

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES
EXPERIMENTALES DE CALABAZA (*Cucurbita* spp)
RESISTENTES A HONGOS QUE AFECTAN LA RAÍZ**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

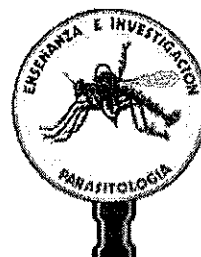
PRESENTA:

MIRIAM SÁNCHEZ VEGA



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

Chapingo, México. Diciembre del 2008.

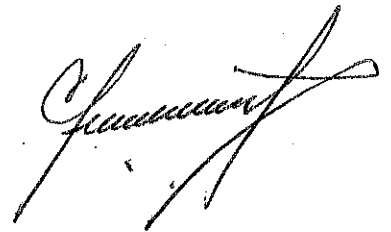


**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES EXPERIMENTALES
DE CALABAZA (*Cucurbita* spp) RESISTENTES A HONGOS QUE AFECTAN
LA RAÍZ**

Tesis realizada por **MIRIAM SÁNCHEZ VEGA** bajo la dirección del Dr. Clemente Villanueva Verduzco y asesorada por la Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, la M. C. Bertha Tlapal Bolaños y el Dr. Marcelo Acosta Ramos y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

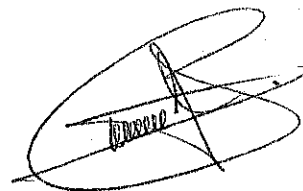
DIRECTOR: DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO



ASESOR: DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ



ASESOR: M. C. BERTHA TLAPAL BOLAÑOS



ASESOR: DR. MARCELO ACOSTA RAMOS



AGRADECIMIENTOS

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

A la Universidad Autónoma Chapingo y a los profesores de la Maestría en Protección Vegetal, por inculcarme los conocimientos necesarios para el logro de esta formación objetiva e integral.

Al Comité Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestro en Ciencias.

A los Departamentos de Parasitología Agrícola y Fitotecnia, por los apoyos brindados a mi Persona.

Al programa de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, por permitir parte del desarrollo de mi investigación.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco, por sus importantes y oportunas aportaciones a esta investigación.

A la Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, por su amistad, enseñanza, consejos y acertadas aportaciones para la realización de esta investigación.

A la M. C. Bertha Tlapal Bolaños, por el apoyo brindado a mi persona, así como por sus consejos y sugerencias a esta investigación.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por las aportaciones realizadas a mi enseñanza y a ésta investigación.

A los trabajadores del Laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola: Juan Feroso García y Mariana Calzada Millán, quienes colaboraron con mi tesis, en asesoría en laboratorio y ayuda en la toma de datos.

A Romeo Alonso Pinzón, por su amistad y su gran apoyo durante la realización de este trabajo.

A los trabajadores del Campo Agrícola Experimental de Fitotecnia, en especial a Maximino Ramírez Ayala y Agustín Carrillo Solano, por el apoyo en trabajo de campo como la toma de datos y análisis de los mismos.

A los compañeros del Laboratorio de Interacción Planta-Patógeno del programa de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, por su valiosa amistad y el apoyo con sus enseñanzas: Diana, Damaris, Ruth, Yolanda, Lidia, Celia, Ernesto y Edgar.

Al Dr. Aquiles Carballo y a María Elena por su gran amistad y apoyo brindado.

A todos gracias...

DEDICATORIA

A mi hijita

Ximena

*Por ser lo más maravilloso que ha llegado a mi vida.
Por ser un gran motivo para seguir adelante contra todo, mi vida...
...Te Amo peque*

A mi esposo

Alonso Méndez López

*Por su intenso amor, comprensión y confianza, por ser parte importante de
mi vida y estar conmigo apoyándome incondicionalmente...
...Te Amo vida*

A mi madre

Rosalba Guadalupe Vega Rodríguez

*Por haberme dado el mejor regalo, la vida. Por apoyarme siempre, en
cualquier circunstancia, por confiar en mí y seguir creyendo.
Por ser la mujer más fuerte que he conocido y por seguir adelante a pesar
de las adversidades...
...Te Amo chiquita, siempre contarás conmigo.*

A mis hermanos

Lorena, Gerardo y Brenda†

*Por su amor y apoyo, por que a pesar de las circunstancias seguimos
juntos, en cuerpo y alma...
...Los Amo.*

A mi suegra Angelita y mis cuñados

*Por su cariño y confianza durante todo este tiempo, gracias. Por haberme
abierto las puertas de su casa y dejarme ser parte de su familia...
...gracias.*

A la Sra. Julia Salmón

*Por ser una gran amiga y por su apoyo incondicional...
...la quiero mucho*

Miriam Sánchez Vega

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació en el Distrito Federal, México, el 16 de Junio de 1982. Cursó sus estudios de Primaria en la Escuela "Tierra y Libertad", de Secundaria en la Escuela Secundaria Técnica, No. 11 "José Antonio Alzate" y de Preparatoria Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario (CBTA) No. 35. Ingresa a la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) a propedéutico en el año 2000, donde egresa en el 2005, obteniendo el Título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. En enero del 2006 ingresa a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, egresando en diciembre del 2007.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

	Pag.
ÍNDICE GENERAL	<i>i</i>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vii</i>
RESUMEN	<i>xi</i>
ABSTRAC	<i>xi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Importancia del género <i>Cucurbita</i>	4
2.2. Descripción del género <i>Cucurbita</i>	5
2.3. Clasificación taxonómica	6
2.4. Descripción por especie de <i>Cucurbita</i>	6
2.4.1 <i>Cucurbita pepo</i>	6
2.4.1.1 Caracteres distintivos	7
2.4.2 <i>Cucurbita argyrosperma</i>	7
2.4.2.1 Caracteres distintivos	8
2.4.3 <i>Cucurbita ficifolia</i>	8
2.4.3.1 Caracteres distintivos	9
2.4.4 <i>Cucurbita moschata</i>	9
2.4.4.1 Caracteres distintivos	10
2.5. Principales enfermedades en cucurbitáceas	10
2.6. Principales enfermedades de la raíz en cucurbitáceas	12
2.6.1. Marchitez por <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend	12
2.6.1.1. Importancia y distribución	12
2.6.1.2. Sintomatología y daños	13
2.6.1.3. Agente causal	14
2.6.1.4. Ciclo biológico y epidemiología	15
2.6.2. Ahogamiento de raíz por <i>Pythium aphanidermatum</i> E.	17

2.6.2.1.	Importancia y distribución	18
2.6.2.2.	Sintomatología y daños	18
2.6.2.3.	Agente causal	19
2.6.2.4.	Ciclo biológico y epidemiología	20
2.6.3.	Pudrición radicular y marchites por <i>Phytophthora capsici</i>	22
2.6.3.1.	Importancia y distribución	22
2.6.3.2.	Sintomatología y daños	23
2.6.3.3.	Agente causal	25
2.6.3.4.	Ciclo biológico y epidemiología	25
2.6.4.	Pudrición de la raíz y cuello por <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	28
2.6.4.1.	Importancia y distribución	28
2.6.4.2.	Sintomatología y daños	29
2.6.4.3.	Agente causal	30
2.6.4.4.	Ciclo biológico y epidemiología	31
2.6.5.	Manejo de hongos que afectan la raíz	33
2.6.5.1.	Uso de variedades resistentes	35
2.7	Resistencia genética a enfermedades	36
2.7.1	Definición de resistencia	36
2.7.2	Tipos de resistencia	37
2.7.2.1	Resistencia vertical	37
2.7.2.2	Resistencia horizontal	38
2.8	Objetivos del mejoramiento genético en calabaza	38
2.8.1	Antecedentes de mejoramiento genético para resistencia a hongos que afectan la raíz en calabaza (<i>Cucurbita</i> spp)	39
2.9	Métodos de mejoramiento	
2.10	Marcadores genéticos	40
2.11.	Marcadores moleculares	41
2.11.1	Técnicas para generar marcadores genéticos	42
2.11.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	42
2.11.2.1	RAPD	43
2.11.2.2	Microsatélites (MP-PCR)	44
2.11.2.3	RAMPO y RAMP	47

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1.	Ubicación del experimento	49
3.2.	Material Genético	49
3.3	Fase de invernadero y corroboración de la resistencia	51
3.3.1.	Tratamientos aplicados en la corroboración de resistencia a hongos	51
3.3.2.	Incremento del inóculo	52
3.3.3.	Preparación del inóculo	52
3.3.4.	Siembra e inoculación de calabazas	53
3.3.4.1	Pretratamiento de desinfección de la semilla y aplicación del inóculo	56
3.3.5.	Transplante de plantas resistentes	57
3.3.6.	Variables evaluadas en la fase de campo	59
3.4.	Fase de laboratorio y análisis molecular	60
3.4.1.	Colecta y manejo del material vegetal para análisis de ADN	60
3.4.2.	Extracción y conservación del ADN genómico	61
3.4.2.1.	Método combinado de extracción de ADN	62
3.4.3.	Lavado de pastilla de ADN	63
3.4.4.	Calidad del ADN	64
3.4.5.	Estandarización de condiciones de PCR para generar RAPD, Microsatélites y RAMP	64
3.4.5.1	Iniciadores para RAPD	64
3.4.5.2	Iniciadores para Microsatélites y RAMP	65
3.4.5.3	Condiciones para la mezcla de reacción de la PCR	65
3.4.6.	Separación por electroforesis y visualización de los productos amplificados	67
3.4.7.	Análisis estadístico de datos	68
IV.	RESULTADOS	70
4.1.	Análisis de la fase de invernadero y corroboración de la resistencia	70
4.1.1	Síntomas observados en las plantas	70

4.1.2	Porcentaje de germinación	71
4.1.3	Porcentaje de incidencia en promedio de variedades	77
4.1.3.1	Variedades de Autopolinización	79
4.1.3.2	Variedades de Polinización Libre	84
4.1.4	Porcentaje de plantas resistentes	87
4.1.4.1	Porcentaje de plantas resistentes encontradas en variedades de autopolinización	88
4.1.4.2	Porcentaje de plantas resistentes encontradas en variedades de PL	88
4.2.	Análisis molecular	91
4.2.1.	Extracción, cuantificación y calidad de ADN	91
4.2.2.	Análisis de amplificación por medio de productos de PCR con Marcadores Moleculares	92
4.2.2.1.	Comparación entre variedades resistentes y susceptibles con perfiles RAPD	93
4.2.2.2.	Comparación entre variedades resistentes y susceptibles con perfiles de microsatélites	95
4.2.2.3.	Comparación entre variedades resistentes y susceptibles con perfiles RAMP	98
4.2.3.	Análisis estadístico de marcadores moleculares RAPD, Microsatelites y RAMP	100
4.2.3.1.	Dendogramas de comparación entre variedades resistentes con susceptibles	101
4.2.3.2.	Variedades de autopolinización resistentes	104
4.2.3.3.	Variedades de Polinización Libre resistentes	105
4.2.3.4.	Variedades de autopolinización y de Polinización Libre susceptibles	106
4.2.3.5.	Confiabilidad de resultados obtenidos en los dendogramas	108
V.	CONCLUSIONES	113
VI.	LITERATURA CITADA	114
VII.	ANEXOS	122

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Disponibilidad de semilla de variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) resistentes a hongos que afectan la raíz, encontradas por Aragón (2005), provenientes de PL y de autopolinización	50
Cuadro 2. Tratamientos y concentración de inóculo aplicado en variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) resistentes a hongos que afectan la raíz, para confirmar su resistencia, UACH, 2008.	51
Cuadro 3. Tratamientos utilizados en variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) resistente a hongos que afectan la raíz, de PL y de autopolinización, caracterizados por Aragón (2005) y sujeto a caracterización molecular, UACH, 2008.	54
Cuadro 4. Identidad de semillas de plantas usadas por variedad de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) resistente a hongos que afectan la raíz encontradas por Aragón (2005), para corroborar su resistencia, UACH, 2008.	56
Cuadro 5. Tratamientos utilizados en las variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) resistentes a hongos que afectan la raíz, encontradas por Aragón (2005), para corroborar su resistencia, UACH, 2008.	57
Cuadro 6. Identidad de plantas resistentes de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) obtenidas de la corroboración de la resistencia y transplantadas a invernadero para incremento de semilla. UACH, 2008.	58
Cuadro 7. Variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, obtenidas de la confirmación de la resistencia. UACH, 2008.	62
Cuadro 8. Condiciones de reacción para obtener RAPD, Microsatélites y RAMP de calabazas (<i>Cucurbita</i> spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz.	66
Cuadro 9. Condiciones de termociclaje para amplificar RAPD, 76Microsatélites y RAMP, obtenidos de ca90labazas (<i>Cucurbita</i> spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz.	67
Cuadro 10. Porcentaje de germinación en los tratamiento y testigos, provenientes de autopolinización, en variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) evaluadas para la verificación de la resistencia.	75

Cuadro 11.	Porcentaje de germinación en los tratamiento y testigos, provenientes de polinización libre, en variedades de calabaza (<i>Cucurbita spp.</i>) evaluadas para la verificación de la resistencia.	76
Cuadro 12.	Variedades de calabaza (<i>Cucurbita spp.</i>) que resultaron resistentes en la verificación de la resistencia a hongos que afectan la raíz.	90

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructuras morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> . a. Macroconidios, b. Microconidios, c. Clamidosporas.	15
Figura 2. Esquema del ciclo biológico de <i>Fusarium oxysporum</i> .	17
Figura 3. Estructuras morfológicas de <i>P. aphanidermatum</i> . a. oospora aplerótica, b. Anteridio claviforme, c. micelio cenocítico, y d. estructura de resistencia (clamidosporas).	20
Figura 4. Esquema del ciclo biológico de <i>Pythium sp.</i>	21
Figura 5. Esquema del ciclo de vida de <i>Phytophthora capsici</i> .	28
Figura 6. Esquema del ciclo biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> .	33
Figura 7. Croquis de localización del experimento	49
Figura 8. Visualización del tamaño de las bandas en pb que proporciona el marcador de peso molecular 1 Kb (Kilobase) Ladder, Invitrogen®. (0.5 µg/carril, en un gel de 0.9% agarosa, teñido con bromuro de estidio).	68
Figura 9. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de autopolinización, evaluadas a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds) para la corroboración de la resistencia.	73
Figura 10. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de autopolinización, empleadas como testigo, en el experimento de confirmación de la resistencia, evaluados a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds).	73
Figura 11. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de polinización libre, evaluadas a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds), para la verificación de la resistencia.	74
Figura 12. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de polinización libre, empleadas como testigo en el experimento de la verificación de la resistencia, evaluados a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds).	74

Figura 13.	Porcentaje de incidencia por fecha, provocada por los hongos que afectan la raíz en promedio de variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de autopolinización.	78
Figura 14.	Porcentaje de incidencia por fecha, provocada por los hongos que afectan la raíz en promedio de variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de polinización libre.	78
Figura 15.	Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, en variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de autopolinización a los 50 dds.	80
Figura 16.	Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades de <i>C. ficifolia</i> provenientes de autopolinización.	81
Figura 17.	Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades <i>C. moschata</i> de autopolinización.	82
Figura 18.	Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades <i>C. pepo</i> de autopolinización.	83
Figura 19.	Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades <i>C. argyrosperma</i> de polinización libre	83
Figura 20.	Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, en variedades de calabaza (<i>Cucurbita</i> spp) provenientes de polinización libre a los 50 dds.	84
Figura 21.	Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades de <i>C. ficifolia</i> provenientes de polinización libre.	85
Figura 22.	Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades <i>C. moschata</i> de polinización libre.	85
Figura 23.	Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades <i>C. argyrosperma</i> de polinización libre.	86
Figura 24.	Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades <i>C. pepo</i> de polinización libre.	87
Figura 25.	Gel de agarosa 1%, que muestra los perfiles de ADN de extracciones de 10 variedades resistentes a hongos que afectan la raíz en <i>Cucurbita</i> spp.	91
Figura 26.	Gel de agarosa 1.5%, que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD),	92

generados por el iniciador aleatorio OPA 15, usado en variedades de calabaza (*Cucurbita* spp).

- Figura 27.** Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPA 13, evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de autopolinización. 94
- Figura 28.** Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPA 13, evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de polinización libre. 95
- Figura 29.** Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos realizada con Microsatélites, generadas por el iniciador (GATA)₄, evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de autopolinización. 97
- Figura 30.** Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos realizados con Microsatélites, generadas por el iniciador (GATA)₄, evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de polinización libre. 98
- Figura 31.** Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos realizada con RAMP, generadas por el iniciador aleatorio OPA13 más el iniciador de Microsatélites (GATA)₄: (OPA 13 + (GATA)₄) evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de polinización libre. 100
- Figura 32.** Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes y susceptibles provenientes de autopolinización. 102
- Figura 33.** Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes provenientes de polinización libre. 103
- Figura 34.** Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes provenientes de autopolinización. 104

Figura 35.	Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes provenientes de polinización libre.	106
Figura 36.	Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades susceptibles provenientes de autopolinización.	107
Figura 37.	Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades susceptibles provenientes de polinización libre.	107
Figura 38.	Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similaridad remuestreada, en las variedades resistentes provenientes de autopolinización.	110
Figura 39.	Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similaridad remuestreada, en las variedades resistentes provenientes de polinización libre.	110
Figura 40.	Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similaridad remuestreada, en las variedades susceptibles provenientes de autopolinización.	111
Figura 41.	Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similaridad remuestreada, en las variedades susceptibles provenientes de polinización libre.	111

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES EXPERIMENTALES DE CALABAZA (*Cucurbita* spp) RESISTENTES A HONGOS QUE AFECTAN LA RAÍZ

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EXPERIMENTAL VARIETIES OF PUMPKIN (*Cucurbita* spp.) RESISTANT TO ROOT-INFECTING FUNGI

Sánchez Vega Miriam¹, Villanueva Verduzco Clemente², Rojas Martínez Reyna Isabel³, Tlapal Bolaños Bertha⁴, Acosta Ramos Marcelo⁵

RESUMEN

Se corroboró la resistencia de 49 variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) (25 provenientes de polinización libre y 24 de autopolinización) resistentes a hongos (*Fusarium oxysporium*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, y *Rhizoctonia solani*) que afectan la raíz, y se hizo la caracterización molecular de las mismas, empleando técnicas de PCR (RAPD, Microsatélites y RAMP). *P. capsici* fue el patógeno que ocasiono mayor incidencia (71.9%) y arrojó el menor número de plantas resistentes en las cuatro especies de *Cucurbita* (*C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*). *C. pepo* fue la especie más susceptible (100% de plantas muertas). De las técnicas moleculares empleadas, los Microsatélites detectaron 19 variedades resistentes de autopolinización (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 24 y 25); y 15 variedades resistentes de polinización libre (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23 y 24) marcando diferencias con respecto a las susceptibles, los RAMP (RAPD + Microsatélites) identificaron diferencias contundentes en cuanto a la separación de grupos y alta variabilidad genética entre las especies de calabaza a través de las variedades resistentes; en tanto que los RAPD solo detectaron agrupaciones entre las variedades de cada especie estudiada.

Palabras clave: *Cucurbita* spp, resistencia a damping-off, técnicas de PCR, variedades resistentes.

ABSTRACT

The resistance of 49 varieties of pumpkin (*Cucurbita* spp.) (25 produced by open pollination and 24 by auto-pollination) resistant to root-infecting fungi (*Fusarium oxysporium*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, and *Rhizoctonia solani*) was verified and molecular characterization was done on these species using PCR techniques (RAPD, Microsatellites and RAMP). *P. capsici* was the pathogen which caused the highest incidence (71.9%), and produced the lowest number of resistant plants in the four species of *Cucurbita* (*C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* and *C. argyrosperma*). *C. pepo* was the most susceptible specie (100% of plant Mortality). From the molecular techniques applied, the Microsatellites detected 19 auto-pollinated resistant varieties (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 24, and 25), and 15 openly pollinated resistant varieties (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23 and 24), marking differences with respect to the susceptible varieties. The RAMP technique (RAPD, + Microsatellites) identified decisive differences with regards to the separation of groups and high genetic variability among the pumpkin species through resistant varieties, while the RAPD technique only detected groups or associations among the varieties of each studied specie.

Key words: *Cucurbita* spp, resistance to damping-off, PCR techniques, resistant varieties.

I. INTRODUCCIÓN

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).

Como cualquier otro cultivo, la calabaza es afectada por plagas y enfermedades que disminuyen su rendimiento y calidad. Las enfermedades que en los últimos años han mostrado un potencial destructivo son las del complejo damping off (*Phytophthora infestans*, *Pythium* spp, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*) en todas las zonas productoras de nuestro país. El método más práctico y económico de lucha contra estas enfermedades es la utilización de cultivares de calabaza resistentes a dichos hongos (Aragón, 2005).

En México, el mejoramiento genético en calabazas tradicionalmente se ha enfocado hacia la obtención de variedades para la producción de verdura, rendimiento y calidad de fruto y semilla *in situ* y poco se ha considerado el aspecto de resistencia hacia los patógenos, con lo que se puede reducir pérdidas por el ataque de las enfermedades (Pérez, 2002).

En busca de solución al ataque de hongos en hortalizas, se ha trabajado con genes de resistencia para controlar enfermedades en cucurbitáceas; por ejemplo la resistencia a *Clamidosporium cucumerinum* y *F. oxysporum* f. sp. *melonis* en pepino (*Cucumis sativus* L.) y melón (*Cucumis melo* L.), respectivamente (Pollak, 2001). En esta línea, a partir de 1999 en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) se han realizado varios trabajos tendientes a buscar genotipos de resistentes al damping off en varias especies de calabazas, los cuales han arrojado resultados muy alentadores (Aragón, 2005).

La caracterización morfológica tradicional de variedades experimentales de calabaza resistentes al damping off realizada por Aragón (2005), utilizadas en este estudio, está condicionada por los factores ambientales porque depende del

fenotipo y por lo mismo puede presentar problemas como variación en los caracteres que diferencian a un grupo de otro.

El manejo sanitario de una enfermedad debe basarse en la complementación integrada de todas las medidas de manejo y control, entre las cuales se encuentran las variedades resistentes y el uso de fungicidas. La siembra de variedades con resistencia genética, es una medida preferencial porque permite maximizar el manejo integrado, aunque su durabilidad cuando es de naturaleza vertical se ve afectada por cambios de virulencia de los hongos que se adaptan a la presión selectiva que ejercen prácticas inadecuadas como el uso de variedades susceptibles y fungicidas aplicados incorrectamente.

En la actualidad se dispone de herramientas de caracterización de germoplasma mucho más objetivas y complementarias como son las técnicas moleculares, concretamente la secuenciación del ADN (Ácido desoxirribonucleico) ribosomal.

La caracterización morfológica no está determinada por el número de variables, sino por la calidad de las mismas, por lo que es importante establecer una lista de factores de estudio que sean altamente discriminantes y no influenciados por el ambiente. La bondad de utilizar marcadores moleculares es que esta tecnología está consolidando uno de los métodos más apropiados para llevar a cabo estudios precisos y confiables de identificación de genotipos y similitud genética en numerosas especies vegetales (Montalvo, 1998).

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

Teniendo ya disponibles las características morfológicas, es necesario seguir con las investigaciones de los materiales estudiados en la UACH, con el uso de herramientas más apropiadas y confiables, por lo que se plantea un análisis molecular a partir de marcadores tipo RAPD, Microsatélites y RAMP en las calabazas resistentes al complejo de hongos damping off, con los siguientes:

1.1 Objetivos

1. Corroborar la resistencia en variedades experimentales de calabaza (*Cucurbita* spp) seleccionadas como resistentes al complejo de hongos (*Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, y *Rhizoctonia solani*) que afectan la raíz.
2. Caracterizar mediante marcadores moleculares las variedades experimentales de calabaza (*Cucurbita* spp) resistentes al complejo de hongos causales del damping off, identificados en el Programa de Mejoramiento Genético de Calabazas de la Universidad Autónoma Chapingo, con fines de registro varietal.

1.2 Hipótesis

Es posible caracterizar las variedades experimentales de calabaza resistentes a hongos causantes del damping off, y a la vez diferenciarlas de los segregantes susceptibles, utilizando marcadores moleculares de los tipos RAPD, microsatélites y RAMP (RAPD y microsatélites en conjunto y en corrida simultánea).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del género *Cucurbita*

La calabaza ha sido uno de los cultivos más importantes para el hombre desde principios de la civilización como fuente de alimento y otros usos (Teodoro, 2005).

El género *Cucurbita* es bien conocido por sus especies cultivadas (Lira, 1995), ha estado presente en todas las culturas americanas desde épocas remotas hace más de 10,000 años (Bruce, 1997), siendo cultivada mucho antes que el maíz, de ahí que tiene importancia nacional y cultural en México y en el mundo (Villanueva, 2007).

Hay cinco especies de *Cucurbita*: *C. pepo* L., *C. moschata* Duch Ex Lam., *C. argyrosperma* Huber, *C. ficifolia* Bouché, y *C. maxima* Duch Ex Lam., de las cuales las cuatro primeras están ampliamente distribuidas en México y *C. maxima* es originaria de Sudamérica (Perú, Colombia y Bolivia) (Villanueva, 2007).

Los frutos inmaduros, maduros, semillas flores y puntas de guía de las especies cultivadas de este género han tenido y tienen gran importancia alimenticia en una gran parte del mundo, y en muchas regiones de Latinoamérica, las flores y algunas partes vegetativas (las punta tiernas de los tallos o “guías” y los zarcillos) también son utilizadas como verdura (Lira, 1995; Villanueva 2007).

México es uno de los principales productores de calabazas en el mundo. En el 2006 ocupó el séptimo lugar en producción para las diferentes especies cultivadas, sólo después de China, India, Federación de Rusia, Ucrania, EUA y Egipto. Entre los principales países exportadores se encuentran España, Nueva Zelanda, México, Francia y Marruecos y entre los países que más importan este cultivo se encuentra EUA, Francia, Japón, Alemania y Reino Unido (FAO, 2006).

En México en Otoño-Invierno (O-I) del año agrícola del 2005-2006, se sembró un total de 35,045 ha tanto para condiciones de temporal como de riego, y se registró

una producción de 508,487 toneladas, con un rendimiento promedio de 15.749 t.ha⁻¹. Los principales estados productores son Michoacán, Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila y Durango, tanto para el ciclo O-I como P-V (Primavera-Verano) (SAGARPA, 2006).

2.2 Descripción del género *Cucurbita*

El género *Cucurbita* se considera originario de México y de América Central, de donde fue distribuido a América del Norte y del Sur. Sus orígenes se remontan al año 7000 a. de C. (Whitaker y Davis, 1962)

Las especies silvestres y cultivadas de *Cucurbita* son plantas herbáceas, anuales, monoicas (con flores masculinas y femeninas separadas), rastreras, trepadoras o subarborescentes y arbustivas (erectas todo su ciclo) en las variedades mejoradas. Sus flores son gamopétalas con corolas campanuladas, muy vistosas, de color ~~amarillo~~ anaranjado brillante, ~~abren~~ muy temprano por la mañana y su polinización es principalmente entomófila. Las flores masculinas siempre aparecen primero, presentan los estambres estructurados a manera de columna, en donde los filamentos son libres o más o menos coherentes y las anteras se hallan soldadas formando una estructura cilíndrica o angostamente piramidal, tienen tallo muy largo y delgado, a diferencia de las femeninas, éstas por su parte, presentan un ovario ínfero con numerosos óvulos en posición horizontal, los estilos están fusionados casi en toda su longitud o sólo son cortamente libres en el ápice; los estigmas son grandes, carnosos y más o menos hendidos o lobulados y se observan ligeras modificaciones en cuanto a la estructura del perianto respecto de las estaminadas, principalmente correspondientes a diferencias de tamaño de alguna o algunas de sus partes (el receptáculo es siempre mucho más reducido). Los tallos son angulares, cinco bordes o filos, cubiertos de vellos; las hojas se sostienen por medio de pecíolos largos y huecos. Los frutos son de tipo pepo en una gran diversidad de formas, tamaños, colores, tipos de superficies, etc. (Lira, 1995; Villanueva, 2007).

2.3 Clasificación taxonómica

DOMINIO: Eucariota

REINO: Plantae

DIVISION: Spermatophyta

SUBDIVISION: Angiospermae

CLASE: Dicotyledoneae

SUBCLASE: Metachlamideae

ORDEN: Cucurbitales

FAMILIA: Cucurbitaceae

GÉNERO: *Cucúrbita*

ESPECIES: *Cucubita pepo*

C. argyrosperma

C. ficifolia

C. moschata

C. máxima

(León, 1987).

2.4 Descripción por especie de *Cucurbita*

2.4.1 *Cucurbita pepo*

Cucúrbita pepo es una de las especies cultivadas del género que ha sido mejor estudiada en los últimos años (Lira, 1995).

