



"ENSEÑAR LA EXPLOTACIÓN DE
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**BÚSQUEDA DE PARTENOCARPIA GENÉTICA EN CALABAZA
ARBUSTIVA (*Cucurbita pepo* L.) TIPO *ROUND ZUCCHINI***

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

ALONSO MÉNDEZ LÓPEZ

Chapingo, Estado de México. Mayo del 2010.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Instituto de Horticultura

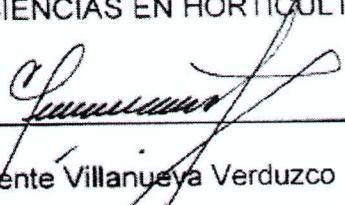
BÚSQUEDA DE PARTENOCÁRPIA GENÉTICA EN CALABAZA

ARBUSTIVA (*Cucurbita pepo* L.) TIPO ROUND ZUCCHINI

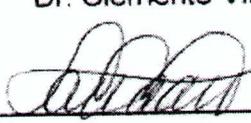
Tesis realizada por Alonso Méndez López, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: _____


Dr. Clemente Villanueva Verduzco

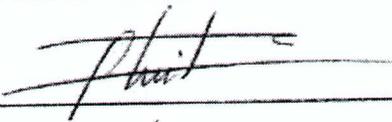
ASESOR: _____


Dr. Jaime Sahagún Castellanos

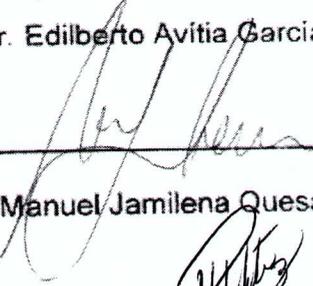
ASESOR: _____


Dra. María Teresa B. Colinas León

ASESOR: _____


Dr. Edilberto Avitia García

ASESOR: _____


Dr. Manuel Jamilena Quesada

LECTOR EXTERNO: _____


Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

Chapingo, México. Mayo de 2010.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació el 9 de octubre de 1977 en Suchiate, Chiapas. Es en la ciudad de Escuintla, Chiapas donde realizó sus estudios de Primaria en la Escuela Miguel Hidalgo y Costilla, de Secundaria en la escuela Dr. Belisario Domínguez y de Preparatoria en el Colegio de Bachilleres de Chiapas (COBACH) Plantel 02. En 1997 ingresa a Propedéutico en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y egresa en junio del 2002 obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. En agosto del 2003 ingresa al Departamento de Parasitología Agrícola para iniciar sus estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal y obtiene el Grado en octubre del 2005. En enero del 2006 inicia sus estudios de Doctorado en Ciencias en Horticultura en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia, UACH.

Ha trabajado como asesor técnico en la producción de hortalizas (jitomate y chile) a campo abierto en Sahuayo, Michoacán. Participó en la elaboración e impartición de talleres sobre cultivos alternativos en zonas marginadas de Puebla y Morelos financiado por la Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL). Fue asesor técnico en el proyecto Agencia de Desarrollo Local (ADL) Sierra de Huautla, Morelos financiado por la SEDESOL. Actualmente trabaja en la Preparatoria Agrícola de la UACH.

AGRADECIMIENTOS

A dios por permitirme vivir y disfrutar de haber alcanzado una meta más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de Doctorado en Ciencias en Horticultura.

A la Universidad Autónoma Chapingo y a los profesores del Doctorado en Ciencias en Horticultura por inculcarme los conocimientos científicos y técnicos necesarios para lograr una formación objetiva e integral.

Al departamento de Fitotecnia por el apoyo y las facilidades brindadas para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados (CP) por las facilidades brindadas para el desarrollo de la fase molecular de esta investigación.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco, por su amistad, enseñanza, aportaciones puntuales y fundamentales a esta investigación.

A la Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, por sus importantes y puntuales aportaciones a esta tesis.

A los Doctores: Jaime Sahagún Castellanos; María Teresa B. Colinas León; Edilberto Avitia García y Manuel Jamilena Quesada, por sus consejos y aportaciones a la tesis.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez, por su amistad y apoyo durante mi estancia en el Doctorado.

A los trabajadores de Campo Agrícola Experimental de Fitotecnia, en especial a Maximino Ramírez Ayala y Agustín Carrillo Solano por su apoyo en la fase de campo de la tesis.

A mis amigos y compañeros del posgrado por su amistad y por todos los momentos de convivencia dentro y fuera de las aulas.

A todos gracias...

DEDICATORIA

Especialmente a mi hija

Ximena

*Por ser lo mas maravilloso que ha llegado a mi vida.
Por ser el motivo para seguir adelante a pesar de todos los
obstáculos.*

...Te amo loquí.

A mi amada esposa

Miriam Sánchez Vega

*Por su inmenso e incondicional amor, confianza, comprensión
y apoyo decidido.
Por ser el pilar del cual se apoya toda mi estructura.*

...Te amo güerita.

A mis padres

Ángela López Cruz y Alonso Méndez Pérez

*Por darme la vida y su apoyo incondicional en todos mis
proyectos profesionales.*

A mis hermanos

Teresa†, Gonzalo, Leandro, José Ángel, Ramón, Marisela y Ciro.

Por su amor y apoyo.

A mi suegra y cuñados

Rosalba G. Vega Rodríguez, Gerardo, Lorena y Brenda†

Por su cariño y apoyo

¡Gracias!

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN GENERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA	2
LITERATURA CONSULTADA	14
CAPÍTULO I. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y AGRUPAMIENTO DE GENOTIPOS PARTENOCÁRPICOS DE CALABAZA (<i>Cucurbita pepo</i> L.) TIPO <i>ROUND ZUCCHINI</i>	18
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE RAPD EN NUEVAS VARIEDADES PARTENOCÁRPICAS ARBUSTIVAS DE CALABAZA (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	42
CAPÍTULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIANTE MICROSATÉLITES Y RAMP DE VARIEDADES PARTENOCÁRPICAS ARBUSTIVAS DE CALABAZA (<i>Cucurbita pepo</i> L.) TIPO <i>ROUND ZUCCHINI</i>	63
DISCUSIÓN GENERAL	86
CONCLUSIONES GENERALES	88

**BÚSQUEDA DE PARTENOCARPIA GENÉTICA EN CALABAZA
ARBUSTIVA (*Cucurbita pepo* L.) TIPO ROUND ZUCCHINI**

**SEARCH FOR GENETIC PARTHENOCAOPY IN FIELD PUMPKIN (*Cucurbita
pepo* L.) ROUND ZUCCHINI TYPE**

Alonso Méndez López¹ y Clemente Villanueva Verduzco².

RESUMEN GENERAL

Este estudio se desarrolló en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), con el objetivo de buscar, localizar y caracterizar morfológica y molecularmente (RAPD, Microsatélites y RAMP) genotipos arbustivos partenocárpicos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) tipo *round zucchini*. El material genético base de esta investigación fue una población de amplia base genética proveniente de la libre recombinación de las progenies de cruzamientos dialélicos con el método IV completo de Griffing (1989) con siete variedades experimentales de calabazas arbustivas usadas como progenitores. Dicha población fue desarrollada ex profeso en el Programa de Mejoramiento genético del Departamento de Fitotecnia de la UACH; de donde fueron seleccionados 46 genotipos *partenocárpicos* arbustivos, precoces y productivos tipo *round zucchini*, que pueden ser usados directamente como variedades para la producción de calabacita en invernadero sin el requerimiento de los ineficientes abejorros (*Bombus terrestris*) como polinizadores.

Palabras clave: partenocarpia, variedades partenocárpicas, marcadores moleculares, *C. pepo* L.

¹Autor de la tesis

²Director de la tesis

GENERAL ABSTRACT

This study was conducted at the Universidad Autonoma Chapingo (UACH), in order to search for locate and characterize morphological and molecular (RAPD, microsatellites and RAMP) parthenocarpic field pumpkin genotypes (*Cucurbita pepo* L.) *round zucchini* type. The genetic material in this investigation was a broad genetic base population from free recombination of progenies of diallel crosses with the full IV Griffing method (1989) with seven experimental varieties of shrub type pumpkins used as parents. This population was developed expressly in the Breeding Program of the Department of Plant Science of the University, from which were selected 46 parthenocarpic bush pumpkin genotypes, precocious and productive *round zucchini* type, which can be used directly as varieties for the production of greenhouse zucchini without requiring inefficient bumblebees (*Bombus terrestris*) as pollinators.

Keywords: parthenocarpy, parthenocarpic varieties, molecular markers, *C. pepo* L.

¹Thesis author

²Thesis director

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de calabaza (*Cucurbita* spp.) ha sido importante desde épocas prehispánicas y de primordial importancia en el desarrollo de las primeras civilizaciones de América. En México, su cultivo y consumo es muy popular, atribuible a la gran variedad de tipos criollos que existen en las diferentes regiones del país (Villanueva, 2007).

La importancia de la calabaza se debe a su contenido de sustancias nutritivas y a las cualidades gustativas de su fruto; la pulpa del fruto maduro contiene de 11 a 27 % de sólidos totales y 45 % de azúcares de acuerdo con las variedades; las semillas son muy ricas en grasas, proteínas y albúminas (Guenkov, 1974). El fruto tierno y la semilla contienen 40 % de aceite y 40 % de proteína (Villanueva, 2007).

Al caracterizar una especie se estima la variabilidad existente en el genoma vegetal del conjunto de individuos que la conforman; así, toda la información codificada por los genes establece su identidad morfológica (Franco e Hidalgo, 2003).

Diversos estudios han demostrado variaciones en el grado de partenocarpia natural entre las variedades de calabaza. Los tipos *zucchini* y *caserta* son los más partenocárpicos (Nijs y Balder, 1983; Om y Hong, 1989; Robinson y Reiners, 1999). Aunque las variedades híbridas tipo *zucchini* que se utilizan en invernadero poseen un nivel de partenocarpia elevado, la falta de polinización o de tratamientos hormonales disminuye la calidad final de los frutos (Gómez *et al.*, 2004).

Esta investigación tuvo como objetivo la búsqueda de partenocarpia en genotipos arbustivos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) tipo *round zucchini*, así como su caracterización morfológica y genética mediante análisis moleculares tipo RAPD, Microsatélites y RAMP.

REVISIÓN DE LITERATURA

La calabaza (*Cucurbita pepo* L. spp. *pepo*), pertenece al género *Cucurbita*, uno de los géneros cultivados económicamente más importantes. Está compuesto por unas veintidos especies silvestres y cinco especies cultivadas (Decker, 1988). Estas especies son *C. pepo*, *C. moschata*, *C. maxima*, *C. ficifolia* y *C. argyrosperma* (sin. *C. mixta*), siendo las tres primeras (*C. pepo*, *C. moschata* y *C. maxima*) las más importantes económicamente y las más ampliamente distribuidas. *Cucurbita* es un género Americano, caracterizado por sus hojas grandes palmeadas, por sus flores amarillo-anaranjadas productoras de néctar y polinizadas por abejas, y por sus frutos grandes, duros, esféricos e indehiscentes. La mayoría de las especies de este género son mesófilas, monoicas y con sistema radical fibroso (Paris, 2001; Nee, 1990; Villanueva, 2007).

C. pepo es la especie cultivada del género *Cucurbita* de mayor importancia económica a nivel mundial, así como la más polimórfica. Este polimorfismo se manifiesta especialmente en sus frutos (tamaño, forma, color, patrón de coloración, textura, etc), pero también en sus características vegetativas (hábito de crecimiento, longitud y grosor de los entrenudos, tamaño de las hojas, etc). La principal forma de

consumirla es usando el fruto como verdura, seguida del fruto maduro en la reposttería (Villanueva, 2007).

Actualmente se cree que han existido al menos dos domesticaciones independientes de *C. pepo*, una en México y otra en Estados Unidos. Esta idea está apoyada por hallazgos arqueológicos, datos de estudios aloenzimáticos (Decker, 1988), y estudios filogenéticos con ADN mitocondrial (Sanjur et al., 2002) y marcadores moleculares RAPDs, AFLPs, ISSR y SSR (Smith, 2006), que ponen de manifiesto la domesticación de *C. pepo* desde hace 4000 años en tres sitios bastante alejados de Norteamérica, concretamente en el Sureste y Noroeste de México y Este de Estados Unidos (Paris, 2001). Estas dos domesticaciones dieron lugar a dos linajes, que actualmente se clasifican como dos subespecies *C. pepo* spp. *pepo* y *C. pepo* spp. *ovifera*. *C. pepo* spp. *pepo*, fue domesticada desde un progenitor desconocido hace unos 10,000 años en México; mientras que *C. pepo* spp. *ovifera* se cree que proviene de una domesticación posterior (hace unos 5000 años) en el Este de Estados Unidos desde la especie silvestre *C. pepo* spp. *ovifera* variedad ozarcana (Lira, 1995).

Existen ocho variedades botánicas o morfotipos comestibles de *C. pepo* clasificado en función de la morfología de sus frutos. Esto se ha confirmado por análisis con marcadores moleculares (Paris, 1989; Paris et al., 2003; Paris y Janick, 2005). Éstas son: 'Punpkin', 'Vegetal Marrow', 'Cocozelle' y 'zucchini' (pertenecientes a *C. pepo* spp. *pepo*), 'Scallop', 'Acorn', 'Crookneck' y 'Straighneck' de la subespecie *ovifera*.

Análisis multivariados

La Estadística Multivariada (quimiometría) ha sido definida en amplios términos como la ciencia que correlaciona las mediciones realizadas en un sistema o proceso químico mediante la aplicación de métodos estadísticos o matemáticos. El uso de técnicas de análisis multivariado de datos, en los cuales varias muestras correlacionadas son analizadas simultáneamente. La Estadística Multivariada se basa en la necesidad de analizar diferentes variables conjuntamente para obtener la mayor cantidad de información posible de un sistema; el ordenamiento típico de los datos se define en una estructura de dos vías; una matriz en la cual las columnas representarán cada una de las variables estudiadas y las filas de cada muestra analizada (Todeschini *et al.*, 2009).

La Estadística Multivariada permite manejar grandes cantidades de datos, procesarlos y entregar resultados útiles que puedan ser interpretados por los operadores. Otra característica fundamental de estos métodos es la simplicidad de sus respuestas, esto significa que los modelos matemáticos usados para interpretar los datos pueden ser complejos, pero las respuestas entregadas deben ser claras (Todeschini *et al.*, 2009).

Marcadores Moleculares

El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, principalmente los basados en

Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR e ISSR), RAMPO y RAMP.

Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP)

Los RFLPs permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del ADN (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con las proteínas (Wang *et al.*, 1992). Las principales ventajas de los RFLPs radican en la presencia de un número ilimitado de ellos no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos y pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Foolad *et al.*, 1995).

La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce cantidades equimolares de fragmentos para una molécula de ADN dada. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos-X, de acuerdo con el peso molecular de la banda.

Básicamente, los RFLPs son causados por rearrreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de

diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico al hibridar con la sonda seleccionada (Foolad *et al.*, 1995).

Los RFLPs se heredan en forma Mendeliana simple con acción codominante, y si la sonda empleada representa una copia única, ella es considerada como un *locus* y las variaciones en patrones son analizados como alelos (bialélicos o multialélicos) (Doebley y Wendel, 1989). La expresión de estos marcadores es codominante, por lo que todas las formas alélicas del gen son distinguibles, permitiendo detectar los híbridos y con ellos estudiar el flujo de genes entre poblaciones. El nivel de polimorfismo que esta técnica puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad en cuanto al tamaño del genoma de la especie en estudio (Valadez y Kahl, 2005).

Entre las principales desventajas de los RFLP están la clonación de las sondas, detección de RFLP en las membranas y el uso de radioactividad; tareas consideradas laboriosas, lentas y caras. Aunque últimamente el desarrollo de la técnica no-radioactiva ha simplificado esta metodología (Foolad *et al.*, 1995).

El uso de los RFLP en plantas representa una buena alternativa para realizar diversos estudios relacionados con los tres genomas que existen en ellas, el nuclear (ADNn), mitocondrial (ADNmt) y el de cloroplasto (ADNcp). La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, diversidad genética (Becerra y Gepts, 1994) e identificación de cultivares con propósitos de protección varietal.

El uso de uno u otro genoma dependerá de los propósitos del estudio. El ADN nuclear ha sido mayormente usado para estudios de diversidad genética de individuos emparentados por su mayor tasa de mutación en comparación al ADN mitocondrial y el de cloroplasto.

Es así como el ADNmt ha sido usado mayormente en estudios de filogenia en animales. En plantas, el uso de este genoma en estudios filogenéticos es discutido debido a la presencia de rearrreglos del ADN y a la detección de ADN foráneo dentro de sus secuencias nucleotídicas (Palmer, 1992). Sin embargo, en maíz este ADN ha sido usado, detectándose una variabilidad considerable (Weissinger *et al.*, 1983). Debido a su alta tasa de rearrreglos, la mitocondria pareciera ser más útil que el uso del cloroplasto para estudiar diversidad en las especies.

Se ha detectado diversidad de ADNcp entre especies, por lo que el uso de cloroplastos es importante en estudios de filogenia (Palmer *et al.*, 1983). Durante la evolución del cloroplasto han ocurrido considerables sustituciones de bases, lo que ha producido cambios en los sitios de restricción, en lugar de rearrreglos dentro del genoma como ha ocurrido con las mitocondrias. Dentro de las especies el ADNcp ha sido usado principalmente para comparar entre genotipos cultivados y silvestres.

Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)

Recientemente, se ha desarrollado una serie de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (White *et al.*, 1989). El principio de esta técnica se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando un partidor, ADN genómico molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y *Taq* ADN polimerasa. Esta

reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde. Estos productos son polimórficos cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la cadena molde (ADN genómico).

A partir del PCR se han generado una serie de técnicas, tales como la de Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificado al Azar (RAPD). Esta técnica usa partidores aleatorios de 10 mers (Williams *et al.*, 1990) para amplificar el ADN. Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferente peso molecular representan diferentes *loci*. En algunas especies, la técnica da la opción de usar dos o más partidores dentro de la misma reacción para aumentar el número de bandas, logrando una mayor cantidad de información por reacción.

Los productos de la reacción dependerán del genoma en estudio, del partidor y de las condiciones de la reacción. Los resultados de RAPD obtenidos en plantas indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 *loci* por partidor), su tremenda potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica; y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas.

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo como desventaja aparece la inconsistencia de los datos. Diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación, pueden dar origen a resultados

diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes (Valadez y Kahl, 2005).

Minisatélites y Microsatélites.

Las secuencias de ADN de mini (VNTR) y microsatélites (SSR e ISSR) son dos categorías de secuencias repetidas que se presentan en eucariontes. Ellas se encuentran repetidas en tandem y dispersas a través del genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad. A través del uso de estos marcadores se han obtenido patrones complejos de ADN en animales, plantas, y microorganismos.

Dentro de la primera categoría, los minisatélites son usados como sondas de secuencias simples repetidas. Las secuencias repetidas de estos minisatélites son monómeros que generalmente tienen 15-35 pares de bases, y han sido aislados de mamíferos, plantas y del genoma del bacteriófago M13. Una combinación de una enzima de restricción con la sonda de M13 puede generar un alto número de bandas, lo cual produce una gran información, comparada con los RFLPs. Al igual que éstos, la técnica es de alta reproducibilidad, aunque requiere de un proceso de clonación previo de la sonda hipervariable, además de un ADN de alta calidad para el proceso de restricción y transferencia (Southern blot), e hibridación con la sonda, generalmente marcada radioactivamente, y finalmente de la exposición a una película de rayos-X. Actualmente, este polimorfismo puede ser detectado mediante PCR,

mediante el uso de partidores que reconocen secuencias externas que rodean a las secuencias repetidas (Heat *et al.*, 1993). Este polimorfismo identifica un *locus* que resulta ser multialélico debido a un elevado número de unidades repetidas, que corresponden a muchos alelos.

La segunda categoría de secuencias repetidas son los microsatélites, ellos son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidos en tandem y existen en forma abundante en plantas (Condit y Hubbell, 1991). Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de partidores y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los partidores que rodean los microsatélites (Brondani *et al.*, 1998). Los fragmentos generados son separados en geles denaturantes de poliacrilamida y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata.

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas, pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad. El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicos y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas (Lu *et al.*, 1996).

