seta amarela) gerado pelo marcador SCAR SC522₉₄₅ em parte da população amostral. Na parte superior do gel estão indicados os códigos das amostras, os genótipos 39, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 pertencem a espécie *C. pepo*, os genótipos 45, 46, 48, 49, 53, 54, 55 pertencem a *C. moschata* e os genótipos 33, 34, 35, 36, 37, 38 pertencem os híbridos e o ladder de 1 kb no primeiro poço à esquerda.

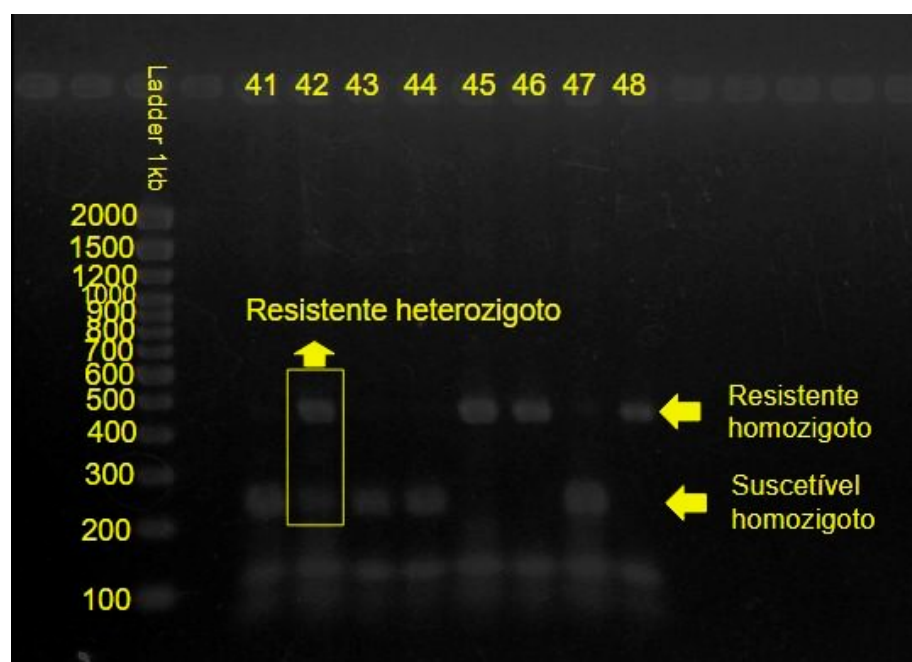


Figura 2: Fragmento de DNA digerido com a enzima BgIII para análise do polimorfismo associado à resistência ao Zucchini Yellow Mosaic Virus, gerado pelo marcador SNP1 CAPS de CAPUOZZO *et al.* 2017 em uma população de *Cucurbita pepo*. As setas indicam o fragmento de interesse associado à resistência e o fragmento homozigoto suscetível e no retângulo o fragmento heterozigoto.

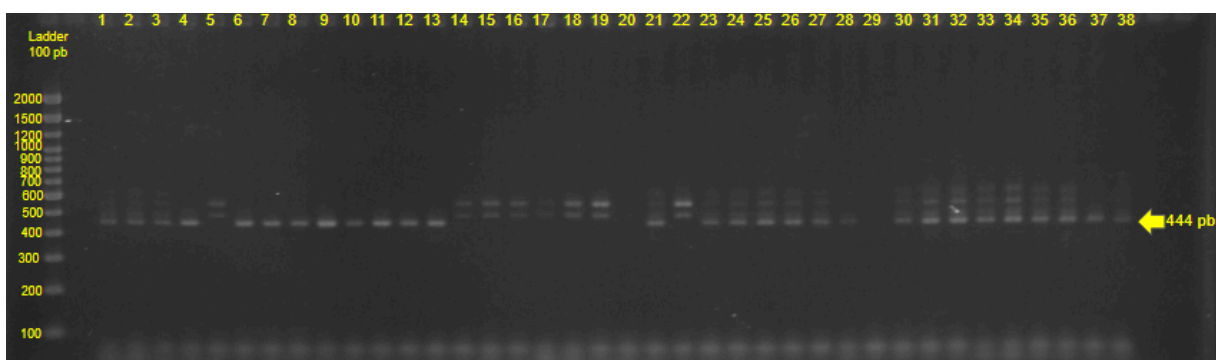


Figura 3: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 1%, com a amplificação do fragmento de 444 pb (indicado pela seta amarela) gerado pelo marcador VirSq-F19 em parte da população amostral *Curcubita* spp. Na parte superior do gel estão indicados os genótipos sendo os códigos 1, 2, 3, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 pertencentes aos híbridos, os genótipos 5, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22 pertencentes a *C. maxima* e 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 pertencentes a *C. moschata* e o ladder de 1 kb no primeiro poço à esquerda.