La Calabacita es una hortaliza de clima cálido que no tolera heladas, la temperatura para la germinación debe ser mayor de 15° C, siendo el rango óptimo de 22 a 25° C; la temperatura para su desarrollo tiene un rango de 18 a 35° C, con temperaturas frescas y días cortos hay mayor formación de flores femeninas. Prospera en cualquier tipo de suelo, prefiriendo los profundos y ricos en materia orgánica. Catalogada como una hortaliza moderadamente tolerante a la acidez, siendo su pH 6.8 a 5.5; en lo que se refiere a la salinidad, se reporta como medianamente tolerante (Valadez, 1990).

2.4.1.1 Caracteres distintivos

La especie *C. pepo* presenta hojas de entrenudos superiores con lóbulos profundos o casi palmeadas con el lóbulo terminal pinado. Lamina foliar con tendencia a formar un cono. Pecíolos y venas de las láminas foliares visto por el envés (indumento) con bases persistentes de los tricomas. Pedúnculo del fruto robusto y rígido con tricomas fuertes (casi espinas) y costillas agudas, levemente más grueso en la parte basal y el punto de unión con el fruto. El tamaño del fruto es muy variable, en algunas formas o cultivares ornamentales es de menos de 10 cm de largo (Lira, 1995; Villanueva, 2007).

2.4.2 *Cucurbita argyrosperma*

Cucurbita argyrosperma conocida también como *C. mixta*. Su distribución nativa es desde el suroeste de los Estados Unidos hasta Centroamérica, lo que sugiere a partir del centro-sur de México se diversificó, confinado su cultivo en esta área, aunque recientemente se cultiva en China y Sudamérica (Lira, 1995). Comprende cuatro variedades: *argyrosperma*, *callicarpa*, *sternosperma* y *palmeri*. Las tres primeras incluyen todos los tipos cultivados, mientras que la última variedad corresponde a poblaciones poco comunes del noroeste del país que son generalmente conocidas como *Cucurbita Palmieri* (Estrada, 2000).

Son plantas anuales, herbáceas, rastreras a trepadoras no muy vigorosas. Raíces fibrosas. Tallos anguloso-surcados, pubescentes. Zarcillos 2-4 ramificados, bien desarrollados, pubescentes. Hojas pecioladas, pecíolos hasta 35.0 cm largo, cortamente pubescentes a pilosos; láminas 20.0-30.0 cm largo, 25.0-40.0 cm ancho, anchamente ovado-cordadas, de consistencia herbácea, ligera a profundamente lobadas, lóbulos triangulares, obtusos, apiculados, la base cordada, ambas superficies aterciopeladas, cortamente pubescentes a pilosas, la superficie adaxial comúnmente más escabrosa, con manchas blancas o plateadas a lo largo de las venas, márgenes denticulados a incisos (Lira, 1995, Villanueva, 2007).

2.4.2.1 Caracteres distintivos

Esta especie presenta pelos suaves y cortos en pecíolos y venas primarias en el envés de las hojas. Pedúnculo rígido y anguloso poco o nada engrosado hacia su parte basal y en la inserción con el fruto, semillas grandes de testa blanca con borde engrosado de color gris-azul (*C. argyrosperma* var. *argyrosperma*); o pedúnculo muy engrosado, suave cilíndrico a globoso y sin costillas, y semillas angostas-largas o anchas-largas, con pequeñas hendiduras (cicatrices) irregulares en tamaño y orientación, algunas veces muy profundas (*C. argyrosperma* var. *sternosperma*) (Villanueva, 2007).

2.4.3 *Cucurbita ficifolia*

El área de distribución de esta especie abarca las zonas medias o altas de prácticamente todas las cordilleras o cadenas montañosas de Latinoamérica, desde el norte de México hasta Argentina y Chile, sin embargo, como en el caso de su origen, el centro de domesticación y diversificación, aún representa un enigma a resolver, sin embargo, los restos arqueológicos encontrados en Perú, pudiesen inclinar la balanza hacia esta zona (Lira y Montes-Hernández, 1992; Lira, 1995; Villanueva, 2007).

Las diferentes partes de las plantas de *C. ficifolia* se destinan, en toda el área de distribución en América, a diversos usos alimenticios. Los frutos inmaduros se consumen hervidos como verdura, mientras que la pulpa de los maduros se destina a la elaboración de dulces y bebidas refrescantes o ligeramente alcohólicas; en el Perú, dado que la cáscara es dura, la usan como recipiente para guardar agua. Las semillas son también muy apreciadas, en el estado de Chiapas, México, se usan para preparar dulces con miel, conocidos como palanquetas. En algunas regiones de México y Colombia (y tal vez en otros países del continente), los tallos jóvenes (o puntas de las guías) y las flores también se consumen como verdura cocida y en sopas; El valor nutritivo más importante se encuentra en las semillas, cuyo consumo representa un aporte considerable de proteínas y aceites. La pulpa de los frutos, por su color blanco, presenta deficiencias en betacarotenos, además de una moderada cantidad de

carbohidratos y bajo contenido en vitaminas y minerales (Lira y Montes-Hernández, 1992; Lira, 1995).

Plantas rastreras a trepadoras, anuales, aunque persistentes por un cierto período de tiempo, dando la impresión de ser perennes. Raíces primarias y adventicias fibrosas. Tallos vigorosos ligeramente anguloso-surcados, ligeramente pubescentes, hirsutos o hispídos, armados con aguijones cortos, punzantes, escasos y pelos glandulares que pueden manchar de negro los dedos. Zarcillos 3-4 ramificados, robustos, pedunculados. Hojas pecioladas, pecíolos 5.0-38.0 cm de largo, pubescencia similar a la del tallo; láminas 20.0-25.0 cm de largo, igualmente anchas o más anchas, ovado-cordadas a suborbiculares, 3-5 lobuladas, lóbulos redondeados u obtusos, apiculados, lóbulo central mayor que los laterales, verde claras a verde oscuras, superficie adaxial con o sin manchas blancas o plateadas en la intersección de las nervaduras, superficie abaxial con pubescencia similar a la del tallo, márgenes denticulados (Lira, 1995; Villanueva, 2007).

2.4.3.1 Caracteres distintivos

La presencia de pubescencia (tricomas glandulares) en el envés de las hojas. Frutos maduros siempre lisos de cáscara gruesa y dura, de pulpa fibrosa y blanca; semillas planas, cortas, generalmente negras, aunque las hay pardas blanco-crema. Su hábitat relativamente restringido a zonas medias a altas 1.0 a 3.0 de altitud, esta entre las características mas importantes que distinguen a *C. ficifolia* del resto de las especies cultivadas del género *Cucurbita* (Villanueva, 2007).

2.4.4 *Cucurbita moschata*

Esta especie originaria de América Latina se difundió como cultivo tanto dentro como fuera del continente americano. Se cultiva principalmente en zonas de baja altitud, raramente mayores a 1.8 de altitud, aunque no parece ser tan estricta a dichos límites, debido a que recientemente se han corroborado colectas de

variantes que se cultivan a más de 2.2 de altitud dentro de la región de la Mixteca Alta en Oaxaca, México (Lira y Montes-Hernández, 1992; Lira, 1995).

Plantas herbáceas, comúnmente rastreras a trepadoras o algunas veces con habito subarborescente, anuales. Partes vegetativas y flores suaves y densamente pubescentes a vellosas, con tricomas cortos y largos uniseriados, septados y no septados, algunas veces estrigosos; ápices vegetativos más o menos reflexos. Raíces fibrosas. Tallos rígidos, ligeramente angulosos apareciendo surcados al secar. Zarcillos 3-5 ramificados. Hojas pecioladas, pecíolos de 30.0 o más cm largo; láminas 20.0-25.0 cm o más de largo, 25.0-30.0 cm o más de ancho, anchamente ovado-cordadas a suborbiculares, ligeramente 3-5 lobadas, lóbulos ovados o triangulares, ápice obtuso, cortamente apiculado o mucronado, superficie adaxial frecuentemente con manchas blancas en la intersección de las venas, márgenes serrado-denticulados (Lira y Montes-Hernández, 1992; Lira, 1995; Villanueva, 2007).

2.4.3.1 Caracteres distintivos

Esta especie presenta pecíolos y venas primarias de las hojas (vistas por el envés) vellosos (con pelos largos). Sépalos frecuentemente foliáceos aunque a veces los presenta lineares-lanceolados. Pedúnculo algo delgado, rígido, anguloso y notablemente ensanchado en el punto de unión con el fruto. Las costillas del pedúnculo con poca tendencia a engrasarse hacia la base (Villanueva, 2007).

2.5 Principales enfermedades en cucurbitáceas

El cultivo de la calabaza presenta una serie de enfermedades de importancia económica que reducen el rendimiento considerablemente y demeritan la calidad de los frutos. Entre las principales enfermedades fungosas se encuentra al tizón de las cucurbitáceas (*Alternaria cucumerina*), mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*), cenicilla (*Erysiphe cichoracearum* y oidiopsis (*Leveillula taurica*)), antracnosis (*Colletotrichum lagenarium*), pudrición radicular y marchitez (*P. infestans*), ahogamiento y pudrición de la raíz (*Pythium* spp), marchitez (*F.*

oxysporum) y pudrición de raíz y cuello (*R. solani*) (Aragón, 2005). Otras enfermedades que afectan a las cucurbitáceas son la cladosporiosis (*C. cucumerinum*), podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), chancros gomósicos sobre tallos, podredumbres negras de los frutos (*Didymella bryoniae*), manchas foliares diversas (*Corynespora cassicola*), podredumbre negra de las raíces (*Phomopsis sclerotioides*), enfermedad de las raíces suberosas (*Pyrenochaeta lycopersici*), chancros azules sobre tallos y podredumbres estilares de los frutos (*Penicillium oxalicum*), chancros sobre tallos y podredumbre blanca sobre los frutos (*Sclerotinia sclerotiorum*), verticilosis (*Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*), entre muchos patógenos fungos más, que llegan a atacar a las cucurbitáceas (Blancard *et al.*, 1991).

Los agentes bacterianos que provocan daños al cultivo son las especies *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, responsable de la mancha angular; *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, responsable de la pudrición bacteriana de los frutos de calabaza; *Erwinia tracheiphila*, responsable del marchitamiento bacteriano, otras bacterias que atacan a las cucurbitáceas son *Erwinia ananas*, *Erwinia aroidaeae*, *Erwinia carnegiana*, *Pectobacterium carotovora* var. *carotovora* y *Agrobacterium rhizogenes* (Blancard *et al.*, 1991).

Entre los virus que más afectan a las calabazas se encuentra el virus mosaico de la calabaza SqMV (Squash Mosaic Virus), virus del mosaico del pepino CMV (Cucumber Mosaic Virus) y al virus del mosaico de la sandía WMV (Watermelon mosaic virus) (Garzon, 1978); virus mosaico moteado verde del pepino CGMMV (Cucumber Green Mottle Mosaic Virus), virus de las manchas necróticas del melón MNSV (Melon necrotic spot virus), virus de las manchas anulares de la papaya PRSV (Papaya ringspot virus), virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones CABYV (Cucurbit aphid-borne yellows virus), virus del mosaico amarillo del calabacín ZYMV (Zucchini Yellow Mosaic Virus), virus del falso amarilleo de la remolacha BPYV (Beet pseudo-yellows virus), virus del amarilleo de las venas del pepino CVYV (Cucumber vein yellowing virus), virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas CYSDV (Cucurbit yellow stunting disorder virus), virus del amarilleo del melón MYV (Muskmelon Yellows Virus), entre otros (Blancard *et al.*, 1991).

Entre las medidas de prevención o control de enfermedades tanto de origen fungosas como bacterianas, así como las virales, en forma general se deben destruir residuos de cosecha, hacer uso de variedades tolerantes o resistentes, evitar plantaciones densas, es decir que haya aireación, eliminar plantas hospedantes y controlar a los vectores transmisores de las enfermedades en forma racional (Gómez, 2005).

2.6 Principales enfermedades de la raíz en cucurbitáceas

2.6.1 Marchitez por *Fusarium oxysporum* Schlechtend

El hongo *Fusarium oxysporum* es cosmopolita y en las plantas ocasiona pudriciones y marchitamientos al bloquear los tejidos vasculares e impidiendo el movimiento de agua por las raíces de más de 100 especies de plantas de importancia económica. Este patógeno puede ocasionar pérdidas que fluctúan entre un 75-90% de plantas establecidas en campo. Específicamente en cucurbitáceas, todas las especies cultivadas de ésta familia son fácilmente atacadas por las siguientes formas especiales del género *Fusarium*: melón (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*), sandía (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*), pepino (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* y f. sp. *radicis-cucumerinum*), calabaza (*F. oxysporum* f. sp. *niveum* y *cucurbitae*) (Caperton, 1986).

2.6.1.1 Importancia y distribución

La especie y formas especiales de *F. oxysporum* son predominantemente saprofitas (vive y se alimenta de materia en descomposición), muy abundantes y activas en el suelo y sobre la materia orgánica, aunque algunas cepas tienen una actividad patogénica específica, constituyendo solo una proporción muy pequeña de la población total del suelo; sin embargo son la causa de enfermedades muy importantes a los cultivos. Algunas están poco especializadas y causan muerte de plántulas, necrosis o podredumbres, sin embargo las formas responsables de la marchitez vascular son las más importantes (Smith *et al.*, 1992).

La enfermedad afecta y ocasionan pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas. Los marchitamientos causados por *Fusarium* se ven favorecidos ampliamente por las condiciones ambientales y del suelo de los invernaderos (Agrios, 1996).

F. oxysporum fue descrita por vez primera por G. E. Basse en Inglaterra en 1985. Es una enfermedad de importancia mundial, habiendo sido descrita al menos en 32 países. La enfermedad es destructiva en campo en localidades meridionales de Estados Unidos y Europa, pero las zonas más al norte la enfermedad se desarrolla sólo en los cultivos de invernadero. La enfermedad es más destructiva en climas cálidos y en suelos cálidos y arenosos de las regiones templadas (Smith *et al.*, 1992).

La marchitez por *Fusarium* es la enfermedad más ampliamente distribuida y perjudicial a la agricultura. A nivel internacional *F. oxysporum* es reportada en Japón, EUA, Canadá, Italia, Israel y Francia. Para México, se encuentra en los estados de Sinaloa, San Luís Potosí, Baja California y Michoacán (Mendoza, 1999).

2.6.1.2 Sintomatología y daños

La marchitez del follaje es el síntoma característico y se presenta en cualquier estado de crecimiento de la planta. Los haces vasculares se tornan amarillentos o pardos (Mendoza, 1999). Cuando las plantas son infectadas en la etapa de la plántula, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas. Las plantas adultas en el campo pueden marchitarse y morir repentinamente en caso de que la infección sea severa y el clima sea favorable para el patógeno. Sin embargo, es más frecuente que en las plantas adultas ocurra epinastia foliar y un previo aclaramiento de las nervaduras de sus hojas antes de que se produzca achaparramiento, amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de las hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de las hojas persistentes y, finalmente, su muerte (Agrios, 1996).

Cuando el hongo se presenta en semillas en germinación pueden podrirse en el suelo; en plántulas, los cotiledones y hojas pequeñas pierden su color verde, se marchitan y caen (Mendoza, 1999). Es común un ataque al tejido vascular, pero sin embargo no ocasiona pérdidas considerables al menos que la temperatura del suelo y aire aumenten durante gran parte de la estación (Agrios, 1996).

La caída de hojas inferiores es un síntoma característico, en los tejidos internos de la raíz y el tallo se observa una coloración parda oscura correspondiendo las lesiones externas que gradualmente estrangulan al tallo. Otros síntomas se presentan con un doblado de las hojas inferiores debido a una pudrición húmeda de la raíz, la cual termina con un desprendimiento de la epidermis y una excreción de goma (Mendoza, 1999). También se presenta clorosis intervenal y muerte en plántulas (Smith *et al.*, 1992).

Los síntomas de *Fusarium* en la calabaza varían, dependiendo de los factores ambientales, la edad de la planta infectada así como la virulencia y densidad de la población del patógeno; cuando ésta es muy elevada, puede aparecer damping off en las plántulas jóvenes. En ciertos cultivos puede aparecer también una podredumbre de las semillas. En plantas más maduras, el avance normal de los síntomas es de apariencia verde grisácea de las hojas seguida de amarillamiento del follaje, comenzando generalmente con las hojas viejas próximas a la corona y avanzando hacia afuera. Las hojas pierden rápidamente turgencia y se marchitan. El marchitamiento aparece más rápidamente cuando la planta sufre estrés de sequía o lleva fruto (Mendoza, 1999).

2.6.1.3 Agente causal

Presenta hifas septadas, de paredes delgadas hialinas. Los conidióforos (Figura 1) son variables en longitud, con abundantes microconidios pequeños, elípticos y hialinos, producidos en conidióforos pequeños. Los macroconidios finos de 3.8-43.2 x 2.8-4.3 μm , fusiformes con 3-7 septas, curvados, agudos en ambos extremos de paredes delgadas, liso, hialino producidos en conidióforos formando ramas alargadas de paredes delgadas, hialinas, dentro de un esporodioquio (Evans, 1990; Romero, 1988).

En medio de cultivo PDA crece rápido: 50 mm en una semana. Al principio la colonia es lisa y algodonosa. Con el tiempo, la colonia o masa de esporas puede presentar varias tonalidades de color con aspecto de fieltro, de color blanco o salmón pálido, tiñéndose de púrpura en su zona central. El reverso es púrpura o azul oscuro. Produce un pigmento púrpura-violeta que difunde al medio; siendo su micelio estriado, suave algodonoso y a veces rugoso; algunas cepas tienen un característico olor a lilas (Romero, 1998). El esporodoquio, presente en algunas cepas, da una coloración crema anaranjada al cultivo *in vitro* (Evans, 1990).

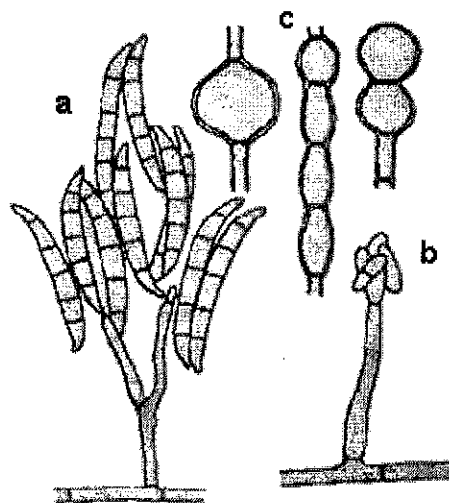


Figura 1. Estructuras morfológicas de *Fusarium oxysporum*.
a. Macroconidios, b. microconidios, c. clamidosporas.

2.6.1.4 Ciclo biológico y epidemiología

El ciclo de la enfermedad (Figura 2), empieza con la presencia de macroconidios, microconidios y/o clamidosporas en el suelo infestado, estos germinan y penetran por heridas que se forman al emerger las raíces laterales o penetran directamente en el tejido joven en la zona de elongación e incluso puede entrar a la planta por aberturas naturales, heridas de laboreo, atacando el xilema; el micelio avanza intercelularmente desarrollándose hasta llegar a invadir las células adyacentes de la región del xilema. El micelio se ramifica y produce microconidios, las cuales son arrastradas hacia arriba por corrientes de savia, vuelven a germinar y producen más micelio y microconidios (Mendoza y Pinto, 1985).

El patógeno excreta enzimas pectolíticas que destruyen la lámina del parénquima del xilema y las células parenquimatosas se mueren y se tornan de color café, lo cual se observa como un anillo en un corte transversal. Estas toxinas y la obstrucción mecánica de los tejidos son los responsables de la marchitez y muerte de la planta. La formación de conidios se efectúa en las hojas de las plantas muertas y en el suelo (Mendoza y Pinto, 1985).

El inicio de la enfermedad se favorece por elevada humedad y alta temperatura del suelo, mismas que son necesarias para la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio. El daño es más intenso cuando se presentan temperaturas de 21 a 33° C; con menos de 21° C o superiores a 33° C, el hongo se desarrolla más lentamente. Las plantas mueren dos a cuatro semanas después de la infección (Mendoza, 1999).

La propagación se hace a cortas distancias, por lo que la diseminación del patógeno se ve favorecida por el agua de riego, salpique de agua de lluvia, plántulas y plantas infectadas y por labores culturales o el contacto de instrumentos de trabajo con la parte infectada. El hongo sobrevive en la semilla o entre los cultivos, en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hacen con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, sobre todo en las regiones templadas frías (Romero, 1993).

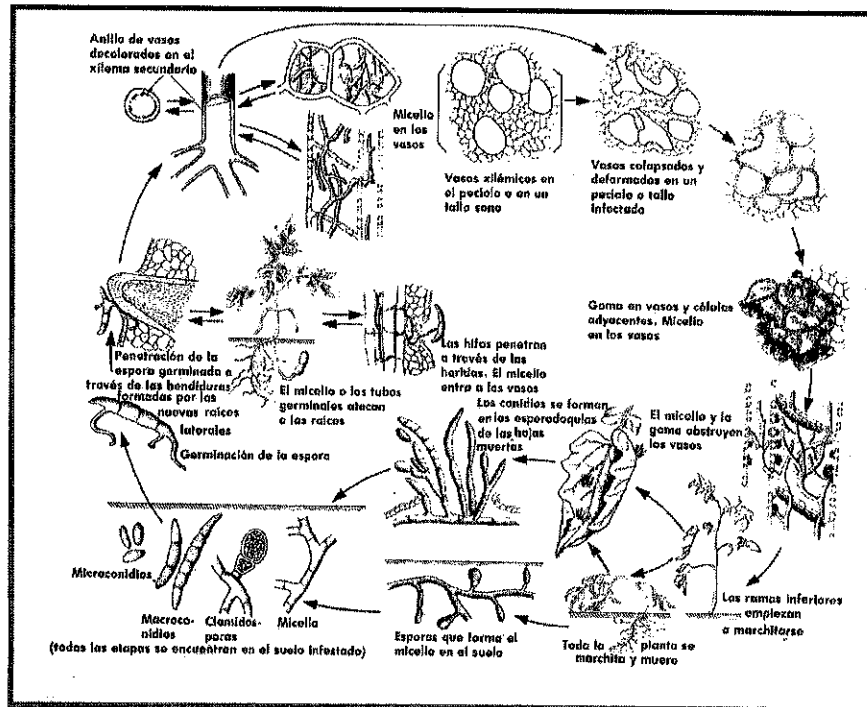


Figura 2. Esquema del ciclo biológico de *Fusarium oxysporum*.

En cultivares susceptibles, el hongo se hace sistémico produciendo microconidios, que son translocadas a los elementos vasculares. En cultivares resistentes, la colonización está limitada al córtex o a sólo unos pocos vasos (Evans, 1990).

2.6.2 Ahogamiento y pudrición de la raíz por *Pythium aphanidermatum* E.

El patógeno *Pythium aphanidermatum* causa el ahogamiento de las plantas, con una amplia gama de hospedantes; es un hongo cosmopolita, se encuentra distribuido en todo el mundo. Se trata de una especie muy agresiva, afecta desde semillas hasta plantas adultas de la mayoría de las hortalizas, cereales y muchos árboles frutales. El daño más severo lo produce a las semillas y las raíces de las plántulas durante la germinación. Es de los patógenos de mayor interés para la economía en la mayoría de plantas anuales, entre ellas las cucurbitáceas, ya que es un patógeno habitante del suelo crece y sobrevive muy bien en condiciones de alta humedad y temperaturas cálidas por lo que puede llegar a ser un problema en la mayoría de los cultivos bajo invernadero (Romero, 1993).

2.6.2.1 Importancia y distribución

Pythium sp es el hongo causante del damping off, ahogamiento, secadera o muerte rápida de plantas en sus diferentes especies, también en esta enfermedad se encuentran asociados hongos como *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Phytophthora*, atacando a las plantas en semilleros o almácigos, en los cultivos de algodón, cereales, leguminosas, cafeto, hortalizas, principalmente solanáceas afectando la germinación de las semillas y causando la muerte de las plantas (Anaya y Romero, 1999).

Aparece en valles y suelos forestales, en climas tropicales y templados y en invernaderos. Esta enfermedad afecta semillas, plántulas y plantas adultas. Las pérdidas debidas a esta enfermedad varían considerablemente de acuerdo con la temperatura, humedad del suelo y otros factores, sin embargo con mucha frecuencia las plántulas de los almácigos son completamente destruidas o bien mueren poco después del transplante (Agrios, 2007).

Este patógeno se distribuyen por todo el mundo tanto en zonas templadas como en zonas cálidas y se pueden encontrar en todos los continentes, sin embargo, la especie *P. aphanidermatum* se distribuyen ocasionando daños principalmente en condiciones de alta humedad y temperatura, áreas tropicales y ecuatoriales (Agrios, 2007; Smith *et al.*, 1992).

2.6.2.2 Sintomatología y daños

Se consideran tres tipos de síntomas: fallas en la germinación por la pudrición de las semillas. Las plantas recién emergidas del suelo, se marchitan rápidamente por la pudrición de tejidos en el cuello de la raíz y presentan un estrangulamiento en esa zona, acompañado de una coloración oscura más arriba del cuello. Y pudrición blanda de tejidos, esto es más común en frutos suculentos, sobre todo aquellos que están en contacto con el suelo. Estos síntomas varían con la edad o etapa de desarrollo de la planta (Agrios, 2007; Anaya y Romero, 1999).

El principal efecto de la enfermedad ocasionada por *Pythium* es la caída de plántulas debido a ataques súbitos y de desarrollo rápido a plántulas jóvenes en campo o en invernadero, especialmente en condiciones de alta humedad. Si el ataque se produce a semilla o plántula antes de la emergencia, se percibe por un fallo total de emergencia o por una proporción enorme, si el ataque tiene lugar posterior a la emergencia, las plántulas recién emergidas se colapsan a consecuencia de los ataques a nivel de cuello (Smith *et al.*, 1992).

Los síntomas en cucurbitáceas se presentan en pre-emergencia provocaron infecciones que ocasionan lesiones acuosas y ligeramente oscuras que invaden todos los tejidos. La infección post-emergencia, se desarrolla a nivel de cuello causando lesiones acuosas y decoloradas que al dañar circularmente la base del tallo, la plántula se dobla, cae al suelo y muere rápidamente (Agrios, 1996).

2.6.2.3 Agente causal

El género *Pythium* contiene alrededor de 125 especies, la mayoría de las cuales no son selectivas a los hospedantes que afectan. Se trata de un Oomiceto íntimamente relacionado con *Phytophthora* y se distingue de este por la naturaleza en la maduración de las zoosporas y por la morfología de los esporangios, hifas y órganos sexuales (Figura 3). Los esporangios no son deciduos y pueden germinar o producir zoosporas, la diferenciación de éstas ocurre en una vesícula a través de un tubo de descarga. Dependiendo de la especie, los esporangios de *Pythium* pueden ser filamentosos, globosos, inflados o de varios tipos. Produce zoosporas móviles, biflageladas que sirven como propágulos de diseminación. Presenta micelio cenocítico, usualmente de 5-7µm de ancho y es uniforme en diámetro. La mayoría de las especies son homotáticas (una sola colonia produce anteridios y oogonios). Los oogonios son principalmente esféricos y lisos pero hay algunas especies ornamentadas con espinas o proyecciones sin punta (Romero, 1993).

En el caso específico de *P. aphanidermatum* la característica distintiva es la presencia de 1-2 anteridios por oogonio claviformes y oosporas apleróticas (Tlapal, 2004).

El crecimiento de este hongo en forma artificial para su estudio es en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), pero la abundancia de esporangios producidos por *P. aphanidermatum* es mucho mayor en jugo de tomate-agar a 32° C que en PDA (Romero, 1993).

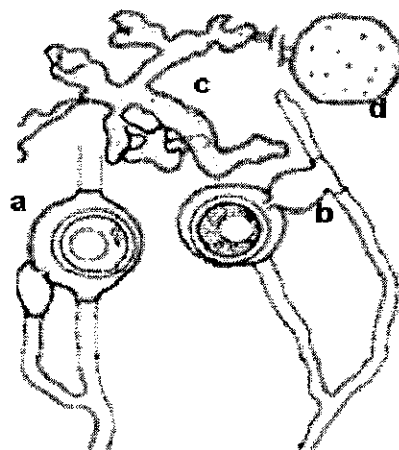


Figura 3. Estructuras morfológicas de *P. aphanidermatum*. a. oospora aplerótica, b. Anteridio claviforme, c. micelio cenocítico, y d. estructura de resistencia (clamidosporas).

2.6.2.4 Ciclo de vida y epidemiología

Las especies de *Pythium* sobreviven en el suelo principalmente como oosporas en sustratos en podredumbre, donde puede permanecer por muchos años. La germinación de las zoosporas se estimula en condiciones de alta humedad de suelo, por sustancias orgánicas sencillas; la fuente de estas sustancias pueden ser las raíces, las semillas en germinación o la materia orgánica añadida al suelo. Las oosporas germinan formando esporangios, que pueden liberar zoosporas. Para la dispersión de zoosporas se necesita agua, por lo tanto los suelos inundados representan un riesgo especial además los sistemas de riego en campo o invernadero pueden extender el ataque del hongo con facilidad (Figura 4). Con temperaturas de 25° C el ataque se presenta durante toda la temporada (Smith *et al.*, 1992).