En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Por ejemplo, en *Cucumis* 29 isoenzimas no mostraron polimorfismo entre dos genotipos comerciales (Perl-Treves *et al.*, 1985). Dentro del mismo género RAPD detectó un 38% de polimorfismo, mientras que los microsatélites detectaron un 71%, e incluso detectaron diferencias genéticas entre cultivares altamente emparentados que mediante otras técnicas no habían podido ser distinguidos (Katzir *et al.*, 1996). Es así como se ha comprobado, en diversas especies, la complementariedad de todas las técnicas mencionadas anteriormente en el estudio global de la organización genética del germoplasma.

Una de las desventajas de los microsatélites es el tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada partidor; sin embargo, existe la posibilidad de usar los mismos partidores en más de una especie. Esto es debido a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies tan distantes como son algunos mamíferos, plantas anuales y perennes. Esto no es generalizado en todas las especies, puesto que al comparar entre cereales de grano pequeño como trigo, cebada y centeno, se ha detectado una limitada conservación de las secuencias microsatelitales (Berumen, 1993).

Hasta ahora también se han desarrollado microsatélites en especies perennes, aunque el número de ellos ha sido escaso (Brondani *et al.*, 1998). En el caso de *Eucaliptus* los microsatélites han sido transferidos entre poblaciones y especies del mismo género. En forma adicional, la estimación de heterocigosidad que este marcador puede entregar presenta una gran ventaja en el mapeo de características cuantitativas (QTLs), comparación de mapas que incluyen QTL y estudios de flujo genético en árboles.

RAMPO y RAMP

Hipotéticamente cada reacción de RAPD genera muchos más productos de amplificación los que pueden ser detectados al teñir el gel con bromuro de etidio. Éste es el caso principalmente de aquellos amplicones que son flanqueados por algún iniciador de homología incompleta y que como consecuencia pueden presentar bajo nivel de detección. La técnica de RAMPO permite optimizar la información obtenida con cualquiera de las técnicas de PCR. Por ejemplo, las huellas de RAPD y microsatélites. Las huellas de ADN detectadas con estas técnicas se revierten como “marcadores de primera generación”. La optimización consiste en la detección mediante hibridación con sondas de huellas de microsatélites presentes en los amplicones sintetizados durante la PCR. Los patrones de bandeo RAMPO obtenidos con microsatélites han mostrado una mayor complejidad respecto a los detectados con RAPD; sin embargo, son altamente reproducibles, además de que las diferentes secuencias principales de microsatélites pueden utilizarse como sondas. La mayoría de las posibilidades de combinaciones de iniciadores de RAPD y sondas de microsatélites no son limitantes para hacer de la técnica de RAMPO una fuente rica de marcadores moleculares. Esta técnica extiende la información contenida en geles de RAPD o microsatélites al menos de cinco a ocho veces y las bandas obtenidas pueden ser clonadas y usadas para sondas de RFLP o como puntos de inicio para el aislamiento de marcadores de microsatélites para *locus* específicos (Jeffreys *et al.*, 1985).

La técnica RAMP significa amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites. Combina a los RAPD (técnica que utiliza moléculas iniciadoras aleatorias y sintéticas) con hibridación de microsatélites como sondas, para producir

varias huellas genéticas polimórficas e independientes en un único gel electroforético. La técnica inicia con la amplificación del ADN genómico con un iniciador aleatorio sintético (RAPD). Después se separan electroforéticamente y se tiñen los productos de la PCR, el gel se seca o se transfiere a una membrana de nylon, y una subsecuente hibridación con una sonda de oligonucleótidos complementario al microsatélite. La autorradiografía obtenida es una huella génica polimórfica y reproducible, la cual no corresponde a los patrones teñidos en el gel y puede ser diferente al usar sondas distintas. Con esta prueba se generan patrones de bandas que revelan huellas génicas variables entre genotipos cercanamente relacionados (Valadez y Kahl, 2005).

Aunque el uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de germoplasma y diversidad genética es limitado por el costo de los reactivos, y en algunos casos por el elevado costo de los equipos, los avances técnicos que estas tecnologías han alcanzado en los últimos años, los hacen más accesibles a los genetistas y a los programas de mejoramiento. Ambos tipos de análisis son complementarios en la caracterización morfológica y agronómica del germoplasma y en el entendimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones y especies.

LITERATURA CONSULTADA

- BECERRA, V. AND GEPTS, P. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. *Genome* 37: 253-263.
- BERUMEN C., J. 1993. El análisis del ácido desoxirribonucleico –DNA- en la identificación de individuos. *Ciencia y Desarrollo*. No 111: 34-42.
- BRONDANI, R.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R. AND GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97:816-827.
- CONDIT, R. AND HUBBELL, S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome* 34:66-71.
- DECKER, D. S. 1988. Origin(s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* 42(1), 4-15.
- DOEBLEY, J. AND WENDEL, J.D. 1989. Application of RFLPs to plant systematics. In : Helentjarus, T.; Barr, B. (Eds.) Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. New York, U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratories. p.57-67
- FOOLAD, M.R.; ARULSEKAR, S.; BECERRA, V. AND BLISS, F.A. 1995. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* 91 :262-269.
- FRANCO T., L. E HIDALGO, R. (2003). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- GÓMEZ P., PEÑARANDA A., PAYÁN C., CÁRCELES R., JAMILÉNA M. 2004. Alternativas a la utilización de hormonas sintéticas para el cuajado del fruto de calabacín en invernadero. *Actas del VI Congreso de SEAE*.

- GUENKOV, G. 1974. Fundamentos de Horticultura Cubana. Instituto cubano del libro. La Habana, Cuba. pp. 169-172.
- HEAT, D.D.; IWAMA, G.K. AND DEVLIN, R.H. 1993. PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Res.* 21: 5782-5785
- JEFFREYS A., J.; WILSON, V. AND THEIN L., S. 1985. Hipervariable "minisatelite" regions in human DNA. *Nature* 312:67-73.
- KATZIR, N.; DANIN-POLEG, Y.; TZURI, G.; KARCHI, Z.; LAVI, U. AND CREGAN, P. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1282-1290.
- LIRA S. R. 1995. Estudios taxonómicos y Ecogeográficos de las *Cucurbitaceae* Latinoamericanas de importancia económica. IPGRI. Roma, Italia. 218 p.
- LU J.; KNOX M., R.; AMBROSE M., J.; BROWN J., K. M. AND ELLIS T., H. N. 1996. Comparative Análisis of Genetic Diversity in pe Assessed by RFLP-and PCR-based methods. *Theor. Appl. Genet.* P3:1103-1111.
- NEE, M. 1990. The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* 44 (3 supplement), 56-68.
- NIJS A.P.M. AND BALDER J. 1983. Growth of parthenocarpic and seed bearing fruits of *Zucchini* squash. *Cucurbit Genet Coop Rpt* 6: 84-85
- OM Y.H. AND HONG K.H. 1989. Evaluation of parthenocarpic fruit set in *zucchini* squash. *Res. Rpt. Rural Dev. Adm.* 31:30-33.
- PALMER, J.D. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics : applications and limitations. In : Soltis, P. ; Soltis, D. and Doyle, J. (Eds) *Molecular systematic of plants*. New York, U.S.A. Chapman and Hall. p. 36-49

- PALMER, J.D.; SHIELD, C.D.; COHEN, D.B. AND ORTON, T.J. 1983. Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica* species. *Theor. Appl. Genet.* 109 :195-213.
- PARIS, H. S. 1989. Historical records, origins, and development of edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* 43 (4), 423-443.
- PARIS, H. S. 2001. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews* 25, 71-170.
- PARIS, H. S., YONASH, N., PORTNOY, V., MOZES-DAUBE, N., TZURI, G., KATZIR, N. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 106, 971-978.
- PARIS, H. S., JANICK, J: 2005. Early evidence for the culinary use of squash flowers in Italy. *Chronica Horticulturae* 45 (2), 20-21.
- PERL-TREVES, R.; ZAMIR, R.; NAVOT, D. AND GALUN, E. 1985. Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 71 :430-436
- ROBINSON R.W. AND REINERS S. 1999. Parthenocarpy in summer squash. *Hortscience* 34: 715-717.
- SANJUR, O. I., PIPERNO, D. R., ANDRES, T. C., WESSEL-BEAVER, L. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 99 (1), 535-540.
- SMITH, B. D. 2006. Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103 (33), 12223-12228).

- TODESCHINI, R.; BILLABIO, D.; MANGANARO, A.; A. MAURI. 2009. Canonical measure of correlation (CMC) and canonical measure of distance (CMD) between sets of data. Part 1. Theory and simple chemometric applications. *Analytica Chimica Acta* (2009), 648: 52-59.
- VALADEZ M., E Y KAHL, G. 2005. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Editorial. Mundi-Prensa. México, D. F.
- VILLANUEVA V., C. 2007. Calabazas Cultivadas. Identificación de Especies, Caracterización y Descripción Varietal. Editorial. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 117 pp.
- WANG, Z.Y.; SECOND, G. AND TANSKLEY, S.D. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 83 :565-581
- WEISSINGER, A.K.; TIMOTHY, D.H.; LEVINGS, C.S. AND GOODMAN, M.M. 1983. Patterns of mitochondrial DNA variation in indigenous maize races of Latin America. *Genetics* 104:365-379
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N. AND ERLICH, H. 1989. The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* 5:185-188
- WILLIAMS, K.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A. AND TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18:6531-6533

CAPÍTULO I

OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y AGRUPAMIENTO DE GENOTIPOS PARTENOCÁRPICOS DE CALABAZA (*Cucurbita pepo* L.) TIPO *ROUND* *ZUCCHINI*

RESUMEN

Este estudio se realizó en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Estado de México, con el objetivo de obtener y caracterizar nuevos genotipos arbustivos precoces y partenocárpicos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) para el desarrollo de variedades aptas para la producción en invernadero. Se obtuvieron y caracterizaron agrónomicamente 46 genotipos arbustivos tipo *round zucchini*. Los genotipos fueron identificados y seleccionados de una población de 5,000 plantas provenientes de una población de amplia base genética construida ex-profeso; lo que representó el 0.92 % de eficiencia del sistema. Del total de genotipos, 28 presentaron frutos redondos, 12 frutos oblongos, seis frutos aplanados y uno cilíndrico; 41 genotipos mostraron frutos con costillas superficiales, cuatro con costillas intermedias y uno con costillas ausentes; 17 genotipos exhibieron pulpa dulce, 10 intermedia y 19 con pulpa insípida; seis genotipos presentaron frutos maduros con grosor de pulpa < 20 mm, 29 con grosor de pulpa entre 20-30 mm, y 11 con grosor de pulpa > 30 mm. Los 46 genotipos partenocárpicos obtenidos se conjuntaron en tres grupos; grupo 1: plantas con entrenudos de longitud intermedia, frutos redondos, pesados, con cáscara gruesa y muchas semillas grandes; grupo 2: plantas con entrenudos cortos, frutos pequeños, alargados, de bajo peso y cáscara delgada, con pocas semillas pequeñas; grupo 3: plantas con entrenudos largos, frutos redondos, con cáscara delgada y con muchas semillas de tamaño pequeño.

Palabras clave adicionales: Genotipos arbustivos, partenocarpia, selección, caracterización.

ABSTRACT

This study was conducted in the Experimental Field of the Chapingo Autonomous University, located in Chapingo, Mexico State. The aim was to collect and characterize new early (precocious) and parthenocarpic pumpkin (*Cucurbita pepo* L) genotypes for the development of varieties suitable for greenhouse production. Forty-six parthenocarpic bush-type *round zucchini* genotypes were obtained and agronomical characterized. The genotypes were identified and selected from a population of 5,000 plants originating from a purposely-constructed population of wide genetic base, which represented a system efficiency of 0.92 %. From the total of genotypes, 28 presented round fruits, 12 presented oblong fruits, six presented flattened fruits and one presented a cylindrical fruit. There were 41 genotypes with shallow ribs, four with intermediate ribs and one without ribs. Seventeen genotypes exhibited sweet pulp, 10 with intermediate pulp and the 19 with insipid pulp. Six genotypes presented mature fruits with pulp thickness of <20 mm, 29 with pulp thickness between 20-30 mm and 11 with pulp thickness >30 mm. The 46 parthenocarpic genotypes obtained came together in three groups: group 1; plants with internodes of intermediate length, fruits round, heavy, thick shell, and many large seeds; group 2: plants with short internodes, small fruits, low weight and elongated thin-shelled with few small seeds, group 3: plants with long, round fruit with thin skin and many small seeds.

Additional Keywords: Bush-type genotypes, parthenocarpy, selection, characterization.

INTRODUCCIÓN

La calabaza (*Cucurbita* spp.) es una especie alógama de polinización entomófila. La producción de calabacita bajo cubierta enfrenta dificultades derivadas de la mala polinización por los abejorros (*Bombus terrestris*) que tienen hábito de vuelo elevado, y las condiciones desfavorables de temperatura en el interior del invernadero. Actualmente existen en el mundo algunas variedades de calabacita comercializadas como partenocárpicas, entre ellas destacan 'Cora', 'Tosca', 'Balboa', 'Elite', 'Cavili' y 'Mastil'; sin embargo, sus evaluaciones en invernadero han indicado que presentan algunos inconvenientes como la deformación y caída de frutos tiernos (calabacita) en ausencia de polinizadores (Peñaranda *et al.*, 2007).

Entre los inconvenientes de la mala polinización de la calabacita producida en invernadero en España, están: el acortamiento de la vida de anaquel, el crecimiento deforme del fruto y el sabor amargo de la hortaliza; adicionales a algunos problemas fisiológicos como el denominado síndrome de "flor pegada" y masculinización de las plantas ocasionado por las altas temperaturas (Peñaranda *et al.*, 2007).

En este contexto, algunas compañías semilleras importantes del mundo, actualmente están buscando intensamente materiales partenocárpicas que permitan obtener variedades específicas para la producción de calabacita en invernadero. El cultivo de calabacita tipo *zucchini* en España, en el 2006 superó las 240,000 toneladas, concentrándose en Almería el 70 % de la producción española, donde se ha convertido en el cuarto cultivo en importancia en cuanto a productividad y rentabilidad producido bajo invernadero (Peñaranda *et al.*, 2007).

Durante el año agrícola 2007, en México se sembraron 31,738.2 ha de calabaza para verdura a cielo abierto, obteniendo 444,827.2 ton. El Estado de México participó con 1,252 ha y con producción total de 17,316.4 ton (SAGARPA, 2008). En México, los trabajos sobre mejoramiento genético están encaminados a generar variedades de calabaza con alto potencial de producción de fruto maduro y con alto contenido de semillas (Montes, 1991; Lira, 1995; Villanueva, 2007).

La producción de calabacita en invernadero es una alternativa económica importante, factible de desarrollarse. Los frutos partenocárpicos son frutos sin semillas que se desarrollan en ausencia de polinización y fecundación. La partenocarpia supone el desacoplamiento de los procesos de fecundación y crecimiento del fruto, por lo que se trata de un carácter de gran interés a la hora de corregir la falta de amarre de frutos en condiciones ambientales desfavorables para la polinización y la fecundación (Schwabe y Mills, 1981).

Actualmente, conociendo de la importancia de la partenocarpia para variedades de calabacita de invernadero, se realizan esfuerzos en la búsqueda de partenocarpia genéticamente determinada para variedades de calabaza para verdura (*Cucurbita pepo* L.) que no requieran del estímulo de la polinización para que el fruto desarrolle de forma normal hasta la madurez.

México es centro de origen y domesticación de cuatro especies de calabaza (*C. ficifolia*, *C. argyrosperma*, *C. moschata* y *C. pepo*), con una amplia biodiversidad intraespecífica, razón por la que se consideró que es posible encontrar fuentes de partenocarpia para generar variedades especiales de calabaza para la producción en invernadero. El objetivo de esta investigación fue obtener y caracterizar

agronómicamente nuevos genotipos arbustivos precoces de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) tipo *round zucchini* que muestren la característica genética de partenocarpia natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

El experimento se desarrolló durante el ciclo primavera-verano (abril a agosto) de los años 2007 y 2008 en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo en Chapingo, México, geográficamente localizado a 19° 32' de latitud norte y 98° 51' de longitud oeste del meridiano de Greenwich a una altura de 2240 msnm y con clima tipo C: templado húmedo y con estación invernal seca (García, 1988).

Material genético

La semilla de la población utilizada fue un compuesto de amplia base genética proveniente de la recombinación mediante un diseño dialélico completo con el método IV de Griffing (1989) con siete variedades experimentales de calabazas arbustivas tipo *round zucchini* usadas como progenitores. Dicha población fue desarrollada *ex profeso* durante el ciclo primavera-verano del año 2007, en el programa de mejoramiento genético del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Establecimiento del experimento

En la primavera del 2008 se sembraron 5,000 semillas provenientes de la población de amplia base genética formada para tal efecto, en charolas de poliestireno con 200 cavidades. Se utilizó turba (peat moss) como sustrato. Se colocó una semilla por cavidad y posteriormente se humedeció perfectamente cada charola sembrada. Las charolas se mantuvieron apiladas durante los ocho primeros días, hasta el inicio de la emergencia de las plántulas. En el invernadero se les aplicó un riego diario con agua sola durante los primeros 15 días y posteriormente se regó con solución nutritiva. La nutrición aplicada fue la solución hidropónica universal (Steiner, 1984) diluída al 50 % hasta el transplante a campo, que ocurrió a los 25 días posteriores a la siembra, cuando las plántulas presentaban dos hojas verdaderas pequeñas. El transplante se hizo el 6 de mayo del 2008, en 50 surcos de 50 m de largo, separados a 1.0 m y una distancia entre plantas de 0.5 m. Se utilizó riego por goteo, este mismo sirvió como medio para la aplicación de la fertilización al cultivo con la dosis (200-150-100), distribuida en tres aplicaciones: la primera al momento del transplante, la segunda a los 15 días después del transplante (ddt) y la tercera a los 30 ddt.

Identificación y selección de plantas partenocárpicas

Un día antes de la antesis de las flores femeninas de calabaza, éstas fueron cubiertas en forma manual para evitar la polinización, con una bolsa de papel tipo glassine y aseguradas con una grapa para evitar su caída y la introducción de insectos polinizadores. A los seis días después de cubiertas las flores y cuando los frutos rompieron la bolsa por su crecimiento y desarrollo, se asumió que estas plantas

que no mostraron flacidez y caída de frutos por la falta de polinización, son partenocárpicas; por lo que se comenzó con la toma de datos cualitativos y cuantitativos para su caracterización a nivel de plantas individuales. A los 40 días se eliminaron los frutos de las flores inicialmente cubiertas para determinar partenocarpia; para luego proceder a autofecundar manualmente las flores de la planta y así procurar la homocigosis y los genes responsables de la partenocarpia en cada planta; al eliminar los frutos partenocárpicos ya amarrados se logro asegurar suficiente energía de la planta para el desarrollo normal de los frutos de las flores autofecundadas y así producir la semilla S_1 que permitirá su mantenimiento y utilización.

Genotipos caracterizados

De las 5,000 plantas establecidas pudieron seleccionarse 46 plantas (genotipos) como partenocárpicas, ya que fueron plantas que mostraron la capacidad de amarrar y desarrollar el fruto en flores no polinizadas. Dichas plantas fueron sometidas a la descripción y caracterización morfológica y agronómica, durante ese mismo ciclo mientras permanecieron en el campo. La caracterización morfológica se hizo mediante la medición calificada con una escala de 1 a 7 de 45 descriptores (hoja, hábito de crecimiento, fruto y semilla) para *Cucurbita pepo* L., conforme a la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales 2002-2007, TG/119/4); y siete caracteres cuantitativos adicionales de interés agronómico.

Análisis estadístico

Caracterización

El análisis de los datos de las variables registradas se hizo con el paquete estadístico *Statistical Analysis System (SAS)* Versión 8.0. Inicialmente se realizó una discriminación de variables al eliminar aquellas que presentaron coeficientes de variación menores de 10 %. De 52 caracteres en total, se eliminaron 15 para dejar 37 que fueron útiles, ya que los componentes principales no detectaron eficientemente las variables que permitieran la caracterización de genotipos partenocárpicos y separación de grupos similares entre ellos.

Análisis Multivariado de grupos

Se aplicó un análisis de agrupamiento utilizando distancias euclidianas al cuadrado, calculadas a partir de datos estandarizados. Con el propósito de verificar los resultados del análisis de agrupamiento y determinar los caracteres responsables de la agrupación obtenida, se realizó un análisis discriminante, donde se consideraron dichos grupos como variable categórica. Para verificar la pertenencia de cada uno de los genotipos a los grupos formados, se aplicó una prueba de resustitución de variables (Johnson, 1998), la cual consiste en utilizar las funciones discriminantes generadas sobre las variables originales.