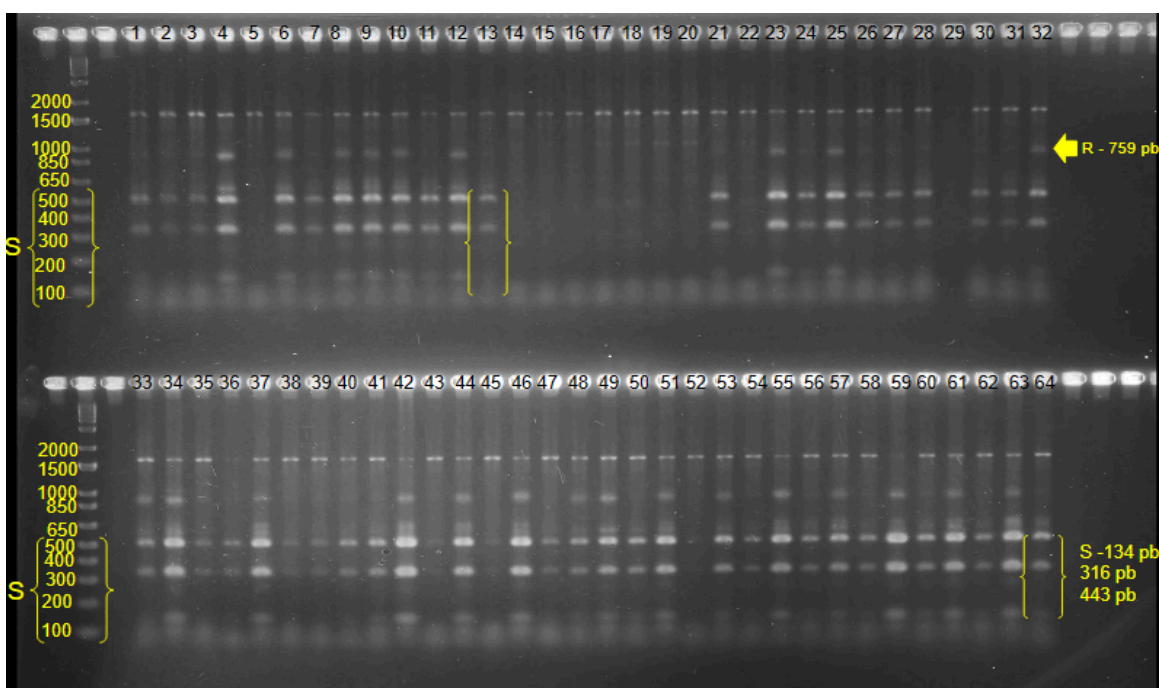


Figura 4: Marcador NBS_S9_1495924 após a digestão com a endonuclease HaeIII, na população amostral de *Cucurbita* spp., os códigos 1, 2, 3, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 pertencentes aos híbridos, 5, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 pertencentes a *C. maxima* e 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 45, 46, 48, 49, 53, 54, 55 pertencentes a *C. moschata* e os genótipos 39, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 pertencem a espécie *C. pepo*, a seta indica o fragmento de resistência e os colchetes indicam o conjunto das bandas de suscetibilidade.

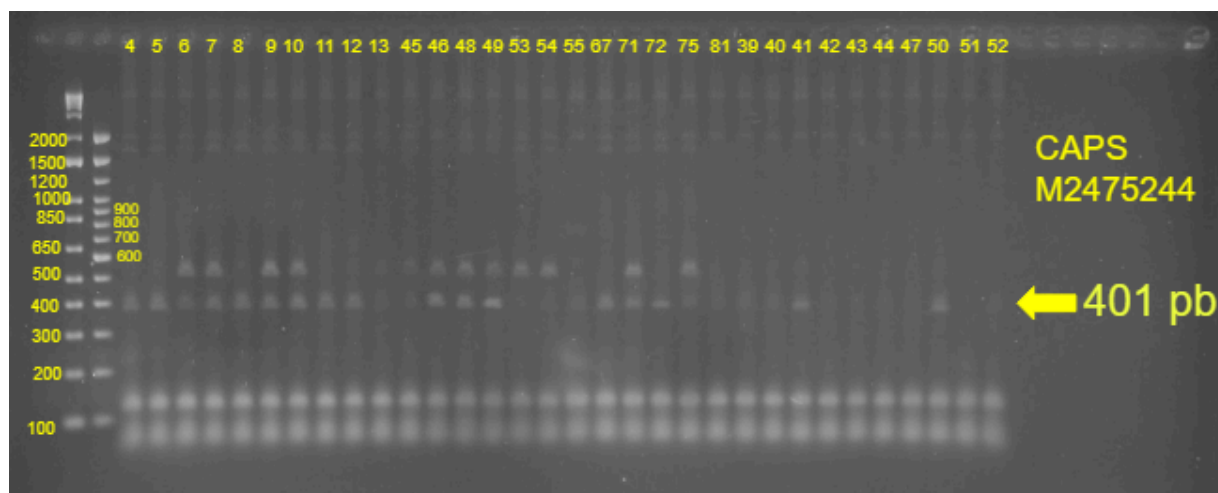


Figura 5: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 1%, com o marcador M2475244 testado em parte da população de *C. pepo* que corresponde ao genótipos 39, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 50, 51, 52, 56 e os genótipos 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 45, 46, 48, 49, 53, 54, 55, 67, 71, 72, 75, 81 pertencentes a *C. moschata*, a seta indica o fragmento de amplificação de 401 pb.