Cuando el daño inicia en semilla, el hongo penetra directamente los tejidos a través de las cubiertas hinchadas y humedecidas, o bien a través de hendiduras,

e incluso puede penetrar el embrión o los tejidos de las plántulas emergentes mediante la presión mecánica y degradación enzimática. Las invasiones posteriores y la degradación de los tejidos es el resultado del crecimiento del hongo entre las células y a través de ellas (Agrios, 2007).

La infección de las raíces y los tallos de las plántulas tiernas por lo común se produce a nivel de la superficie del suelo o ligeramente por debajo. El micelio penetra directamente los tejidos del tallo y degrada sus paredes celulares, produciendo la desintegración de los tejidos, así las plantas que son invadidas mueren con gran rapidez. En plantas adultas con tejidos lignificados el daño se reduce a lesiones leves y generalmente son capaces de resistir a la invasión (Agrios, 2007).

Durante el desarrollo de la infección, solo el micelio del hongo se desarrolla en los tejidos infectados de la planta, sin embargo conforme avanza la infección, el hongo comienza a producir esporangios y más tarde oosporas. Estas estructuras se pueden producir dentro o fuera del tejido del hospedante (Agrios, 2007).

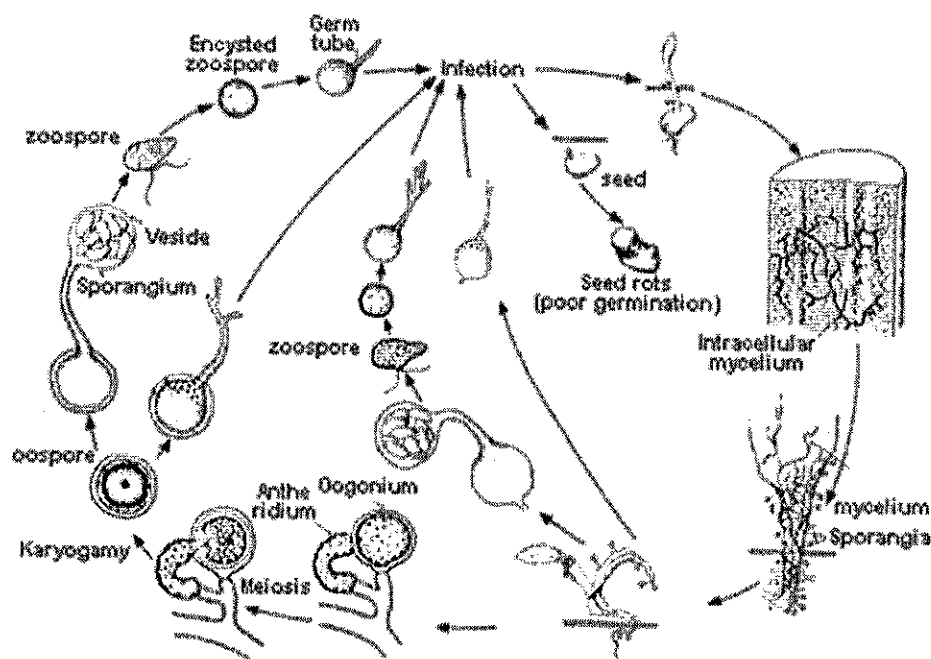


Figura 4. Esquema del ciclo biológico de *Pythium* sp.

2.6.3 Pudrición radicular y marchitez por *Phytophthora capsici* Leonian

En México, *Phytophthora capsici* puede causar pérdidas de 40-80% en los cultivos de chile, tomate y cucurbitáceas (Mendoza, 1996). Los síntomas que presenta esta enfermedad en las cucurbitáceas son principalmente pudrición de raíz, los frutos también presentan una pudrición, la cual se inicia con pequeñas decoloraciones circulares de color café, que incrementan su tamaño y cambia su coloración a un color verde oliváceo y de consistencia acuosa, esta pudrición también se presenta con lesiones acuosas de márgenes irregulares, en estados avanzados se aprecia micelio de color blanco. En el follaje se observa marchitamiento de las guías, debido al daño sufrido en la base del tallo, el cuál toma una consistencia corchosa (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.6.3.1 Importancia y distribución

La marchitez en hortalizas causada por *P. capsici* es una enfermedad muy extendida y devastadora. El patógeno, tiene un rango muy amplio de cultivos hospedantes y puede infectar al chile (de ahí su nombre), jitomate, calabaza, melón y pepino (Romero, 1988).

El género *Phytophthora* fue descrito por primera vez por Antón de Bary en 1876. Sin embargo, la especie fue reportada en Nuevo México, Estados Unidos, en 1922 por Leon H. Leonian (Edwin y Ribeiro, 1996).

En México, fue reportada su presencia por vez primera en 1944 por el servicio de cuarentenas de los Estados Unidos, al detectar el patógeno en chiles procedentes de México. Se confirmó la presencia de ésta enfermedad ("Marchitez del chile") y el agente causal (*P. capsici*) en 1960. En años subsiguientes *P. capsici* fue encontrada en varias especies de calabaza y calabacita (Romero, 1993).

Se han descubierto 4 especies de *Phytophthora* capaces de atacar el cuello de pepinos, melones y calabacitas, de las cuales la más importante es *P. capsici*. Las pérdidas debidas a la pudrición de raíces son esporádicas, pero la enfermedad puede causar la destrucción completa de cultivos de cucurbitáceas en

condiciones ambientales favorables, parece que muchas especies de cucurbitáceas son susceptibles, el pepino y el melón son relativamente tolerantes y no se ha observado en sandía (Zitter, 1998).

El patógeno tiene una distribución mundial. Los ataques más severos de *P. capsici* se han reportado en Carolina del Norte, Florida, Georgia, Michigan, Nuevo México y Nueva Jersey, pero puede presentarse en casi todos los lugares de producción de hortalizas de fruto, principalmente (Romero, 1993).

En México se encuentra atacando a zonas productoras de chile en el Bajío, Aguascalientes y San Luís Potosí. También afecta a las cucurbitáceas (calabaza, pepino, sandía), en tomate de cáscara ocasiona daños de hasta un 50% en Nayarit y Jalisco (Mendoza y Pinto, 1985). Otros estados que también se encuentran afectados por el patógeno ocasionando pérdidas considerables, se encuentra a Morelos, Puebla, Veracruz, Zacatecas, Durango, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo, Colima y Sinaloa principalmente (Romero, 1993).

2.6.3.2 Sintomatología y daños

El hongo *P. capsici* no tiene preferencia por algún tejido, por lo que es capaz de infectar cualquier parte de la planta, sin importar la edad de la misma. En almácigos, la enfermedad se presenta en manchones y se extiende rápidamente; el síntoma que se observa es el damping off o secadera de las plántulas de almácigo. La infección primaria se inicia a nivel del suelo, los tallos atacados presentan una mancha de color castaño rojizo que ciñe o bien avanza hacia arriba y llega a cubrir todo el contorno de tallo; la parte invadida pierde turgencia, cae o queda erguida (Ristiano *et al.*, 1994).

El daño se presenta en preemergencia y postemergencia; en el primer caso la semilla solo alcanza a germinar y la radícula se muestra de color café con muerte rápida, en el segundo la planta presenta flacidez progresiva hasta marchitarse por completo, apreciándose así en el cuello un estrangulamiento café-oscuro que luego ocasiona la muerte (Mendoza, 1996).

En plantas adultas, los síntomas iniciales son un repentino marchitamiento permanente en las plantas infectadas sin un cambio de color. Con frecuencia, las plantas mueren a los pocos días de los primeros síntomas, o después de que el suelo se saturado por excesivas precipitaciones o riego. Las plantas enfermas son fácilmente arrancadas del suelo, pues todas las raíces laterales pueden deshacerse. Los frutos en contacto con el suelo son también atacados en cualquier fase de madurez, y la infección de los frutos puede provocar pérdidas en el transporte y almacenamiento (Zitter, 1998).

El estrangulamiento también se puede presentar después de la floración; los frutos dañados colorean rápidamente y se arrugan, sin que la planta cambie de coloración. En el cuello los tejidos dañados son de consistencia dura y no descascaran con facilidad, observándose tizones en ramas (Mendoza, 1990).

La infección en las raíces provoca una marchitez generalizada de la planta. El hongo puede infectar también a las hojas, causando lesiones circulares de color verde amarillento, luego cambia café grisáceo con aspecto acuoso. Las lesiones sobre las hojas y tallo se dan principalmente cuando el inóculo es dispersado por salpique desde el suelo hacia las partes bajas de la planta; en ramas, es una pudrición café oscuro. El hongo puede infectar también frutos, provocando lesiones verde claro y suaves, que posteriormente se cubre de un moho blanquecino, lo cual es un signo de este hongo, aunque la apariencia en general puede confundirse con el ataque de *R. solani*; pero ésta causa una pudrición no compacta en el cuello y se desprende la epidermis, mientras que en *P. capsici* la pudrición es dura y no se descascara. Se pueden llegar a tener pérdidas totales del cultivo cuando los campos están muy infestados (Mendoza, 1990).

Cabe mencionar que cuando las plantas son afectadas en la zona de la raíz o a la altura del cuello, la marchitez termina por ser total; en cambio si el hongo se localiza en la parte alta del tallo o en ramas, la marchitez y muerte se limita a la parte de la planta que se encuentra sobre la lesión (Mendoza, 1999).

2.6.3.3 Agente causal

Las especies de *Phytophthora* están más estrechamente relacionadas a las algas no fotosintéticas que a los hongos verdaderos y han sido colocados en el reino Chromista y en el phylum Oomycota. Las especies de *Phytophthora* son considerados como mohos acuáticos, por lo que el agua juega un papel muy importante en el ciclo de esta enfermedad (Romero, 1988).

El organismo causal de la podredumbre de raíces es *Phytophthora capsici*, pero la enfermedad también puede ser causada por otras especies de *Phytophthora* spp. Presenta micelio cenocítico, liso o con hinchamientos; colonias de apariencia finamente radiada (Romero, 1998).

Hongo heterotático, clasificado en el grupo II (Waterhouse), de micelio cenocítico con abundantes ramificaciones lisas e hinchadas y de colonia finamente radiada; esporangióforo simple o ramificado de forma robusta y gruesa, hinchamiento cercano a la base del esporangio, el cual es ovoide y mide de 360 x 25-35 μm y son papilados y caducos, de crecimiento indeterminado y simposio simple, papila conspicua, en ocasiones dividida y frecuentemente con dos: clamidosporas raras o ausentes; oogonio esférico a subesférico, de paredes lisas, anteridios basales anfígenos de 23-21 μm de largo por 12-17 μm de ancho; esporas generalmente apeleróticas esféricas a subesféricas con pared gruesa o lisa, de un diámetro promedio de 31.5 μm . El crecimiento es óptimo a 28° C; la temperatura mínima para el crecimiento es 11° C, y la máxima es superior a 35° C (Romero, 1988; Smith *et al.*, 1992; Zitter, 1998).

2.6.3.4 Ciclo de vida y epidemiología

El hongo es un habitante natural del suelo, puede sobrevivir sobre y dentro de la semilla, otra forma de inóculo primario son las oosporas siendo capaces de sobrevivir en el invierno. Es común que el rápido desarrollo del hongo dependa de la cantidad de inóculo existente, además de un mal drenaje del suelo. Este hongo se puede extender por diversos mecanismos en las plantas (Mendoza, 1999).

Puede reproducirse por formas sexuales y asexuales. Las oosporas (esporas sexuales), pueden ser diseminadas por el viento y servir de fuente de inóculo. El hongo produce dos tipos de cepas, A1 y A2. Estos tipos son compatibles y no corresponden a las formas dimórficas. Cada uno de estos dos tipos produce hormonas que son las responsables de la diferenciación gametangial. Ambos tipos de cepas son comunes en un mismo campo, y han sido identificados incluso en una misma planta. Produce anteridios y oogonios; el anteridio es anfígeno en esta especie. La meiosis ocurre por contacto gametangial como resultado de la plasmogamia y cariogamia, formando así las oosporas, éstas pueden germinar directamente por la formación de un tubo germinativo o indirectamente formando esporangios. Se asegura que la reproducción sexual rara vez ocurre en la naturaleza. La reproducción asexual se presenta con la formación de esporangios, los cuales nacen de esporangioforos ramificados. Los esporangios son generalmente ovoides y tienen una papila prominente en su ápice (Agrios, 1996).

La enfermedad se presenta generalmente después del trasplante originando infecciones en el cuello de la planta donde los esporangios pueden ser desprendidos con facilidad del esporangióforo y diseminados a través de los campos de cultivo por el viento, lluvia y por el agua de riego. Los esporangios germinan indirectamente liberando zoosporas las cuales son biflageladas y se mueven libremente sobre la superficie de las hojas a través de la humedad o por los suelos saturados y pueden iniciar la infección a través de heridas y estomas, afectando principalmente la raíz de las plantas. Las zoosporas tienen un geotropismo negativo y químicamente siguen los gradientes de nutrientes que van a la raíz de la planta. Una vez que las zoosporas tienen contacto con la superficie de la planta, se enquistan y germinan, siendo capaces de penetrar directamente a la cutícula intacta en tan solo una hora a través de las aberturas naturales de la planta como los estomas. *P. capsici* segrega un enzima que probablemente juega un papel importante en la abertura de la epidermis de la planta y de la penetración a través del tejido del hospedante susceptible. Finalmente se produce una marchitez por la destrucción del tejido cortical y la inyección de dicha enzima, otros afirman que la marchitez es debida al taponamiento de los vasos conductores (Mendoza, 1990).

El mayor desarrollo del patógeno se logra con un óptimo de temperatura de 26 a 32° C esto conjuntamente con una alta humedad en el suelo. La cantidad de inóculo es un factor determinante para el rápido desarrollo del hongo, acompañado del mal drenaje de suelo (Mendoza, 1999).

La podredumbre de las raíces puede aparecer en las plántulas de las cucurbitáceas; en algunas zonas es poco común una alta incidencia de la enfermedad hasta mediados o finales del ciclo de cultivo, lo que generalmente coincide con temperaturas altas. La enfermedad está asociada con alta humedad en el suelo, debido a lluvias, riegos en exceso o suelos con mal drenaje. EL riego frecuentemente aumenta la incidencia de la enfermedad (Zitter, 1998).

El inóculo en el suelo puede moverse hacia partes más altas en la planta a través del viento o por el salpique de agua durante las lluvias o al momento de regar lo cual puede incrementar en gran medida la severidad de la enfermedad en muy poco tiempo. El inóculo se dispersa en el aire desde la esporulación que se produce en las lesiones de las hojas, tallos y frutos (Mendoza, 1996).

Las oosporas son las únicas fuentes de inóculo primario y sobreviven en las semillas o en el suelo más de 2 años en ausencia del hospedante o de una estación a otra en los residuos de cosecha (Figura 5). El micelio es una fuente importante de inóculo secundario. En la semilla el hongo forma micelio y no sobrevive por más de un mes (Ramírez, 1991).

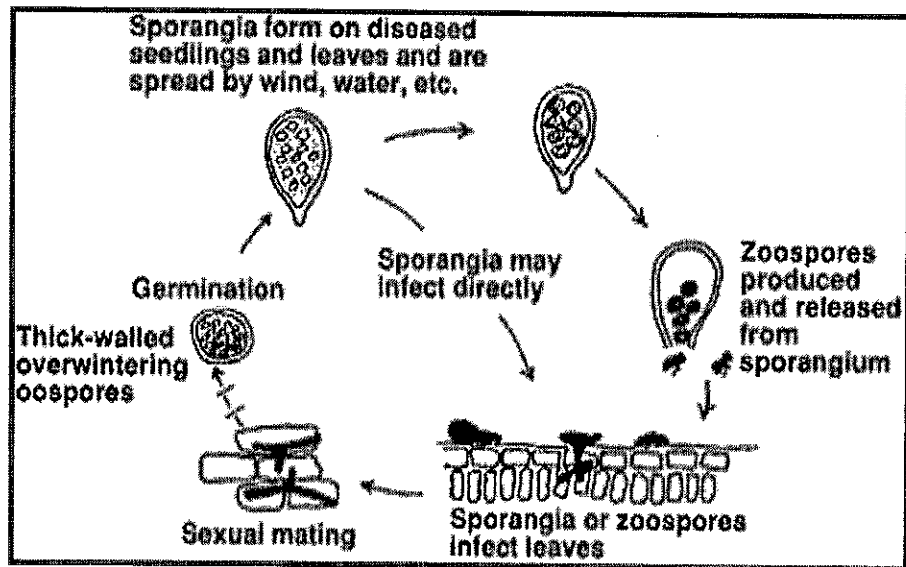


Figura 5. Esquema del ciclo de vida de *Phytophthora capsici*.

2.6.4 Pudrición de la raíz y cuello por *Rhizoctonia solani* Kühn

El síntoma común ocasionado por éste hongo es el ahogamiento acompañado de lesiones necróticas y pudrición de raíces. Las plántulas pueden morir antes de que emerjan del suelo, debido a la destrucción del meristemo apical y si las plántulas llegan a emerger, entonces el ataque es a la base del tallo, donde tiene lugar una pudrición húmeda que provoca que las plántulas caigan y mueran, la lesión siempre es hundida y muestra varios tonos de café canela a café rojizo. En el cuello provoca una pudrición no compacta, por lo que se desprende fácilmente la epidermis; esto último a diferencia de la marchitez causada por *P. capsici* (Mendoza, 1996). En plantas adultas se puede observar canchros del tallo y pudrición de raíces, que provocan un debilitamiento general de la planta, amarillamiento del follaje y algunas veces la muerte de la planta (Romero, 1993).

2.6.4.1 Importancia y distribución

Esta ampliamente distribuida, tiene un amplio intervalo de hospedantes y causa damping off, pudrición de raíces o pudrición de la corona y tizón en hojas y tallo (Blancard *et al.*, 1991).

Esta enfermedad ocurre en todo el mundo y causan pérdidas en la mayoría de las plantas anuales, incluyendo a las malezas, casi todas las hortalizas y plantas florales, varios cultivos mayores y también en plantas perennes, tales como los pastos para césped (Agrios, 2007). En México esta presente en todas las regiones donde se producen cucurbitáceas y provoca daños principalmente a nivel de plántula (Blancard *et al.*, 1991).

La infección por *Rhizoctonia* es una de las enfermedades más antiguas y de mayor dispersión a nivel mundial. Desde que fue reportada por primera vez en 1858 por Kühn, ha sido detectada subsecuentemente en casi todas las áreas productoras de papa en el mundo, principalmente; aunque se presenta en muchos cultivos hortícolas. La enfermedad, cuyo agente etiológico es *Rhizoctonia solani* (Kühn) (= *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) ha sido objeto de gran cantidad de investigaciones durante los últimos años (Blancard *et al.*, 1991).

2.6.4.2 Síntomatología y daños

Las especies de *Rhizoctonia* producen manchas y pudriciones foliares, de raíces, de cuellos, estolones y rizomas (Goodman, 1991).

Esta enfermedad aparece en cualquier etapa del ciclo biológico de la planta, comúnmente causa pudrición de la semilla por lo cual la planta nunca germina, en otros casos la semilla es atacada después de germinar, también daña plantas y tejidos suculentos (Lucas *et al.*, 1985). Esta enfermedad es mas frecuente en plántulas; se caracteriza por una pudrición del cuello de la raíz, donde se observan lesiones hundidas, o chancros, que invaden la porción del hipocotilo y las raíces. La forma de las lesiones varía de circular a oblonga; están deprimidas y delimitadas por márgenes de color café; cuando las lesiones se unen pudren totalmente el hipocotilo e impiden la absorción de nutrientes, en consecuencia la parte, aérea de la plántula manifiesta cierta flacidez del follaje y finalmente un secamiento total (Blancard *et al.*, 1991).

Las hojas de las plántulas enfermas primero se tornan verde amarillo, luego se marchitan, y eventualmente mueren. Las regiones vasculares de las plántulas

infectadas, especialmente el cepellón y la parte basal del tallo, son de color café bronceado oscuro (Ramos, 1976).

El hongo se identifica por causar lesiones húmedas y hundidas, de tamaño variable y con una coloración café canela a café rojizo (Romero, 1988), además la pudrición en el cuello de la planta no es compacta, por lo que la epidermis se desprende con facilidad (Mendoza, 1990).

En plantas de mayor edad, el ataque del hongo sobrepasa la superficie del suelo; entonces se observan chancros en la base de la planta. En frutos también se observan estas mismas lesiones, también se ha encontrado causando marchitez con amarillamiento por la pudrición del cuello y raíz (Mendoza y Pinto, 1985).

Durante y después de la floración, las plantas afectadas inicialmente aparecen con el follaje marchito (hojas verde pálido, seguido de un amarillo ligero con lesiones negras en el margen o en las puntas) que al poco tiempo se torna amarillento y finalmente negro; las hojas superiores de la planta pueden estar en una posición erecta y un poco más rígida que las normales; las hojas se marchitan progresivamente hacia la nervadura; después se retuercen y toman una textura papelosa. Los tallos a la altura del cuello muestran un estrangulamiento y lesiones negras, y posteriormente se van tornando marchitos y negros; las raíces quedan de color negro y se pudren, las plantas mueren aproximadamente 20-30 días después del ataque inicial (Ramos, 1976).

2.6.4.3 Agente causal

R. solani K., es el estado anamorfo del Basidiomycota *T. cucumeris* (Frank.) Donk. Las hifas de este hongo son capaces de anastomosarse (fusión de hifas), por lo que los diferentes aislamientos han sido agrupados en función a esta particularidad (Romero, 1993).

El micelio es casi siempre de color canela o castaño oscuro y las hifas tienen un diámetro que va desde los 8-10 μm . Las hifas vegetativas jóvenes tienen sus células multinucleadas y se ramifican cerca del septo distal de la célula. Las

características más típicas de *R. solani* son sus ramificaciones en ángulo recto, constricciones muy marcadas en las septas, o en el punto de origen de la ramificación de la hifa, se genera la formación de un septo en la rama cerca de su origen y un septo tipo doliporo, la ramificación se origina subterminalmente a la septa. El micelio tiene distribución uniforme sobre la superficie del sustrato y algunas veces agregado en cordones miceliales productores de fructificaciones asexuales (esclerocios) de color café a negro de forma variable, frecuentemente pequeños pero no muy compactos y formados por filamentos miceliales (Romero, 1993; Blancard *et al.*, 1991).

Los esterigmas son fuertes y generalmente erguidos. Las esporas son mucosas, de paredes delgadas, prominentemente apiculadas, no amiloides, hialinas, tienden a ser oblongas a elipsoidales, aplastadas por un lado y, a menudo, más anchas hacia el extremo distal (León, 1978). Éste patógeno, se presenta en la superficie de los tallos, sobre la línea del suelo, formando una capa blanco-plomiza, sobre la cual se forman las basidiosporas, dándole a la superficie una apariencia polvorienta (INIFAP, 2004).

2.6.4.4 Ciclo de vida y epidemiología

Sobrevive en periodos desfavorables por el crecimiento en forma de estromas, células monilioides, o micelio de pared gruesa en desechos de la planta. Estas estructuras son bastante tolerantes a los extremos ambientales y fitosanitarios. Cuando un estroma germina o surgen hifas de una planta infectada, el hongo se propaga radicalmente en la parte superior del terreno o la capa del fieltro para formar una colonia aproximadamente circular (Goodman, 1991).

Es un habitante natural del suelo donde persiste como hifa o esclerocio (Figura 6) teniendo reservas de alimento. Su diseminación es por el agua, tejidos vegetales y el hombre, logrando vivir hasta por cinco años, al germinar el crecimiento hifal penetra directamente al tejido, luego causa la muerte por enzimas que reblandecen al tejido que le servirá como alimento (Lucas *et al.*, 1985).

Las condiciones favorables óptimas para el crecimiento del micelio de este hongo son de 24° C a 26° C, el máximo abajo de 33° C y el mínimo entre 5° C a 6° C, con un pH 4.5 a 8.9 y excesos de humedad. Las esporas germinan con un rango amplio de temperaturas y más rápidamente cuando las temperaturas se aproximaron al óptimo para el crecimiento del micelio (Ramos, 1976); sin embargo, para la germinación del esclerocio es necesario una alta humedad y una temperatura entre 8° C a 30° C con óptimo de 21° C a 25° C (Mendoza y Pinto, 1985). Se desarrolla tanto en suelos húmedos y pesados que en suelos más ligeros y secos, con temperaturas comprendidas entre 15° C y 26° C (Blancard *et al.*, 1991).

El hongo se mantiene de un año a otro, como esclerocios y como micelio en residuos de cosecha que se encuentran en el suelo o por largos periodos de tiempo y puede atacar a las plántulas cuando las condiciones son favorables. Así mismo, este hongo puede sobrevivir como saprofita en el suelo por tiempo indefinido; no obstante, para causar infección los esclerocios o fragmentos de hifas deben germinar o empezar acrecer, ya que sólo las hifas resultantes al desarrollarse a través del suelo por varios milímetros forman un cojín de infección en la superficie del hospedante y penetran (Romero, 1998).

En plantas suculentas se puede observar el micelio como filamentos de color café o ámbar a la altura del cuello de la raíz (Mendoza y Pinto, 1985).

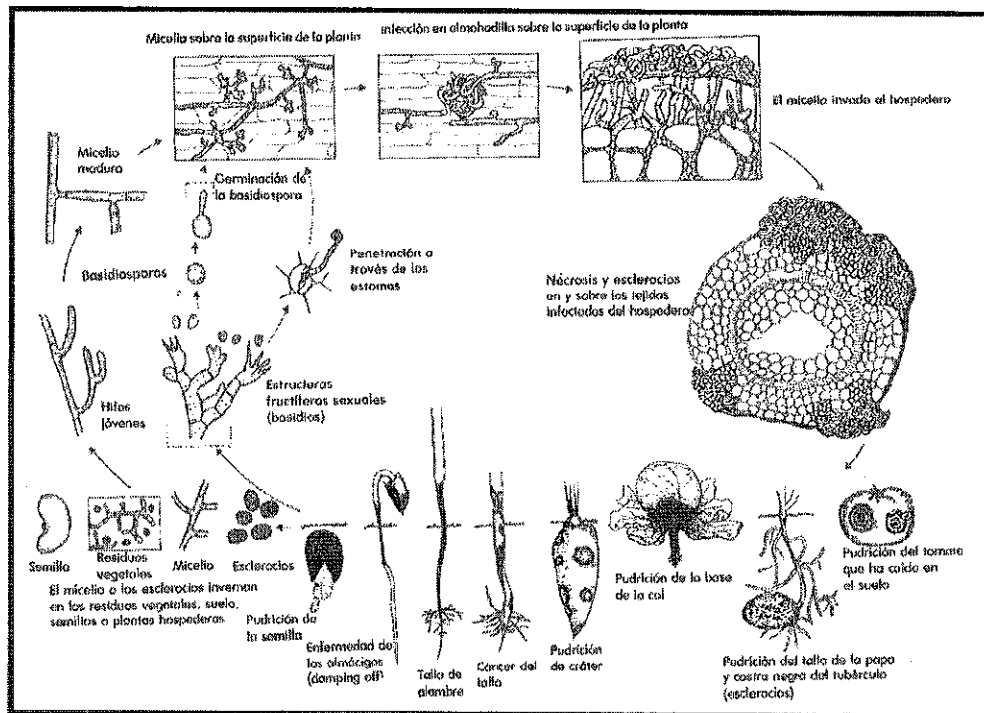


Figura 6. Esquema del ciclo biológico de *Rhizoctonia solani*.

2.6.5 Manejo de hongos que afectan la raíz

El control o manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos es un sistema orientado a mantener los organismos, que afectan a un cultivo en niveles que no causen daño económico utilizando preferentemente los factores naturales adversos al desarrollo de las plagas y enfermedades; y sólo recurre al uso de plaguicidas como medida de emergencia. El manejo integrado ha rebasado el ámbito agrícola y se le considera como el sistema más razonable desde el punto de vista ecológico, que tiende a preservar la calidad del medio ambiente contra la contaminación por plaguicidas al mismo tiempo que se protege la producción agrícola contra los daños de las plagas, enfermedades y malezas. Existen ciertos componentes en el MIC, como la resistencia de las plantas, la acción de los controladores biológicos y algunas prácticas agrícolas, que tienden a producir efectos duraderos y constituyen la base del sistema del manejo integrado (FAO, 1998).

Entre las medidas para el manejo integrado de las enfermedades de la raíz en hortalizas se puede citar: la utilización de variedades resistentes y la desinfección de semillas y suelo, utilización de semilla sana, elección de una buena alternativa y tratamientos preventivos en agua de riego. Sembrar en suelos con buen drenaje y evitar la excesiva humedad del suelo. Realizar fertilización adecuada al cultivo. Si el suelo lo requiere hacer el encalado y desinfectar los equipos y herramientas de trabajo. Otras alternativas, pueden ser las aplicaciones de productos químicos de contacto y sistémicos del grupo de las triazinas, pirimidinas, imidazoles y bencimidazoles (Acosta, 2007; comunicación personal, 2007).