La construcción del dendrograma derivado de las distancias euclidianas se realizó con el método de mínima varianza de Ward. La altura de corte del cluster para definir el número de grupos se estableció mediante las pruebas: criterio de

agrupamiento cúbico (CCC) y el estadístico denominado pseudoestadística- T^2 de Hollander (Johnson, 1998). Por último, se representaron en forma gráfica los grupos de genotipos partenocárpicos generados de las variables discriminantes, a partir de la aplicación de una prueba de resustitución de variables (Johnson, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de genotipos partenocárpicos

Se identificaron y seleccionaron 46 genotipos partenocárpicos obtenidos a partir de una población inicial de 5,000 plantas provenientes de un compuesto de amplia base genética; los que representan el 0.92% del total plantas establecidas. De ellos se obtuvo semilla (S_1) mediante sus correspondientes autofecundaciones manuales. En los Cuadros 1 y 2 se muestran los caracteres cualitativos y cuantitativos, que describen y caracterizan a los 46 genotipos partenocárpicos arbustivos de calabaza obtenidos. Los correspondientes caracteres cualitativos que permitieron agrupar en cada caso a los 46 genotipos partenocárpicos obtenidos, fueron:

De fruto: a) forma (27 genotipos redondos, 12 oblongos, seis aplanados y uno cilíndrico); b) costillas en el fruto maduro (41 genotipos con costillas superficiales, cuatro con intermedias y uno ausentes); c) resistencia a la separación del pedúnculo en fruto maduro (25 genotipos de separación difícil, 19 intermedia y dos de fácil separación); d) dureza de la cáscara del fruto maduro (40 genotipos con cáscara dura, cinco intermedia y uno suave); e) cantidad de tejido placentario (23 genotipos

con alto contenido placentario, 18 intermedio y cinco bajo); f) sabor de la pulpa cruda (17 genotipos con pulpa dulce, 10 intermedia y 19 insípida).

De semilla: a) color de semilla (nueve genotipos con semilla de color blanco, 17 crema y 20 naranja-bronceado); b) color del margen de la semilla (11 genotipos con margen blanco, 16 bronceado y 19 amarillo); c) tamaño de semilla (33 genotipos con semilla de tamaño mediano y 13 con semilla pequeña) (Cuadro 1).

En tanto que de los caracteres cuantitativos estudiados, los que se identificaron con mayor aporte a la caracterización de los respectivos 46 genotipos fueron:

Grosor de cáscara del fruto maduro (nueve genotipos con grosor de cáscara < 2.0 mm, 22 entre 2.0-3.9 mm y 15 fueron > 4.0 mm); grosor de pulpa (seis genotipos con grosor < 20 mm, 29 entre 20-30 mm, y 11 fueron > 30 mm); peso seco de semilla por planta (siete genotipos tuvieron < 10 g, 12 entre 10-20 g y 27 tuvieron > 20 g de semilla) (Cuadro 2).

Valor agronómico de los genotipos

Se aprecia que todos los genotipos partenocárpicos encontrados son de porte arbustivo; precoces a floración masculina y femenina; productivos (en número total de frutos por planta, fruto maduro y peso de semillas secas por fruto) (Cuadro 2), por lo que se podrían utilizar directamente como nuevas variedades competitivas para la producción en invernadero con la ventaja de no requerir la deficiente polinización entomófila con abejorros (*Bombus terrestris*), al ser partenocárpicas.

CUADRO 1. Caracterización agronómica mediante 11 descriptores cualitativos de 46 genotipos partenocárpicos de calabaza tipo round zucchini.

No. GENOTIPO	FF	CF	SEP	DC	CTP	CP	SP	CS	GMS	CMS	TS
1	redondo	superficiales	intermedio	dura	alto	blanca	intermedia	crema	deigado y uniforme	Amanillo	intermedia
2	oblongo rectangular	superficiales	difícil	intermedia	alto	anaranjada	dulce	naranja	grueso e irregular	Naranja	intermedia
3	oblongo rectangular	intermedias	difícil	intermedia	alto	salmon	dulce	naranja	grueso y uniforme	Bronceado	intermedia
4	redondo	superficiales	difícil	intermedia	alto	blanca	inspida	blanco	deigado y uniforme	bronceado	pequeña
5	redondo	superficiales	difícil	intermedia	alto	anaranjada	dulce	blanco	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
6	redondo	intermedias	intermedio	dura	intermedia	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
7	redondo	superficiales	intermedio	dura	intermedio	amarilla	intermedia	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
8	aplanado	superficiales	difícil	dura	alto	amarilla	intermedia	café	deigado y uniforme	bronceado	pequeña
9	redondo	superficiales	difícil	dura	intermedio	blanca	inspida	blanco	deigado y uniforme	blanco	pequeña
10	redondo	superficiales	difícil	dura	alto	salmon	intermedia	bronceado	grueso y uniforme	bronceado	intermedia
11	oblongo rectangular	superficiales	difícil	dura	alto	blanca	inspida	blanco	grueso y uniforme	bronceado	pequeña
12	rectangular	superficiales	difícil	dura	bajo	blanca	inspida	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
13	oblongo rectangular	superficiales	difícil	dura	intermedio	salmon	dulce	naranja	deigado y uniforme	bronceado	intermedia
14	redondo	superficiales	intermedio	dura	intermedio	blanca	intermedia	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
15	redondo	intermedias	intermedio	dura	intermedia	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
16	redondo	intermedias	intermedio	dura	intermedia	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
17	oblongo rectangular	superficiales	difícil	suave	intermedio	blanca	inspida	naranja	grueso y uniforme	bronceado	pequeña
18	redondo	superficiales	difícil	dura	alto	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
19	redondo	superficiales	intermedio	dura	intermedio	amarilla	intermedia	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
20	aplanado	superficiales	difícil	dura	alto	amarilla	intermedia	café	deigado y uniforme	bronceado	pequeña
21	redondo	superficiales	difícil	dura	intermedio	blanca	inspida	blanco	deigado y uniforme	blanco	pequeña
22	redondo	superficiales	difícil	dura	intermedio	blanca	inspida	amarillo	deigado y uniforme	amanillo	pequeña
23	oblongo rectangular	superficiales	intermedio	dura	alto	amarilla	intermedia	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
24	redondo	superficiales	intermedio	dura	bajo	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
25	redondo	ausentes	intermedio	dura	intermedio	salmon	inspida	amarillo	deigado y uniforme	blanco	intermedia
26	oblongo rectangular	superficiales	intermedio	dura	intermedio	blanca	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
27	aplanado	superficiales	difícil	dura	alto	amarilla	intermedia	blanco	deigado y uniforme	blanco	pequeña
28	oblongo rectangular	superficiales	difícil	dura	alto	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
29	redondo	superficiales	intermedio	dura	bajo	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
30	oblongo rectangular	intermedias	difícil	dura	alto	salmon	inspida	bronceado	deigado y uniforme	blanco	intermedia
31	redondo	superficiales	intermedio	dura	intermedio	blanca	inspida	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
32	aplanado	superficiales	difícil	dura	intermedio	amarilla	inspida	bronceado	grueso y uniforme	bronceado	intermedia
33	redondo	superficiales	intermedio	dura	alto	salmon	inspida	bronceado	deigado e irregular	bronceado	pequeña
34	oblongo rectangular	superficiales	difícil	dura	alto	salmon	inspida	bronceado	deigado y uniforme	blanco	pequeña
35	aplanado	superficiales	difícil	dura	alto	blanca	inspida	blanco	grueso y uniforme	bronceado	pequeña
36	redondo	superficiales	intermedio	dura	alto	amarilla	inspida	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
37	oblongo rectangular	superficiales	difícil	dura	alto	blanca	inspida	bronceado	grueso e irregular	bronceado	pequeña
38	redondo	superficiales	intermedio	dura	alto	anaranjada	dulce	crema	deigado y uniforme	amanillo	intermedia
39	redondo	superficiales	intermedio	dura	intermedio	amarilla	intermedia	bronceado	deigado y uniforme	blanco	pequeña
40	aplanado	superficiales	difícil	dura	intermedio	blanca	inspida	bronceado	grueso y uniforme	bronceado	intermedia
41	redondo	superficiales	intermedio	dura	intermedio	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	blanco	intermedia
42	redondo	superficiales	intermedio	dura	intermedio	blanca	inspida	bronceado	grueso y uniforme	bronceado	intermedia
43	redondo	superficiales	difícil	dura	alto	amarilla	inspida	amarillo	deigado y uniforme	bronceado	intermedia
44	redondo	superficiales	difícil	dura	alto	amarilla	dulce	crema	deigado e irregular	blanco	intermedia
45	redondo	superficiales	intermedio	dura	alto	amarilla	dulce	crema	deigado y uniforme	amarillo	intermedia
46	redondo	intermedias	difícil	dura	intermedio	amarilla	intermedio	blanco	deigado e irregular	blanco	pequeña

FF: forma del fruto; CF: costillas en el fruto; SEP: separación del pedúnculo; DC: dureza de la cáscara; CMS: cantidad de tejido placentario; CP: color de la pulpa; SP: sabor de la pulpa; CS: color de la semilla; GMS: grosor del margen de la semilla; CMS: color del margen de la semilla; TS: tamaño de semilla.

CUADRO 2. Caracterización agronómica mediante 17 descriptores cuantitativos de 46 genotipos partenocárpicos de calabaza tipo round zucchini.

No.	GENOTIPO	DF _f	DF _m	LE (cm)	LGP (cm)	NRAM	NFTP	LP (cm)	LF (mm)	AF (mm)	PF (g)	GC (mm)	GP (mm)	NSF	PS100	PF _{SF}	PSS	
1		49	54	0.63	68	1	11	1.4	166	182	1985	2.3	21	501	6.5	66.5	123	32.5
2		49	54	1.33	65	0	22	1.7	162	167	1605	2.7	19	362	6.0	47.1	148	21.7
3		49	54	2.33	90	0	12	2.5	193	183	2955	4.5	45	381	9.5	59.4	300	36.2
4		49	54	0.60	97	0	14	2.2	130	182	1785	5.2	28	379	7.9	67.4	79	29.9
5		49	54	2.20	74	0	13	2.0	164	172	2395	4.3	27	434	14.8	114.5	202	64.3
6		49	54	2.70	99	0	12	2.1	155	124	2480	1.6	22	432	11.4	86.0	279	49.3
7		49	55	1.23	51	1	10	1.7	126	164	1480	1.9	23	249	11.3	53.0	126	28.2
8		56	63	1.30	62	1	12	1.9	129	198	2400	2.5	29	239	11.1	51.9	167	26.6
9		56	64	1.33	59	2	15	1.7	135	192	1905	3.8	28	358	9.3	61.5	125	33.3
10		49	55	2.60	89	5	18	1.9	181	217	3240	4.5	34	412	8.7	63.5	268	35.9
11		49	54	1.43	83	2	21	2.6	157	189	2290	5.7	30	395	8.5	65.3	162	33.6
12		49	56	1.50	56	0	10	2.5	155	165	1785	2.2	28	404	7.5	29.0	92	30.3
13		49	56	0.90	61	1	13	1.8	157	126	1405	3.5	29	188	7.1	24.0	116	13.4
14		49	57	1.17	57	0	16	1.5	115	141	950	1.5	24	81	12.8	19.5	57	10.4
15		54	60	1.97	59	0	12	1.4	150	124	2510	5.1	34	408	13.3	81.7	185	54.2
16		50	57	1.57	58	1	12	1.8	158	158	1465	5.0	22	326	5.6	32.8	86	18.2
17		50	54	1.23	43	1	12	1.7	213	164	2200	3.5	26	235	9.2	48.0	93	21.6
18		50	55	0.93	47	0	12	1.7	163	127	1410	2.2	28	312	6.9	32.0	71	21.5
19		50	55	1.67	80	0	19	2.8	118	131	1145	3.4	25	10	7.2	1.9	55	0.7
20		50	57	1.83	94	0	21	1.8	137	205	2345	3.1	26	99	4.6	17.0	202	4.5
21		52	57	1.73	80	1	18	2.1	159	194	2525	8.8	36	237	9.0	50.3	230	21.4
22		52	57	2.13	49	0	16	2.0	160	167	1955	2.5	19	572	9.9	99.7	85	56.6
23		52	57	1.20	70	0	17	1.7	144	143	1245	1.4	18	295	4.9	46.0	84	14.4
24		52	57	1.73	68	0	14	2.1	153	184	2125	3.6	28	215	4.7	31.5	205	10.1
25		52	58	1.07	54	1	18	2.3	133	192	1890	3.5	24	126	4.3	13.9	104	5.4
26		52	58	1.23	53	2	12	1.7	152	147	1455	2.0	29	251	9.4	55.5	101	23.6
27		53	58	1.37	52	2	21	2.3	108	158	1230	4.0	21	305	6.3	35.4	109	19.2
28		53	58	1.50	47	1	11	1.7	180	165	2140	1.1	19	302	8.4	56.8	122	25.3
29		50	58	1.87	47	2	12	2.9	113	156	1185	1.7	22	364	6.1	51.5	63	22.2
30		53	58	2.33	68	0	15	1.8	185	174	2350	4.6	31	333	7.3	53.7	171	24.3
31		50	58	1.57	72	0	23	1.6	106	127	805	1.1	15	248	5.6	50.5	41	13.9
32		53	58	1.27	76	0	15	2.2	128	165	1580	4.6	29	92	10.9	20.1	117	10.0
33		53	58	1.37	77	0	15	1.7	128	149	1250	3.3	26	265	1.1	10.9	123	2.9
34		49	58	1.97	60	0	11	2.3	197	184	2975	3.1	35	389	5.2	55.0	190	20.3
35		53	58	1.77	90	0	17	2.1	138	206	2115	5.3	22	172	6.8	37.9	149	11.7
36		53	59	1.23	73	2	15	2.5	155	187	2060	3.3	28	145	6.8	40.5	122	9.8
37		53	59	1.40	48	0	12	1.8	188	183	2680	3.6	25	353	6.4	58.9	159	22.6
38		53	59	1.53	57	1	15	2.3	116	169	1525	0.9	28	135	13.0	39.5	119	17.5
39		53	59	1.80	64	0	15	1.6	131	151	1325	4.6	22	158	3.8	12.9	115	6.0
40		53	59	1.83	46	0	12	1.3	101	150	1075	5.2	28	154	11.7	33.1	66	18.0
41		53	59	1.53	59	1	14	2.1	156	198	2720	3.2	38	413	3.5	50.5	250	14.5
42		53	59	1.33	55	0	14	2.2	143	185	1980	5.9	33	379	9.5	63.1	132	36.0
43		56	59	1.57	52	0	11	1.6	154	173	1935	2.9	34	668	8.6	66.1	107	57.5
44		56	59	1.57	52	2	13	1.7	134	193	2295	3.9	35	398	2.9	38.8	195	11.6
45		56	59	1.60	52	0	10	1.7	162	197	2735	1.4	21	517	8.7	29.5	212	45.0
46		56	60	1.40	79	1	21	1.8	101	127	910	2.3	16	69	6.1	13.4	45	4.2

DF_f: días a floración masculina; DF_m: días a floración femenina; LE: longitud de entrenudos; LGP: longitud de la planta; NRAM: número de ramas por planta; NFTP: número de frutos por planta; LP: longitud del pedúnculo; LF: longitud del fruto; AF: ancho del fruto; PF: peso del fruto; GC: grosor de la cáscara del fruto; GPF: grosor de la pulpa del fruto; NSF: número de semillas por fruto; PS100: peso de 100 semillas; PF_{SF}: peso fresco de semillas por fruto; PSS: peso seco del fruto; PSS: peso de semilla seca por planta.

Selección de variables

Como ya se mencionó en Materiales y Métodos, en la selección de variables mediante coeficientes de variación menores a 10%, y que por ser prácticamente iguales para todos los genotipos en estudio, estos no fueron considerados para el análisis; de los 52, fueron eliminados 15 caracteres: hábito de crecimiento (HC), días a floración masculina ($DF_{\text{♂}}$), días a floración femenina ($DF_{\text{♀}}$), forma transversal del tallo (FTT), pubescencia en el haz (PH), pubescencia en el envés (PE), zarcillos (Z), margen de la hoja (MH), forma transversal del pedúnculo (FTP), forma apical del fruto (FA), color externo predominante del fruto (CEP), color de flor (CF), vida de anaquel (VA), porcentaje de materia seca en pulpa (MSP), facilidad para separar la semilla (FSS); por su baja eficiencia para discriminar los genotipos.

Agrupamiento multivariado de genotipos

El análisis de agrupamiento mediante el método de mínima varianza de Ward y distancias euclidianas al cuadrado (Johnson, 1998), incluyó únicamente las 37 variables seleccionadas. La Figura 1 representa los valores del CCC, y la pseudoestadística t^2 de Hollander (Johnson, 1998); estas herramientas estadísticas, fueron utilizadas para definir que tres fue el número apropiado de agrupamientos de los 46 genotipos partenocárpicos encontrados.

El criterio de agrupamiento cúbico (CCC) definió el número de grupos. El criterio fue el primer número de grupos que en la gráfica respectiva rompe la tendencia del número de grupos conformados por los genotipos (Figura 1). Esto es conforme a lo señalado por SAS Institute (1998), en el sentido de que un pico en la

gráfica generada a partir del CCC en el segundo o tercer grupo, indica una buena agrupación. El estadístico pseudoestadística t^2 define el número de grupos con base en el primer valor numérico que incluye al menos a 20 % del total de los genotipos (Johnson, 1998) (Figura 1).

Así, el primer grupo quedó constituido por 16 genotipos partenocárpicos (plantas autofecundadas 3, 19, 26, 28, 29, 38, 44, 48, 51, 57, 63, 69, 73, 88, 91 y 97), el segundo grupo por 18 genotipos (5, 14, 21, 25, 33, 35, 41, 45, 56, 62, 82, 83, 87, 90, 93, 96, 103 y 108) y el tercer grupo por 12 genotipos (13, 15, 16, 20, 23, 30, 47, 70, 84, 105, 106 y 107) (Figura 2).

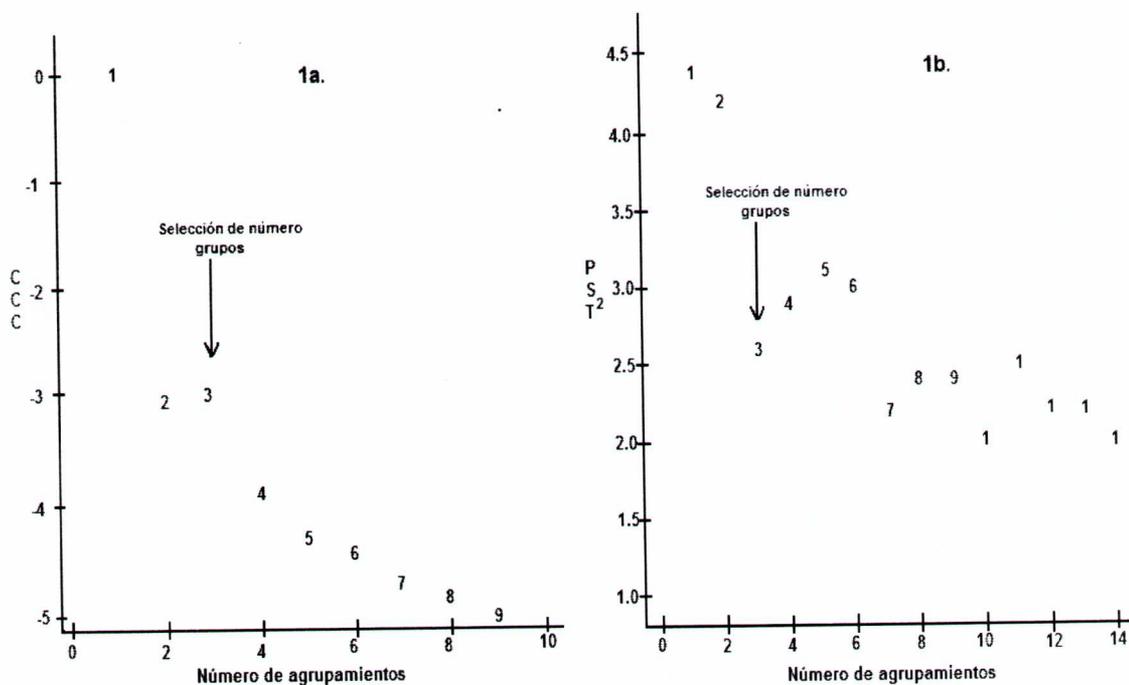


FIGURA 1. Definición del número de grupos conformados de acuerdo al criterio cúbico de agrupamiento (1a) y la pseudoestadística T^2 de Hollander (1b).