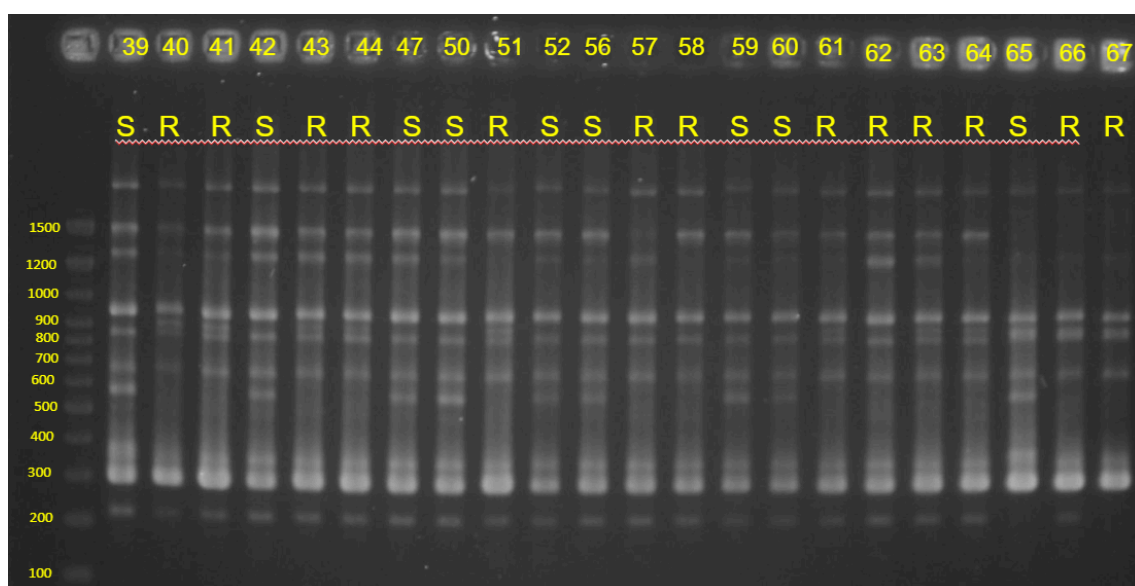


Figura 6: Análise do polimorfismo do marcador molecular associado à resistência ao PRSV-W, gerado pelo marcador de SAWAZAKI *et al.* 2017 na população de *Cucurbita pepo*.

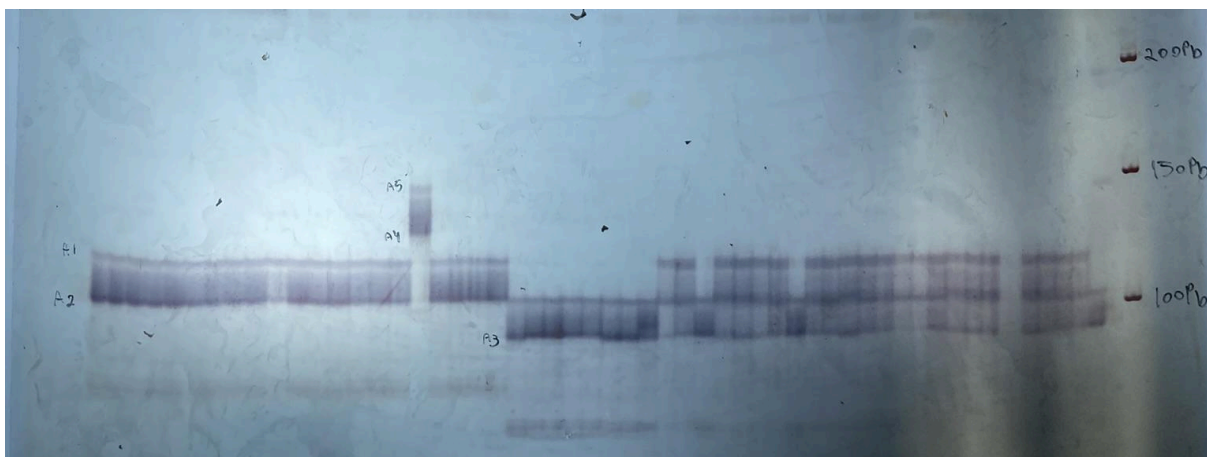


Figura 7: Marcador molecular do tipo microsatélite (CMTp259), faixa de leitura 80 pb a 140 pb, um dos marcadores usados para avaliar a variabilidade genética na população, em um gel de poli-acrilamida 6% com o marcador de peso molecular de 50pb à direita do gel.