El riesgo económico que ocasionan las enfermedades causadas por los hongos que afectan raíz, en cultivos susceptibles como las solanáceas y cucurbitáceas entre otras podría ser reducido, si las estrategias de manejo de la enfermedad se llevan adecuadamente considerando un manejo integral, antes de implementar un control químico, tales estrategias son mediante el implemento de prácticas agronómicas entre ellas la destrucción de fuentes de inóculo como los residuos de cosecha, solarización del suelo y uso de acolchado, incorporación de materia orgánica al suelo, realizar las siembras adecuadamente, tener control de riegos, evitar encharcamientos, con buena nivelación del terreno y manejar densidad baja de siembra, rotación de cultivos, uso de semilla certificada y uso de plántula para transplante sana, resistencia varietal, uso de microorganismos benéficos (aplicación de *Trichoderma* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus subtilis*, entre otros) y uso de agroquímicos, como los tratamientos a la semilla con captan, thiram y metalaxyl, así como la aplicación preventiva con fungicidas como el fosétil-aluminio, metalaxyl, propamocarb, fluopicolide, clorhidrato y cymoxanil, antes de que haya una infección en el almácigo y al momento del transplante, en campos que hayan sido infestados. Una vez establecido el cultivo en campo se deben realizar observaciones al cultivo para detectar cualquier principio de enfermedad como damping off, raíces o tallos dañados y eliminar frutos enfermos (Zavaleta-Mejía, 2000).

Se debe evitar el salpique al momento de regar, ya que es una de las formas en que el inóculo puede ser dispersado hacia las partes altas de la planta. Se recomienda que en suelos muy infestados no se deben sembrar hospedantes susceptibles en

por lo menos tres años, ya que el inóculo puede sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo (Mendoza, 1990).

2.6.5.1 Uso de variedades resistentes

El uso de variedades resistentes se centra a la eliminación de características del cultivo que lo hacen susceptible a las enfermedades, en este caso las que afectan la raíz de los cultivos hortícolas, esta estrategia esta orientada particularmente a explotar las variedades de plantas tolerantes o resistentes a los ataques de las enfermedades (Apple, 1978).

Las variedades de plantas que se cultivan, en la mayoría de los casos, son el resultado de selecciones y mejoramientos genéticos en los que se ha buscado fundamentalmente mejorar la calidad de los frutos y/o aumentar los rendimientos. El aspecto sanitario, sobre todo en lo que a resistencia o tolerancia a enfermedades se refiere, no ha constituido un criterio básico de selección. Por el contrario, con frecuencia se ha sacrificado la capacidad de las plantas para defenderse de las enfermedades en aras de la mejor calidad y rendimientos de las cosechas. Este criterio está cambiando en forma substancial debido a los casos, cada vez más comunes, de cultivos mejorados que resultan particularmente susceptibles y que requieren condiciones de protección que muchas veces no están al alcance de los agricultores (Apple, 1978).

En la naturaleza, afortunadamente, se presentan plantas que exhiben ciertos grados de resistencia; es decir que resultan menos dañadas que otras plantas en condiciones similares de contacto con la enfermedad. La resistencia de las plantas tiende a ser una forma de control permanente de la enfermedad sobre todo cuando esta condición se debe a la concurrencia de múltiples factores genéticos (genes); pero cuando la resistencia se debe a un solo factor o a muy pocos, no puede descartarse la posibilidad de que los patógenos desarrollen biotipos o razas fisiológicas que venzan la resistencia de la planta. En algunos casos se presentan biotipos que divergen grandemente de las formas originales (Apple, 1978).

2.7 Resistencia genética a enfermedades

2.7.1 Definición de resistencia

Resistencia es la capacidad natural y heredable de una población determinada para sobrevivir a un tratamiento, que debería de controlar con eficacia esa población en las condiciones normales de uso (Hance y Holly, 1990; citado por Estrada, 2000).

Una planta resistente es aquella que evita o supera los problemas asociados con las amenazas naturales por medio de estrategia que ha desarrollado para su supervivencia, a los factores externos, algunos naturales y otros creados por el hombre, entre los que se encuentran los patógenos, las plagas, los herbicidas químicos y las condiciones extremas, tales como la temperatura, la sequía y las inundaciones (Lindsey y Jones, 1992).

Los procesos de incorporación de las características de resistencia a las variedades cultivadas presentan grados de simplicidad o complejidad muy diversos. Todo esto, según se trate de características gobernadas por un solo gen, por unos pocos o por muchos genes; que dichos factores sean dominantes o recesivos; que existan otros efectos genéticos indeseables asociados con los factores de resistencia; o que la expresión fenotípica de la resistencia sea afectada por factores ambientales. La resistencia monogénica y dominante puede ser incorporada a variedades de plantas cultivadas por procedimientos relativamente simples, resultando por lo general en resistencia estable y de alto nivel para diversas condiciones ambientales, desafortunadamente esta resistencia es muy vulnerable a la aparición de nuevos biotipos. De allí que en la actualidad existe la tendencia de poner mayor énfasis en el desarrollo de variedades con resistencia poligénica. Hasta la fecha no se ha determinado ninguna raza fisiológica o biotipo de un patógeno que sea capaz de vulnerar la resistencia poligénica de un cultivo (Apple, 1978).

2.7.2 Tipos de resistencia

2.7.2.1 Resistencia vertical

En el mejoramiento genético de especies vegetales se conocen dos tipos de resistencia la que se encuentra controlada por un gen único (monogénicas) o de dos a tres genes (oligogénica), conocida como resistencia vertical (Robinson, 1999) y se define como la expresión de un nivel alto de resistencia de una variedad a alguna raza fisiológica de un patógeno y un nivel bajo de resistencia a otras razas (Manners, 1993; citado por Sánchez y Velásquez, 1999), este tipo de resistencia también es conocida como resistencia específica y es fácil de detectar, aún en etapa de plántula y relativamente fácil de incorporar a nuevas variedades. Se puede llegar a tener el control total de la enfermedad, sin embargo esta resistencia no tiene larga duración ya que las nuevas razas del patógeno, frecuentemente son capaces de atacar al nuevo cultivar (Sánchez y Velásquez, 1999).

La herencia de la resistencia en calabazas puede ser simple y se puede introducir genes con facilidad en una variedad, lo que da como resultado niveles de resistencia altos; además, puede ser oligogénica, ya que las variedades llevan uno o dos genes necesarios para asegurar el nivel máximo de resistencia (Blancard *et al.*, 1991).

La resistencia vertical de las plantas a muchas enfermedades da la protección completa contra el parásito en cuestión y una compatibilidad con el mejoramiento para una gran capacidad de adaptación al clima, pero su carácter es temporal, puesto que desaparece frente a nuevas biotipos o razas del patógeno. La herencia de la resistencia vertical está controlada por genes únicos que son parte de una relación de gen a gen, donde para cada gen de resistencia del huésped hay un gen correspondiente infectado por el parásito, cuando aparece una cepa del parásito que encaja, la resistencia falla en todos los huéspedes de ese cultivo y, poco después, en el cultivar entero (Robinson, 1999).

2.7.2.2 Resistencia horizontal

La resistencia que esta determinada por varios genes, conocida como resistencia horizontal (Robinson, 1999), es un tipo de resistencia expresada a todas las razas conocidas del patógeno (Manners, 1993; citado por Sánchez y Velásquez, 1999); también es conocida como resistencia no específica y coincide con la resistencia poligénica gobernada por más de tres genes. Estos genes actúan de manera aditiva. El nivel de resistencia varía de acuerdo al genotipo de la variedad y confiere una resistencia parcial que raramente es alta, pero más duradera; además esta fuertemente influenciada por el medio, llega a ser evidente conforme las plantas maduran y es más difícil de cuantificar y manipular en programas de mejoramiento. Puede ser evidente en la etapa de plántula, pero los efectos completos requieren de estudios detallados en campo, y del progreso del patógeno durante la vida del cultivo (Sánchez y Velásquez, 1999). Este tipo de resistencia, funciona también contra la mayoría de las cepas de parásitos, por lo que no puede fallar del mismo modo que la vertical; es una resistencia durable. La resistencia horizontal es la que se produce siempre en ausencia de la vertical, o después de que ésta ha fracasado (Robinson, 1999).

2.8 Objetivos del mejoramiento genético en calabaza (*Cucurbita* spp)

El mejoramiento genético de las calabazas se enfoca a (Montes, 1991; Pérez *et al.*, 1997; Villanueva, 2008; comunicación personal, 2008):

1. Mejorar el rendimiento, calidad de fruto y semilla, tanto para consumo en fresco como para procesamiento.
2. Producción de híbridos, con características de maduración temprana, incremento de vigor y uniformidad.
3. Mejorar calidad y cantidad de aceite en la semilla.
4. Búsqueda de resistencia a las principales enfermedades en calabaza y resistencia a herbicidas.
5. Para las especies que proveen semilla, se basa en generar variedades con mayor número de frutos por planta, mas semillas por fruto y mayor proporción de aceite en la semilla, y para las especies cuyo uso primordial

es la pulpa se enfoca en incrementar la proporción de pulpa en el fruto y estandarización de forma y tamaño de fruto.

Desde 1996, en la Universidad Autónoma Chapingo, a través del proyecto "Milpa" financiado por la fundación Mc Knigth, se han realizado numerosos estudios en el sistema milpa-calabaza, obteniéndose importantes resultados en la mejora de la cantidad y calidad de frutos y semilla por fruto producidos por planta; incremento en la cantidad de azúcares y del color de la pulpa; cultivares resistentes a herbicidas comunes preemergentes empleados en maíz y resistentes a hongos que afectan la raíz (Sánchez y Velásquez, 1999; Ayala, 2002 y Pérez, 2002).

2.8.1 Antecedentes de mejoramiento genético para resistencia a hongos que afectan la raíz en calabaza (*Cucurbita* spp)

Henz & Lima (1994); citados por Pérez (2002), probaron tres genotipos de *Cucurbita* spp: CNPH 88-393 resistente, Mocinha moderadamente resistente y CNPH 88-625 susceptible en diferentes etapas de desarrollo (7, 11, 14 y 18 días después de la siembra), concentración de inóculo (102, 103, 104 y 105 zoosporas por mL) y condiciones ambientales (invernadero de cristal, plástico y condiciones controladas); para observar su reacción a *P. capsici*. El resultado fue que los tres genotipos mantuvieron su respectiva resistencia bajo todas las condiciones ambientales evaluadas. La inoculación con 103 o 104 zoosporas mL⁻¹ los 7, 11 ó 14 días después de la siembra fue considerado lo adecuado para buscar la resistencia.

Sánchez y Velásquez (1999), hicieron una evaluación de germoplasma con características de resistencia a damping off. Encontraron que un 26.75% del germoplasma de *C. pepo*, presentó mayor resistencia a *Pythium* spp, y fue susceptible a la mezcla de hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. capsici* y *Pythium* spp), en *C. ficifolia*, un 4.5% de resistencia a *R. solani* y un 0.25% de susceptibilidad a la mezcla de hongos.

Pérez (2002), realizó inoculaciones artificiales bajo condiciones de invernadero en calabaza (*C. pepo*) de hongos que afectan la raíz, obteniendo plantas resistentes

a *R. solani* (1.43%), *F. oxysporum* (0.32%), *P. capsici* (0.24%), *P. aphanidermatum* (6.66%) y la mezcla de ellos (2.35%); además, estableció una metodología de micropropagación en la cual clono plantas resistentes para incremento del germoplasma.

Otros estudios, relacionados con resistencia a hongos que afectan la raíz en calabaza (*Cucurbita* spp), son los realizados por Montiel (2003) y Aguilar y Medina (2003) y Santos (2003). En los tres casos, realizaron inoculaciones artificiales bajo condiciones de invernadero en *C. pepo* (3.66% de plantas resistentes a *R. solani*, 0% a *F. oxysporum*, 0.62% a *P. capsici*, 0.4% a *p. aphanidermatum* y 0.19% a la mezcla de los cuatro hongos), *C. argyrosperma* var. *argyrosperma* y var. *sternosperma* (para *R. solani* 2.28% y 2.52%, *F. oxysporum* 0.22% y 0%, *P. capsici* 0.56% y 1.73%, *P. aphanidermatum* 4.91% y 6.08% y a para la mezcla de los cuatro hongos 1.13% y 1.90%) y *C. moschata* (5.46% de plantas resistentes a *R. solani*; 0.77% a *F. oxysporum*, 5.05% a *P. capsici*, 33.33% a *P. aphanidermatum* y 8.74% a la mezcla de los cuatro hongos), respectivamente; encontrando plantas resistentes en el germoplasma evaluado para resistencia a patógenos que son causantes del damping off (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y la mezcla de los cuatro hongos).

Aragón (2005), llevo a cabo una verificación de resistencia en materiales experimentales de calabaza trabajados en la Universidad Autónoma Chapingo y realizó la caracterización agronómica de los materiales que resultaron resistentes en la confirmación de la resistencia.

2.9 Métodos de mejoramiento

Los métodos del mejoramiento utilizados en calabaza son semejantes a los empleados en maíz, dado a que su sistema de reproducción (monoica) es similar. Los métodos son: selección, retrocruza, hibridación (en cruza simple, debido a su leve depresión endogámica, suficiente heterosis y fácil emasculación), método trisódico (se utiliza para la aportación de características deseables, localizando el cromosoma en que se encuentra el gen y transferirlo mediante retrocruzamientos) citogénico y cruzamientos interespecíficos (se han estudiado para transferir

cualidades superiores a los frutos, resistencia a enfermedades y plagas, así como la obtención de variedades que se adapten a climas adversos) (Pérez *et al.*, 1997). Las especies de calabaza exhiben una gran variación debido probablemente a un alto grado de heterocigosis y endogamia (Sánchez y Velásquez, 1999).

El mejoramiento genético es un proceso a largo plazo, sobre todo con el uso de las metodologías tradicionales, por lo que es necesario recurrir al apoyo de las nuevas técnicas desarrolladas en Biología Molecular y Biotecnología basadas en el uso del material genético o ADN. Los marcadores genéticos moleculares, son desarrollados por un gran número de metodologías, como: RFLP, VNTR (Restriction Fragment Length Polymorphism y Variable Number of Tandem Repeats, por sus siglas en inglés, respectivamente), tecnología de la Reacción de Polimerización en Cadena o PCR (Polymerase Chain Reaction) (Montalvo, 1998).

2.10 Marcadores genéticos

Un marcador genético es una banda de ADN que puede estar asociada con un carácter agronómico si se habla de plantas; o también, es cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico detectable fácilmente, por ejemplo un gene que ocasiona resistencia para alguna plaga o enfermedad, factor ambiental adverso, etc. (Valadez y Kahl, 2005).

Los avances en bioquímica, genética y biología molecular, entre otras ciencias han proveído descriptores o marcadores basados en el ADN. La utilización de fragmentos del ADN cromosómico como marcadores genéticos refleja diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Todo organismo diploide contiene dos copias de cada cromosoma, uno que proviene del padre y otro de la madre, las cuales son parecidas excepto por alguna diferencia pequeña que se encuentra en la secuencia del ADN de ambos progenitores, llamada polimorfismo del ADN. Estos polimorfismos son la base molecular que determina genéticamente las diferencias fenotípicas entre los individuos (Berumen, 1993), y son el producto de cambios o rearrreglos entre los pb (pares de bases o nucleótidos), que van desde simples cambios de un

nucleótido en la secuencia de ADN, hasta translocaciones, inversiones, o inserciones de segmentos de ADN (Valadez y Kahl, 2005).

Los marcadores genéticos moleculares consisten en la caracterización detallada del patrón de bandeo obtenido al finalizar cualquiera de las técnicas desarrollada para tales fines. Este perfil de bandas es también conocido como huellas genómicas. La utilidad del uso de marcadores de ADN se fundamenta en una extensa tecnología utilizada para definir los polimorfismos del ADN (Tingey y Tufo, 1993). Dichas tecnologías están basadas en un sin número de principios y metodologías; tales como, corte del ADN con enzimas de restricción, clonación, hibridación, tinción, y últimamente la PCR, entre otras (Montalvo, 1998).

2.11 Marcadores moleculares

En general, los marcadores 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, dichos marcadores pueden ser morfológicos y moleculares, incluyendo los bioquímicos y genéticos (Rivera *et al.*, 1991).

Los marcadores moleculares se han utilizado ampliamente en los últimos 20 años, dentro de éstos existen varios tipos como: los bioquímicos (isoenzimas y proteínas) y genéticos (basados en fragmentos de ADN) (Montalvo, 1998).

2.11.1 Técnicas para generar marcadores genéticos

La elección de la técnica para generar alguna clase de marcador genético para un proyecto en particular depende de muchos factores. Primero considerar los objetivos y/o alcances del trabajo, incluyendo el tipo de población a evaluar; cantidad de material biológico disponible; genética del carácter y del organismo a ser estudiado; el costo o recursos económicos disponibles y equipo; incluso, considerar la complejidad de cada técnica, con el fin de seleccionar la más adecuada para el cumplimiento de los objetivos de la investigación (Balbás, 2002).

Entre algunas de las técnicas que generan marcadores moleculares genéticos son: RFLP, VNTR, PCR. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores de 6 Kb en promedio. Estas secuencias iniciadoras pueden ser aleatorias semialeatorias o específicas, con las cuales ha sido posible caracterizar genomas de diferentes organismos, detectar y aislar genes, e incluso, diferenciar organismos relacionados genéticamente. Para esta tecnología, se pueden citar por ejemplo, las metodologías que generan los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR), DAF (DNA Amplification Fingerprinting), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), STSP (Sequence Tagged Sites Polymorphisms) entre otras. Las abreviaciones de los nombres de las técnicas corresponden a sus siglas en inglés (Valadez y Kahl, 2005).

La tercer categoría involucra metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern (esta técnica explora las variaciones en la longitud de los fragmentos del ADN, ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa en particular). Por ejemplo la técnica de RAHM (Random Amplified Hybridization Microsatellites) o la RAMPO (Random Amplified Microsatellite Polymorphisms, por sus siglas en inglés) RAMP (Random Microsatellite Polymorphisms, por sus siglas en inglés), requiere de la síntesis previa de ADN (Valadez y Kahl, 2005).

2.11.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un procesos *in vitro* que permite amplificar secuencias de ADN de manera exponencial; dicha amplificación se puede visualizarse por técnicas de tinción convencionales. En cada ciclo de la PCR la cadena se duplica con respecto al ciclo previo; así, la concentración de moléculas de ADN de doble cadena colocadas inicialmente en el aparato (termociclador) serán 2 moléculas, donde $n =$ al número de ciclos realizados (Valadez y Kahl, 2005).

La PCR es un procedimiento que se realiza en tres pasos: el primero es una desnaturalización que sirve para separar la cadena doble de ADN en dos sencillas mediante alta temperatura (94° C); en el segundo, la temperatura se reduce para permitir el alineamiento de las moléculas iniciadoras o "primers" a la secuencia blanco o secuencia original del ADN; en el tercer paso se lleva a cabo la elongación o extensión (polimerización) de la molécula iniciadora, momento donde interviene la enzima ADN polimerasa que anexa a esta molécula los desoxirribonucleótidos necesarios para formar la nueva cadena de ADN; esta enzima tolera activa hasta 72° C de temperatura. Al término de dichos pasos se realiza un ciclo de amplificación y estos se repiten en un aparato llamado termociclador, el cual es un incubador pre-programado que cicla automáticamente (Valadez y Kahl, 2005).

2.11.2.1 RAPD

Actualmente los marcadores tipos RAPD (amplificación aleatoria del ADN polimórfico), proporcionan un método rápido para generar mapas genéticos y analizar poblaciones. Además, este tipo de metodologías puede dirigirse a la búsqueda de regiones monomórficas por marcadores previamente caracterizados y a la captura de regiones o de genes específicos con fines de clonación. Esta técnica permite la síntesis de diferentes fragmentos pequeños del ADN (Valadez y Kahl, 2005).

La técnica RAPD, ha sido la metodología mas ampliamente utilizada en la PCR para diferentes propósitos, es una amplificación enzimática diferencial de fragmentos pequeños de ADN, utiliza pequeños iniciadores de oligonucleótidos de secuencias de pb arbitrarias o aleatorias, que usualmente tienen un contenido de GC (Guanina y Citocina), mayor a 50%. Esos iniciadores no tienen secuencias repetidas inversas internas y se pegan a distintos sitios a un genoma, si es que extienden diferentes sitios blanco para ellos. Esta unión es reconocida por la enzima ADN polimerasa que inicia el alargamiento del iniciador a partir del extremo 3'; el alargamiento resultante produce una cadena de ADN, cuya secuencia de bases es complementaria a la cadena molde. El producto de la amplificación, se acumulará a un gran número de copias ($\approx 10^6$) y puede ser

visualizado con electroforesis después de teñirse el gel con bromuro de etidio. Una amplificación es exitosa, solo si el sitio blanco para el iniciador está localizado en ambas cadenas del ADN molde en polaridad opuesta y a una distancia de 50-6000 pares de bases en promedio (Valadez y Kahl, 2005).

Usualmente esta técnica provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas. Estos últimos resultan de inserciones o deleciones en las regiones amplificadas, o a partir de cambios de bases con lo que se altera la unión del iniciador (Valadez y Kahl, 2005).

La técnica es rápida, fácil de realizar, comparativamente barata, y se aplica a diferentes organismos, puesto que solamente se utilizan pequeñas cantidades de ácido nucleico (Valadez y Kahl, 2005).

Para la reproducibilidad de los patrones de RAPD, es absolutamente necesario optimizar las concentraciones del ADN, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), iniciadores y dNTPs. También, la clase de polimerasa termoestable debe de mantenerse constante durante la experimentación así como la utilización del mismo termociclador. Cualquier cambio en la polimerasa o en el termociclador, pueden afectar inevitablemente la reproductibilidad de los patrones. Una vez que todos los parámetros se conocen, los patrones de RAPD son reproducibles (Valadez y Kahl, 2005).

2.11.2.2 Microsatélites (MP-PCR)

Los marcadores moleculares provenientes de este tipo de secuencias se han denominado como: secuencias simples repetidas (SSR del inglés Simple Sequence Repeats), secuencias repetidas en serie (STR del inglés Sequence Tandem Repeats) o incluso como STMS (Sequence Tagged Microsatellite Sites). Se han reportado muchas técnicas para revelar estos polimorfismos; algunas guardan similitudes entre sí, aunque, dentro de las más relacionadas se tienen a los SSR-PCR, ISSR-PCR (Inter- SSR), MP-PCR (PCR iniciada por microsatélites) y STS-PCR (Valadez y Kahl, 2005).

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN de diferente tamaño (dos a no más de 100 pb) repetidas varias veces en el genoma de eucariotes, lo que confiere polimorfismo suficiente a los organismos (Berumen, 1993; Jeffreys *et al.*, 1985 citados por Lu *et al.*, 1996).

La unidad básica de estas repeticiones seriadas consiste de una cantidad pequeña de bases, las cuales están conectadas entre sí y forman una cadena de unidades repetidas. El polimorfismo está dado por el número diferente de unidades básicas conectadas. A estas regiones del genoma se les llama satélites: minisatélites, microsatélites y macrosatélites. Estas pequeñas secuencias de bases se repiten n veces en forma aleatoria a lo largo de los cromosomas; los microsatélites no sobrepasan los cinco pares de bases, los minisatélites tienen entre 10 y 20 pb, y los macrosatélites poseen más de 20 pb. Los genetistas han conseguido reconocer varias de estas secuencias y sintetizar a partir de ellas sondas radioactivas que son capaces de identificar estas secuencias hipervariables en el ADN y obtener las huellas génicas de los individuos en estudio a través de diferentes métodos (Ramírez, 1991).

Los satélites son ampliamente conocidos como partes de ciertos cromosomas de plantas que presentan como protuberancias en sus extremos. Actualmente los satélites pueden encontrarse dispersos o agrupados en el genoma de la mayoría del organismo, pero en cada caso están compuestos de una secuencia principal de alrededor de 0.1-10 Kb de longitud (Valadez y Kahl, 2005).

Los minisatélites consisten en secuencias de ADN repetidas y dispuestas en forma seriada a lo largo del genoma, con una unidad de 10 a 35 pb. Estas secuencias se caracterizan porque tienen regiones ricas en GC, que con frecuencia cruzan (hibridan) entre especies diferentes (Jeffreys *et al.*, 1985).

Los microsatélites son conocidos también como secuencias simples, tienen una arquitectura parecida a los minisatélites, ya que los "motifs" (secuencias motivo) están también repetidos en serie, pero son más pequeños, pues solo se han identificado de dos a diez pares de bases como unidad básica. Algunos ejemplos

de microsatélites que se han utilizado para la obtención de huellas genómicas, son: (GATA)₄, (GACA)₄, (TCC)₅, (GTG)₅, (GGAT)₄, (CT)₈ y (CA)₈. Los productos obtenidos después de la reacción con microsatélites son utilizados también para la diferenciación de individuos (Jeffreys *et al.*, 1985).

Las desventajas de trabajar con marcadores basados en secuencias satélites son el requerimiento de librerías genómicas y clones secuenciados para diseñar dichas sondas que permitirán su amplificación en el genoma (Hartl y Seefelder, 1998). También se tiene problema cuando la cantidad de ADN disponible es escasa y poco puro; aunque con el uso de la amplificación enzimática del ADN o de la PCR, este aspecto puede solucionarse. En general estas metodologías requieren de secuenciar la(s) zona(s) que se desee amplificar para diseñar los iniciadores apropiados para cada especie u organismo de estudio (Valadez y Kahl, 2005).

2.11.2.3 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. Este 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, fue descrita por Morjane *et al.* (1994) y Richardson *et al.* (1995). 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).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El experimento se desarrolló en dos fases, una de campo y la otra de laboratorio. La primera se llevó a cabo en la sección de invernaderos del Departamento de Parasitología Agrícola, en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y la segunda fase se realizó en el laboratorio de Fisiología y Patología de Plantas del Instituto de Fitopatología del Colegio de Postgraduados (Figura 7).



Figura 7. Croquis de localización del experimento

3.2 Material Genético

Se trabajó con 25 variedades resistentes de calabaza (*Cucurbita* spp) manejadas por polinización libre (PL) y 24 variedades resistentes manejadas por autopolinización (5 de *C. pepo*, 4 de *C. argyrosperma*, 6 de *C. ficifolia* y 10 de *C. moschata*) (Cuadro 1) caracterizadas morfológicamente y agronómicamente, así como verificados en cuanto a su resistencia al complejo de patógenos causantes del damping off, las cuales son parte del resultado de trabajos de detección y selección de resistencia hacia los hongos *P. aphanidermatum*, *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*, obtenidas en la UACH, desde 1999, (Pérez, 2002 y Aragón, 2005).

Cuadro 1. Disponibilidad de semilla de variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) resistentes a hongos que afectan la raíz, encontradas por Aragón (2005), provenientes de PL y de autopolinización.

Num. de variedad actual	Num. de variedad de procedencia ¹	Especie	Característica distintiva del genotipo	Origen	Resistencia	Disponibilidad de semilla de variedades resistentes a hongos	
						Número de sobres por variedad y tipo	
						PL	⊗
1	1	<i>C. ficifolia</i>	Fruto fino, semilla negra	UACH-99 5 PL	<i>F. oxysporum</i>	17	7
2	2	<i>C. ficifolia</i>	Fruto fino, semilla blanca	UACH-02 15 PL	<i>F. oxysporum</i>	2	1
3	4	<i>C. ficifolia</i>	Fruto fino, semilla blanca	UACH-02 16 PL	<i>R. solani</i>	9	1
4	5	<i>C. ficifolia</i>	Fruto fino, semilla negra	UACH-02 (17) ⊗	<i>R. solani</i>	22	3
5	6	<i>C. ficifolia</i>	---	UACH-02 14 PL	<i>R. solani</i>	1	(sin semilla)
6	8	<i>C. ficifolia</i>	Fruto fino semilla blanca y negra	UACH-02 10 PL	<i>P. aphanidermatum</i>	17	8
7	9	<i>C. moschata</i>	<i>In vitro</i> ²	UACH-02 13 PL	<i>F. oxysporum</i>	94	32
8	10	<i>C. moschata</i>	Pulpa naranja gruesa y dulce	UACH-99 7 PL	<i>F. oxysporum</i>	40	20
9	11	<i>C. moschata</i>	Fruto camotudo pulpa dulce (<i>in vitro</i> ²)	UACH-02 11 PL	<i>F. oxysporum</i>	144	48
10	12	<i>C. moschata</i>	Pulpa delgada (<i>in vitro</i> ²)	UACH-02 12 PL	<i>P. aphanidermatum</i>	19	5
11	13	<i>C. moschata</i>	Pulpa gruesa (<i>in vitro</i> ²)	UACH-02 21 PL	<i>P. aphanidermatum</i>	38	9
12	14	<i>C. moschata</i>	<i>In vitro</i> ²	UACH-99 4 PL	<i>P. capsici</i>	43	10
13	15	<i>C. moschata</i>	Pulpa naranja y dulce	UACH-02 (27) ⊗	<i>P. capsici</i>	44	15
14	16	<i>C. moschata</i>	Pulpa delgada (<i>in vitro</i> ²)	UACH-99 1 PL	Mezcla de hongos ³	44	20
15	17	<i>C. moschata</i>	---	UACH-02 20 PL	Mezcla de hongos ³	38	58
16	18	<i>C. moschata</i>	Pulpa gruesa (<i>in vitro</i> ²)	UACH-02 22 PL	Mezcla de hongos ³	39	21
17	19	<i>C. pepo</i>	<i>In vitro</i> ²	UACH-99 2 PL	<i>P. capsici</i>	19	13
18	20	<i>C. pepo</i>	<i>In vitro</i> ² guía	UACH-02 19 PL	Mezcla de hongos ³	33	7
19	21	<i>C. pepo</i>	Población interconectas semiguía	UACH-99 3 PL	<i>P. capsici</i>	20	12
20	22	<i>C. pepo</i>	<i>In vitro</i> ²	UACH-02 26 PL	<i>P. aphanidermatum</i>	14	3
21	23	<i>C. pepo</i>	---	UACH-02 23 PL	<i>R. solani</i>	4	4
22	24	<i>C. argyrosperma</i>	Var. stenosperma (<i>in vitro</i> ²)	UACH-02 24 PL	Mezcla de hongos ³	1	5
23	25	<i>C. argyrosperma</i>	Var. Stenosperma (<i>in vitro</i> ²)	UACH-99 6 PL	<i>R. solani</i>	3	7
24	26	<i>C. argyrosperma</i>	Híbrido interespecífico (<i>in vitro</i> ²)	UACH-02 (18) ⊗	<i>R. solani</i>	18	18
25	27	<i>C. argyrosperma</i>	<i>In vitro</i> ²	UACH-02 25 PL	<i>P. capsici</i>	2	1

¹ Variedades obtenidas y reportadas por Aragón (2005).