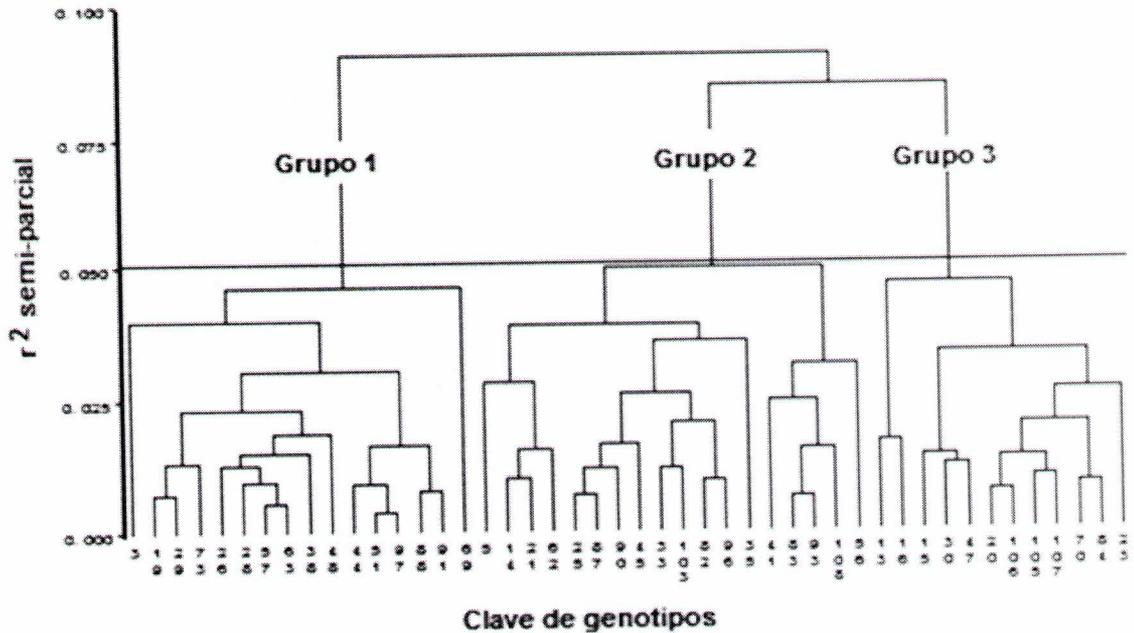


FIGURA 2. Dendrograma jerarquizado de 46 genotipos partenocárpicos de calabaza, obtenido mediante el uso de distancias euclidianas cuadradas ($r^2=0.050$).

Análisis discriminante

Los tres agrupamientos resultantes (Figura 2) por el método de mínima varianza de Ward, fueron corroborados mediante un análisis discriminante canónico que utiliza como variables clasificatorias precisamente a los tres grupos anteriores de genotipos partenocárpicos conformados (Figura 3). El análisis discriminante permitió identificar los caracteres que tuvieron mayor relevancia en la definición de estos grupos.

El análisis determinó que dos funciones discriminantes canónicas (VD1 y VD2) describieron el 100 % acumulado de la variabilidad conjunta de los 37

caracteres seleccionados para definir los grupos; la primera (VD1) representó el 89 % y la segunda (VD2) el 10 % (Cuadro 3).

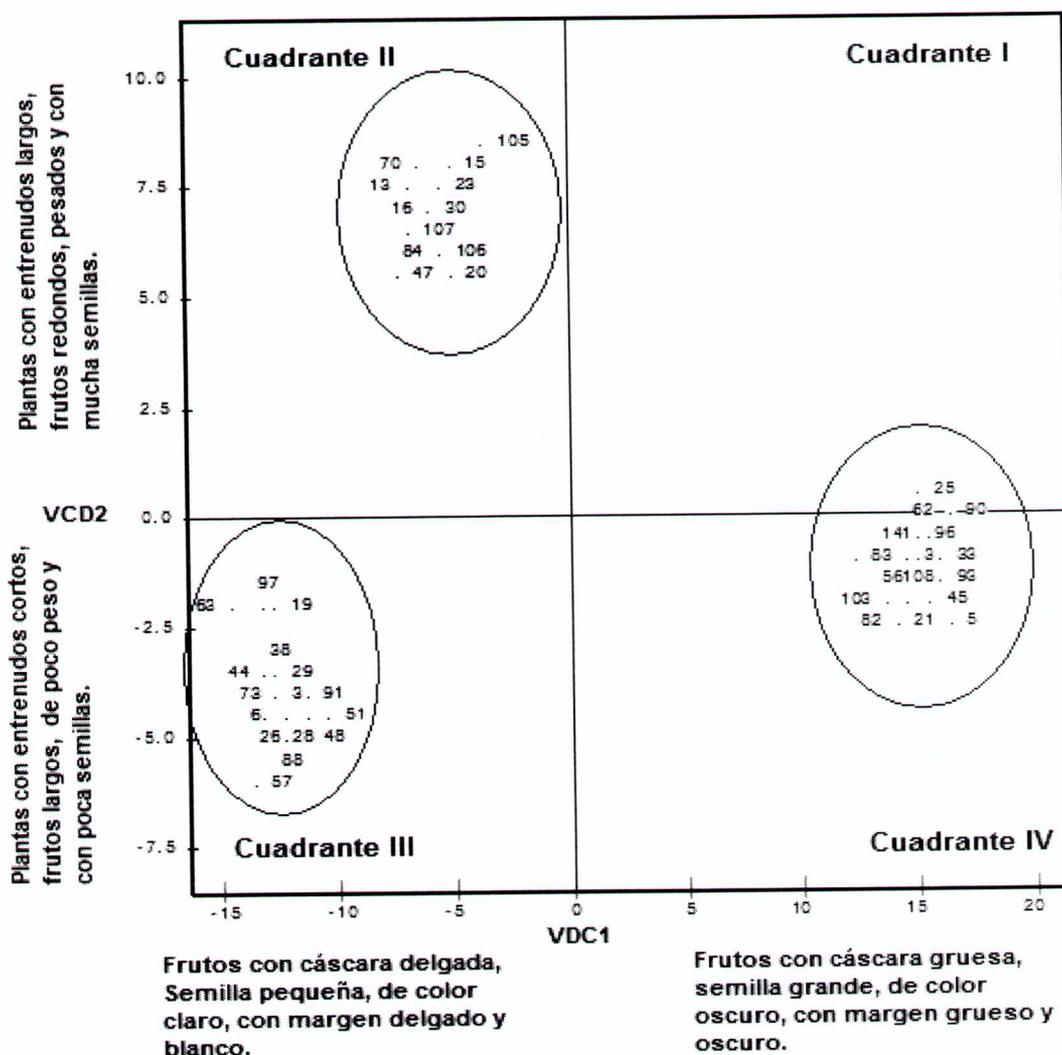


FIGURA 3. Agrupamiento de los 46 genotipos partenocárpico de calabaza mediante análisis discriminante.

Correlaciones canónicas

La estructura canónica total representada en las correlaciones lineales entre las funciones discriminantes generadas con las 37 variables originales seleccionadas se muestra en el Cuadro 3.

CUADRO 3. Estructura de las variables discriminantes canónicas definidas a partir de tres grupos de genotipos partenocárpicos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.).

Descripciones	VD1	VD2	CV (%) de las variables
LE	-0.111409	0.639412	28.9691
FH	-0.238108	-0.057833	13.5602
CMF	0.011933	0.125636	33.9999
LOF	-0.169404	0.057884	13.2255
SFA	-0.152757	-0.139335	28.2597
TH	0.163184	-0.050634	22.1768
LGP	0.135318	0.129470	23.3095
NRAM	-0.057457	-0.021568	46.9100
NFTP	0.337607	-0.216452	24.0424
CAP	-0.030415	0.186617	14.8917
CAP	-0.030415	0.186617	14.8917
FF	0.037677	-0.059884	67.0691
CF	-0.119870	0.304845	23.7144
LP	0.083997	-0.051148	18.9752
SEP	0.083629	0.388439	19.5631
FBF	0.152757	0.139335	12.0041
CES	0.361257	0.307985	11.2020
DP	-0.010501	0.165638	75.1517
TF	0.471547	0.131192	81.8322
LF	-0.146323	0.350328	17.7469
AF	0.075492	0.210721	14.8482
PF	-0.128995	0.607371	31.7339
DC	-0.182569	-0.202885	12.5459
CTP	0.074249	0.358557	23.6026
GCF	0.604905	0.181977	46.2953
GPF	-0.081083	0.368324	22.9788
CP	-0.217069	0.321466	52.9960
SP	-0.458169	-0.021194	39.8701
CS	-0.771016	-0.414598	67.7795
GMS	0.623682	0.039238	58.3419
CMS	-0.587175	-0.293990	36.6888
TS	-0.519272	-0.071489	40.3712
NSF	-0.215268	0.541406	47.0352
PS100	-0.116461	0.281252	37.7484
PFSF	-0.216154	0.491181	50.2057
TP	0.003199	0.097747	33.0193
PSF	-0.165044	0.539537	46.2859
PSS	-0.196222	0.626676	64.9669

LE: Longitud de entrenudo; FH: Forma de la hoja; CMF: Color de manchas foliares; LOF: Lóbulos foliares; SFA: Susceptibilidad a factores adversos; TH: Tamaño de la hoja; LGP: Longitud de la planta; NRAM: Número de ramas por planta; NFTP: Número de frutos por planta; CAP: Características del pedúnculo; FF: Forma del fruto; CF: Castillas en el fruto; LP: Longitud del pedúnculo; SEP: Separación del pedúnculo; FBF: Forma basal del fruto; CES: Color externo secundario del fruto maduro; DP: Diseños producidos por el color secundario; TF: Textura externa del fruto; LF: Longitud del fruto; AF: Ancho del fruto; PF: Peso del fruto; DC: Dureza de la cáscara; CTP: Cantidad de tejido placental; GCF: Grosor del margen de la cáscara del fruto; GPF: Grosor de la pulpa del fruto; CP: Color de la pulpa; SP: Sabor de la pupa; CS: Color de la semilla; GMS: Grosor del margen de la semilla; CMS: Color del margen de la semilla; TS: Tamaño de semilla; NSF: Número de semillas por fruto; PS100: Peso de 100 semillas; PFSF: Peso fresco de semillas por fruto; TP: Textura de la pulpa; PSF: Peso seco del fruto; PSS: Peso de semilla seca.

La variable discriminante 1 (VD1) tuvo mayor correlación positiva con los caracteres: textura externa del fruto maduro (TF; $r_c = 0.47$), grosor de la cáscara del fruto maduro (GCF; $r_c = 0.60$) y grosor del margen de la semilla (GMS; $r_c = 0.62$); y una asociación negativa con los caracteres: color de la semilla (CS; $r_c = -0.77$), color del margen de la semilla (CMS; $r_c = -0.58$) y tamaño de la semilla (TS; -0.51).

En otras palabras, un mayor valor positivo de VD1 representa genotipos con frutos con cáscara gruesa y de textura rugosa y con semillas de menor tamaño (correlación negativa) de tonalidad oscura. En este sentido, Den Nijs y Miotay, (1991) mencionan que en pepinos (*Cucumis sativus* L), hay una correlación negativa entre longitud de fruto y rendimiento de semilla por fruto.

La variable VD2, presentó correlación positiva con: longitud de entrenudos (LE; $r^2 = 0.63$), peso del fruto (PF; $r^2 = 0.60$), número de semillas por fruto (NSF; $r^2 = 0.54$), peso seco del fruto (PSF; $r^2 = 0.53$) y peso seco total de semilla por planta (PSS; $r^2 = 0.62$).

La magnitud de estas correlaciones indica que los genotipos en general son plantas largas, con frutos grandes y alto contenido de semilla. Estos resultados coinciden con los reportados por Canul *et al.* (2005), quienes señalan a las características fenológicas de semilla y de fruto como las que explican en mayor grado las diferencias entre poblaciones nativas de calabaza.

Debido a que en cada genotipo fueron calculadas ambas variables discriminantes, es posible representarlas en un plano cartesiano, donde el eje de las

abscisas corresponde a la VD1 y el de las ordenadas a la VD2 (Figura 3). En dicha representación se aprecian los tres grupos separados en forma evidente.

De acuerdo con lo anterior, en la Figura 3 también se definen las características de cada grupo de genotipos:

El grupo 1 integró genotipos con las siguientes características: plantas con entrenudos con longitud intermedia, frutos redondos, pesados, con cáscara gruesa, con mucha semilla y de tamaño grande.

El grupo 2 se caracterizó por agrupar plantas con entrenudos cortos, frutos alargados, con cáscara delgada y de bajo peso; frutos con pocas semillas de tamaño pequeño. En este sentido, Haim *et al.* (2000), indican que el rendimiento de semilla por fruto en *Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* ha decrecido con el transcurso de la historia con más altos rendimientos en los tipos ancestros, y el grupo de las calabacitas con los rendimientos más bajos.

El grupo 3 lo integraron genotipos con características de plantas con entrenudos largos, frutos redondos, con cáscara delgada y con mucha semilla de tamaño pequeño. Al respecto, Haim *et al.* (2000), mencionan que frutos redondos de *C. pepo* L, producen mayor cantidad de semilla y de menor tamaño en comparación con los frutos alargados. Por otro lado Canul *et al.* (2005), indican que la forma de los frutos es fundamental para determinar el tipo de aprovechamiento del mesocarpio, las formas achatadas son las preferidas para el consumo como verdura (fruto tierno) y en la preparación de dulces (fruto maduro); en este caso específico,

todos los grupos encontrados presentan excelentes características para consumo como verdura.

En la etapa vegetativa, los grupos formados se asociaron principalmente por caracteres de la planta, como la longitud de entrenudos; y en menor proporción, con el porte (longitud) de la planta; mientras que en la etapa reproductiva los grupos se integraron principalmente por caracteres del fruto y semilla, como: la forma del fruto, peso y grosor de cáscara, así también contenido de semilla y tamaño de la misma; así como color y grosor del margen de éstas.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron y caracterizaron 46 nuevos genotipos partenocárpicos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) arbustivos y precoces, aptos para el desarrollo de nuevas variedades de calabacita para producción en invernadero, ya que no requieren de insectos polinizadores para el desarrollo normal de los frutos hasta la cosecha.

En la población de amplia base genética construida *ex profeso*, los 46 nuevos genotipos partenocárpicos obtenidos, representaron una frecuencia de 0.92% de plantas partenocárpicas. El análisis discriminante permitió confirmar tres diferentes grupos perfectamente diferenciables a partir de los 46 nuevos genotipos partenocárpicos de calabaza tipo *round zucchini*.

De 52 caracteres evaluados, 37 de ellos permitieron explicar el 99 % de variabilidad conjunta de los 46 genotipos partenocárpicos, así como su clasificación en tres grupos bien definidos.

Los 46 genotipos partenocárpicos obtenidos se conjuntaron en tres grupos; grupo 1: plantas con entrenudos de longitud intermedia, frutos redondos, pesados, con cáscara gruesa y muchas semillas grandes; grupo 2: plantas con entrenudos cortos, frutos pequeños, alargados de bajo peso y cáscara delgada con pocas semillas pequeñas; grupo 3: plantas con entrenudos largos, frutos redondos, con cáscara delgada y con muchas semillas de tamaño pequeño.

LITERATURA CITADA

- CANUL K., J.; RAMÍREZ V., P.; CASTILLO G., F.; CHÁVEZ S., J. L. 2005. Diversidad morfológica de calabaza en el centro-oriente de Yucatán, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28 (4): 339-349.
- DEN NIJS N., P. M. AND MIOTAY, P. (1991). Fruit and seed seed in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) in relation to pollen tube, sex type and parthenocarpy. *Gartenbauwissenschaft* 56: 46-49.
- GARCÍA M., E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ta edición. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 219 p.
- GRIFFING, B. 1989. Genetics Analysis of Plants Mixture. *Genetics*. pp. 943-956.
- HAIM, N.; HARRY S., P. AND EFFI P., P. 2000. Fruit shape, size and seed yield in *Cucurbita pepo*. *Acta Horticulturae*. 510. pp. 227-230.

- JOHNSON D., E. 1998. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. International Thompson Editors S. A. de C. V. México. 566 pp.
- LIRA S., R. 1995. Estudios taxonómicos y Ecogeográficos de las *Cucurbitaceas* Latinoamericanas de importancia económica. IPGRI. Roma, Italia. 281 p.
- MONTES H., S. 1991. Calabazas (*Cucurbita* spp.). *In: Avances en el estudio de los Recursos Fitogenéticos de México*. R. Ortega, P., G. Palomino, H., F. Castillo, G., V. A. González, H. Y M. Livera M. (eds). Sociedad Mexicana de Fitogenética. pp. 239-250.
- PEÑARANDA A.; PAYAN M. C.; GARRIDO D.; GÓMEZ P.; JAMILENA M. 2007. Production of fruits with attached flowers in *zucchini* squash is correlated with arrest of maturation of female flower. *Journal of horticultural science of Biotechnology* 82(4), 579-584.
- SAGARPA. 2008. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Centro de Estadística Agropecuaria.
- SAS (Statistic Analysis System). 2002. SAS Institute, Version 8.0. Inc. N. C. USA.
- SAS Institute Inc. 1998. Technical report A-108. Cubic Clustering criterion. SAS Campus Drive. Cary, NC 27513.
- SCHWABE W., W.; MILLS J. J. (1981) Hormones and parthenocarpic fruit set: a literature survey. *Hortic Abstr* 51: 661-699.
- STEINER A., A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceedings International Congress on Soilless Culture* 6:633-650.
- UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). 2002-2007. Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad de calabaza (*Cucurbita pepo* L.). Ginebra, Suiza. TG/119/4.

VILLANUEVA V., C. 2007. Calabazas Cultivadas. Identificación de Especies, Caracterización y Descripción Varietal. Editorial. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 86 pp.

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE RAPD EN NUEVAS VARIETADES PARTENOCÁRPICAS ARBUSTIVAS DE CALABAZA (*Cucurbita pepo* L.)

RESUMEN

Se analizaron 46 variedades partenocárpicas de calabaza (*Cucubita pepo* L.) tipo *round zucchini* obtenidas en la Universidad Autónoma Chapingo, el objetivo fue identificar la variabilidad genética existente entre ellas y obtener las huellas genéticas correspondientes. Se utilizaron marcadores moleculares tipo RAPD (Polimorfismos en el ADN amplificados al azar). Se probaron 14 iniciadores de la serie A de Operon y se estudió un total de 44 *loci*. El 84.1% de los *loci* fueron polimórficos, entre las variedades partenocárpicas, encontrándose poca variabilidad genética entre variedades. El dendrograma general remuestreado generó cinco grupos de variedades, éstas se encuentran a un coeficiente de distancia genética muy cercana a uno, entre el rango de 0.6573 y 0.9770, lo que indica que son variedades muy emparentadas genéticamente. El análisis de componentes principales entre *loci* identificó cuatro componentes influenciados principalmente por dos iniciadores (OPA13, OPA05) y 11 *loci* polimórficos totales (A13-1, A13-2, A13-3, A13-5, A13-6, A13-7, A13-10, A13-11, A13-13, A05-6 y A05-7), siendo OPA13 el iniciador que generó agrupamientos caracterizados principalmente por la reducida variabilidad según las distancias genéticas entre las variedades partenocárpicas.

Palabras clave: Partenocarpia, huellas genéticas, RAPD, polimorfismo, *Cucurbita pepo* L.