² Las variedades fueron incrementadas por Pérez (2002) en forma *in vitro* a partir de plantas resistentes, por lo que la semilla de estas variedades fue obtenida de clones resistentes al complejo damping off y reverificadas en cuanto a su resistencia por Aragón (2005).

³ Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*)

3.3. Fase de invernadero y corroboración de la resistencia

Consistió en sembrar las 25 variedades resistentes de calabaza (*Cucurbita* spp) manejadas por PL y 24 variedades resistentes manejadas por autopolinización (5 de *C. pepo*, 4 de *C. argyrosperma*, 6 de *C. ficifolia* y 10 de *C. moschata*), en condiciones de invernadero para confirmar su resistencia y de esta forma obtener el tejido vegetal sano (hojas) para extraer mejor calidad de ADN para su posterior análisis molecular en laboratorio, por lo que se procedió de la siguiente manera:

3.3.1 Tratamientos aplicados en la corroboración de resistencia a hongos

Los tratamientos evaluados y la respectiva concentración de inóculo aplicado por patógeno se indican en el Cuadro 2, y son los mismos que fueron establecidos por Aragón (2005).

Cuadro 2. Tratamientos y concentración de inóculo aplicado en variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) resistentes a hongos que afectan la raíz, para confirmar su resistencia, UACH, 2008.

Tratamiento	Patógeno	Concentración utilizada
1	<i>F. oxysporum</i>	5×10^5 conidios ml^{-1}
2	<i>R. solani</i>	2.36×10^4 propágulos ml^{-1}
3	<i>P. aphanidermatum</i>	5×10^5 zoosporas ml^{-1}
4	<i>P. capsici</i>	5×10^4 zoosporas ml^{-1}
5	Mezcla de hongos ¹	

¹ Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*)

Para los tratamientos testigos (sin ninguna inoculación de hongos) se utilizó semilla de cada una de las 49 variedades resistentes (25 variedades de PL y 24 variedades de autopolinización), mismas utilizadas en los tratamientos para confirmar la resistencia; los testigos solo se establecieron con la finalidad de comparar el porcentaje de germinación con las variedades sembradas para los tratamientos con hongos, y fueron eliminadas sin ser llevadas a la madurez fisiológica.

3.3.2 Incremento del inóculo

Se trabajó con las mismas cepas de hongos y con las mismas densidades de inóculo (detallados previamente en el Cuadro 2) que se usaron en los anteriores trabajos de resistencia a hongos, realizados en la UACH dentro del programa de investigación en calabaza.

Los hongos se incrementaron en el Laboratorio de Micología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH, partiendo de cepas incubadas en aceite mineral. Se utilizó PDA (Papa-Dextrosa-Agar) como medio de cultivo para *F. oxysporum* y *R. solani* y medio selectivo a base de jugo de tomate V8 para *P. aphanidermatum* y *P. capsici*. Los aislamientos se incubaron a 25° C y 16 h luz día⁻¹.

Las cepas incrementadas, fueron purificadas y preparadas para su mantenimiento en tubos de ensaye con aceite mineral, para su posterior uso en otras investigaciones.

3.3.3 Preparación del inóculo

Una vez que los hongos se desarrollaron completamente en las cajas Petri, se preparó el inóculo; raspando la superficie del medio de cultivo, lo cual se procedió de la siguiente forma:

Para el caso de las cepas de los hongos de *F. oxysporum* y *R. solani* el medio de cultivo usado en las cajas Petri fue PDA. Se usaron diez cajas Petri de 90 x 110 mm de dimensiones, para cada inoculación. El micelio colectado por hongo se licuo con agua destilada estéril, midiendo la concentración con la cámara de Newbahr (hematocitometro), fue necesario hacer diluciones hasta ajustar la concentración requerida para los hongos antes mencionados (Aragón, 2005).

El patógeno *P. aphanidermatum*, esporuló en el medio de cultivo de jugo V8-Agar, la preparación del inóculo se llevó a cabo con el mismo procedimiento empleado en los hongos *F. oxysporum* y *R. solani* (Aragón, 2005).

En *P. capsici* se utilizó la cepa Pc 105 patógena a chile (A2); para esta cepa se requirieron de diez cajas Petri (90 x 110 mm de dimensión) con agua destilada estéril a las cuales se les adicionó 10 rodajas pequeñas de un centímetro de diámetro, del hongo crecido previamente en medio de cultivo jugo V8-Agar por caja y diez hojas pequeñas de chile (*Capsicum annum*) previamente hervidas, las cajas Petri sembradas se incubaron durante 36 a 72 horas con luz para que el hongo esporulara. Una vez que el hongo esporuló, la solución se diluyó en agua estéril hasta ajustar la densidad requerida para la inoculación (Tlapal, 2007; comunicación personal).

Para el tratamiento cinco se realizó una mezcla en proporciones iguales, de las diluciones ya ajustadas a la concentración específica para cada hongo (Aragón, 2005).

3.3.4 Siembra e inoculación de calabazas

Para asegurarse que las plantas de la variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) a caracterizar molecularmente fueran resistentes al complejo de hongos de damping off (*P. aphanidermatum*, *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*) se realizó la corroboración de la resistencia, la cual se llevó a cabo en condiciones controladas (Invernaderos del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH).

La siembra de 25 variedades de calabaza de polinización libre y de 24 variedades de autopolinización, se realizó en charolas de plástico de 30 x 20 x 10 cm de dimensión, sin perforaciones para evitar la pérdida del inóculo, se usó sustrato nuevo, estéril (Sunshine® No.3).

De cada una de las 49 variedades resistentes (inoculadas) se sembraron diez semillas por charola, considerada está como unidad experimental (Cuadro 3), sin repeticiones. Cada semilla sembrada fue etiquetada para identificar su origen y proteger su identidad.

Para los testigos (sin inoculación) fueron sembradas diez semillas por charola de cada una de las 49 variedades en estudio, con la misma identidad de las variedades inoculadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos utilizados en variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) resistente a hongos que afectan la raíz, de PL y de autopolinización, caracterizados por Aragón (2005) y sujeto a caracterización molecular, UACH, 2008.

Num. de variedad actual	Especie	Tratamientos	Num. de variedad de procedencia ¹	Número de semillas sembradas			
				Polinización libre		Autopolinización	
				Inoculadas	Testigo	Inoculadas	Testigo
1	<i>C. ficifolia</i>	<i>F. oxysporum</i>	1	10	10	10	10
2	<i>C. ficifolia</i>	<i>F. oxysporum</i>	2	10	10	10	10
3	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	4	10	10	10	10
4	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	5	10	10	10	10
5	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	6	10	10	Sin semilla	Sin semilla
6	<i>C. ficifolia</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	8	10	10	10	10
7	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	9	10	10	10	10
8	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	10	10	10	10	10
9	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	11	10	10	10	10
10	<i>C. moschata</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	12	10	10	10	10
11	<i>C. moschata</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	13	10	10	10	10
12	<i>C. moschata</i>	<i>P. capsici</i>	14	10	10	10	10
13	<i>C. moschata</i>	<i>P. capsici</i>	15	10	10	10	10
14	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ²	16	10	10	10	10
15	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ²	17	10	10	10	10
16	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ²	18	10	10	10	10
17	<i>C. pepo</i>	<i>P. capsici</i>	19	10	10	10	10
18	<i>C. pepo</i>	Mezcla de hongos ²	20	10	10	10	10
19	<i>C. pepo</i>	<i>P. capsici</i>	21	10	10	10	10
20	<i>C. pepo</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	22	10	10	10	10
21	<i>C. pepo</i>	<i>R. solani</i>	23	10	10	10	10
22	<i>C. argyrosperma</i>	Mezcla de hongos ²	24	10	10	10	10
23	<i>C. argyrosperma</i>	<i>R. solani</i>	25	10	10	10	10
24	<i>C. argyrosperma</i>	<i>R. solani</i>	26	10	10	10	10
25	<i>C. argyrosperma</i>	<i>P. capsici</i>	27	10	10	10	10

¹ Variedades obtenidas y reportadas por Aragón (2005).

² Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*)

La identidad de cada una de las plantas de las variedades resistentes utilizadas en esta investigación se detalla en el Cuadro 4; es importante mencionar que de algunas variedades no se contó con semilla de muchas plantas por variedad (para considerar las diez semillas que se sembraron por variedad). Por ejemplo, para la

variedad actual No. 2 solo se tenía semilla proveniente de las plantas resistentes uno y dos para ambos tipos (PL y autopolinización); otro ejemplo es la variedad actual No. 5 de la cual solo contó con semilla proveniente de la planta seis y solo de tipo de PL, de variedades identificadas por Aragón (2005), por lo que para esos casos se sembró semilla repetida para completar las diez semillas utilizadas, y de las variedades con sobres de semilla de plantas suficiente, se tomó una semilla de cada sobre correspondiente a plantas resistentes diferentes por variedad, como es el caso de la variedad actual No. 7 se sembró semilla de las plantas 40, 65, 116, 91, 16, 24, 33, 114, 115 y 36 provenientes de PL, y la misma variedad actual No. 7 se sembró la semilla de las plantas 24, 67, 114, 63, 119, 34, 20, 46, 59 y 117 obtenidas mediante autopolinización.

Es decir, cada variedad resistente tiene dos modalidades de procedencia de PL y de autopolinización, esperándose que la procedente de autopolinización produzca mayor frecuencia de plantas resistentes por efecto de la homocigosis que ocasiona dicha condición.

Cuadro 4. Identidad de semillas de plantas usadas por variedad de calabaza (*Cucurbita* spp) resistente a hongos que afectan la raíz encontradas por Aragón (2005), para corroborar su resistencia, UACH, 2008.

Num. de variedad actual	Tratamientos	Identidad de semillas de plantas resistentes utilizadas	
		Polinización libre (PL) ¹	Autopolinización (⊗) ¹
1	<i>F. oxysporum</i>	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
2	<i>F. oxysporum</i>	1, 2	1, 2
3	<i>R. solani</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
4	<i>R. solani</i>	1, 2, 6, 7, 8., 9, 10, 11, 13, 14	7, 9, 12,
5	<i>R. solani</i>	6	Sin semilla
6	<i>P. aphanidermatum</i>	3, 4, 5, 7, 8, 10, 11	1, 3, 4, 5, 7, 8, 10
7	<i>F. oxysporum</i>	16, 24, 33, 36, 40, 65, 91, 114, 115, 116	20, 24, 34, 46, 59, 63, 67, 114, 117, 119
8	<i>F. oxysporum</i>	9, 11, 16, 17, 19, 36, 44, 51, 52, 53	1, 5, 8, 9, 15, 20, 33, 35, 36, 39
9	<i>F. oxysporum</i>	47, 53, 86, 88, 92, 95, 100, 121, 147, 168	11, 13, 29, 35, 37, 91, 136, 142, 145, 201
10	<i>P. aphanidermatum</i>	2, 4, 5, 6, 11, 12, 15, 18, 21, 24,	3, 5, 20, 23
11	<i>P. aphanidermatum</i>	1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 16	4, 6, 9
12	<i>P. capsici</i>	1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14	2, 3, 6, 7, 14, 15, 31, 33, 34
13	<i>P. capsici</i>	1, 2, 3, 5, 6, 22, 36, 41, 46, 51	4, 8, 9, 12, 15, 20, 34, 49, 52
14	Mezcla de hongos ²	6, 11, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 29, 30	1, 3, 4, 5, 8, 13, 14, 21, 23, 28
15	Mezcla de hongos ²	2, 4, 5, 11, 23, 28, 33, 39, 43, 44	4, 19, 22, 23, 24, 25, 29, 31, 36, 39,
16	Mezcla de hongos ²	6, 9, 10, 13, 20, 21, 25, 34, 37, 48	1, 2, 3, 5, 6, 28, 29, 30, 39, 50
17	<i>P. capsici</i>	1, 5, 7, 9, 11, 12, 15, 17, 18, 19,	1, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18
18	Mezcla de hongos ²	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 29, 30
19	<i>P. capsici</i>	1, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 15, 17, 19	4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 15, 14, 18
20	<i>P. aphanidermatum</i>	1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13	Semilla revuelta sin etiqueta
21	<i>R. solani</i>	5, 6, 7, 8	1, 2, 3, 4
22	Mezcla de hongos ²	1	1, 2, 3, 4, 5
23	<i>R. solani</i>	1, 5, 8	1, 3, 5, 7, 8, 9, 10
24	<i>R. solani</i>	10, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 24	3, 8, 13, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 28
25	<i>P. capsici</i>	2, 3	1

¹ Los números de las columnas de polinización libre y autopolinización, corresponden a la planta resistente de la que proviene, cada una de las 10 semillas sembradas por variedad.

² Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*)

3.3.4.1 Pretratamiento de desinfección de la semilla y aplicación del inóculo

Previo a la siembra, la semilla se desinfectó, remojándola en una solución de cloro al 0.5% por tres min. La inoculación de los hongos se llevo acabo en forma de riego al sustrato aplicando 100 mL del inóculo por tratamiento (Cuadro 5), se hicieron dos aplicaciones en fechas distintas, la primera inoculación se llevó a cabo durante la siembra, para lo cual primero se realizó un riego al sustrato con la finalidad de facilitar la diseminación del inóculo. A los 15 días después de la siembra (dds) se realizó la segunda aplicación del inóculo para asegurar mayor contacto del patógeno con la semilla y las plántulas ya emergidas y evitar resistencia por escape.

Una vez emergidas las plántulas se realizaron conteos cada semana hasta los 20 dds, posteriormente se realizaron los conteos cada 15 dds, hasta los 50 dds, para determinar el porcentaje de germinación y se llevaron acabo las observaciones correspondientes de sintomatología, por plántula y charola.

Cuadro 5. Tratamientos utilizados en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) resistentes a hongos que afectan la raíz, encontradas por Aragón (2005), para corroborar su resistencia, UACH, 2008.

Tratamiento	Hongos inoculados	Num. de variedad actual	Número de charolas inoculadas		
			PL	⊗	Total
1	<i>F. oxysporum</i>	1, 2, 7, 8, 9	5	5	10
2	<i>R. solani</i>	3, 4, 5, 21, 23, 24	6	5	11
3	<i>P. aphanidermatum</i>	6, 10, 11, 20	4	4	8
4	<i>P. capsici</i>	12, 13, 17, 19, 25	5	5	10
5	Mezcla de hongos ¹	14, 15, 16, 18, 22	5	5	10

¹ Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*).

PL: Polinización libre; ⊗: Autopolinización.

3.3.5 Transplante de plantas resistentes

El transplante de las plantas resistentes obtenidas de la corroboración de la resistencia, se realizó con la finalidad de obtener semilla por medio de autopolinización para asegurar la disponibilidad de material genético útil en futuras investigaciones.

El transplante de las plantas que resultaron resistentes en la confirmación de la resistencia, se llevo a cabo a los 50 dds; se transplantaron en bolsas negras de cinco kilogramos, con una mezcla de 50% de arena de tezontle para favorecer la aireación y 50% de suelo, esta mezcla no fue esterilizada, tampoco se perforaron las bolsas para evitar escape del inóculo y contaminar el invernadero con los hongos inoculados. El transplante se realizó sin perder la identidad de cada una de las plantas resistentes (Cuadro 6).

Las plantas fueron llevadas hasta su fructificación con el manejo correspondiente, este consto de nutrición aplicada en forma de solución nutritiva y aplicaciones de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades, las guías fueron conducidas por medio de tutores para facilitar su manejo; los frutos obtenidos durante esta etapa fueron de autopolinización.

Las plantas de las variedades correspondientes a la especie *C. pepo*, todas resultaron susceptibles (tanto de PL como las de autopolinización), por lo que no aparecen en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Identidad de plantas resistentes de calabaza (*Cucúrbita* spp) obtenidas de la corroboración de la resistencia y transplantadas a invernadero para incremento de semilla. UACH, 2008.

Procedencia					
Polinización Libre (PL)			Autopolinización (⊗)		
Num. de variedad actual	No. de identidad de plantas resistentes	Especie	Num. de variedad actual	No. de identidad de plantas resistentes	Especie
1	1, 2, 4, 6(2), 9, 10, 11,	<i>C. ficifolia</i>	1	9(2), 5, 1, 7, 8(2), 6	<i>C. ficifolia</i>
2	1(4), 2(3)		2	1, 2	
3	2, 6, 7, 3, 1(2)		3	1(2), 3, 6(2), 7, 2, 4, 5	
4	8, 10, 9, 1, 2, 6, 13, 11, 7		4	7(3), 12(3), 9(2)	
5	6(8)		6	8(2), 10, 1(2), 3, 7	
6	4, 1(2), 7, 5, 10, 8(2), 11		7	24, 67, 114, 63, 119	<i>C. moschata</i>
7	36, 114, 33, 24, 16, 91, 116, 65, 40	<i>C. moschata</i>	8	5, 9, 20, 35, 36, 1, 8, 15, 33	
8	36, 11, 9, 51, 16, 17, 44		9	145, 201, 37, 91, 13, 29, 35, 142	
9	53, 147, 95, 100, 86, 47, 168, 92, 88, 121		10	3(2), 20, 5, 23(3)	
10	6, 2, 4, 11, 12, 18, 15		11	6(2), 9(2), 4(2)	
11	10, 9, 1(2), 3, 16, 11, 7, 2		12	6, 34, 2, 14(2), 15, 33, 31,	
12	14, 9, 7, 8, 2, 5		13	12, 34, 8,	
13	3, 36, 41, 46, 6, 1, 2		14	13, 21, 1, 14, 23, 4, 5, 28, 8	
14	20, 23, 11, 15, 22, 29, 30, 6		15	39, 31, 22, 25, 19, 29, 4	
15	5, 33, 39, 28, 2, 23, 4, 11		16	39, 3, 5, 6, 29, 2, 50	
16	25, 48, 34, 20, 13, 37, 6, 21		22	1, 4	<i>C. argyrosperma</i>
23	8(4)	<i>C. argyrosperma</i>	23	8, 9, 5	
			24	8, 18, 13	
			25	1(4)	

Nota: El número que aparece entre paréntesis, indica las plantas que tuvieron más de una planta resistente en transplante, encontradas en la corroboración de la resistencia.

3.3.6 Variables estudiadas en la fase de campo

Las variables estudiadas en esta primera etapa del experimento fueron las siguientes:

- Porcentaje de germinación (%): esta variable se obtuvo del total las plántulas germinadas dividido entre el total de semillas sembradas por variedad y multiplicado por 100.
- Porcentaje de incidencia (%): para esta variable se consideró, el número total de plantas que presentaron síntomas (enfermas) más el total de plantas muertas, divididas entre el total de la población por variedad, multiplicado por 100.
- Porcentaje de plantas resistentes (%): Es el total de plantas resistentes (125 dds), por 100 entre el total de plantas geminadas.

Las evaluaciones del porcentaje de germinación se realizaron a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds), tanto para las variedades tratadas con los hongos, como para los testigos. Mientras que para el porcentaje de incidencia se realizaron cinco evaluaciones a los 10, 15, 20, 35 y 50 días después de la siembra (dds), esta variable sólo se consideró en las variedades que fueron inoculadas con los hongos patogénicos. Por otro lado, la variable porcentaje de plantas resistentes fue considerada a los 125 dds.

Los síntomas tomados en cuenta para registrar la incidencia fueron: escasa germinación de las semillas, con respecto a la germinación de los testigos, así como la presencia de la misma semilla y que tuvieran micelio de los hongos inoculados.

En semillas que si germinaron y que generaron plántulas, los síntomas fueron: radícula o plúmula con pudrición, plántulas dobladas, plántulas con lesiones en el cuello como pudriciones, grietas y constricción, así como la presencia de micelio, en cualquier estructura de la plántula (cotiledones, cuello y raíz), plántulas muy chicas y raquíticas y plántulas muertas; plantas con clorosis, marchitamiento y senescencia de las hojas.

En las plantas que resultaron resistentes en la verificación y que fueron transplantadas en invernadero para incremento de semilla, y que en algún momento de la etapa adulta presentaron síntomas o murieron por efecto de hongos, se les hizo aislamientos en medio de cultivo de PDA, para identificar las causas de los síntomas o de la muerte.

3.4. Fase de laboratorio de análisis molecular

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

3.4.1 Colecta y manejo del material vegetal para análisis de ADN

La colecta del material vegetal se llevó a cabo en etapa de plántula (40 dds) previo al transplante y posterior a la evaluación de la incidencia, por ello se colectó material vegetal tanto de las plantas de las variedades que resultaron resistentes como de las susceptibles antes de morir, esto evitó la pérdida de los materiales que resultaron susceptibles y que murieron por efecto del ataque de los hongos inoculados y permitió tener puntos de referencia para comparación de diferencias contra las variedades resistentes.

Las muestras colectadas se almacenaron en bolsas de plástico, etiquetadas e identificadas por planta (clave de identificación de muestras: ejemplo 2-5 PL, el primer número indica el número de la variedad; el segundo número indica el número de identidad de la planta dentro de la variedad y el símbolo indica la procedencia (polinización libre (PL) o autopolinización (X)). Las muestras fueron transportadas al laboratorio dentro de una hielera, cuidando que no hubiera contacto directo entre el tejido vegetal y el hielo para evitar quemaduras y oxidación.

Las muestras colectadas fueron almacenadas a -20° C, esto permitió conservarlas y que no sufrieran oxidación ni degradación del ADN, por enzimas endonucleasas que se encuentran naturalmente en las células; posteriormente se liofilizaron las muestras.

3.4.2 Extracción y conservación del ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN a 38 variedades de calabaza resistentes (19 variedades de PL: 6 de *C. ficifolia*, 10 de *C. moschata* y 3 de *C. argyrosperma*. 19 variedades de autopolinización: 5 de *C. ficifolia*, 10 de *C. moschata*, 4 de *C. argyrosperma*) y 43 variedades susceptibles (21 variedades de PL: 5 de *C. ficifolia*, 9 de *C. moschata*, 4 de *C. pepo* y 3 de *C. argyrosperma*. 22 variedades de autopolinización: 5 de *C. ficifolia*, 9 de *C. moschata*, 5 de *C. pepo* y 3 de *C. argyrosperma*). Nótese que de cada variedad actual se tienen tanto variedades resistentes como susceptibles, debido a que son materiales segregantes (Cuadro 7).

Se hizo una mezcla de cuatro plantas por cada una de las variedades (tanto resistentes como susceptibles) para la extracción, tomando un total de 0.03 g de tejido liofilizado, por cada muestra.

Cuadro 7. Variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, obtenidas de la confirmación de la resistencia. UACH, 2008.

Num. de variedad actual	Especie	Tratamiento	Variedades de calabaza			
			Resistentes		Susceptibles	
			PL	⊗	PL	⊗
1	<i>C. ficifolia</i>	<i>F. oxysporum</i>	X	X	X	X
2	<i>C. ficifolia</i>	<i>F. oxysporum</i>	X	X	X	X
3	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	X	X	X	X
4	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	X	X	X	X
5	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	--	X	--	--
6	<i>C. ficifolia</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	X	X	X	X
7	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	X	X	X	X
8	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	X	X	X	X
9	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	X	X	X	X
10	<i>C. moschata</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	X	X	X	X
11	<i>C. moschata</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	X	X	X	X
12	<i>C. moschata</i>	<i>P. capsici</i>	X	X	X	X
13	<i>C. moschata</i>	<i>P. capsici</i>	X	X	X	X
14	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ¹	X	X	X	X
15	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ¹	X	X	--	X
16	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ¹	X	X	X	--
17	<i>C. pepo</i>	<i>P. capsici</i>	--	--	--	X
18	<i>C. pepo</i>	Mezcla de hongos ¹	--	--	X	X
19	<i>C. pepo</i>	<i>P. capsici</i>	--	--	X	X
20	<i>C. pepo</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	--	--	X	X
21	<i>C. pepo</i>	<i>R. solani</i>	--	--	X	X
22	<i>C. argyrosperma</i>	Mezcla de hongos ¹	X	X	X	X
23	<i>C. argyrosperma</i>	<i>R. solani</i>	X	X	X	X
24	<i>C. argyrosperma</i>	<i>R. solani</i>	X	X	X	X
25	<i>C. argyrosperma</i>	<i>P. capsici</i>	X	--	--	--

¹Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*).

PL: Polinización libre; ⊗: Autopolinización.

Nota: la X, indica la presencia de plantas resistentes y/o susceptibles en cada variedad actual y el guión (--), indica la ausencia de plantas resistentes y/o susceptibles en cada variedad actual.

3.4.2.1 Método combinado de extracción de ADN.

El método de extracción empleado fue el modificado por Rojas–Martínez (1998), conocido como método combinado: MLO (Lee *et al.*, 1991) y CTAB 3% (Ahrens y Seemüller, 1992), que considera los siguientes pasos:

- 1) El tejido liofilizado se coloca en un mortero estéril frío (0.03 g por muestra).
- 2) Se agregan 2.0 mL de MLO por muestra: para 100 mL de MLO, se requiere 2.17 g de K₂HPO₄, 0.41 g de KH₂PO₄, 10.0 g de Sucrosa, 0.15 g de BSA (Albúmina, Bovine), 2.0 g de PVP (Polyvinilpyrrolidone) y 0.53 g de Ac. ascórbico
- 3) Transferir la mezcla a un tubo Eppendorf de 2.0 mL.
- 4) Centrifugar a 8,000 rpm durante 15 min, decantar el sobrenadante.

- 5) Agregar 800 μL de la solución CTAB 3% (para preparar 100 mL de solución se requiere, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 1.576 g, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, pH 8.0, 0.76 g; CTAB 3.0 g, NaCl 1.4 M 8.1 g; β -Mercaptoetanol 0.02% 200 μL).
- 6) Incubar a 60° C por 60 min
- 7) Adicionar un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar.
- 8) Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min.
- 9) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 10) Adicionar un volumen de isopropanol frío, mezclar suavemente por inversión siete veces.
- 11) Incubar a -20° C durante 60 min., o toda la noche para precipitar el ADN para que se forme una "pastilla".
- 12) Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min. y decantar sobrenadante (incubar hasta que seque la "pastilla" a 37° C o a temperatura ambiente).
- 13) Resuspender la "pastilla" con 50 μL de agua destilada estéril (stock de ADN).
- 14) Verificar el estado físico del ADN en un gel de agarosa por electroforesis y visualizarlo en un transiluminador.

El ADN extraído de cada una de las muestras tanto de las variedades resistentes como susceptibles fue almacenado para su conservación en un congelador a -20° C.

3.4.3. Lavado de pastilla de ADN

Las "pastillas" de ADN que se obtuvieron sucias u oxidadas, se lavaron con 800 μL de etanol al 70% frío y se centrifugaron a 14000 rpm por cinco min. Decantando el etanol, esto se realizó dos veces, por muestra.

Cuando las "pastillas" de ADN no quedaban limpias, con el lavado con etanol al 70% frío, se procedió a realizar lavados con 80 a 100 μL de acetato de sodio al 0.5 M (pH 5.2), alternando con el etanol al 70% frío, sucesivamente hasta lograr una "pastilla" clara y translúcida.

3.4.4 Calidad del ADN

La integridad del ADN, se comprobó mediante electroforesis para lo cual se preparó un gel de agarosa al 1%. En cada uno de los pozos del gel se colocó una mezcla compuesta de 5 μL de solución stock del ADN y 1.5 μL de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol FF 0.25% y glicerol al 30%) de cada una de las extracciones realizadas. El buffer de corrida utilizado fue TAE 1X (TAE 50X: Tris base 242 g; ácido acético glacial 57.1 mL y EDTA 0.5 M, pH 8.0 100 mL aforado a un litro de buffer amortiguador), la electroforesis se corrió a 95 Volts durante 30 min, después de este tiempo el gel se tiñió con bromuro de etidio (1 μL de Bromuro de etidio [10 mg mL^{-1}] por cada 100 mL de gel de agarosa).

Las imágenes de los geles fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta Modelo Gel-Doc 2000, BIO RAD® y analizadas con el programa Quantity One 4.0.3, incluido en el equipo.

La imagen que se obtuvo reflejó bandas uniformes e integras de ADN a los 12000 pb, aproximadamente, esto corroboró la integridad del ADN, y se procedió a hacer las diluciones 1:20 del ADN con agua inyectable estéril. Se obtuvo una concentración final aproximada de $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN en cada una de las variedades resistentes y susceptibles.

3.4.5 Estandarización de condiciones de PCR para generar RAPD, Microsatélites y RAMP

3.4.5.1 Iniciadores para RAPD

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 cuatro iniciadores (OPA: 10, 13, 15, 19) para su uso en RAPD, estos cuatro iniciadores presentaron el mejor polimorfismo y marcaron diferencias considerables en el bandeo, con respecto a

los diez que no se seleccionaron. La secuencia de dichos iniciadores seleccionados se presenta a continuación:

1. OPA-10 (5'-GTGATCGCAG-3')
2. OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3')
3. OPA-15 (5'-TTCCGAACCC-3')
4. OPA-19 (5'-CAAACGTCGG-3')

3.4.5.2 Iniciadores para Microsatélites y RAMP

La estandarización de las condiciones de PCR para Microsatélites se llevo a cabo con el iniciador de secuencia repetida (GATA)₄ evaluando diferentes condiciones de termociclaje.

Para la técnica de RAMP, se utilizaron los cuatro iniciadores decámeros que tuvieron mejor amplificación en RAPD y el iniciador (GATA)₄ de los microsatélites. De esta forma las combinaciones quedaron de la siguiente manera:

1. OPA-10 + (GATA)₄
2. OPA-13 + (GATA)₄
3. OPA-15 + (GATA)₄
4. OPA-19 + (GATA)₄

3.4.5.3 Condiciones para la mezcla de reacción de la PCR

Para lograr la amplificación del ADN de las variedades estudiadas de calabaza (*Cucurbita* spp) en PCR, los componentes (reactivos) fueron conjugados en una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL de mezcla por tubo de PCR. Estos reactivos se mezclaron en el orden y concentración indicada en el Cuadro 8, el ADN se adicionó de manera individual a cada tubo según el número de variedad a evaluar; por lo que las condiciones de reacción, entre concentraciones finales y reactivos se presentan en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Condiciones de reacción para obtener RAPD, Microsatélites y RAMP de calabazas (*Cucurbita* spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz.

Reactivo	Concentración Stock	Volumen de reactivos <i>in vitro</i> (μL)	Concentración final de los reactivos
RAPD			
Amortiguador de reacción	10 X	2.5	1 X
MgCl ₂ (Cloruro de magnesio)	30 mM μL ⁻¹	1.75	2.1 mM μL ⁻¹
dNTP's	2.5 mM μL ⁻¹	0.5	0.05 mM μL ⁻¹ (50 μM μL ⁻¹)
Iniciador aleatorio	10 pmol μL ⁻¹	2.0	0.8 pmol μL ⁻¹
ADN polimerasa (Amplificasa®)	5 U μL ⁻¹	0.2	0.04 U μL ⁻¹
ADN genómico de cucurbitácea	20 ng μL ⁻¹	4.0	3.2 ng μL ⁻¹
Agua	--	14.05	--
Volumen final	--	25	--
Microsatélites			
Amortiguador de reacción	10 X	2.5	1X
MgCl ₂	30 mM μL ⁻¹	1.75	2.1 mM μL ⁻¹
dNTP's	2.5 mM μL ⁻¹	0.5	0.05 mM μL ⁻¹ (50 μM μL ⁻¹)
Iniciador (microsatélite)	10 pmol μL ⁻¹	2.0	0.8 pmol μL ⁻¹
ADN polimerasa (Amplificasa®)	5 U μL ⁻¹	0.2	0.04 U μL ⁻¹
ADN genómico de cucurbitácea	20 ng μL ⁻¹	4.0	3.2 ng μL ⁻¹
Agua	--	14.05	--
Volumen final	--	25	--
RAMP			
Amortiguador de reacción	10 X	2.5	1X
MgCl ₂	30 mM μL ⁻¹	1.75	2.1 mM μL ⁻¹
dNTP's	2.5 mM μL ⁻¹	0.5	0.05 mM μL ⁻¹ (50 μM μL ⁻¹)
Iniciador aleatorio	10 pmol μL ⁻¹	2.0	0.8 pmol μL ⁻¹
Iniciador (Microsatélite)	10 pmol μL ⁻¹	2.0	0.8 pmol μL ⁻¹
ADN polimerasa	5 U μL ⁻¹	0.2	0.04 U μL ⁻¹
ADN genómico de cucurbitácea	20 ng μL ⁻¹	4.0	3.2 ng μL ⁻¹
Agua	--	12.05	--
Volumen final	--	25	--

Para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un termociclador de la compañía BIO RAD®, serie 582BR. Las condiciones de termociclado para las técnicas empleadas se expresan en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Condiciones de termociclaje para amplificar RAPD, Microsatélites y RAMP, obtenidos de calabazas (*Cucurbita* spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
RAPD		
1	94° C	1'
38	94° C	30"
	35° C	30"
	72° C	1'30"
1	72° C	2'30"
	4° C	α
Microsatélites		
1	94° C	1'
40	94° C	40"
	40° C	1'
	72° C	1'
1	72° C	8'
	4° C	α
RAMP		
1	94° C	2'
35	94° C	1'
	50° C	2'
	72° C	3'
1	72° C	10'
	4° C	α

': Indica minutos; ": Indica segundos

3.4.6 Separación por electroforesis y visualización de los productos amplificados

Los productos de amplificación obtenidos a partir de los RAPD, microsatélites y RAMP fueron almacenados a -20° C, para su posterior separación por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 85 Volts, que se dejó correr durante 3 horas.

En cada uno de los pozos del gel (1.5% de agarosa) se colocó una mezcla compuesta de 5 µL de producto de reacción y 1.5 µL de buffer de carga azul. El buffer de corrida utilizado fue TAE 1X. Se incluyó un pozo con 0.7 µL de marcador de peso molecular 1 Kb (1 Kb Ladder, Invitrogen®, Figura 10) como referencia. 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 tomó con el programa Quantity One 4.0.3, incluido en el equipo de fotodocumentación. Los resultados se imprimieron en papel fotográfico para su posterior análisis.

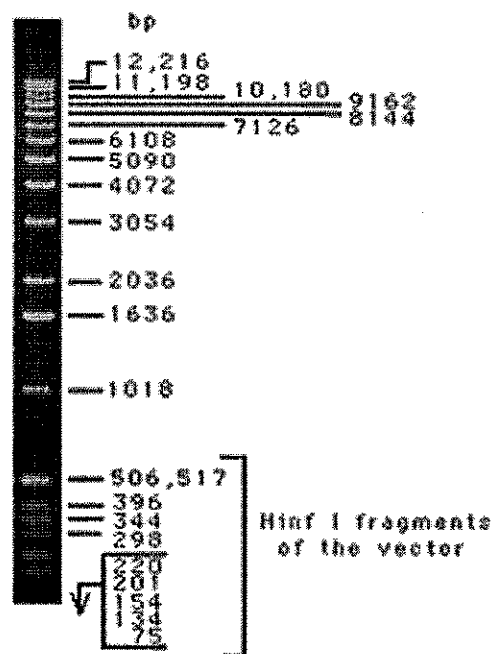


Figura 8. Visualización del tamaño de las bandas en pb que proporciona el marcador de peso molecular 1 Kb (Kilobase) Ladder, Invitrogen®. (0.5 µg/carril, en un gel de 0.9% agarosa, teñido con bromuro de estidio).

3.4.7 Análisis estadístico de datos

En el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el paquete computacional de NTSYS-pc versión 2.2R (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), el Software FreeTree (Freeware program for construction and bootstrap analysis off phylogenetic trees from binary data, Hampl, *et al.*, 2001) y TreeView Win32 (Taxonomy and systematics at glasgow), especialmente diseñados para el análisis estadístico de trabajos realizados con RAPD, Microsatélites y RAMP.

Las bandas obtenidas por cada una de las técnicas empleadas y en cada uno de los iniciadores usados se enumeraron en orden descendente a partir de la banda de mayor peso molecular que corre menos y se codificaron mediante el código binario, asignando un valor numérico: uno para denotar la presencia de la banda y cero a la ausencia de banda, conformando entonces una matriz básica de datos o matriz binaria que fue empleada para generar la matriz de disimilaridad genética mediante el coeficiente de DICE (el coeficiente de Dice (1945) o de Nei and Li (1979), 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 del doble del número de bandas compartidas sobre el total de bandas en ambos individuos), y de esta forma calcular la frecuencia de aparición de cada banda registrada, para obtener la matriz de las distancias genéticas entre las variedades tanto para las que resultaron resistentes como las susceptibles.

Los dendogramas de agrupación de las variedades de calabaza, tanto resistentes como susceptibles a los hongos que afectan la raíz, fueron derivados de la matriz de disimilaridad con el programa SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical Nested Cluster Analysis), Dunn and 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 confiabilidad del dendograma se probó mediante el método de remuestreo en las matrices de datos con Bootstrapping con un $\alpha=0.05$, en el módulo "Transformation/Resample" y "Transformation/Summary" con 2000 remuestreos y por medio de una matriz de comparación 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 con el paquete de NTSYS-pc 2.2R.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de la fase de invernadero y corroboración de la resistencia

En este estudio se consideraron como plantas resistentes a aquellas que sobrevivieron hasta el final de su ciclo biológico, aunque hayan presentado algún tipo de síntoma ocasionado por las inoculaciones de cada patógeno, en alguna de las etapas de su ciclo; y como plantas susceptibles, a las semillas de las variedades que no emergieron y a las plantas emergidas pero que murieron por causa de los hongos inoculados; es decir, que presentaron síntomas y que les siguió la muerte, en cualquier etapa de su ciclo. No todas las plantas calificadas como resistentes lograron producir frutos y semilla.

4.1.1 Síntomas observados en las plantas

Los síntomas se evidenciaron desde la germinación, las semillas no germinadas se cubrieron de micelio y presentaron pudrición, éstos síntomas fueron apreciados principalmente en los tratamientos que fueron inoculados con *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y la mezcla de los cuatro hongos.

Las semillas que si lograron germinar, presentaron germinación deficiente, es decir, hubo presencia de plúmula y radícula, pero esta se encontraba afectada con pudriciones secas y no se desarrollaron las plántulas. Las semillas que escaparon a los efectos de la primera inoculación, germinaron adecuadamente y generaron plántulas sanas, pero con la aplicación de la segunda inoculación, estas plántulas presentaron doblamiento por el efecto de los hongos, además de que se observaban muy pequeñas y/o raquíticas. En las plántulas los síntomas se presentaron cuando estas tenían entre tres y cuatro hojas verdaderas. Las plántulas presentaban algunas grietas y/o constricción en el cuello de su tallo y en algunos casos con micelio. Muchas plantas sanas y con síntomas lograron alcanzar la madurez fisiológica y produjeron semilla.

En las variedades que fueron inoculadas con *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y mezcla de hongos se apreciaron plantas con clorosis intensa y marchitamientos

progresivos de las hojas hasta llegar al tallo de la planta, después de la muerte, las hojas permanecieron adheridas al tallo, estos mismo síntomas se apreciaron en plantas adultas después del trasplante principalmente en el tratamiento con *F. oxysporum*, en la mayoría de los casos las plántulas y plantas que presentaron estos síntomas, murieron o simplemente no tuvieron producción de semilla por autopolinización (Cuadro 12), es decir, muy pocas llegaron a etapa productiva; al respecto, Lancaster (2000) reporta a *P. capsici* como un patógeno que inicia su incidencia en preemergencia, sin embargo, el mayor daño al igual que *F. oxysporum* lo ocasionó, posterior a la emergencia y en planta.

Esto pone de manifiesto la habilidad de los patógenos de atacar a las cuatro especies de *Cucurbita* spp (*C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo*, *C. argyrosperma*) (Cuadro 12) estudiadas en esta investigación; además, si se considera que las plantas inoculadas fueron extraídas de charolas para ser transplantadas, sin ningún tratamiento para la eliminación de los hongos inoculados y con suelo no estéril, los patógenos tuvieron la oportunidad de entrar en las posibles heridas ocasionadas a las raíces; al respecto, Agrios (1996), menciona que los hongos del complejo damping off, solo requieren de mínimos daños mecánicos en plántulas para establecerse e infectar a la planta.

F. oxysporum fue aislado de plantas con síntomas después del trasplante, éstos resultados concuerdan con los reportados por Lancaster (2000) y Aragón (2005), quienes indicaron que es característico de *F. oxysporum* que presente síntomas pos- emergentes e incluso en plantas adultas y en fructificación.

4.1.2 Porcentaje de germinación

Las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) que fueron inoculadas para corroborar la resistencia a hongos que ocasionan el damping off, presentaron menor porcentaje de germinación con respecto a los testigos, tanto para las variedades de PL, como para las de autopolinización, estos resultados pudieron deberse en gran medida al efecto de los hongos inoculados y posiblemente al número reducido de semillas que se utilizaron por variedad (diez semillas por variedad) ya que cada una que no nació representaba un 10% de falla. Se decidió

realizarlo con una cantidad de semilla reducida, debido a que no se contaba con suficiente semilla de las variedades resistentes para la desarrollar el experimento (Figuras 9-12).

Los testigos no tuvieron ninguna influencia, por factores externos, como contaminación en el sustrato por los hongos que se manejaron en la verificación de la resistencia u otro patógeno que pudiera alterar los resultados, ya que la germinación que presentaron fue incrementando en cada una de las observaciones (10, 15 y 20 dds) (Figuras 10 y 12). A pesar de que en muchas variedades inoculadas el porcentaje de germinación era alto durante los primeros días posteriores a la inoculación, los daños por efecto de los hongos aplicados fueron apareciendo después de los 15 dds por lo que para los 20 dds, se presentó un decremento en el número de plantas germinadas (Figuras 9 y 11).

Los resultados que se encontraron para el caso de la variable porcentaje de germinación, indican que las variedades provenientes de autopolinización fueron menos afectadas por la inoculación de los hongos, que las variedades provenientes de PL, ya que a los 20 días posteriores a la siembra de las semillas y después de las dos inoculaciones realizadas, las variedades presentaron reducciones en cuanto al número de plantas germinadas por efecto de los hongos; ya que en las variedades de autopolinización se apreciaron dos variedades (6 y 13), que fueron afectadas por los hongos después de los 15 dds y ocho variedades provenientes de PL (4, 6, 11, 12, 13, 17, 18 y 19) (Figuras 9 y 11; Cuadros 10 y 11); al respecto Aragón (2005), menciona que se espera que los materiales seleccionados como resistentes e incrementados vía autopolinización, produzcan en la progenie mayor frecuencia de plantas resistentes y sean menos segregantes para resistencia y en las variedades incrementadas por PL, se espera que presenten mayor segregación para resistencia.

Las dos variedades provenientes de autopolinización que presentaron efectos por la inoculación en el porcentaje de germinación a los 20 dds fueron: la variedad 6 que pertenece a la especie *C. ficifolia*, inoculada con *P. aphanidermatum* (porcentaje de germinación a los 15 dds de 90%, con una disminución de plantas germinadas de 10% para los 20 dds) y la variedad 13 de *C. moschata* inoculada

con *P. capsici* (porcentaje de germinación a los 15 dds de 100%, con una disminución de 10% para los 20 dds) (Figura 9; Cuadro 10).

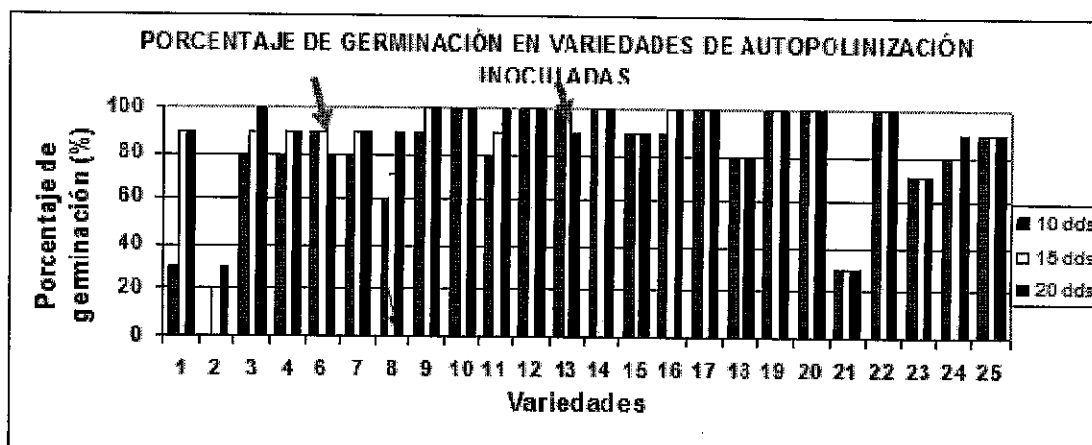


Figura 9. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de autopolinización, evaluadas a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds) para la corroboración de la resistencia.

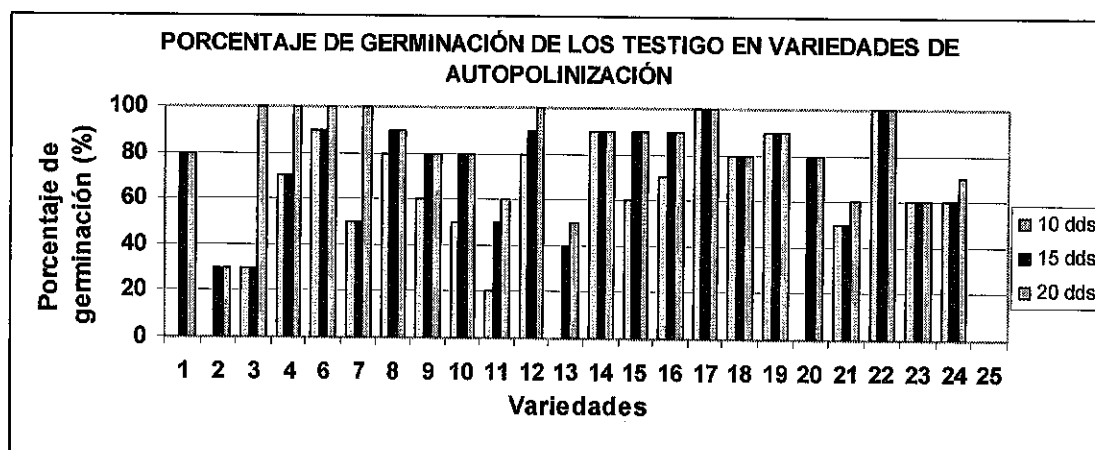


Figura 10. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de autopolinización, empleadas como testigo, en el experimento de confirmación de la resistencia, evaluados a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds).

Por otro lado, las ocho variedades provenientes de PL, afectadas en el porcentaje de germinación a los 20 dds por efecto de los patógenos inoculados, son las variedades 4 y 6 de *C. ficifolia* (10% de daño por *R. solani* y 20% de daño por *P. aphanidermatum*, respectivamente); la 11, 12 y 13 de *C. moschata* (la variedad 11 presentó 10% de daño por *P. aphanidermatum* y la 12 y 13 presentaron 10% y

40% de daño por *P. capsici*, respectivamente), la 17, 18 y 19 de *C. pepo* (las variedades 17 y 19 tuvieron daños de 20% y 30% por *P. capsici*, respectivamente, y la 18 presentó 40% de daños por la mezcla de hongos) (Figura 11; Cuadro 12).

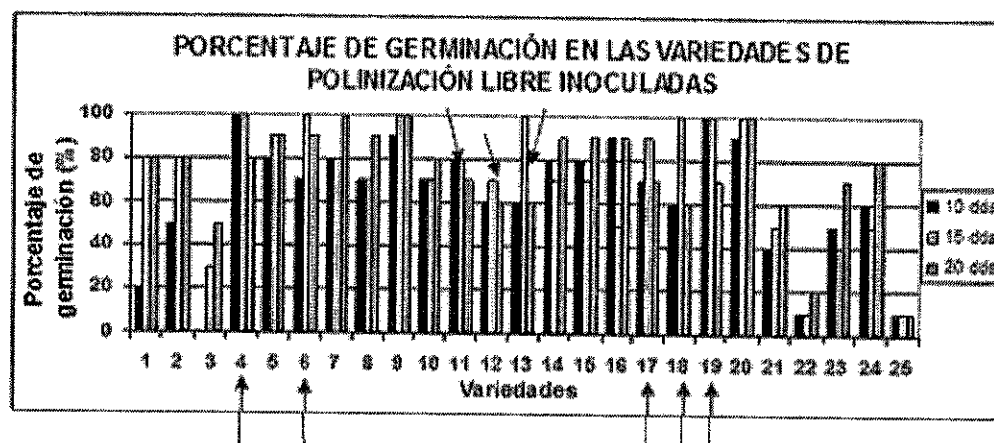


Figura 11. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de polinización libre, evaluadas a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds), para la verificación de la resistencia.

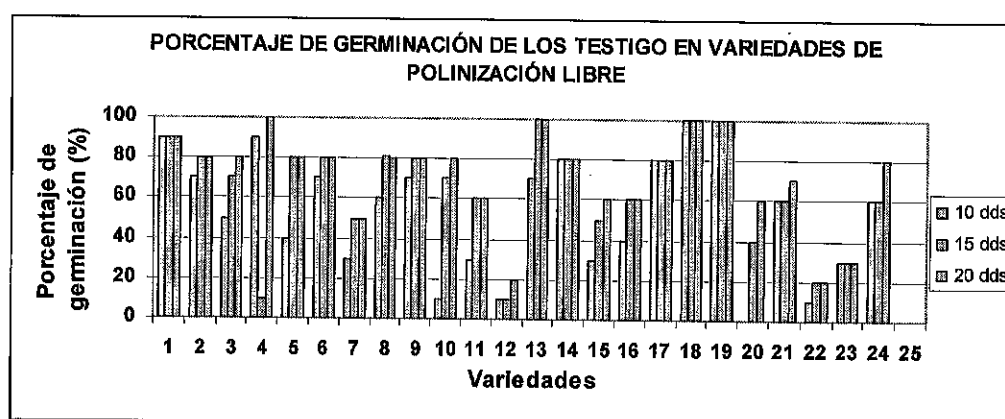


Figura 12. Porcentaje de germinación en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de polinización libre, empleadas como testigo en el experimento de la verificación de la resistencia, evaluados a los 10, 15 y 20 días después de la siembra (dds).

Cuadro 10. Porcentaje de germinación en los tratamientos y testigos, provenientes de autopolinización, en variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) evaluadas para la verificación de la resistencia.

Num. de Variedad actual	Especie	Hongo inoculado	Porcentaje de germinación (%)					
			Autopolinización					
			Tratamientos			Testigo		
			Días después de la siembra					
			10	15	20	10	15	20
1	C. ficifolia	F. oxysporum	30	90	90	0	80	80
2	C. ficifolia	F. oxysporum	0	20	30	0	30	30
3	C. ficifolia	R. solani	80	90	100	30	30	100
4	C. ficifolia	R. solani	80	90	90	70	70	100
5	C. ficifolia	R. solani	--	--	--	--	--	--
6	C. ficifolia	P. aphanidermatum	90	90	80	90	90	100
7	C. moschata	F. oxysporum	80	90	90	50	50	100
8	C. moschata	F. oxysporum	60	70	90	80	90	90
9	C. moschata	F. oxysporum	90	100	100	60	80	80
10	C. moschata	P. aphanidermatum	100	100	100	50	80	80
11	C. moschata	P. aphanidermatum	80	90	100	20	50	60
12	C. moschata	P. capsici	100	100	100	80	90	100
13	C. moschata	P. capsici	100	100	90	0	40	50
14	C. moschata	Mezcla de hongos ¹	100	100	100	90	90	90
15	C. moschata	Mezcla de hongos ³	90	90	90	60	90	90
16	C. moschata	Mezcla de hongos ¹	90	100	100	70	90	90
17	C. pepo	P. capsici	100	100	100	100	100	100
18	C. pepo	Mezcla de hongos ¹	80	80	80	80	80	80
19	C. pepo	P. capsici	100	100	100	90	90	90
20	C. pepo	P. aphanidermatum	100	100	100	0	80	80
21	C. pepo	R. solani	30	30	30	50	50	60
22	C. argyrosperma	Mezcla de hongos ¹	100	100	100	100	100	100
23	C. argyrosperma	R. solani	70	70	70	60	60	60
24	C. argyrosperma	R. solani	80	80	90	60	60	70
25	C. argyrosperma	P. capsici	90	90	90	0	0	0

¹ Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*).

PL: indica las variedades provenientes de polinización libre; ⊗: indica las variedades provenientes de autopolinización.

Cuadro 11. Porcentaje de germinación en los tratamientos y testigos, provenientes de polinización libre, en variedades de calabaza (*Cucurbita spp.*) evaluadas para la verificación de la resistencia.

Num. de Variedad actual	Especie	Hongo inoculado	Porcentaje de germinación (%)					
			Polinización libre					
			Tratamientos			Testigo		
			Días después de la siembra					
			10	15	20	10	15	20
1	<i>C. ficifolia</i>	<i>F. oxysporum</i>	20	80	80	90	90	90
2	<i>C. ficifolia</i>	<i>F. oxysporum</i>	50	80	80	70	80	80
3	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	0	30	50	50	70	80
4	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	100	100	80	90	10	100
5	<i>C. ficifolia</i>	<i>R. solani</i>	80	90	90	40	80	80
6	<i>C. ficifolia</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	70	100	90	70	80	80
7	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	80	80	100	30	50	50
8	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	70	70	90	60	80	80
9	<i>C. moschata</i>	<i>F. oxysporum</i>	90	100	100	70	80	80
10	<i>C. moschata</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	70	70	80	10	70	80
11	<i>C. moschata</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	80	80	70	30	60	60
12	<i>C. moschata</i>	<i>P. capsici</i>	60	70	60	10	10	20
13	<i>C. moschata</i>	<i>P. capsici</i>	60	100	60	70	100	100
14	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ¹	80	70	90	80	80	80
15	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ³	80	70	90	30	50	60
16	<i>C. moschata</i>	Mezcla de hongos ¹	90	50	90	40	60	60
17	<i>C. pepo</i>	<i>P. capsici</i>	70	90	70	80	80	80
18	<i>C. pepo</i>	Mezcla de hongos¹	60	100	60	100	100	100
19	<i>C. pepo</i>	<i>P. capsici</i>	100	100	70	100	100	100
20	<i>C. pepo</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	90	100	100	0	40	60
21	<i>C. pepo</i>	<i>R. solani</i>	40	50	60	60	60	70
22	<i>C. argyrosperma</i>	Mezcla de hongos ¹	10	10	20	10	20	20
23	<i>C. argyrosperma</i>	<i>R. solani</i>	50	40	70	30	30	30
24	<i>C. argyrosperma</i>	<i>R. solani</i>	60	50	80	60	60	80
25	<i>C. argyrosperma</i>	<i>P. capsici</i>	10	10	10	0	0	0

¹ Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*).

PL: indica las variedades provenientes de polinización libre; ⊗: indica las variedades provenientes de autopolinización.

En esta investigación se contó con tres variedades S_2 (con un 75% de endogamia; es decir, que llevaban dos ciclos de selección y producción de semilla con autopolinización: la variedad 4 de *C. ficifolia* inoculada con *R. solani*, la variedad 13 de *C. moschata* inoculada con *P. capsici* y la variedad 24 de *C. argyrosperma* inoculada con *R. solani*, ver Cuadro 1), obtenidas por Pérez (2002) y Aragón (2005), por lo que en estos resultados se espera que por lo menos estas tres variedades, sobresalgan por su grado de estabilidad y frecuencia de plantas resistentes.

La variedad 4, a pesar de que cuenta con dos autofecundaciones (S_2) con 75% de endogamia, aún presentó segregación a la resistencia (20% de daño a los 20 dds), por *R. solani*, al igual que la variedad 13 inoculada con *P. capsici* (10% de daño a los 20 dds), mientras que en la misma variedad 13, pero proveniente de PL, la segregación fue más marcada (40% de daño a los 20 dds), con respecto a estos resultados, Aragón (2005), destacó que la autopolinización fija los genes de resistencia al damping off en calabaza (*Cucurbita* spp) (Cuadros 10 y 11).