ABSTRACT

Forty six 46 parthenocarpic *round zucchini* pumpkin (*Cucurbita pepo*) varieties obtained from the Chapingo Autonomous University were analyzed. The objective was to identify the existing genetic variability among including and to obtain the corresponding genetic fingerprinting. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) molecular markers were used. Fourteen (14) Operon Series A primers were tested and 44 *loci* were studied. 84.1% of the *loci* were polymorphic among parthogenic varieties with very little genetic variability among varieties. The resampled general dendrogram generated five groups of varieties found at a genetic distance coefficient close to one, at a range of 0.6573 and 0.9770, thus indicating that they are genetically related. Analysis of main components among the *loci* identified four components influenced mainly by two primers (OPA13, OPA51) and 11 polymorphic loci total (A13-1, A13-2, A13-3, A13-5, A13-6, A13-7, A13-10, A13-11, A13-13, A05-6 y A05-7), with OPA13 being the primer which generated groupings characterized mainly by the reduced variability of the genetic distances among parthenocarpic varieties.

Keywords: Parthenocarpy, genetic fingerprinting, RAPD, polymorphism, *Cucurbita pepo* L.

INTRODUCCIÓN

La partenocarpia es importante cuando se cultiva la calabaza fuera de temporada bajo cubierta o a campo abierto, porque las flores masculinas y los insectos polinizadores pueden estar ausentes. Los cultivares de calabaza difieren en la expresión sexual y el amarre de frutos suele ser bajo al inicio de la temporada cuando los precios de venta son a menudo más altos (Wien, 1997). Las bajas temperaturas de la noche y los días cortos estimulan la partenocarpia en pepino y calabaza (Rylski, 1974).

Diversos estudios han demostrado variaciones en el grado de partenocarpia natural entre las variedades de calabacita, encontrándose a los tipos *zucchini* y *caserta* como los más partenocárpicos (Nijs y Balder, 1983; Robinson y Reiners, 1999).

El mejoramiento de las plantas ha contribuido sin duda a la producción de nuevas variedades, que rinden más y mejor, que los cultivos tradicionales. Adelantos sin precedentes se han obtenido en la tolerancia a la sequía y a los suelos ácidos, en la habilidad simbiótica para la fijación del nitrógeno, en la arquitectura de la planta, y en otras características. Sin embargo, hay limitaciones en la velocidad y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas y utilizadas en los programas de mejoramiento (Ramírez *et al.*, 1991).

Los marcadores moleculares proveen una herramienta valiosa para establecer una precisa genotipificación de cultivares y son utilizados internacionalmente con estos fines (Spooner *et al.* 2005).

Los marcadores tipo RAPD (Polimorfismos en el ADN amplificados al azar) se han utilizado para diversos tipos de análisis genéticos, que incluyen el mapeo del genoma, las huellas dactilares del individuo, la reconstrucción de la filogenia, y la medición de similitudes genéticas. Cuando los datos de RAPD se utilizan para calcular los coeficientes de similitud genética, estas herramientas genéticas pueden generar sesgos importantes en la estimación. Los tres coeficientes más utilizados para el análisis de los datos obtenidos mediante RAPD son: el coeficiente de apareamiento simple (SM), el coeficiente de Jaccard y el de Nei y Li, difieren en la cantidad de sesgo producido por un determinado nivel de las bandas amplificadas (Lamboy, 1994).

El objetivo de este trabajo fue identificar la variabilidad genética mediante RAPD en las variedades partenocárpicas de calabaza tipo *round zucchini* útiles para su mejora genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal utilizado

El material utilizado fue colectado de plantas con características de partenocarpia, provenientes de una población de amplia base genética proveniente

de la libre recombinación mediante un diseño dialélico completo con el método IV de Griffing (1989) con siete variedades experimentales de calabazas arbustivas tipo *round zucchini* usadas como progenitores. Dicha población fue desarrollada ex profeso en el programa de mejoramiento genético del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo durante el ciclo primavera-verano del 2007.

Fase de laboratorio de análisis molecular

La fase del análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Interacción Planta-Patógeno (FPP) del Instituto de Fitopatología en el Colegio de Postgraduados. Se colectó material vegetal de 46 variedades partenocárpicas arbustivos de calabacita, seleccionando brotes recientes; cada una de las 46 muestras fue liofilizada para evitar su oxidación durante el almacenamiento. Se hizo la extracción del ADN genómico a cada una de las muestras, el protocolo de extracción utilizado fue el modificado por Rojas-Martínez (1998) conocido como método combinado: MLO (Lee *et al.*, 1991) y CTAB 3% (Ahrens y Seemüller, 1992).

La calidad de ADN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2 % (p/v) teñidos en una solución de bromuro de etidio (10 mg ml^{-1}). La concentración de ADN en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de cada muestra se cuantificó con base en la absorbancia de 260-280 nm en un Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 V3.7 de Thermo Scientific. De la concentración inicial, se hicieron diluciones del ADN con agua inyectable estéril hasta obtener una concentración de $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN en cada una de las 46 muestras procesadas. Se realizaron diferentes pruebas de

estandarización de la PCR para RAPD con 14 iniciadores decámeros de secuencia aleatoria de la serie A de Operon (01, 02, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 12, 13, 15, 16, 17 y 19); estos iniciadores fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM). Después de la estandarización se seleccionaron cinco iniciadores (OPA: 05, 10, 13, 15, 19) para su uso en RAPD, estos cinco iniciadores presentaron el mejor polimorfismo y marcaron diferencias considerables en el bandeo, con respecto a los nueve que no se seleccionaron.

La amplificación al azar del ADN genómico de las variedades de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) se hizo mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), en 25 μL de solución que contenía 2.5 μL de Buffer [10 X] pH 7.0, 1.5 μL de cloruro de magnesio (MgCl_2) [30 mM μL^{-1}], 0.5 μL de dNTP's [2.5 mM μL^{-1}], 2.0 μL de Iniciador aleatorio [10 pmol μL^{-1}], 0.2 μL de la Taq ADN-polimerasa (Amplificasa[®]) [5 U μL^{-1}], 4.0 μL de ADN genómico de calabaza [20 ng μL^{-1}] y 14.05 μL de agua desionizada estéril. El ADN se adicionó de manera individual a cada tubo según el número de genotipo a caracterizar.

Para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un termociclador APOLO Instrumentation ATC 201, serie 00449. Las condiciones de amplificación consistieron de un ciclo de predesnaturalización de un min a 94 °C, 38 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 35 °C y 1.30 min a 72 °C, seguidos de un ciclo de 2.30 min a 72 °C y un periodo a 4 °C de extensión final.

Los productos de amplificación obtenidos a partir de los RAPD, se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2.5 % (p/v) a 85 Volts, durante

un periodo de corrido de 4.5 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, BIO RAD®), la foto del gel se capturó con el programa Quantity One 4.0.3, incluido en el equipo indicado. Los resultados se imprimieron en papel fotográfico para hacer la matriz básica de datos. Se utilizó marcador de peso molecular 1 Kb (1 Kb Ladder, Invitrogen®) a cada extremo del gel de agarosa, como referencia al patrón de bandeo de las variedades.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete computacional de NTSYS-pc versión 2.2R (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), especialmente diseñados para el análisis estadístico de trabajos realizados con RAPD y Microsatélites, entre otros.

La matriz de similaridad genética se obtuvo mediante el coeficiente de SM [Simple matching coefficient: m/n (default) o coeficiente de apareamiento simple (Sokal and Sneath, 1963)], este coeficiente es una medida de similaridad genética, que se refiere a la comparación de un par de patrones de bandeo de dos individuos, y se obtiene mediante el número de casos de presencia y ausencia en un individuo, comparada con otro individuo y se calcula la distancia genética con la siguiente fórmula $(A+D)/N$, donde $A=(0,0)$ número de casos con dobles ausencias de banda, $D=(1,1)$ número de casos con dobles presencias de banda y $N=(\sum A+B+C+D)$, donde $B=(0,1)$ y $C=(1,0)$, son los números de casos con ausencia y presencia de banda por comparación entre individuos, por lo que el programa va discriminando a los

individuos con el valor más bajo obtenido. De esta forma se calcula la frecuencia de aparición de cada banda registrada, para obtener la matriz de las distancias genéticas entre las accesiones (Lambooy, 1994).

Los dendrogramas de agrupación de las variedades partenocárpicas arbustivas de calabaza fueron derivados de la matriz de disimilaridad con el programa SAHN (Sequential Agglomerative Hierarical Nested Cluster Analysis) de Dunn y Everitt (1982), del sistema de análisis multivariado y taxonómico numérico (NTSYS-pc 2.2R), por medio del método del promedio aritmético no ponderado por pares entre agrupamientos, tipo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Averages) (Adams *et al.*, 2000).

La robustez del dendrograma se probó mediante el método de remuestreo en las matrices de datos y de disimilaridad con Bootstrapping con un $\alpha=0.05$, en el módulo "*Transformation/Resample*" y "*Transformation/Summary*" con 1000 remuestreos y la confiabilidad de los resultados, se llevó a cabo por medio de una comparación de matrices con la Prueba de Mantel (1967), entre la matriz de similitud generada de la matriz básica de datos y de una matriz promedio generada con el remuestreo con Bootstrap, realizada con el modulo "*Graphics/Matrix comp. Plot*", todo contenido en el programa NTSYS-pc 2.2R.

Para verificar los resultados obtenidos en el patrón de bandeo, se hizo un análisis de componentes principales por medio del programa NTSYS-pc 2.2R, a partir de una matriz de correlaciones entre las bandas, la finalidad fue identificar el iniciador y patrón de bandeo polimórfico con mayor aporte a la variabilidad de las

variedades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de iniciadores RAPD

Los cinco iniciadores de la serie A de Operon utilizados en el análisis RAPD amplificaron un total de 44 *loci*, de los cuales el 84.1% mostraron polimorfismo (Cuadro 1). Este resultado coincide con el encontrado por Tapia y Legaria (2007), quienes de un total de 226 *loci* de RAPD evaluadas obtuvieron 84.07% de polimorfismo con 17 iniciadores utilizados. Los iniciadores OPA05, OPA10 Y OPA19 (Figura 1) revelaron un 100 % de polimorfismo en el bandeo, mientras que los iniciadores OPA13 Y OPA15 detectaron 71.4 y 70 % de polimorfismo respectivamente, entre las variedades evaluadas.

CUADRO 1. Número de bandas amplificadas con los iniciadores de la serie A de Operon® en 46 variedades partenocárpicas de calabaza (*C. pepo*).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Productos amplificados		% de polimorfismo	% de <i>loci</i> monomórficos	Rango de peso molecular (pb) del patrón de bando
		Totales	Polimórficos			
OPA05	AGGGGTCCTG	7	7	100	0.0	506-220
OPA10	GTGATCGCAG	7	7	100	0.0	1018-298
OPA13	CAGCACCCAC	14	10	71.4	28.6	1636-220
OPA15	TTCCGAACCC	10	7	70.0	30.0	1636-298
OPA19	CAAACGTCGG	6	6	100	0.0	1636-1018
		44	37	84.1	15.9	

Lo anterior indica que existe poca variabilidad genética entre las variedades partenocárpicas de calabaza evaluados. Al respecto Gwanama *et al.* (2006), quienes caracterizaron molecularmente 31 genotipos de *Cucurbita* provenientes de la región de Zambia y Malawi, África, con la técnica RAPD, observaron baja variabilidad genética entre las poblaciones de cada región, y reportan a los patrones RAPD generadores de pocas diferencias entre variedades evaluadas e indican la existencia de un número reducido de secuencias nucleóticas diferentes amplificadas al azar.

La Figura 1 muestra cada uno de los perfiles de electroforesis amplificados, en los cuales se logró observar la separación bien definida de los *loci* (bandeo) por cada uno de los iniciadores aleatorios utilizados (OPA 05, OPA 10, OPA 13, OPA 15 y OPA 19).

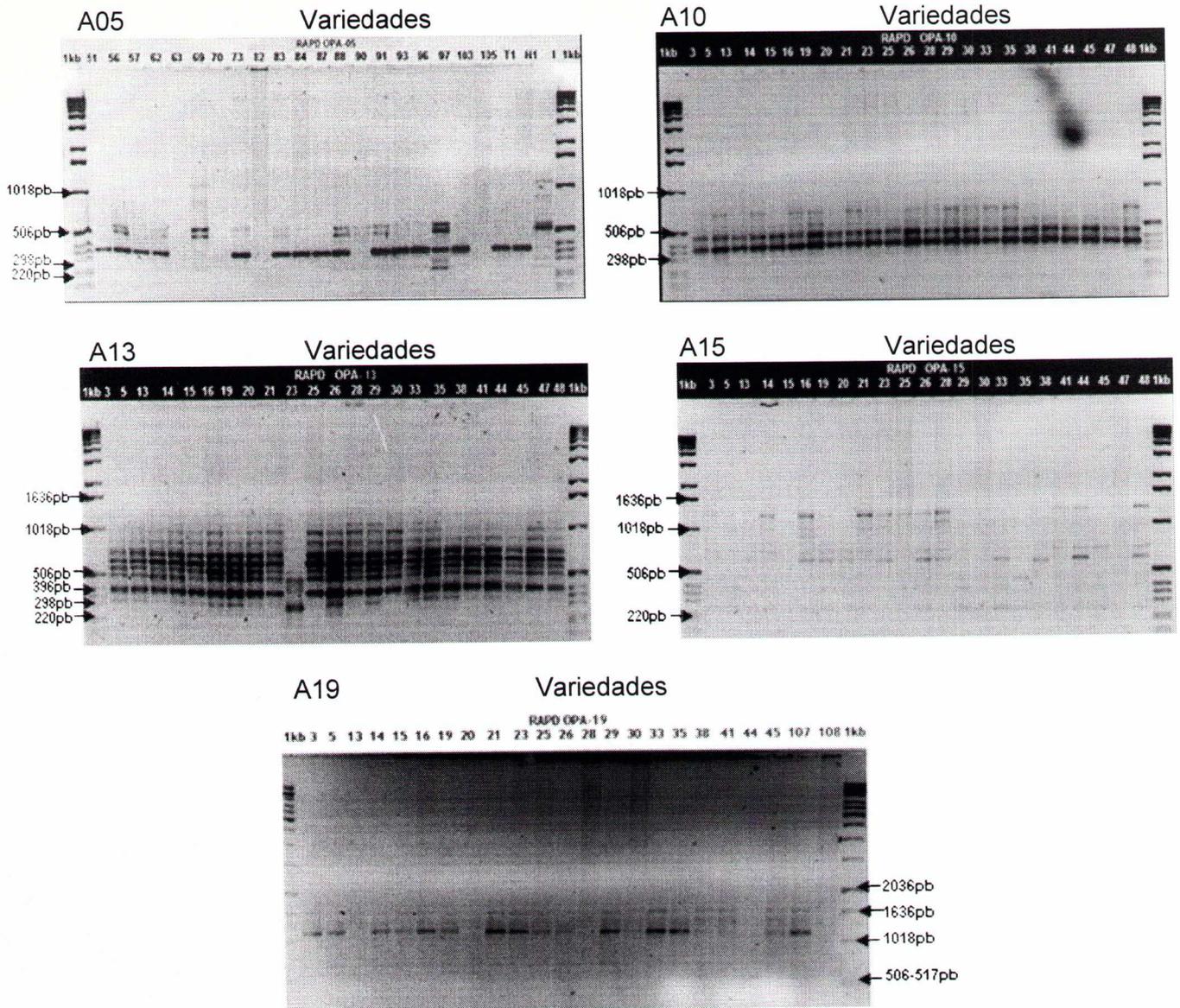


FIGURA 1. Amplificación de los iniciadores RAPD A05: OPA05, A10: OPA10, A13: OPA13, A15: OPA15, A19: OPA19 en 46 variedades partenocárpicas de calabaza; 1kb: marcador de peso molecular.

La robustez del agrupamiento se obtuvo mediante un análisis de 1,000 remueos con el programa NTSYS-pc 2.2R. El árbol de consenso o dendrograma de distancias genéticas generó cinco grupos, definidos principalmente por la variabilidad genética que existe entre las variedades, dado que provienen de una población (S_1) de amplia base genética.

Las variedades dentro de cada agrupación presentan valores de distancias génicas muy cercanos a uno, entre el 0.9770 y el 0.7934 del valor del coeficiente de distancias génicas (Figura 2). Valores cercanos a uno son poblaciones muy emparentadas genéticamente, mientras que los coeficientes cercanos a cero, se refiere a poblaciones poco emparentadas genéticamente (Lambooy, 1994).

Los resultados encontrados en el dendrograma general remuestreado (Figura 2) muestran a las variedades 3, 5, 13, 15, 20, 29, 33, 35, 38, 41, 44, 45, 47, 48, 56, 62, 69, 87, 88, 90, 91, 93, 96, 97, 103, 105, 106, 107 y 108 en el grupo I, con un rango de distancias génicas (rdg) de 0.9770 a 0.8860; el grupo II lo integran las variedades 73, 83 y 84 siendo su rdg de 0.9083 a 0.8638; en tanto que el grupo III está integrado por las variedades 51, 57, 63, 70 y 82 (rdg: 0.9309 a 0.7509); el grupo IV lo integran las variedades 14, 16, 19, 21, 25, 26, 28 y 30 (rdg: 0.9099 a 0.7934); mientras que el grupo V lo integra la variedad 23, que a su vez es la variedad que se identificó como la más alejada genéticamente (0.6573) de las 45 variedades partenocárpicas restantes. Lo que puede ser explicado por el origen de la población, ya que ésta fue producto de cruzamientos directos y recíprocos entre siete progenitores y probablemente la variedad 23 está conservando las características de un progenitor específico y es lo que manifiesta.

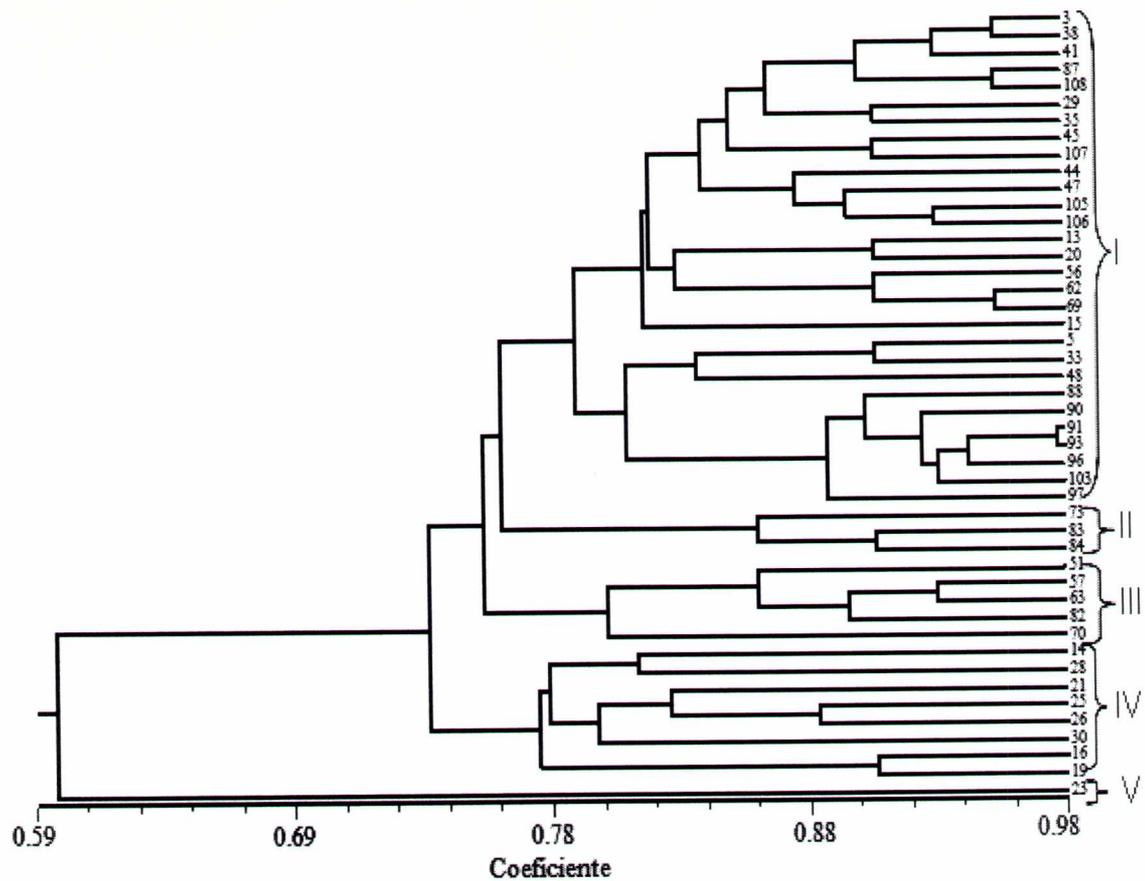


FIGURA 2. Dendrograma general construido a partir de 1,000 combinaciones de remuestreo obtenida mediante el coeficiente de apareamiento simple (SM) de los productos RAPD generados de 46 variedades partenocárpicas de calabacita.