4.1.3 Porcentaje de incidencia en promedio de variedades

El hongo *P. capsici* presentó el mayor porcentaje de incidencia en todas las fechas de evaluación, en promedio de las 24 variedades provenientes de autopolinización y 25 variedades de PL, alcanzando porcentajes arriba al 70% en la última fecha de evaluación (50 dds; Figuras 13 y 14), seguido por la mezcla de hongos, tratamiento que en la segunda fecha de evaluación (15 dds), alcanzó su máxima incidencia (30%, para las variedades de autopolinización y 60% en las de PL). Se encontró un comportamiento similar en ambos tratamientos, esta tendencia pudo deberse a efectos de *P. capsici* más que a el resto de los hongos en la mezcla (Figuras 13 y 14); al respecto Pérez (2002) y Aragón (2005), en trabajos similares en calabaza reportan a *P. capsici* y a la mezcla de hongos como los más agresivos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici*), pero que los efectos que se presentaron en la mezcla de hongos se expresaron debido a la virulencia de *P. capsici*, ya que el comportamiento fue similar.

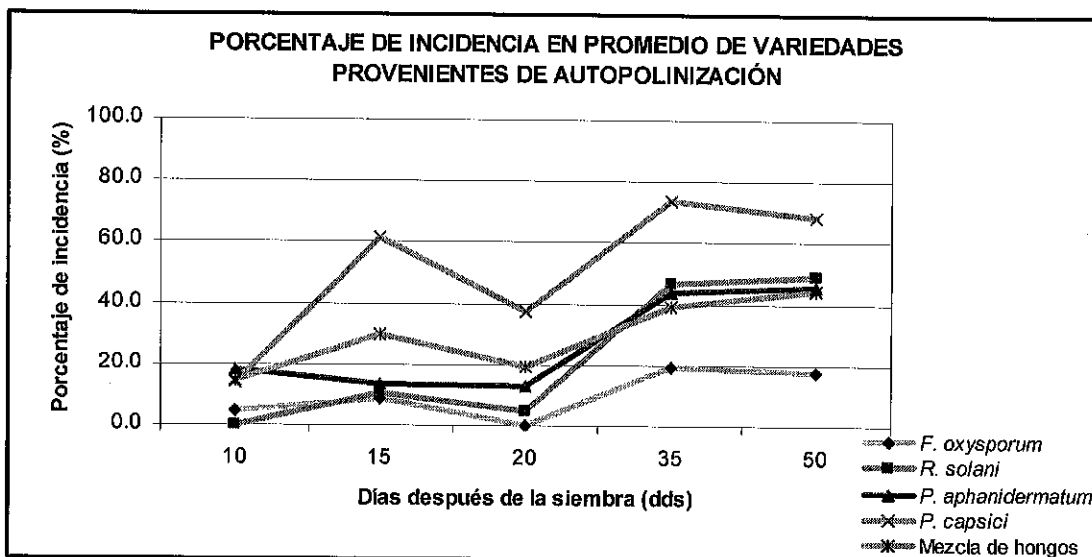


Figura 13. Porcentaje de incidencia por fecha, provocada por los hongos que afectan la raíz en promedio de variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de autopolinización.

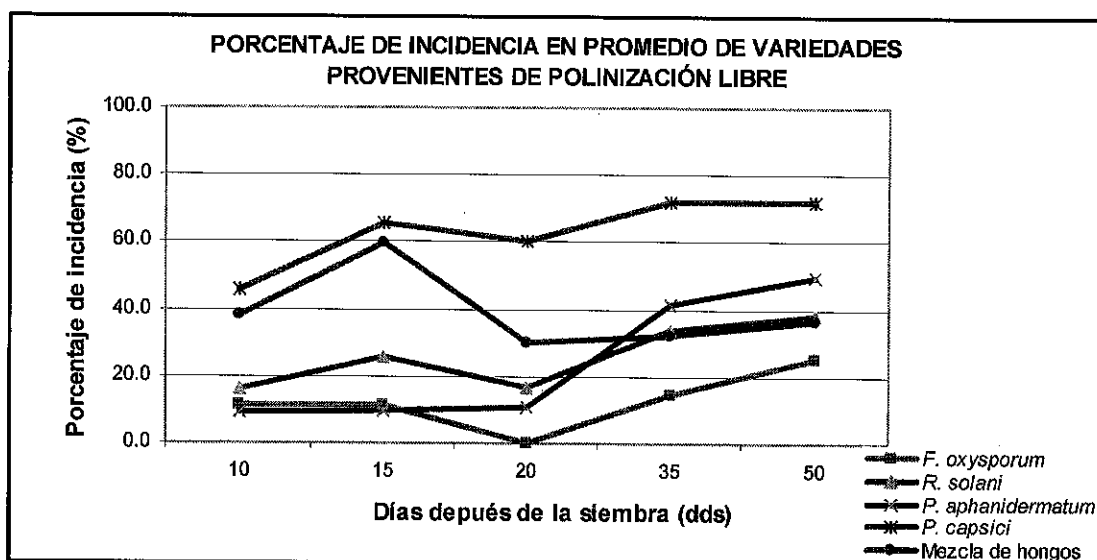


Figura 14. Porcentaje de incidencia por fecha, provocada por los hongos que afectan la raíz en promedio de variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de polinización libre.

La mayor resistencia a hongos en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) se presentó en el tratamiento que se inoculó con *F. oxysporum* ya que este patógeno, tuvo las menores incidencias (0% a 25%; Figuras 13 y 14), que el resto de los patógenos evaluados (Figura 13).

En general, se observó que en las 49 variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) después de la primera inoculación de los hongos (al momento de la siembra) se presentaron porcentaje de incidencia bajos (Figuras 13 y 14); pero la presencia de síntomas que se refleja en el porcentaje de incidencia, fue más notoria conforme pasaron los días ya que aumentó, debido a que los hongos permanecieron en contacto con las plantas y tuvieron mas tiempo para establecerse y provocar daño; resultados similares fueron reportados por Pérez (2002), quien indica que la incidencia de los patógenos se incrementa a medida que pasa el tiempo por aumento en la virulencia de los hongos.

El único tratamiento que no presentó esta tendencia fue la mezcla de hongos en las variedades de PL (Figura 13), ya que se apreció un decremento en la incidencia a los 15 dds (de 60% a 30%), sin incrementar su porcentaje de incidencia hasta la ultima evaluación; sin embargo, en el resto de los tratamientos también es posible apreciar un decremento a los 20 dds, o altibajos en la tendencia del porcentaje de incidencia, pero manteniéndose un incremento en el porcentaje de incidencia. Esto pudo deberse probablemente a que en alguna evaluación se consideraron de forma errónea a plantas un poco marchitas y dobladas por déficit hídrico, como plantas con síntomas provocados por los hongos inoculados, síntomas que no fueron constante en la toma de datos, por ello se apreciar este efecto en la tendencia del porcentaje de incidencia.

4.1.3.1 Variedades de autopolinización

Las variedades provenientes de autopolinización, a los 50 dds tuvieron porcentajes de incidencia del 100% en las variedades que pertenecen a la especie *C. pepo* (Figura 15), esto indica que resultaron ser las más susceptibles a los hongos que se inocularon.

Por otro lado, las variedades 8 y 9 fueron las más resistentes, en este caso a *F. oxysporum*, ya que no presentaron incidencia (0%) (Figura 15).

El resto de las variedades tuvieron porcentajes de incidencia menores al 70% y mayores al 10%, por lo que la resistencia a los patógenos inoculados se aprecia considerablemente (Figura 15).

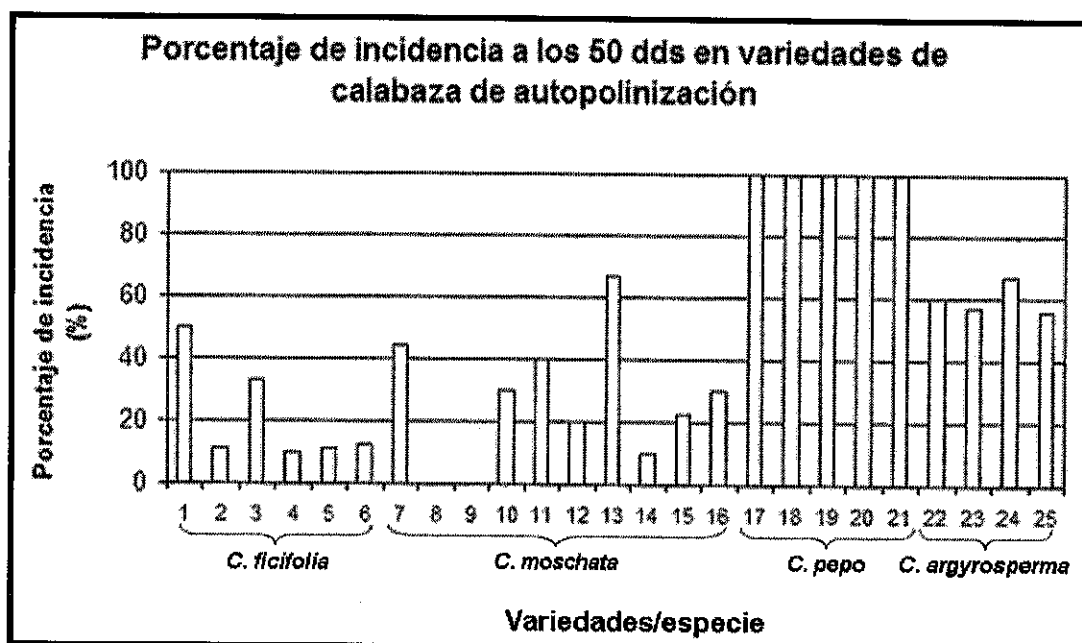


Figura 15. Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, en variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de autopolinización a los 50 dds.

El comportamiento ante las inoculaciones, que tuvieron las variedades de calabaza (*C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo*, *C. argyrosperma*) en forma general fue distinto entre ellas, se puede considerar que *C. ficifolia*, de las cuatro especies es la mas resistentes debido a que la mayoría de las variedades que la conforman presentaron un porcentaje menor de incidencia y un número mayor de plantas sobrevivientes (Figura 16), esto se puede explicar debido a la rusticidad que la especie tiene, en comparación con el resto de las otras tres especies.

Es importante mencionar a la variedad 4 (resistente a *R. solani*), en este caso en particular, ya que es una variedad que ha tenido dos ciclos de autopolinización, es decir que cuenta con una frecuencia de homocigosis del 75%, presentó poca segregación a la resistencia, ya que su comportamiento en cuanto al porcentaje de incidencia fue bajo (10% a los 50 dds; Figuras 15 y 16), con un porcentaje considerable de plantas resistentes obtenidas (88.9%; Cuadro 12), por lo que en

particular en esta variedad se puede decir que los genes de resistencia a *R. solani*, se han ido fijando por efecto de autopolinizaciones.

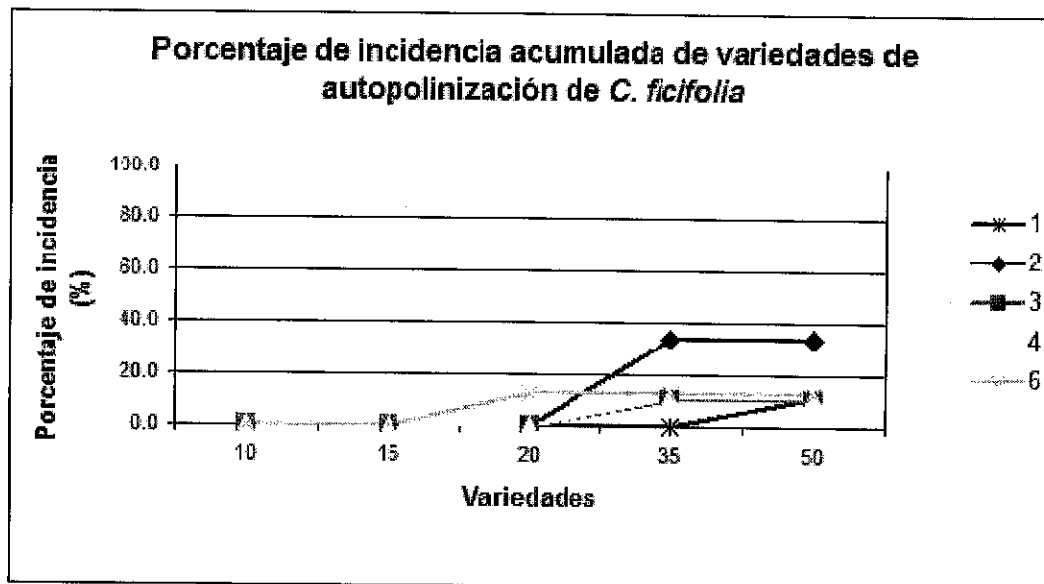


Figura 16. Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades de *C. ficifolia* provenientes de autopolinización.

Las variedades de *C. moschata*, se podrían considerar como variedades resistentes y tolerantes a los hongo inoculados, ya que la mayoría de su variedades se encuentran con porcentajes de incidencia entre un rango de 0% a 60% (Figura 17).

En el caso de la variedad 13 (resistente a *P. capsici*), ya que en el mismo caso que la variedad 4, ha tenido dos ciclos de autopolinización, es decir que cuenta con una frecuencia de homocigosis del 75%, ésta aún presenta segregación a la resistencia, ya que su comportamiento en cuanto al porcentaje de incidencia fue mayor (66.7% a los 50 dds. Figuras 15 y 17), con respecto al resto de las variedades que conforman a *C. moschata*, en la cual se puede apreciar que a pesar de que *P. capsici*, es de los hongos que presentó los porcentajes de incidencia mayores (63.2% y 51% a los 50 dds; Figuras 13 y 14) con respecto al resto de los patógenos, esta variedad, logró tener un porcentaje de plantas resistente considerable 33.3% (Cuadro 12).

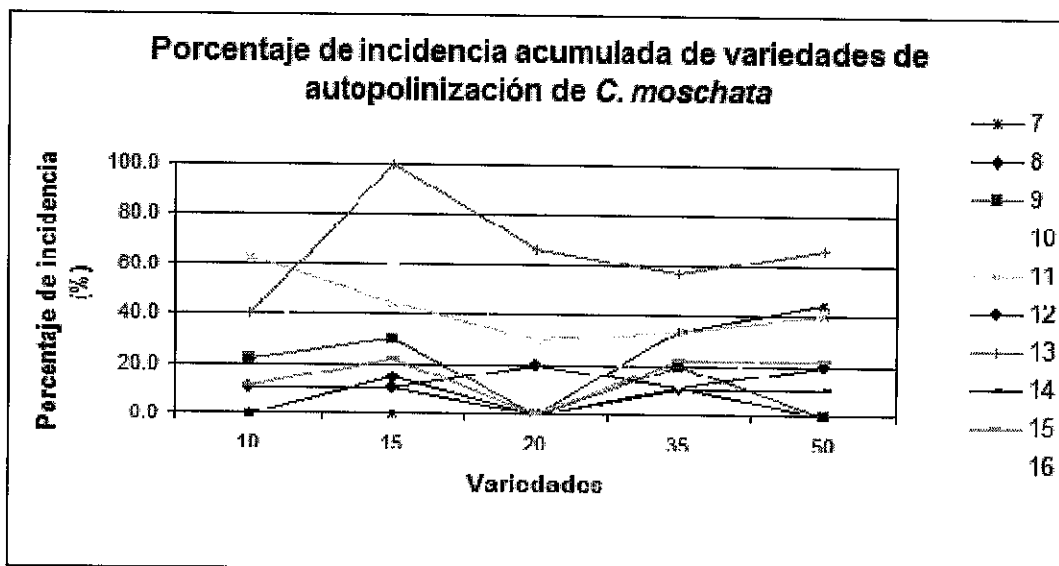


Figura 17. Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades *C. moschata* de autopolinización.

C. argyrosperma se puede considerar como una especie medianamente resistente, ya que los porcentajes de incidencia que se presentaron en las variedades de esta especie se encuentran entre el 60% (Figura 18) y porcentajes de plantas resistentes de entre los 11.1 y 42.9% (Cuadro 12).

La variedad 24 (resistente a *R. solani*), cuenta con un porcentaje de homosis del 75%. Un comportamiento similar resultó en cuanto al porcentaje de incidencia de la variedad 13 de *C. moschata* (resistente a *P. capsici*), ya que presentó un porcentaje de incidencia similar de 66.7% a los 50 dds (Figuras 15 y 18), pero el porcentaje de plantas resistentes disminuyó a 11.1% a los 125 dds (Cuadro 12). Aragón (2005) reportó a *C. argyrosperma* como la especie de *Cucurbita* con resistencia mayor a hongos que afectan la raíz, principalmente a *R. solani* (100% de resistencia).

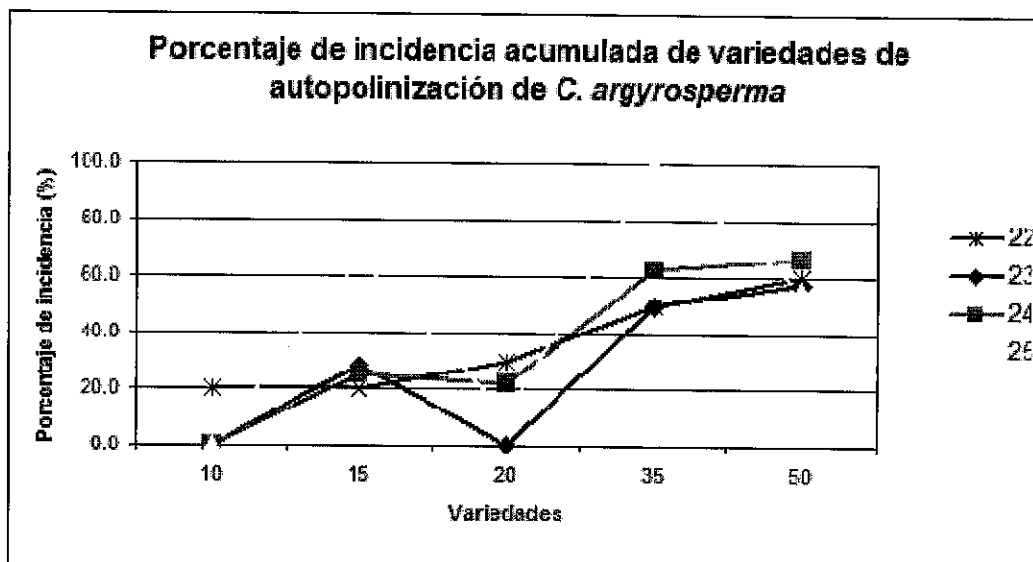


Figura 18. Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades *C. pepo* de autopolinización.

C. pepo resultó ser al igual que en las variedades provenientes de PL, la especie más susceptible, debido a que las variedades que la conforman tuvieron una incidencia del 100%, lo que indica que ninguna de las plantas sobrevivió (Figuras 15 y 19). Pérez (2002) y Aragón (2005) reportaron que de las cinco especies del género *Cucurbita* a la especie *C. pepo* como la menos tolerante al ataque de hongos.

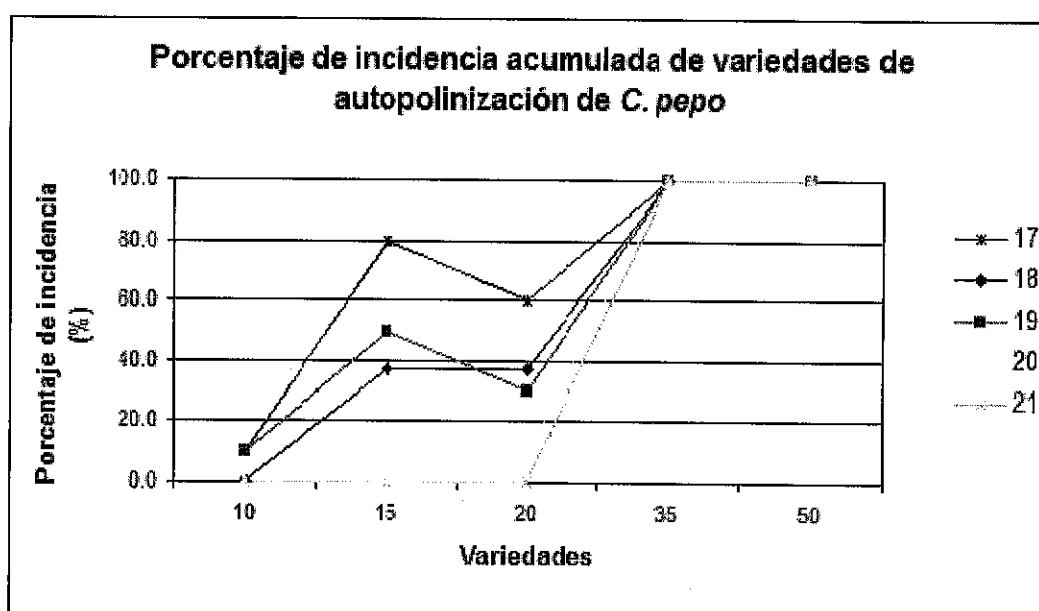


Figura 19. Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades *C. argyrosperma* de polinización libre.

4.1.3.2 Variedades de Polinización Libre

Las variedades de polinización libre que presentaron el mayor porcentaje de incidencia a los 50 dds, fueron 17, 18, 19, 20 y 21 de la especie *C. pepo* y la 25 de *C. argyrosperma*, con un porcentaje de incidencia del 100%, esto indica que estas variedades no fueron resistentes a los hongos con los que se inocularon (Figura 20).

En este caso, las variedades que fueron resistentes, presentaron porcentajes de incidencia por abajo del 60%, destacando las variedades 1 (*C. ficifolia* resistente a *F. oxysporum*) y la variedad 15 (*C. moschata* resistente a la mezcla de hongos) que tuvieron porcentajes de incidencia del 0% (Figura 20).

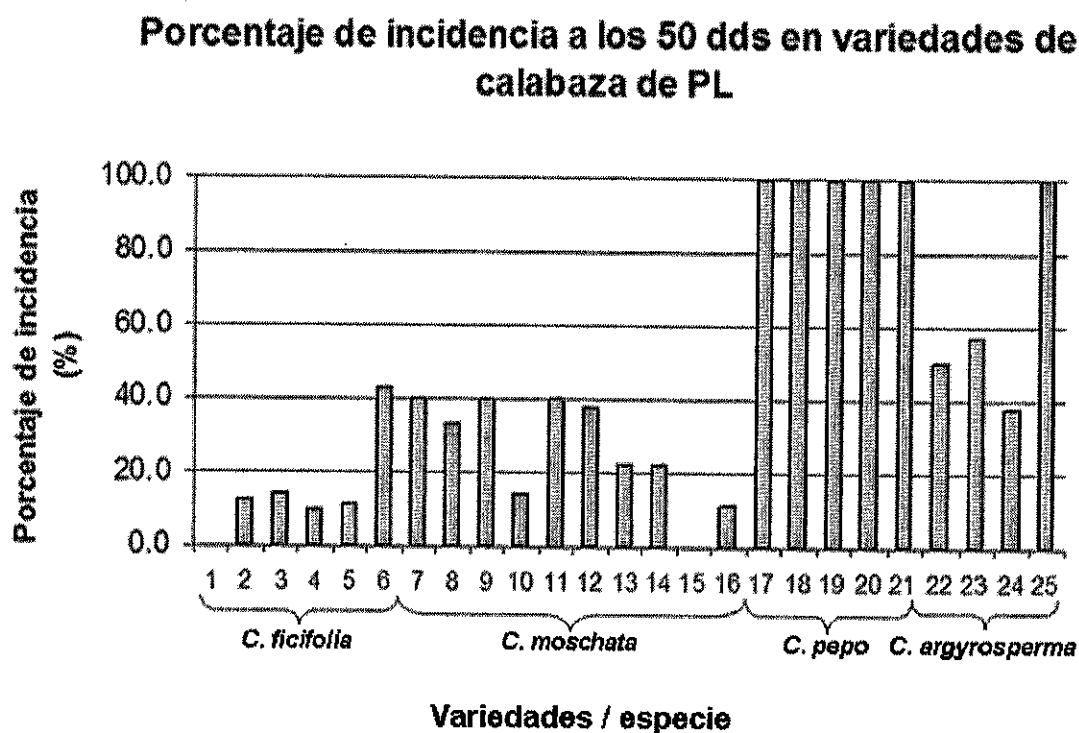


Figura 20. Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, en variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) provenientes de polinización libre a los 50 dds.

Al igual que las especies provenientes de autopolinización, las especies de PL se comportaron de manera similar. *C. ficifolia*, en forma general fue la especie que presentó resistencia mayor a los patógenos que se inocularon, con porcentajes de incidencia menores al 50% (Figura 21).

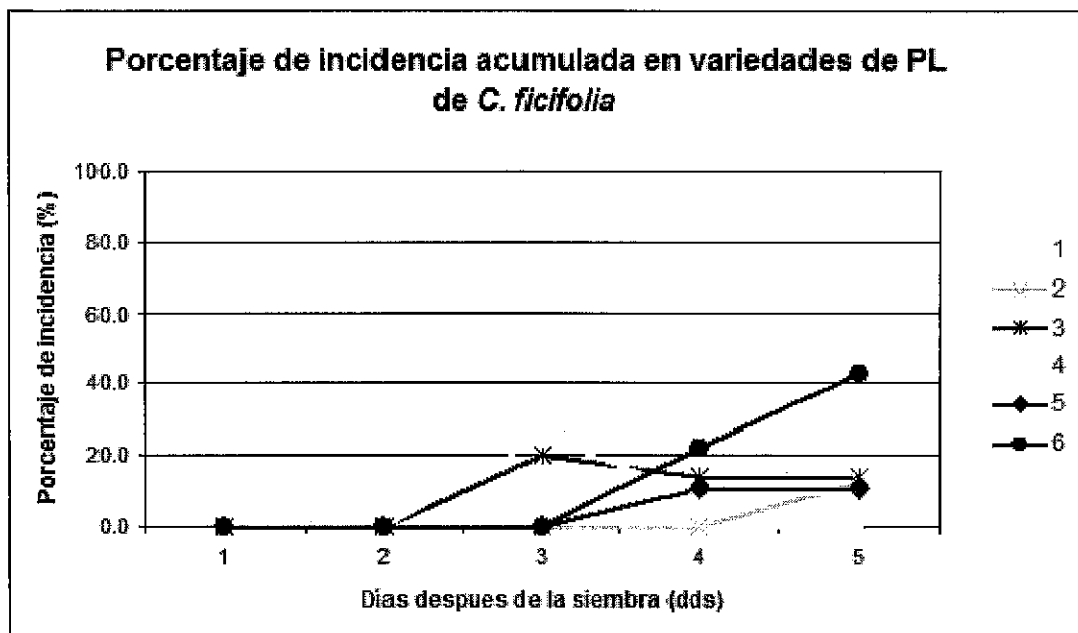


Figura 21. Porcentaje de incidencia causada por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades de *C. ficifolia* provenientes de polinización libre.

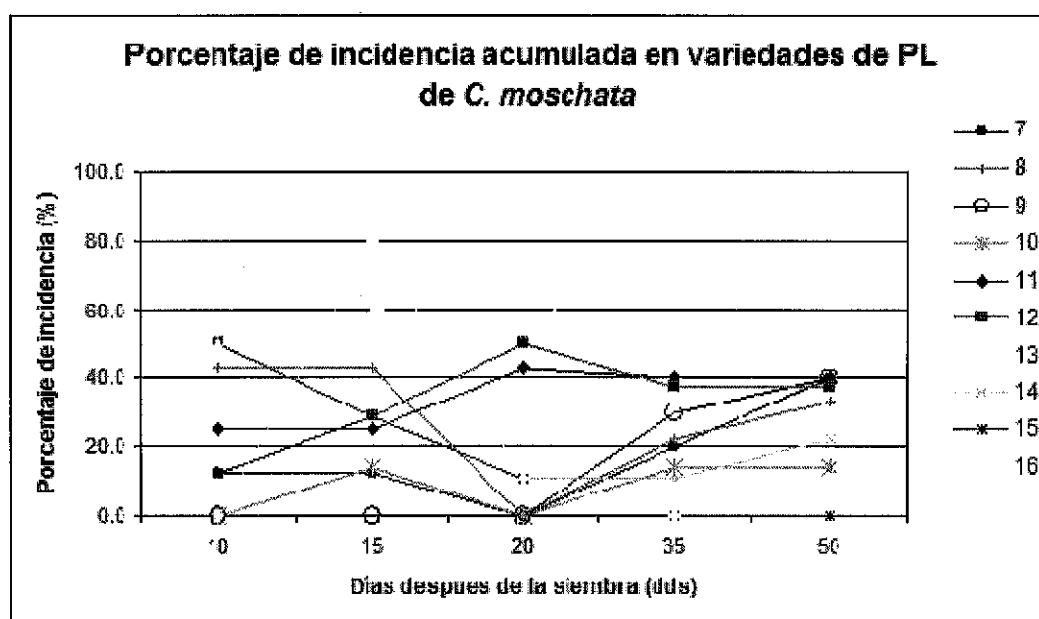


Figura 22. Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades *C. moschata* de polinización libre.