Se realizó una comparación de matrices, entre la matriz de similitud generada con la matriz binaria (presencia-ausencia de banda) y con la matriz de similitud generada con la matriz promedio del Bootstrap (remuestreos). Los resultados obtenidos de dicha comparación se corroboran con un análisis de correlación realizado con la prueba de Mantel (1967), que genera el programa de NTSYS-pc 2.2R, por lo que el valor de correlación para las variedades partenocárpicas de calabaza es de $r=0.99978$, con una media de la matriz de similitud sin remuestreo de 0.7744 y covarianza de 7.0287; mientras que para la matriz de similitud promedio del remuestreo fue de 0.7732 y su covarianza de

7.1120. Con un valor de la prueba de Mantel (1967) de $t = 11.1827$ (Prob. $Z < \text{obs. random } Z: p = 1.0000$). De acuerdo con los resultados anteriores se identifica que existe alta correlación entre ambas matrices. Estos resultados generaron un gráfico (no mostrado) que da una línea diagonal entre los valores comparados, esto indica que no existe mucha dispersión de los valores y que son homogéneos.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales entre los 44 *loci* amplificados con los cinco iniciadores utilizados, se identificó 15 componentes principales de 44 generados, que están caracterizando un 85.95% (Cuadro 2) de la proporción de la variabilidad acumulada en las 46 variedades partenocárpicas de calabaza.

CUADRO 2. Valor propio y porcentaje de variabilidad que aportan los componentes principales de 46 variedades partenocárpicas de calabacita.

Componente principal	Valores propios	Variabilidad del componente (%)	Porcentaje Acumulado de la variabilidad (%)
1	6.69881623	15.9496	15.9496
2	5.22921624	12.4505	28.4001
3	4.04635414	9.6342	38.0343
4	2.84930508	6.7841	44.8183
5	2.66130948	6.3365	51.1548
6	2.16176171	5.1471	56.3018
7	2.01779718	4.8043	61.1061
8	1.92138517	4.5747	65.6808
9	1.71231691	4.0769	69.7578
10	1.45185355	3.4568	73.2146
11	1.35713942	3.2313	76.4458
12	1.16238311	2.7676	79.2134
13	1.06474044	2.5351	81.7485
14	0.92876070	2.2113	83.9599
15	0.83058527	1.9776	85.9374

Los datos indican que la variabilidad está asociada con cada uno de los componentes principales, y esta variabilidad disminuye a medida que se incrementa el número de componentes principales. El primer componente principal concentra el 15.94% de la variabilidad total de los *loci* amplificadas; el segundo componente principal, el 12%, el tercer componente, el 9.6%; el cuarto componente principal, el 6.78%; el quinto componente principal, el 6.33%; los componentes del sexto al treceavo sólo concentran el 30.59% de la variabilidad total.

Los primeros 13 componentes concentran el 81.74% de la variabilidad total de los *loci* generados, en tanto que los componentes 1 al 5, concentran el 51.15% de toda la variabilidad existente entre los *loci* analizados. Cabe señalar que estos cinco componentes principales son los de mayor importancia, puesto que reúnen más de la mitad de la variabilidad acumulada. Al respecto Franco e Hidalgo (2003) indican que la selección no depende del número de componentes principales obtenidos, ya que el análisis genera tantos componentes principales como variables en el estudio.

Los resultados contenidos en el Cuadro 3 muestran los *loci* que más aportaron a la identificación de la variabilidad genética y definición de los grupos de las 46 variedades partenocárpicas de calabaza, el primer componente principal (Dim-1) está relacionado principalmente con el iniciador OPA13, del cual los *loci* A13-6 (aprox. 762pb), A13-7 (aprox. 677 pb) y A13-11 (344 pb) (0.8507% c/u) aportan características genéticas de diferenciación entre las variedades partenocárpicas; mientras que los *loci* A13-10 (aprox. 344pb) y A13-13 (aprox. 220 pb) (-0.8507 c/u) indican características de mayor variabilidad genética entre las variedades.

CUADRO 3. Estructura de los componentes principales definidos a partir de cinco iniciadores y 44 bandas amplificadas totales, en 46 variedades partenocárpicas de calabacita.

Posición del <i>loci</i> en el iniciador	Dim-1	Dim-2	Dim-3	Dim-4	Dim-1 a 4: componentes principales 1 a 4.			
					Posición del <i>loci</i> en el iniciador	Dim-1	Dim-2	Dim-3
A05-1	0.2427	0.3643	0.4450	0.0344	A13-9	0.0000	0.0000	0.0000
A05-2	0.2682	0.3870	0.5585	0.0075	A13-10	-0.8507	0.4779	0.0497
A05-3	0.4104	0.4293	0.3847	0.3135	A13-11	0.8507	-0.4779	-0.0497
A05-4	0.4104	0.4293	0.3847	0.3135	A13-12	0.2907	-0.1240	0.0667
A05-5	0.2081	-0.2083	-0.0822	-0.3137	A13-13	-0.8507	0.4779	0.0497
A05-6	0.3477	0.4446	0.7091	-0.0423	A13-14	-0.0680	-0.1355	0.0178
A05-7	0.3477	0.4446	0.7091	-0.0423	A15-1	-0.0003	-0.0037	0.0709
A10-1	-0.2561	-0.4028	0.1245	-0.0011	A15-2	0.0536	-0.0294	-0.1333
A10-2	-0.5610	-0.1916	0.1367	0.0092	A15-3	-0.2526	0.0673	0.4458
A10-3	-0.2613	-0.2181	0.4514	-0.0128	A15-4	-0.6147	-0.3036	0.1024
A10-4	-0.4420	-0.3617	0.1669	-0.0875	A15-5	-0.2102	-0.3555	0.0912
A10-5	-0.1795	-0.2706	0.4070	-0.1370	A15-6	-0.6063	-0.2885	0.1178
A10-6	-0.1453	-0.3428	0.4940	-0.0126	A15-7	-0.1816	-0.2920	0.1380
A10-7	-0.1453	-0.3428	0.4940	-0.0126	A15-8	-0.2357	-0.2690	0.4376
A13-1	0.0245	-0.1918	-0.0639	0.8042	A15-9	-0.2505	-0.0201	0.2034
A13-2	-0.0939	-0.3825	-0.0238	0.7497	A15-10	0.0246	-0.0175	-0.0858
A13-3	-0.1235	-0.5183	-0.0041	0.6246	A19-1	-0.4840	-0.0976	0.0059
A13-4	0.2325	-0.4127	0.4699	0.1765	A19-2	-0.1559	-0.1654	0.3691
A13-5	0.3036	-0.5454	0.4764	0.0529	A19-3	-0.1303	-0.6625	-0.0718
A13-6	0.8507	-0.4779	-0.0497	-0.0541	A19-4	-0.1964	-0.2162	0.4258
A13-7	0.8507	-0.4779	-0.0497	-0.0541	A19-5	-0.1147	-0.4502	-0.0030
A13-8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	A19-6	-0.1154	-0.4100	0.0507

Para el segundo y cuarto componentes principales (Dim-2 y Dim-4) se identifica una tendencia similar, en el sentido de que el iniciador OPA13 es el iniciador que aporta las características genéticas para definición de las agrupaciones de variedades evaluadas, para el Dim-2 está definido principalmente por los *loci* A13-3 (aprox. 1080pb) y A13-5 (aprox. 916pb) (-0.5183 y -0.5454, respectivamente) que identifican la mayor variabilidad genética entre las variedades, mientras que el

Dim-4, son los *loci* A13-1, A13-2 y A13-3 (0.8042, 0.7497 y 0.6246, respectivamente, estos *loci* se ubican entre los 1636 y 1018 pb) están identificando características de asociación genéticas entre las variedades partenocárpicas.

Respecto al tercer componente principal (Dim-3) se encontró que es el iniciador OPA05 fue el que mejor caracterizó a las variedades en dicho componente, los *loci* que influyeron en la asociación genética principalmente fueron A05-6 y A05-7 (0.7091 c/u, su peso molecular se encontró entre 220 a 298 pb).

A partir del análisis de componentes principales basado en el total de los *loci* amplificados con cinco iniciadores OPA, se identificó al iniciador OPA13, como el que proporciona mayor similitud genética de las variedades partenocárpicas, por ello se construyó el dendrograma de distancias genéticas (Figura 3) generado a partir de los datos con 1,000 remuestreos obtenidos con el iniciador OPA13, en el cual se muestran cinco agrupamientos caracterizados principalmente por la reducida variabilidad en cuanto a las distancias genéticas entre los integrantes de cada uno de los cinco grupos encontrados.

Las variedades dentro de cada agrupación son muy similares entre sí, ya que sus distancias genéticas son muy cercanas o igual a uno (Figura 3), y corroboran los resultados encontrados en el dendrograma general (Figura 2). Sin embargo, con este iniciador (OPA 13) las distancias genéticas son más cercanas a uno o igual a uno, identificando mayor similitud entre las variedades.

LITERATURA CITADA

- ADAMS, D., KIM, J., JENSEN, R., LES, M. SLICE E., D. AND WALKER, J. 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.20r. Exeter Software, new York, U. S. A.
- AHRENS, U. AND SEEMÜLLER, E. 1992. Detection of DNA of Plnt pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- DUNN, G. AND B. S. EVERITT. 1982. An introduction to mathematical taxonomy. Cambridge. New York. 152 pp.
- FRANCO, T. L.; HIDALGO, R. 2003. Análisis estadístico de los datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico Núm. 8, Instituto Nacional de Recursos Geneticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- GRIFFING, B. 1989. Genetics Analysis of Plants Mixture. *Genetics*. pp. 943-956.
- GWANAMA, C.; LABUSCHAGNE M., T. AND BOTHA A., M. 2006. Analysis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.
<http://www.springerlink.com/content/m42086272q173980/>. Consultado el 3 de diciembre del 2009.
- LAMBOY W., F. 1994. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *Genome Res. August 1994 4: 31-37*.
- LEE I., M.; DAVIS E., R. AND HIRUKI, C. 1991. Genetic Interrelatednes among clover proliferation mycoplasmalike organisms (MLOs)and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Enviromental Microbiology*. 57: 3565-3569.
- MANTEL N., A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, 27:209-220.
- NIJS A.P.M. AND BALDER J. 1983. Growth of parthenocarpic and seed bearing fruits of *Zucchini* squash. *Cucurbit Genet Coop Rpt* 6: 84-85
- RAMÍREZ H., CALDERÓN A., Y ROCA W. M. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 840 p.

- ROBINSON R.W. AND REINERS S. 1999. Parthenocarpy in summer squash. Hortscience 34: 715-717.
- ROJAS-MARTÍNEZ, R. I. 1998. Identificación del fitoplasma de la filodia del cempazúchil (*Tagetes erecta*) mediante PCR y RALPH y alteraciones fisiológicas en plantas sintomáticas. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México. 97 p.
- RYLSKI, I., 1974. Effects of Seaton on parthenocarpic and fertilized summer squash (*Cucumis pepo* L.). Expt. Agr. J., 10: 399-440.
- SOKAL, R. R. AND P. H. A. SNEATH. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. 359 pp.
- SPOONER D., VAN TREUREN R., DE VICENTE M. C. 2005. Molecular marker for genebank Management. IPGRI Technical Bulletin N. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia.
- STEINER A., A. 1984. The universal nutrient solution. Proceedings International Congress on Soilless Culture 6:633-650.
- TAPIA P., D. Y LEGARIA S., J. P. 2007. Variabilidad genética en cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista Fitotecnia Mexicana Vol. 30 (4): 391-401.
- WIEN, H. C. 1997. The physiology of vegetable crops. Cab Intl., Wallingford, Oxon, U. K.

CAPÍTULO III

**DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIANTE MICROSATÉLITES Y RAMP DE
VARIEDADES PARTENOCÁRPICAS ARBUSTIVAS DE CALABAZA (*Cucurbita
pepo* L.) TIPO *ROUND ZUCCHINI***

RESUMEN

Se caracterizaron molecularmente 46 variedades partenocárpicas de calabaza (*Cucubita pepo* L.) tipo *round zucchini* obtenidas en la Universidad Autónoma Chapingo. El objetivo fue caracterizar e identificar la diversidad genética entre variedades a partir de la variabilidad genética obtenida mediante marcadores genéticos moleculares del tipo microsatélites (ISSR: inter secuencias simples repetidas) y RAMP (amplificación del polimorfismo de microsatélites). Se utilizó un iniciador de secuencia repetida (GATA)₄ para microsatélites y la combinación de (GATA)₄ con cuatro iniciadores de secuencia aleatoria de la serie A de Operon (OPA05, OPA10, OPA13 Y OPA19) para RAMP. Con las dos técnicas se obtuvo un total de 43 *loci* polimórficos, seis *loci* fueron amplificados con microsatélites y 37 *loci* con RAMP. El porcentaje de *loci* polimórficos para microsatélites fue de 100 %, mientras que para RAMP fue de 91.8 % de polimorfismo, encontrando alto grado de emparentamiento genético entre las variedades partenocárpicas. El análisis de componentes principales entre *loci* identificó cuatro componentes para cada técnica. 11 *loci* (tres de microsatélites [M(GATA)₄-1 (0.8504 %), M(GATA)₄-2 (0.8034 %) y M(GATA)₄-3 (0.9317 %)]; y ocho de RAMP [R05-4 (81.81 %) , R05-6 (0.8003 %), R05-7 (0.8239 %), R10-4 (0.7828 %), R10-6 (0.7888), R19-6 (0.6195 %), R19-10 (0.6428 %) y R13-10 (0.6679 %)] influyeron en mayor proporción en la caracterización genética y definición de los grupos en cada una de las técnicas. La combinación de OPA05+(GATA)₄ fue el RAMP que identificó menor variabilidad genética entre las 46 variedades partenocárpicas de calabaza estudiadas.

Palabras clave: Partenocarpia, microsatélites, ISSR, RAMP, *Cucurbita pepo* LLL.

ABSTRACT

Forty-six (46) varieties of parthenocarpic *round zucchini* pumpkins (*Cucurbita pepo*) obtained from the Chapingo Autonomous University. The aim was to characterize and identify the genetic diversity among varieties from the genetic variability obtained by means of microsatellite (ISSR: inter simple sequence repeat) and RAMP (randomly amplified microsatellite polymorphism) molecular genetic markers. A repeat sequence primer (GATA)₄ was used for microsatellites, and the combination of (GATA)₄ with four series A Operon (OPA05, OPA10, OPA13, and OPA19) random sequence primers were used for RAMP. Utilizing both techniques, 43 polymorphic *loci* were obtained, in which six *loci* were amplified with microsatellites and 37 *loci* with RAMP. The percentage of polymorphic *loci* for microsatellites was 100 %, whereas for RAMP the percentage polymorphism was 91.8 %, with a high level of genetic relation (Kinship) among the parthenocarpic varieties. The analysis of main components among *loci* identified four components for each technique. 11 *loci* (three from microsatellites [M(GATA)₄-1 (0.8504 %), M(GATA)₄-2 (0.8034 %) and M(GATA)₄-3 (0.9317 %)]; and eight for RAMP [R05-4 (81.81 %), R05-6 (0.8003 %), R05-7 (0.8239 %), R10-4 (0.7828 %), R10-6 (0.7888), R19-6 (0.6195 %), R19-10 (0.6428 %) and R13-10 (0.6679 %)]) Influenced to a greater extent in the genetic characterization and definition of groups in each of the techniques. The combination of OPA05 + (GATA) 4 was the RAMP that identified lower genetic variability among the 46 parthenocarpic varieties of pumpkin studied.

Keywords: Parthenocarpy, microsatellites, ISSR, RAMP, *Cucurbita pepo* L.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética de calabazas (*Cucurbita* spp.) es muy amplia en México, principalmente en especies, forma, tamaño y coloración de fruto, cantidad de semilla producida, calidad y grosor de pulpa, tolerancia a enfermedades y precocidad, entre otras características (Montes, 1991).

En México, el mejoramiento genético de la calabaza se ha realizado por compañías semilleras privadas que sólo se han enfocado a obtener variedades para producción de verdura y poco se ha considerado a las calabazas para platillos, obtención de “pepitas” o preparación de dulces y conservas (Sánchez *et al.* 2000); ni variedades especiales como las partenocárpicas. Aunque México es uno de los principales poseedores de la diversidad genética, no ha generado variedades propias más eficientes acordes a las necesidades específicas del mercado y de sus diferentes regiones agrícolas.

Los marcadores morfológicos y moleculares, incluyendo los bioquímicos y genéticos (Rivera *et al.* 1991) son las características distintivas de un organismo o una población que se manifiestan de manera constante. En este aspecto se basa la selección de individuos deseables en el fitomejoramiento.

Los marcadores moleculares se han utilizado ampliamente en los últimos 20 años. Entre éstos existen varios tipos como: los bioquímicos (isoenzimas y proteínas) y genéticos (basados en fragmentos de ADN) (Rivera *et al.* 1991).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente variedades partenocárpicas de calabaza, obtenidas en la Universidad Autónoma Chapingo, México; a partir de la variabilidad genética obtenida mediante marcadores genéticos moleculares tipo Microsatélites (ISSR: inter secuencias simples repetidas) y RAMP (amplificación al azar del polimorfismo de microsatélites: combinación de RAPD (polimorfismos en el ADN amplificados al Azar) + Microsatélites) entre las variedades partenocárpicas de calabacita tipo *round zucchini* obtenidas en la Universidad Autónoma Chapingo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal utilizado

Se tomaron muestras de plantas partenocárpicas seleccionadas de una población de amplia base genética proveniente de la libre recombinación de las progenies de cruzamientos dialélicos con el método IV de Griffing (1989) con siete variedades experimentales de calabazas arbustivas tipo *Round zucchini* usadas como progenitores. Dicha población fue desarrollada ex profeso en el Programa de Mejoramiento Genético del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México.

Análisis molecular en fase de laboratorio

La fase del análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Interacción Planta-Patógeno (FPP) en el Colegio de Postgraduados, México. Se

muestreó material vegetal de 46 variedades partenocárpicas arbustivas de calabacita, seleccionando hojas jóvenes y sanas; cada una de las 46 muestras se liofilizó para evitar su oxidación durante el almacenamiento y procesamiento. A cada una de las muestras se les extrajo el ADN genómico, el protocolo utilizado fue el modificado por Rojas-Martínez (1998) conocido como método combinado: MLO (Lee *et al.*, 1991) y CTAB 3 % (Ahrens y Seemüller, 1992).

La calidad de ADN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2 % (p/v) teñidos en una solución de bromuro de etidio (10 mg ml^{-1}). Las lecturas de absorbancia espectrofotométricas fueron medidas a 260-280 nm en un rango de calidad de 1.33 a 1.94 de absorbancia, en un Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 V3.7 de Thermo Scientific; la concentración de ADN obtenida se encontró entre los rangos de $202.3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ como mínimo y $512.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ como máximo; por lo que de la concentración inicial, se hicieron diluciones del ADN con agua desionizada estéril hasta obtener una concentración de $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN en cada una de las 46 muestras procesadas. Se realizaron diferentes pruebas de estandarización de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para microsatélites se utilizó un iniciador de inter secuencias simples repetidas (GATA)₄, y para la técnica RAMP (amplificación del polimorfismo de microsatélites: que es una combinación de RAPD + microsatélites) se utilizaron 14 iniciadores de secuencia aleatoria de la serie A de Operon (01, 02, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 12, 13, 15, 16, 17 y 19) combinados con (GATA)₄; estos iniciadores fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Después de las estandarización se seleccionaron cuatro iniciadores (OPA: 05, 10, 13, 19) para su uso en RAMP, debido a que presentaron el mejor polimorfismo y marcaron

diferencias considerables en el bandeo, con respecto a los 10 que no se seleccionaron.

El volumen y la concentración de cada reactivo en la mezcla de reacción para la PCR, se ajustó a 25 μL como volumen final, la cual contenía 2.5 μL de Buffer [10 X], 1.5 μL de cloruro de magnesio (MgCl_2) [$30 \text{ mM } \mu\text{L}^{-1}$], 0.5 μL de dNTP's [$2.5 \text{ mM } \mu\text{L}^{-1}$], 2.0 μL de Iniciador de microsatélites del tipo ISSR (GATA)₄ [$10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$], 0.2 μL de Taq ADN-polimerasa (Amplificasa[®]) [$5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$], 4.0 μL de ADN genómico de calabaza [$20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$] y 14.05 μL de agua desionizada estéril; y para RAMP, además de los reactivos citados para microsatélites, se le adicionó 2.0 μL de cada iniciador aleatorio seleccionado de la serie A (OPA05, OPA10, OPA13 y OPA19) [$10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$], quedando las combinaciones de cada RAMP de la siguiente forma: OPA05+(GATA)₄, OPA10+(GATA)₄, OPA13+(GATA)₄ y OPA19+(GATA)₄ por lo que en RAMP se redujo la cantidad de agua desionizada estéril a 12.05 μL . El ADN se adicionó de manera individual a cada tubo según el número de genotipo de calabaza a caracterizar.

En la PCR se utilizó un termociclador APOLO Instrumentation ATC 201, serie 00449. Las condiciones de termociclaje para Microsatélites consistieron de un ciclo de predesnaturalización de un min a 94 °C, 40 ciclos de 40 seg a 94 °C, un min a 40 °C y un min a 72 °C, seguidos de un ciclo de ocho min a 72 °C y un periodo a 4 °C de extensión final; mientras que para RAMP las condiciones consistieron de un ciclo de predesnaturalización de dos min a 94 °C, 35 ciclos de un min a 94 °C, dos min a 50 °C y tres min a 72 °C, seguidos de un ciclo de 10 min a 72 °C y un periodo de extensión final a 4 °C.

Los productos de amplificación obtenidos a partir de los Microsatélites y RAMP se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2.5 % (p/v) a 85 Volts, durante un periodo de corrido de 4.5 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, BIO RAD[®]), la foto del gel se capturó con el programa Quantity One 4.0.3, incluido en el equipo indicado. Los resultados se imprimieron en papel fotográfico para hacer la matriz básica de datos. Se utilizó de marcador de peso molecular 1 Kb (1 Kb Ladder, Invitrogen[®]) en ambos costados del gel de agarosa, como referencia al patrón de bandeo de las variedades.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó en forma separada para cada una de las técnicas empleadas. Se utilizó el paquete computacional de NTSYS-pc versión 2.2R (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), especialmente diseñado para el análisis estadístico de trabajos realizados con marcadores moleculares y trabajos de caracterización.

Las matrices de similitud genética se obtuvieron con el coeficiente de SM [Simple matching coefficient: m/n (default) o coeficiente de apareamiento simple, (Sokal and Sneath, 1963)].

Los dendrogramas de agrupación de las variedades partenocárpicas arbustivas de calabaza, se derivaron de la matriz de similitud o matriz de distancias genéticas con el programa SAHN [Sequential Agglomerative Hierarchical

Nested Cluster Analysis), Dunn y Everitt (1982)], del sistema de análisis multivariado y taxonómico numérico (NTSYS-pc 2.2R), por medio del método del promedio aritmético no ponderado por pares entre agrupamientos, tipo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Averages) (Adams *et al.*, 2000).

La robustez de los dendrogramas se probó mediante el método de remuestreo en las matrices de datos y de similitud con Bootstrapping con un $\alpha=0.05$, en el modulo "*Transformation/Resample*" y "*Transformation/Summary*" con 1,000 remuestreos, y la confiabilidad de los resultados se verificó por medio de una comparación de matrices con la Prueba de Mantel (1967), entre la matriz de similitud generada de la matriz básica de datos y de una matriz promedio generada con el remuestreo con Bootstrap, realizada con el módulo "*Graphics/Matrix comp. Plot*", todo contenido en el programa NTSYS-pc 2.2R.

Para verificar los resultados obtenidos en el patrón de bandeo, se hizo un análisis de componentes principales por medio del programa NTSYS-pc 2.2R, a partir de una matriz de correlaciones entre las bandas, con la finalidad de identificar el iniciador y patrón de bandeo polimórfico con mayor aporte a la variabilidad de las variedades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de iniciadores Microsatélites y RAMP

El iniciador de secuencia repetida (GATA₄) produjo un total de seis *loci* (bandas) amplificados, estos *loci* representaron el 100 % del polimorfismo generado por el iniciador utilizado para microsatélites (Cuadro 1). Éstos resultados sugieren que las variedades partenocárpicas de calabaza estudiadas se encuentran emparentadas. El rango de la amplificación de *loci* polimórficos presentado por los microsatélites, se ubicó entre los 506 y 1,636 pb de peso molecular.

Según Morgante y Olivieri (1993) la técnica de microsatélites es muy usada en trabajos de mejoramiento genético, debido a su alta reproducibilidad en el laboratorio; además de que presentan herencia codominante y muchos alelos suelen ser encontrados entre individuos estrechamente relacionados, por lo que los resultados obtenidos encontrados en este trabajo coinciden con lo mencionado por dichos autores.

Fueron 37 *loci* totales los que se expresaron con amplificación en la combinación del iniciador de secuencia repetida (GATA)₄ y cada uno de los iniciadores decámeros de Operon (OPA05, OPA10, OPA13 y OPA19) en la técnica RAMP. De ellos, el 91.8 % fueron polimórficos, mientras que el resto representó *loci* monomórficos. Las combinaciones (RAMP) de los iniciadores OPA10+(GATA₄) y OPA13+(GATA₄) fueron las que identificaron la mayor variabilidad genética (25.0 % y 8.3 %, respectivamente) entre las variedades partenocárpicas de calabaza

(Cuadro 1). El rango de amplificación de *loci* para la técnica RAMP se ubicó entre los 3,054 y 298 pb de peso molecular.

Chávez (1993) menciona, que las plantas que se propagan por polinización cruzada, como la calabaza, tienen constante intercambio genético que les permite un alto grado de heterocigocidad y en consecuencia alta variabilidad genética, lo que se expresa claramente en los resultados obtenidos en esta técnica, ya que el alto polimorfismo expresa la presencia de la variabilidad en las variedades partenocárpicas de calabaza estudiadas.

CUADRO 1. Número de *loci* (bandas) amplificados por el iniciador de secuencia repetida para microsatélites y para la combinación de iniciadores para RAMP en 46 variedades partenocárpicas de calabaza (*C. pepo*).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Productos amplificados		Polimorfismo (%)	<i>loci</i> monomórficos (%)	Rpm (pb) de <i>loci</i>
		Tts	Plmfcs			
Microsatélites						
(GATA) ₄	GATAGATAGATAGATA	6	6	100	0.0	1636-506
RAMP (RAPD + microsatélites)						
OPA05	AGGGGTCCTG + GATAGATAGATAGATA	7	7	100	0.0	1018-298
OPA10	GTGATCGCAG + GATAGATAGATAGATA	8	6	75	25.0	3054-506
OPA13	CAGCACCCAC + GATAGATAGATAGATA	12	11	91.7	8.3	3054-506
OPA19	CAAACGTCGG + GATAGATAGATAGATA	10	10	100	0.0	2036-396
		37	34	91.8	8.2	

Tts: Totales; Plmfcs: Polimórficos; Rpm: Rango de peso molecular; pb: Pares de bases.

La Figura 1 muestra los perfiles amplificados de las variedades partenocárpicas para microsatélites del tipo ISSR, corridos por electroforesis, en los cuales se logró observar la separación bien definida de los *loci* (bandeo) para el iniciador (GATA₄), y en la Figura 2 se aprecian los perfiles obtenidos de las combinaciones de iniciadores empleadas para RAMP, las cuales fueron: OPA05 +

(GATA)₄, OPA10 + (GATA)₄, OPA13 + (GATA)₄ y OPA19 + (GATA)₄, respectivamente.

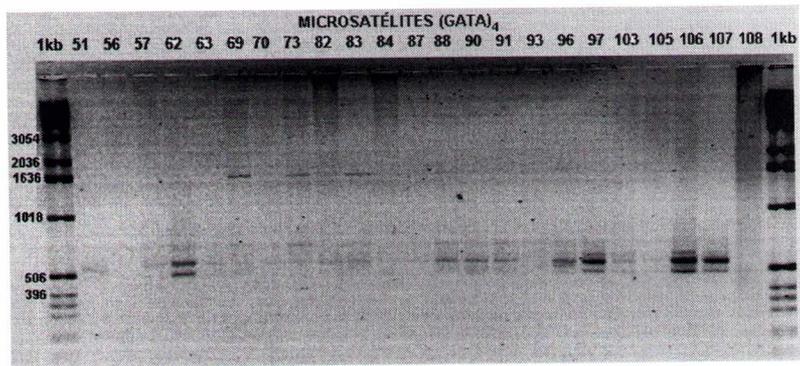


FIGURA 1. Amplificación del iniciador de secuencia repetida (GATA)₄ en 23 variedades partenocárpicas de calabaza. 1kb: marcador de peso molecular.

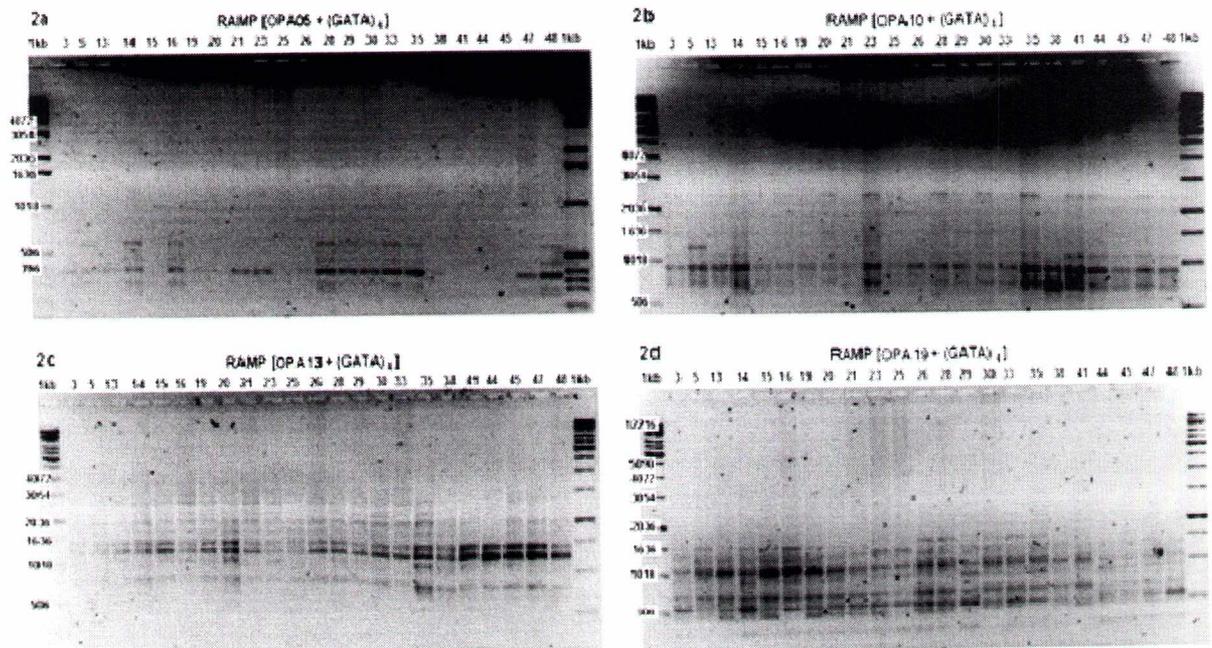


FIGURA 2. Amplificación de la combinación de iniciadores empleados para RAMP 2a: OPA05+(GATA)₄; 2b: OPA10+(GATA)₄; 2c: OPA13+(GATA)₄; 2d: OPA19+(GATA)₄ en 23 variedades partenocárpicas de calabaza. 1kb: marcador de peso molecular.

Análisis de Agrupamientos

La robustez de los agrupamientos tanto para Microsatélites como para RAMP se obtuvieron mediante un análisis de 1,000 remueos con el programa NTSYS-pc 2.2R. El árbol de consenso o dendrograma de distancias genéticas generó cinco grupos con microsatélites y cuatro grupos con la técnica RAMP. Estos grupos fueron definidos principalmente por la variabilidad genética que existe entre las variedades estudiadas.

Las variedades dentro de cada agrupación presentan valores de distancias genéticas muy cercanos a la unidad en ambas técnicas (entre 0.7612 y 1.00 para microsatélites, y entre 0.7196 y 1.00 para RAMP; Figuras 3 y 4), lo que sugiere alto grado de emparentamiento genético entre las variedades partenocárpicas de calabazas estudiadas. Los grupos III y IV (rdg entre 0.8487 a 1.00) fueron las más emparentadas genéticamente en microsatélites. Para RAMP, los grupos III y IV también fueron los que se identificaron con las variedades más emparentadas (drg entre 0.7818 a 1.00).

Los resultados de microsatélites que se reflejan en el dendrograma producido por remuestreo (Figura 3) muestran a las variedades 3, 15, 16, 20, 25, 28, 33, 38, 47, 51, 82, 84, 97, 103, 106 y 107 en el grupo I, con un rango de distancias genéticas (rdg) de 0.7810 a 1.00; el grupo II lo integran las variedades 5, 13, 14, 21, 30, 35, 45, 48, 62, 63, 70, 90, 91 y 105 con un rdg de 0.8019 a 1.00; en tanto que el grupo III está integrado por las variedades 19, 26, 29, 41, 44, 56, 57, 87, 93 y 108 (rdg: 0.8487 a 1.00); el grupo IV lo integran las variedades 23, 69 y 88 con similitud

genética de 1.00 para cada genotipo; mientras que el grupo V lo integran las variedades 73, 83 y 96, que a su vez es el grupo que el análisis genético encontró más alejado (0.4691 de distancia genética) de los otros cuatro, pero entre las variedades que lo integran la similitud es de 0.7612 a 0.8487.

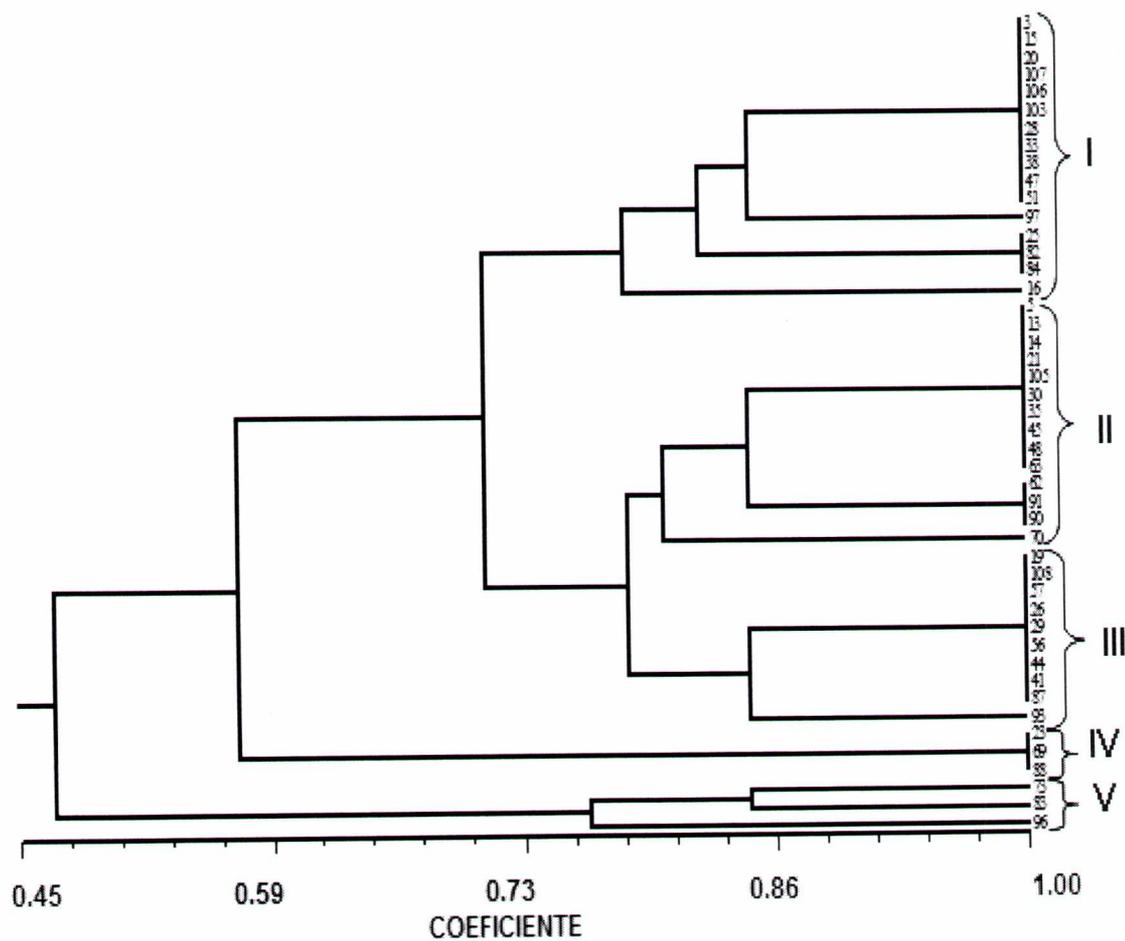


FIGURA 3. Dendrograma promedio construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenido mediante el coeficiente de apareamiento simple (SM) de los productos de Microsatélites (GATA)₄ de 46 variedades partenocárpicas de calabaza.

Según los resultados de RAMP reflejados en el dendrograma general producidos por remuestreo a partir de 1,000 combinaciones para dicha técnica, hay alto emparentamiento genético entre variedades, identificándose cuatro grupos (Figura 4). El grupo I (3, 5, 35, 47, 48 y 56) con un rango de distancias genéticas (rdg) entre ellos de 0.7288 a 0.9186; grupo II (14, 16, 28, 29, 30, 33, 62, 69, 83, 91, 93, 96 y 97) con un rdg entre 0.7196 a 0.9454; grupo III (13, 15, 19, 20, 21, 23, 25, 25, 38, 41, 44, 45, 73, 84, 88, 90, 106, 107 y 108) con rango de rdg de 0.7818 a 0.9741; grupo IV (51, 57, 63, 70, 82, 87, 103 y 105). Éste último grupo contiene las variedades más emparentadas genéticamente (rdg: 0.8352 a 1.00).

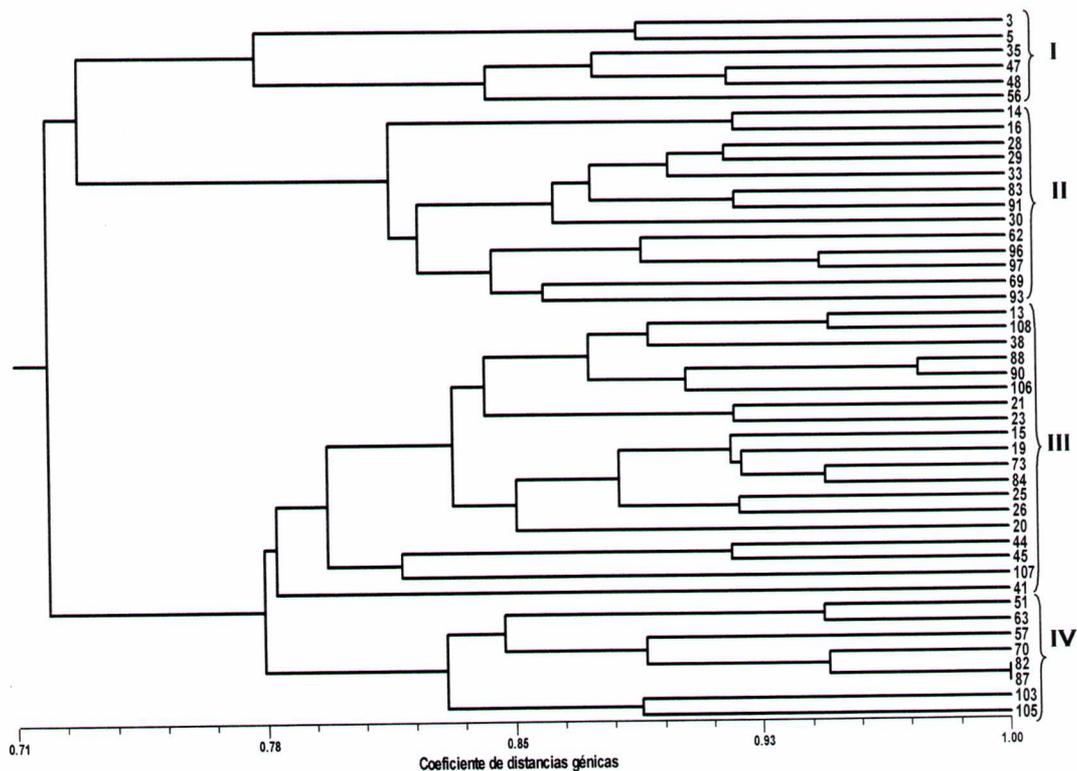


FIGURA 4. Dendrograma general construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenido mediante el coeficiente de apareamiento simple (SM) de los productos de RAMP (OPA05, 10, 13 y 19) + (GATA)₄ de 46 variedades partenocárpicas de calabaza.

Los resultados de la comparación de las matrices de similaridad generada con la matriz básica de datos y con la matriz promedio del Bootstrap (remuestreos) para cada una de las técnicas utilizadas (microsatélites y RAMP) generaron los dendrogramas de distancias genéticas. Respecto a los valores promedio de los remuestreos, dichos resultados fueron corroborados con la prueba de Mantel (1967), misma que identificó alta correlación entre las matrices comparadas (r : 0.99906 en microsatélites y r : 0.99996 en RAMP), por lo que se asume que existe alta homogeneidad de los valores de las correlaciones entre matrices y alta correlación entre las variedades estudiadas, lo que corresponde con la poca variabilidad genética encontrada entre dichas variedades partenocárpicas.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales considerando como variables respuesta a los seis *loci* polimórficos amplificados para microsatélites con el iniciador de secuencia repetida (GATA)₄, identificó cuatro variables que están caracterizando el 91.73 % (Cuadro 2) de la proporción acumulada del total de variedades; mientras que para RAMP y sus 37 *loci* polimórficos amplificados con las cuatro combinaciones de iniciadores RAPD+microsatélites utilizados, identificó 12 componentes de 37 posibles, que están caracterizando en un 82.21 % (Cuadro 2) de la proporción acumulada a las 46 variedades partenocárpicas de calabaza.

La variabilidad encontrada está asociada con cada uno de los componentes principales generados, y esta variabilidad disminuye a medida que se incrementa el número de componentes principales tanto en microsatélites como con RAMP.

En el caso de microsatélites, el primer componente principal concentra el 32.31 % de la variabilidad total de los *loci* amplificados; el segundo componente principal, el 21.44 %, el tercer componente, el 20.77 %; los componentes cuatro a seis concentran el 25.48 % de la variabilidad total.

Los primeros cuatro componentes concentran el 91.73 % de la variabilidad total de los *loci* generados, en tanto que los componentes uno al tres, concentran el 51.15 % de toda la variabilidad existente entre los *loci* analizados. Cabe señalar que estos cuatro componentes principales son los de mayor importancia, puesto que reúnen más de la mitad de la variabilidad acumulada.

Los análisis de componentes principales para RAMP (Cuadro 2), identificó 12 componentes que a su vez son los que están caracterizando en un 82.21 % de la variabilidad genética entre los 37 *loci* totales generados; para esta técnica el primer componente concentra el 16.54 % de variabilidad existente entre los *loci*, el segundo 12.84 % y el tercero 9.52 %, entre estos tres primeros componentes concentran un total de 38.91 % de la variabilidad acumulada; los componentes 4 al 12 concentran 43.30 % de dicha variabilidad genética entre *loci* (Cuadro 2).

CUADRO 2. Valor propio y porcentaje de variabilidad que aportan los componentes principales de 46 variedades partenocárpicas de calabaza.

Componente principal	Valores propios	Variabilidad del componente (%)	Porcentaje acumulado de la variabilidad (%)
Microsatélites			
1	1.61573632	32.3147	32.3147
2	1.07202033	21.4404	53.7551
3	1.03899401	20.7799	74.5350
4	0.86000038	17.2000	91.7350
RAMP (RAPD+Microsatélites)			
1	4.96345380	16.5448	16.5448
2	3.85238486	12.8413	29.3861
3	2.85757883	9.5253	38.9114
4	2.31755397	7.7252	46.6366
5	1.92713783	6.4238	53.0604
6	1.75246070	5.8415	58.9019
7	1.60632221	5.3544	64.2563
8	1.54722999	5.1574	69.4137
9	1.07608360	3.5869	73.0007
10	1.04301952	3.4767	76.4774
11	0.89693538	2.9898	79.4672
12	0.82466371	2.7489	82.2161

Los resultados contenidos en el Cuadro 3, muestran los *loci* que más aportaron a la identificación de la variabilidad genética y definición de los grupos de las 46 variedades partenocárpicas de calabaza, para microsatélites, el primer componente principal (Dim-1) está influenciado principalmente por los *loci* M(GATA)₄-1 (0.8504 %) y M(GATA)₄-2 (0.8034 %); mientras que en el segundo componente principal (Dim-2) fue el *loci* M(GATA)₄-3 (0.9317 %) el que caracteriza genéticamente a las variedades. Estos dos componentes principales fueron los más importantes en la caracterización genética con microsatélites.

Por otro lado, en RAMP el primer componente principal (Dim-1) se caracteriza por la combinación de OPA05+(GATA)₄ (Cuadro 3), específicamente por los altos valores absolutos de los *loci* R05-4 (81.81 %) , R05-6 (0.8003 %) y R05-7 (0.8239 %); en el caso del Dim-2 son los *loci* R10-4 (0.7828 %) y R10-6 (0.7888), los que influyen la caracterización de las variedades, los *loci* R19-6 (0.6195 %) y R19-10 (0.6428 %) caracterizan al tercer componente principal (Dim-3), mientras que el *loci* R13-10 (0.6679 %) al cuarto componente principal (Dim-4). Estos resultados indican que son ocho *loci* de 37 totales los que están aportando más a la caracterización genética de las 46 variedades partenocárpicas de calabaza en estudio.

En general, 11 *loci* (tres de microsatélites y ocho de RAMP) influyeron en mayor proporción a la caracterización genética y definición de los grupos para cada una de las técnicas. La combinación de OPA05+(GATA)₄ fue el RAMP que identificó menor variabilidad genética entre las 46 variedades partenocárpicas de calabaza estudiadas.

CUADRO 3. Estructura de los componentes principales definidos a partir de un iniciador de secuencia repetida (microsatélites) y cuatro combinaciones RAMP y 43 loci polimórficos amplificadores, en 46 variedades partenocárpicas de calabaza.

Posición del loci en el iniciador	Dim-1	Dim-2	Dim-3	Dim-4	Posición del loci en el iniciador
-----------------------------------	-------	-------	-------	-------	-----------------------------------

microsatélites						RAMP (Continuación)					
M(GATA) ₁ -1	0.8504	0.1296	0.0014	0.2710	R13-1	-0.2236	-0.0319	-0.4660	0.2866		
M(GATA) ₂ -2	0.8034	-0.2115	0.3409	0.1308	R13-2	-0.4764	-0.3305	-0.5731	-0.0922		
M(GATA) ₃ -3	0.0529	0.9317	-0.2214	0.2044	R13-3	-0.2464	0.0151	-0.2124	0.1823		
M(GATA) ₄ -4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	R13-4	-0.5925	-0.2903	-0.0293	-0.0217		
M(GATA) ₅ -5	0.4878	0.0812	-0.4029	-0.7699	R13-5	-0.1082	0.5014	-0.5601	0.0618		
M(GATA) ₆ -6	-0.0793	0.3686	0.8435	-0.3674	R13-6	-0.3332	0.4156	-0.3206	-0.1694		
R05-1	0.0918	0.5654	0.0962	0.4699	R13-7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
R05-2	-0.7139	0.4923	0.2067	0.0668	R13-8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
R05-3	-0.5230	-0.0887	0.0338	-0.0320	R13-10	0.0182	0.3199	0.0584	-0.6679		
R05-4	-0.8181	0.3426	0.2634	-0.0418	R13-11	-0.2294	0.2532	-0.1570	-0.0337		
R05-5	-0.4180	0.2601	-0.0287	0.3134	R13-12	-0.1966	-0.1039	-0.1942	-0.0196		
R05-6	-0.8003	0.4100	0.2522	0.0110	R19-1	-0.5669	-0.5333	0.1440	0.1079		
R05-7	-0.8239	0.0908	0.2205	-0.2124	R19-2	0.0162	0.3319	-0.4181	0.5163		
R10-1	0.1671	0.2567	0.1317	0.2107	R19-3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
R10-2	0.1684	0.1190	-0.2399	-0.6336	R19-4	-0.3567	0.0481	0.0727	-0.0651		
R10-3	0.0410	0.4712	0.1654	0.4505	R19-5	-0.1516	0.2346	-0.4308	0.0581		
R10-4	0.2875	-0.0663	-0.1814	-0.7828	R19-6	0.0536	-0.1448	-0.6195	0.2533		
R10-5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	R19-7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
R10-6	0.3639	0.7888	0.0100	-0.2427	R19-8	0.0907	0.1722	-0.2373	-0.3104		
R10-7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	R19-9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
R10-8	0.3917	0.2361	-0.1015	-0.0295	R19-10	-0.0382	-0.1693	-0.6428	-0.0158		

Dim-1 a 4: Componentes Principales; R: RAMP

CONCLUSIONES

El iniciador de secuencia repetida (GATA)₄ utilizado para microsatélites

amplificó seis loci con 100 % de polimorfismo; mientras que la combinación de

(GATA)₄ y cada uno de los iniciadores decámeros de Operon (OPA05, OPA10,

OPA13 y OPA19) en la técnica RAMP, amplificaron 37 loci totales con 91.8 % de

polimorfismo.

Las distancias génicas entre las variedades fueron muy cercanas a la unidad, tanto con microsatélites (entre 0.7612 y 1.00) como con RAMP (entre 0.7196 y 1.00). Éstos resultados reflejaron alto grado de emparentamiento genético entre las variedades partenocárpicas de calabazas estudiadas.

El análisis de componentes principales en el que se consideró como variables respuesta a los seis *loci* polimórficos amplificados para microsatélites y el iniciador de secuencia repetida (GATA)₄, identificó cuatro variables que explican el 91.73 % de la proporción acumulada del total de variedades. Con RAMP y sus 37 *loci* polimórficos amplificados con las cuatro combinaciones de iniciadores RAPD+microsatélites utilizados, se identificó 12 componentes de 37 posibles, que caracterizan en un 82.21 % de la proporción acumulada de las 46 variedades partenocárpicas de calabacita.

Tres *loci* de seis [M(GATA)₄-1 (0.8504 %), M(GATA)₄-2 (0.8034 %) y M(GATA)₄-3 (0.9317 %)] generados por microsatélites y ocho *loci* de 37 [(R05-4 (81.81 %) , R05-6 (0.8003 %), R05-7 (0.8239 %), R10-4 (0.7828 %), R10-6 (0.7888), R19-6 (0.6195 %), R19-10 (0.6428 %) y R13-10 (0.6679 %)] producidos por RAMP, explicaron la mayor proporción de la variación genética de las 46 variedades partenocárpicas de calabacita estudiadas.

LITERATURA CITADA

- ADAMS, D., KIM, J., JENSEN, R., LES, M. SLICE E., D. AND WALKER, J. 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.20r. Exeter Software, new York, U. S. A.
- AHRENS, U. AND SEEMÜLLER, E. 1992. Detection of DNA of PInt pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- DUNN, G. AND B. S. EVERITT. 1982. An introduction to mathematical taxonomy. Cambridge. New York. 152 pp.
- CHÁVEZ, A. J. L. 1993. Mejoramiento de Plantas. Ed. Trillas. 2ª ed. México. 131 p.
- GRIFFING, B. 1989. Genetics Analysis of Plants Mixture. *Genetics*. pp. 943-956.
- LEE I., M.; DAVIS E., R. AND HIRUKI, C. 1991. Genetic Interrelatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 3565-3569.
- MANTEL N., A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, 27:209-220.
- MONTES, H. S. 1991. Calabazas (*Cucurbita* spp.), pp. 239-250. In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. Ed. Ortega P., Palomino H., R. Castillo G., F.; González H., V. A. y Livera M., M. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- MORGANTE, M. and A. M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plants genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- RIVERA, B., R.; I. Torres P., J. A. Garzón T. y L. Herrera E. 1991. Introducción a la Biología Molecular e Ingeniería genética de Plantas. Ed. COMP. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato. México. 222p.
- ROJAS-MARTÍNEZ, R. I. 1998. Identificación del fitoplasma de la filodia del cempazúchil (*Tagetes erecta*) mediante PCR y RALPH y alteraciones

fisiológicas en plantas sintomáticas. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México. 97 p.

SÁNCHEZ, H. C.; Villanueva V. C.; 2002. Sahagún C. J.; Merrick C. L. Variación genética y respuesta a la selección combinada en una variedad criolla de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* huber var. *stenosperma*). Revista Chapingo Serie Horticultura 6(2): 221-240, 2000.

SOKAL, R. R. and P. H. A. Sneath. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. 359 pp.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados encontrados en cada uno de los análisis de 46 variedades partenocárpicas de calabaza encontradas y caracterizadas muestran mucha dispersión entre los grupos de variedades confirmados a través de los diferentes estudios, siendo en el grupo I la variedad 3 (Cuadro 1), la única coincidencia de las 46 variedades en los cuatro estudios realizados. En tanto que de los análisis genéticos moleculares (RAPD, microsatélites y RAMP) la variedad 47, fue la única que coincide en el grupo I en los tres análisis (Cuadro 1).

Por otro lado, en la comparación individual entre el análisis morfológico contra el análisis RAPD (Cuadro 1), se pudieron identificar nueve variedades (3, 29, 38, 44, 48, 69, 88, 91 y 97) que comparten el mismo grupo I en ambos análisis, en el grupo II sólo la variedad 83, y en el grupo III la única coincidencia fue la variedad 70; Así mismo, la comparación entre análisis morfológico contra microsatélites muestra que cinco variedades (3, 28, 38, 51 y 97) coinciden en el grupo I, siete variedades (5, 14, 21, 35, 45, 62 y 90) coinciden en el grupo II, mientras que en el grupo III no se encontraron coincidencias. En tanto que en la comparación entre análisis morfológico contra RAMP solo dos variedades (3 y 48) fueron coincidentes en el grupo I, en el grupo II se encontraron seis variedades (14, 33, 62, 83, 93 y 96) coincidentes, y en el grupo III fueron siete variedades (13, 15, 20, 23, 84, 106 y 107) (Cuadro1).

CUADRO 1. Comparación de agrupamientos confirmados con las 46 variedades partenocárpicas de calabacita tipo *round zucchini*, obtenidas en Chapingo, México, según el tipo de análisis realizado.

Agrupaciones Agronómicas	Genética molecular		
	Morfológica	RAPD	Microsatélites
Grupo I	3, 19, 26, 28, 29, 38, 29, 38, 29, 33, 35, 38, 41, 44, 45, 47, 48, 51, 57, 63, 69, 73, 88, 91 y 97.	3, 5, 13, 15, 20, 29, 33, 35, 38, 47, 51, 44, 45, 47, 48, 51, 57, 62, 69, 87, 88, 90, 91, 93, 96, 97, 103, 106 y 107.	3, 15, 16, 20, 25, 28, 33, 38, 47, 51, 56, 97.
Grupo II	5, 14, 21, 25, 33, 35, 41, 45, 56, 62, 82, 83, 87, 90, 93, 96, 103 y 108.	73, 83 y 84.	5, 13, 14, 21, 30, 35, 45, 48, 62, 63, 70, 90, 91 y 105.
Grupo III	13, 15, 16, 20, 23, 30, 47, 70, 84, 105, 106 y 107.	51, 57, 63, 70 y 82.	13, 15, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 41, 44, 56, 57, 87, 93 y 108.
Grupo IV	14, 16, 19, 21, 25, 26, 28 y 30.	23, 69 y 88.	51, 57, 63, 70, 82, 87, 103 y 105.
Grupo V	23.	73, 83 y 96.	

El mayor número (10) de variedades coincidentes se identificó en el grupo uno de la comparación entre RAPD y microsatélites, (3, 15, 20, 33, 38, 47, 97, 103, 106 y 107) (Cuadro 1). En la comparación RAPD contra RAMP, se observa que 11 variedades del grupo I de RAPD coinciden con el grupo III de RAMP, mientras que todas las variedades que integran el grupo III en RAPD corresponden a cinco de las ocho variedades que integran el grupo IV en RAMP. Estas observaciones sugieren que la designación de los grupos se hizo de forma arbitraria sin considerar las coincidencias de variedades entre las agrupaciones en los diferentes análisis, aunque también es probable que la distancias genéticas entre las 46 variedades

partenocárpicas de calabacita sean muy reducidas, por lo que los programas de análisis designan las combinaciones de variedades en forma indistinta.

CONCLUSIONES GENERALES

Análisis morfológico

Se obtuvieron y caracterizaron 46 nuevas variedades partenocárpicas de calabaza (*Cucurbita pepo* L) arbustivas y precoces, aptas para el desarrollo de variedades de calabacita para producción de hortaliza en invernadero, ya que no requieren insectos polinizadores para el desarrollo normal de los frutos hasta la edad de la cosecha.

De 52 caracteres evaluados, 37 de ellos permitieron explicar el 99 % de variabilidad conjunta de los 46 genotipos partenocárpicos, así como su clasificación en tres grupos bien definidos.

Los 46 genotipos partenocárpicos obtenidos se conjuntaron en tres grupos: grupo 1: plantas con entrenudos de longitud intermedia, frutos redondos, pesados, con cáscara gruesa y muchas semillas grandes; grupo 2, plantas con entrenudos cortos, frutos pequeños, alargados de bajo peso y cáscara delgada con pocas semillas pequeñas; grupo 3, plantas con entrenudos largos, frutos redondos, con cáscara delgada y con muchas semillas de tamaño pequeño (Capítulo 1).

Caracterización y agrupamiento molecular con RAPD

Los iniciadores utilizados en los análisis genéticos moleculares tipo RAPD identificaron que existe poca variabilidad genética entre las variedades partenocárpicas de calabaza evaluadas. Sin embargo, el análisis de componentes principales mostró que el iniciador OPA05 y OPA13, y principalmente los *loci* A13-6, A13-7, A13-11, A13-1, A13-2 y A13-3 fueron los que aportando características de asociación positivas entre las variedades partenocárpicas (Capítulo 2). A demás, OPA13 generó agrupamientos caracterizados por la reducida variabilidad en cuanto a las distancias genéticas entre las variedades partenocárpicas.

Caracterización y agrupamiento molecular con microsatélites y RAMP

El iniciador de secuencia repetida (GATA)₄ utilizado para microsatélites amplificó seis *loci* con 100 % de polimorfismo; mientras que la combinación de (GATA)₄ y cada uno de los iniciadores decámeros de Operon (OPA05, OPA10, OPA13 y OPA19) en la técnica RAMP, amplificaron 37 *loci* totales con 91.8 % de polimorfismo (Capítulo 3).

Los valores de distancias génicas fueron muy cercanos a la unidad entre las variedades, tanto con microsatélites (entre 0.7612 y 1.00) como con RAMP (entre 0.7196 y 1.00). Estos resultados indican alto grado de emparentamiento genético entre las variedades partenocárpicas de calabazas estudiadas.

El análisis de componentes principales considerando como variables

respuesta a los seis *loci* polimórficos amplificados para microsatélites y el iniciador de secuencia repetida (GATA)₄, identificó cuatro variables que caracterizan el 91.73 % de la proporción acumulada del total de variedades; mientras que para RAMP y sus 37 *loci* polimórficos amplificados con las cuatro combinaciones de iniciadores RAPD+microsatélites utilizados, identificó 12 componentes de 37 posibles, que caracterizan en un 82.21% la proporción acumulada de las 46 variedades partenocárpicas de calabacita.

Tres *loci* de seis [M(GATA)₄-1 (0.850 4%), M(GATA)₄-2 (0.8034 %) y M(GATA)₄-3 (0.9317 %)] generados por microsatélites y ocho *loci* de 37 [(R05-4 (81.81 %) , R05-6 (0.8003 %), R05-7 (0.8239 %), R10-4 (0.7828 %), R10-6 (0.7888), R19-6 (0.6195 %), R19-10 (0.6428 %) y R13-10 (0.6679 %)] producidos por RAMP, explicaron la mayor proporción de la variación genética de las 46 variedades partenocárpicas de calabacita estudiadas (Capítulo 3).