Las variedades de *C. moschata*, presentaron porcentajes de incidencia bajos, menores al 40% (Figura 22), por lo que los porcentajes de plantas resistentes obtenidos de estas variedades se encuentran entre un rango de 80% a 55.6%, por lo que se considera a estas variedades como resistentes y tolerantes a los hongos inoculados.

C. argyrosperma se puede considerar como una especie medianamente resistente, ya que los porcentajes de incidencia que presentaron las variedades que la conforman se encuentran entre un rango del 40% al 60% (Figura 23), la variedad 25 de esta especie tuvo porcentajes de incidencia del 100% (Figura 23), pero estos resultados no fueron debidos al efecto de los hongos inoculados, sino a la viabilidad que la semilla presentó, ya que tuvo porcentajes de germinación muy bajos (Figuras 11 y 12; Cuadro 11); además de que fue inoculada con *P. capsici* que resulto ser de los hongos que provocó el porcentaje mayor de incidencia en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp. Figura 14).

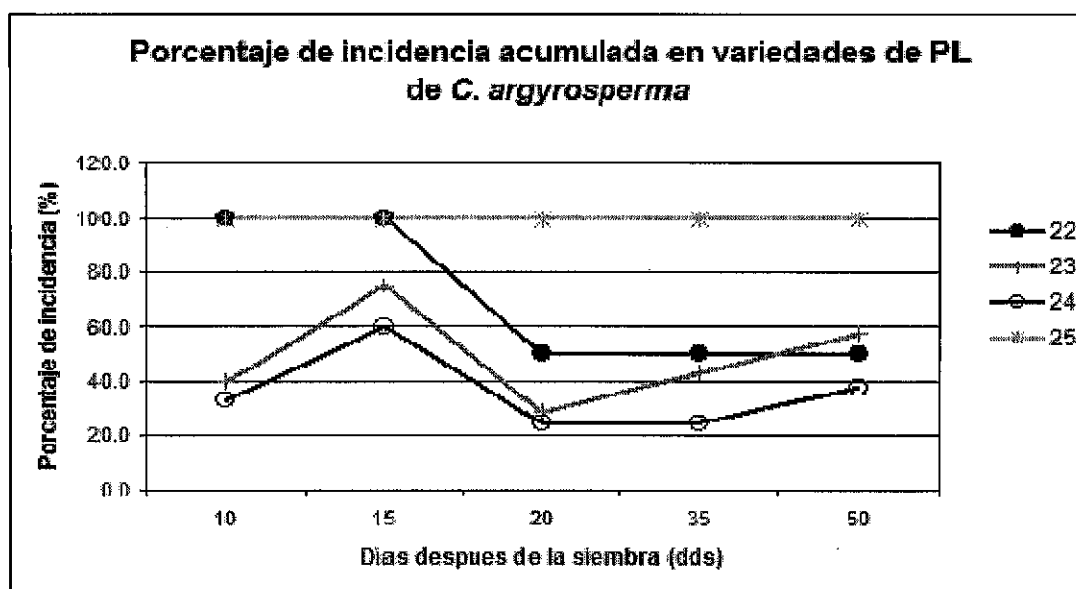


Figura 23. Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades *C. argyrosperma* de polinización libre.

La especie más susceptible fue *C. pepo*, debido a que las variedades que la conforman tuvieron una incidencia del 100%, lo que indica que ninguna de las plantas sobrevivió (Figura 24). Es importante destacar que *C. pepo*, es de las especie más estudiadas de estas cuatro especies, con mayor grado de

intervención en cuanto a su mejoramiento por el hombre, por lo que la rusticidad ha disminuido y esto provoca que algunas de las características como la resistencia a dichos patógenos se pierda. Pérez (2002) reporta a *C. pepo* como una variedad con poca resistencia a hongos del complejo damping off, incluso porcentajes menores al 1%, como *P. capsici* (0.24%) y *F. oxysporum* (0.32%) de plantas resistentes.

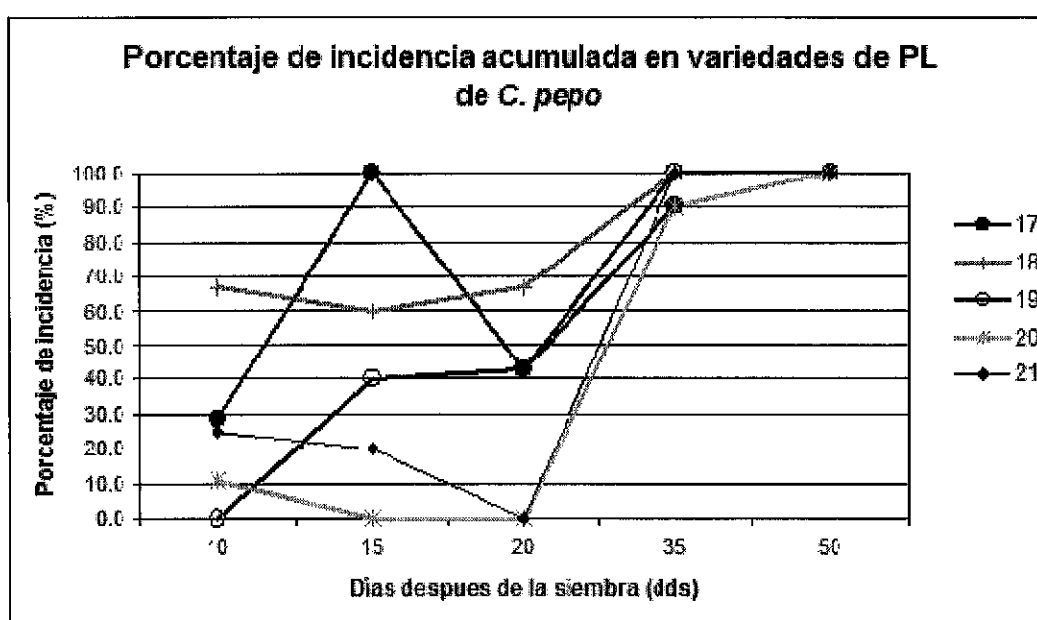


Figura 24. Porcentaje de incidencia por hongos que afectan la raíz, por fecha en variedades *C. pepo* de polinización libre.

4.1.4 Porcentaje de plantas resistentes

De las 25 variedades de calabaza (*Cucurbita* spp), estudiadas en esta investigación (5 de *C. pepo*, 4 de *C. argyrosperma*, 6 de *C. ficifolia* y 10 de *C. moschata*), para corroborar su resistencia a hongos que afectan la raíz, se obtuvieron 19 variedades resistentes provenientes de autopolinización (5 materiales de *C. ficifolia*, 10 de *C. moschata* y 4 de *C. argyrosperma*) y 19 variedades de polinización libre (6 de *C. ficifolia*, 10 de *C. moschata* y 3 de *C. argyrosperma*) (Cuadro 12). Estos resultados concuerdan con los reportados por Aragón (2005), quien en un trabajo similar encontró a las especies *argyrosperma* (Híbrido interespecífico) (100% de plantas resistentes a *R. solani*), *moschata*

(99.7% de plantas resistentes a *F. oxysporum*) y *ficifolia* (99% de plantas resistentes a *R. solani*) del género *Cucurbita*, con porcentajes altos de plantas resistentes a hongos que afectan la raíz.

4.1.4.1 Porcentaje de plantas resistentes encontradas en variedades de autopolinización

Todas la variedades de *C. ficifolia*, presentaron porcentajes de resistencia de 40% el más bajo (variedad 3, resistente a *R. solani*) hasta 88.9%, el más alto (variedad 4, resistente a *R. solani*), todas las variedades produjeron semilla (Cuadro 12).

Las variedades de *C. moschata*, que produjeron semilla con porcentajes de plantas resistentes de 66.7, 80, 50, 33.3, 66.7 y 50% fueron la variedad 7, 9 (resistentes a *F. oxysporum*), 11 (resistente a *P. aphanidermatum*), 13 (resistente a *P. capsici*), 15 y 16 (resistentes a la mezcla de hongos), respectivamente. Del resto de las variedades que no produjo semilla, la variedad que tuvo el mayor porcentaje de plantas resistentes fue la 14, resistente a la mezcla de hongos, con un porcentaje del 90% (Cuadro 12).

De la especie *C. pepo*, ninguna de las variedades resultó ser resistente, ya que todas las plantas murieron antes de los 50 dds.

En el caso de las variedades de *C. argyrosperma*, ninguna de las variedades presentó porcentajes de plantas resistentes superiores a 42.9%, además de que ninguna produjo semilla al final de su ciclo (Cuadro 12).

4.1.4.2 Porcentaje de plantas resistentes encontradas en variedades de PL

En el caso de la especie *C. ficifolia*, las variedades de PL que obtuvieron mayor porcentaje de plantas resistentes después del transplante fueron la 3, 4 y 5, resistentes a *R. solani*, con un porcentaje de 100, 90 y 88.9%, respectivamente y como más susceptible a la variedad 6 con 44.4% de plantas resistentes a *P. aphanidermatum* (Cuadro 12).

En cuanto a *C. moschata*, todas las variedades provenientes de PL, tuvieron porcentajes de plantas resistentes entre un rango de 55.6% (variedad 12 resistente a *P. capsici*) como la más susceptible, hasta 80% las variedades más resistentes, ya que presentaron los porcentajes más altos de plantas resistentes, las variedades con estos porcentajes fueron la 15 y 16, ambas resistentes a la mezcla de hongos, pero éstas no produjeron frutos (Cuadro 12).

C. pepo, no presentó ninguna planta resistente a todos los hongos inoculados (*R. solani*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y mezcla de hongos), por lo que se considera como la especie más susceptible.

C. argyrosperma, presentó resistencia a *R. solani* en dos de sus variedades: 23 y 24, con porcentajes de plantas resistentes de 33.3 y 50%, respectivamente, de las cuales solo la variedad 23 tuvo un fruto, pero no hubo semilla. La variedad 22 presentó resistencia a la mezcla de hongos, con un 66.7%, la cual si tuvo fructificación (un fruto) y produjo semilla (3.6 g) (Cuadro 12), ésta variedad representa una importante fuente de germoplasma, por sus características de resistencia múltiple a hongos, por lo que su conservación y reproducción es aun mas valiosa.

Cuadro 12. Variedades de calabaza (*Cucurbita spp.*) que resultaron resistentes en la verificación de la resistencia a hongos que afectan la raíz.

Efecto de la resistencia a hongos que afectan la raíz.													
No. de variedad actual	Tratamiento	Número de plantas transplantadas ¹		Porcentaje de plantas resistentes (%) ²		Número de plantas que fructifico		Número de frutos por variedad		Número de semillas por variedad		Peso total de semilla por variedad (g)	
<i>C. ficifolia</i>		PL	⊗	PL	⊗	PL	⊗	PL	⊗	PL	⊗	PL	⊗
1	<i>F. oxysporum</i>	8	8	50.0	66.7	5	8	17	16	360	765	30.82	68.47
2	<i>F. oxysporum</i>	7	2	87.5	66.7	7	1	17	1	88.7 8	21	886	1.21
3	<i>R. solani</i>	6	9	100.0	40.0	6	6	14	11	827	603	57.23	34.13
4	<i>R. solani</i>	9	8	90.0	88.9	5	4	8	8	685	327	53.39	26.5
5	<i>R. solani</i>	8	--	88.9	--	7	--	20	--	2426	--	152.82	--
6	<i>P. aphanidermatum</i>	4	7	44.4	62.5	8	3	16	4	893	210	71.26	15.03
<i>C. moschata</i>													
7	<i>F. oxysporum</i>	6	5	60.0	66.7	0	1	0	1	0	221	0	17.03
8	<i>F. oxysporum</i>	6	9	66.7	77.8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	<i>F. oxysporum</i>	6	10	60.0	80.0	0	3	0	3	0	221	0	27.53
10	<i>P. aphanidermatum</i>	6	7	75.0	60.0	3	0	3	0	221	0	25.13	0
11	<i>P. aphanidermatum</i>	6	6	60.0	50.0	0	2	0	2	0	103	0	13.67
12	<i>P. capsici</i>	5	8	55.6	80.0	2	1	2	1	27	0	2.7	0
13	<i>P. capsici</i>	7	3	70.0	33.3	1	0	1	0	24	173	3.14	24.94
14	Mezcla de hongos ³	7	9	70.0	90.0	1	0	1	0	201	0	13.65	0
15	Mezcla de hongos ³	8	7	80.0	66.7	0	1	0	1	0	58	0	8.23
16	Mezcla de hongos ³	8	7	80.0	50.0	0	1	0	1	0	91	0	11.63
<i>C. argyrosperma</i>													
22	Mezcla de hongos ³	2	2	66.7	20.0	1	0	1	0	23	0	3.6	0
23	<i>R. solani</i>	3	3	33.3	42.9	1	0	1	0	0	0	0	0
24	<i>R. solani</i>	5	3	50.0	11.1	0	0	0	0	0	0	0	0
25	<i>P. capsici</i>	0	4	0.0	22.2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. pepo</i>													
No se encontraron plantas resistentes													

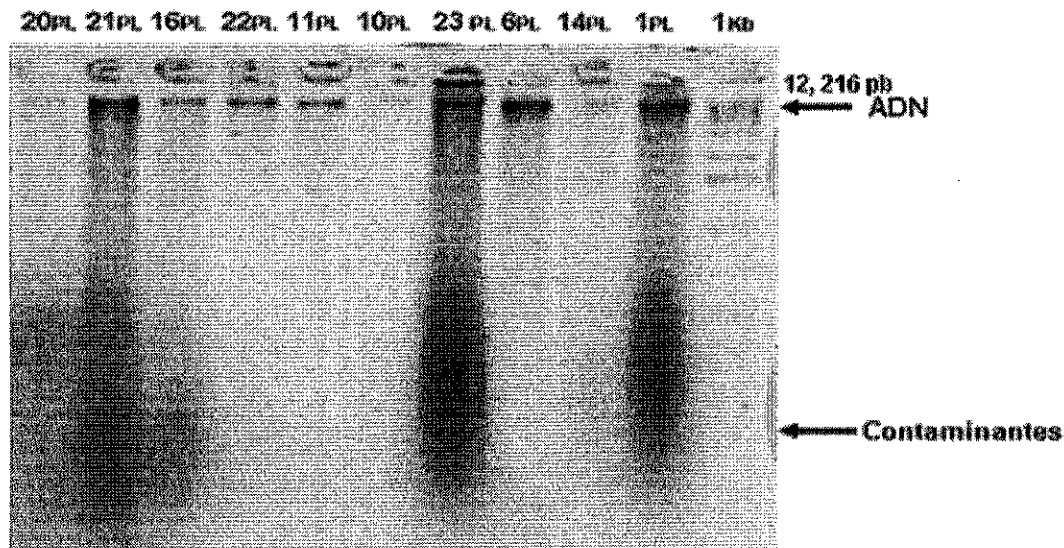
¹ El número de plantas transplantadas se consideró a los 50 dds (días después de la siembra) ² El porcentaje de las plantas sobrevivientes se consideró a los 125 dds, con respecto al total de las plantas germinadas a los 20 dds. ³ Mezcla de cuatro hongos (*F. oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*). PL: indica las variedades provenientes de polinización libre; ⊗: indica las variedades provenientes de autopolinización.

4.2. Análisis molecular

4.2.1. Extracción, cuantificación y calidad de ADN

De variedades de calabaza (*Cucurbita spp.*) que resultaron, resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, fue posible obtener moléculas de ADN de buena calidad en la extracción, adecuadas para la realización de las metodologías del presente trabajo.

La evaluación cualitativa se realizó en gel de agarosa al 1%, observando la integridad de la banda producida por el ADN extraído, por lo que en la Figura 25, se muestran algunos de los resultados de la extracción, evidenciando la calidad del ADN, con una banda uniforme y bien definida a unos 12,000 pb aproximadamente.



pb: pares de bases; PL: polinización libre, 1 Kb (Kilobases): corresponde al marcador de peso molecular (Ladder, Invitrogen®), en el último pozo. Los números representan la variedad a la que pertenece el perfil.

Figura 25. Gel de agarosa 1%, que muestra los perfiles de ADN de extracciones de 10 variedades resistentes a hongos que afectan la raíz en *Cucurbita spp.*

4.2.2. Análisis de Marcadores Moleculares amplificados por PCR

Los análisis de los marcadores moleculares se basaron en el uso de tres técnicas de PCR: RAPD, microsatélites y RAMP; de las cuales en las amplificaciones realizadas se pudo apreciar que algunos de los iniciadores utilizados en cada técnica no amplificaron en algunas de las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp), en estudio. Esto pudo deberse a que las secuencias de los iniciadores no reconocieron ningún sitio blanco en el genoma de estas variedades (Figura 26).

En algunos de los iniciadores utilizados en las tres técnicas, por ejemplo; el caso del iniciador OPA 15 (Figura 26), utilizado en RAPD y en combinación con los microsatélites (RAMP) se pudieron apreciar bandas polimórficas distintivas entre especies, es decir a simple vista en el gel, se pudieron observar las agrupaciones de las especies *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*, tanto en las variedades resistentes como en las susceptibles (Figura 26).

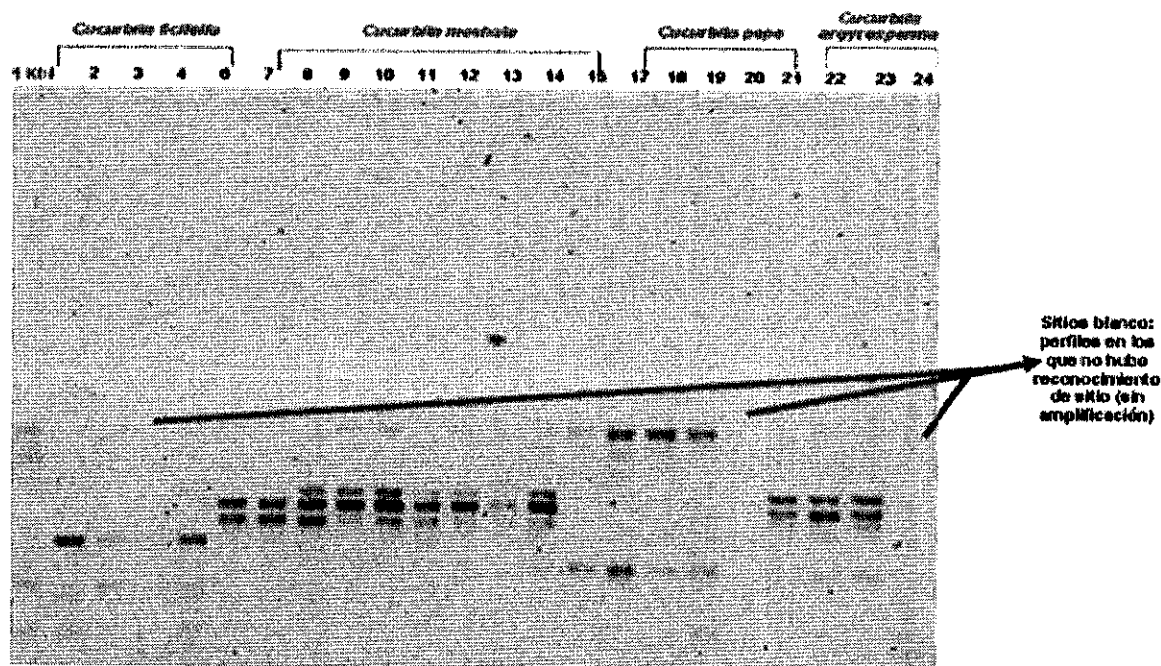


Figura 26. Gel de agarosa 1.5%, que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generados por el iniciador aleatorio OPA 15, usado en variedades de calabaza (*Cucurbita* spp).

4.2.2.1 Comparación entre variedades resistentes y susceptibles con perfiles de RAPD

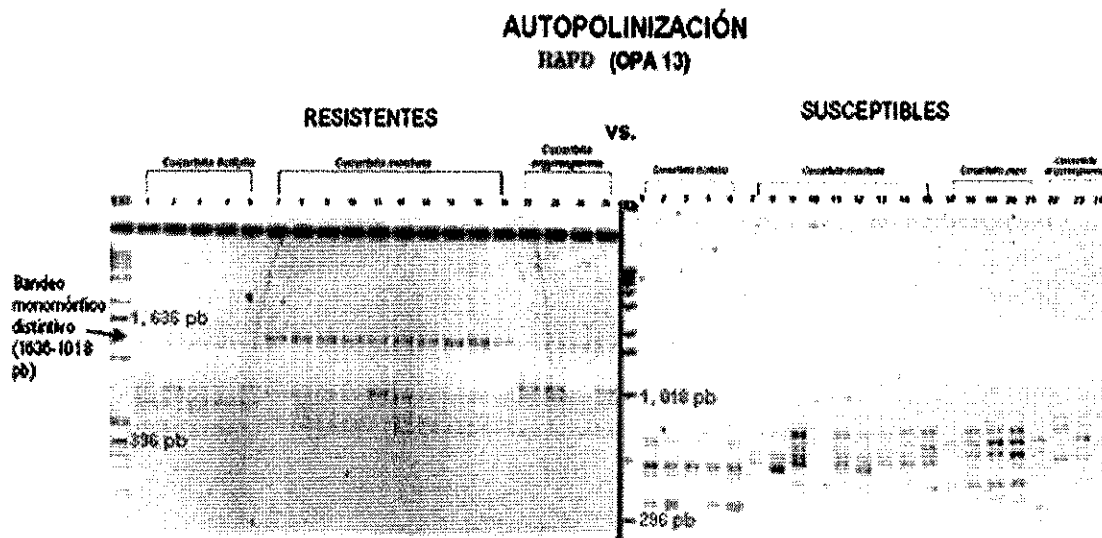
En cada uno de los perfiles de electroforesis se logró observar una separación bien definida de las bandas por cada uno de los iniciadores aleatorios (OPA 10, OPA 13, OPA 15 Y OPA 19) en las variedades tanto, resistentes como susceptibles.

Con los cuatro iniciadores aleatorios utilizados en RAPD se obtuvo un total de 30 bandas (28.09%) con respecto al total del polimorfismo observado, tanto con RAPD, microsatélites y RAMP, para los genotipos provenientes de autopolinización resistentes y 33 (30.55%) para los de polinización libre. En el caso de las variedades susceptibles apareció mayor número de bandeo 97 (43.89%) para las variedades de autopolinización y 79 (45.14%) para las de polinización libre. En general, para RAPD, en las variedades resistentes como las susceptibles, el mayor número de bandas amplificadas se encontró entre un peso molecular de 1636 y 396 pb, mientras que el rango para las variedades susceptibles se encontró entre 1018 y 298 pb.

Para el caso de la técnica RAPD, el iniciador que mejor mostró las diferencias entre las variedades de calabaza (*Cucurbita spp.*) resistentes y susceptibles, fue el OPA 13, en gel correspondiente a las variedades resistentes se aprecia una banda monomórfica la cual se encuentra entre los 1636 y 1018 pb de peso molecular, este bandeo se presentó particularmente en todas las variedades provenientes de autopolinización. Esta banda no se observa en el gel de las variedades susceptibles (Figura 27).

La técnica de RAPD identificó poca variabilidad genética entre variedades resistentes, y entre variedades susceptibles, lo que sugiere mínimas diferencias dentro de cada grupo específico (resistentes y susceptibles). Al respecto resultados obtenidos en trabajos con *C. moschata*, como el de Gwanama *et al.* (2006), quienes caracterizaron molecularmente 31 genotipos de *C. moschata*, provenientes de la región de Zambia y Malawi, África, con la técnica RAPD observaron baja variabilidad genética entre las poblaciones de cada región; por su

parte, reportan a los patrones RAPD generadores de pocas diferencias entre genotipos de *C. moschata* evaluados e indica la existencia de un número reducido de secuencias nucleótidas diferentes amplificadas al azar.



1Kb (Kilobase): marcador de peso molecular (Ladder, Invitrogen®); pb: pares de bases. Los números representan la variedad a la que pertenece, cada una de las muestras analizadas, agrupadas en especies.

Figura 27. Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPA 13, evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita spp.*) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de autopolinización.

Por otra parte, de las variedades provenientes de PL que muestran el bandeo a la misma altura de peso molecular, fueron la 4 y 5 de *C. ficifolia*; de *C. moschata* 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15; en tanto que de *C. argyrosperma*, fueron la 22 y 23 (Figura 28). Estos resultados pueden explicarse con lo mencionado por Arnold *et al.* (2002), que indica que la técnica RAPD es efectiva para determinar polimorfismo genético y niveles de diferenciación ya que los organismos vivos pueden revelar regiones con secuencias nucleótidas (polimorfismo) que los hace diferentes de otros, incluso de la misma especie.

Por otro lado, el número de bandas que se expresaron en las variedades resistentes de autopolinización fueron 11, representando un 10.28% del bandeo con respecto al total del polimorfismo en las tres técnicas; mientras que para las variedades susceptibles se presentaron 27 bandas, representando un porcentaje del 12.21%.

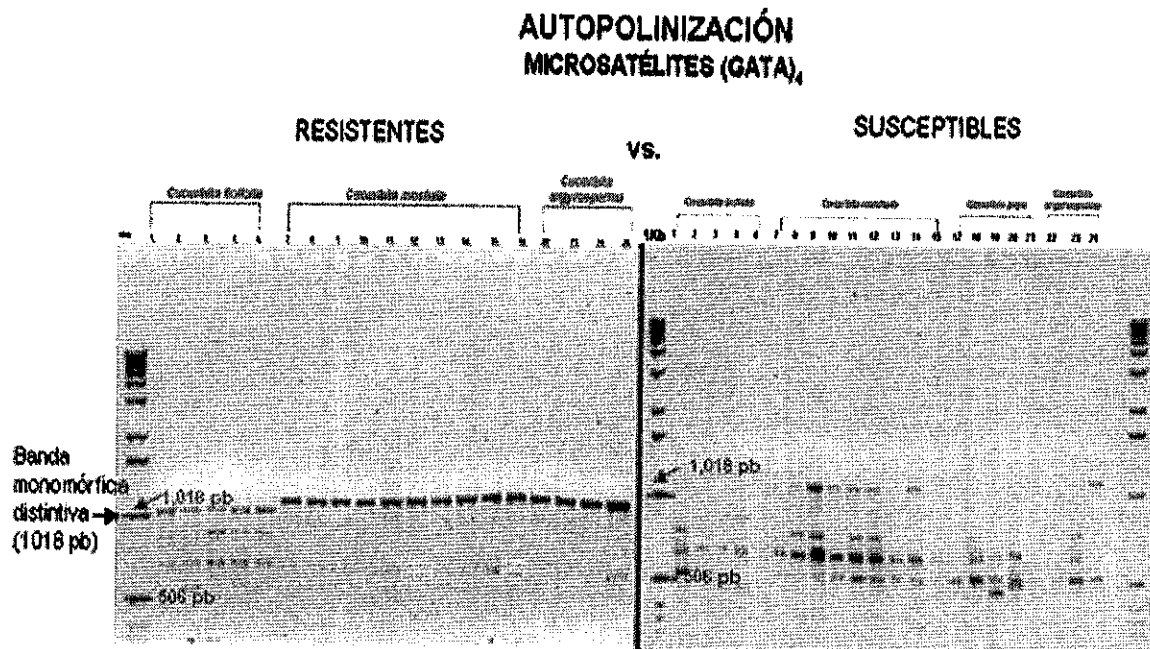
Para el caso de las variedades de PL resistentes se apreciaron 9 bandas con un 8.33%, con respecto al total del bandeo y 13 bandas en las susceptibles expresando un porcentaje del 7.42%.

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 son encontrados entre individuos estrechamente relacionados (Morgante y Olivieri, 1993), por lo que en este trabajo, los resultados obtenidos por esta técnica fueron muy representativos, pues marcaron diferencias contundentes, entre las variedades resistentes y las susceptibles (Figuras 29 y 30).

Las variedades de autopolinización pertenecientes a la especie *C. ficifolia*, presentaron una banda monomórfica de 1018 pb; mientras que las variedades 13, 15 y 16 de *C. moschata* así como la 22, 23 y 25 de *C. argyrosperma* (Figura 29), compartieron una banda monomórfica que se encontraba aproximadamente a 1000 pb, éstas bandas no se apreciaron en las variedades susceptibles, excepto para las variedades 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 14 de *C. moschata*, y la 24 de *C. argyrosperma* (Figura 29).

Fue posible apreciar diferencias en el polimorfismo dentro de las variedades resistentes, como en el caso de las variedades 1, 2, 3, 4 y 6 (pertenecientes a *C. ficifolia*), que presentaron bandas polimórficas por debajo de los 1018 pb y que estas mismas no fueron compartidas en su totalidad con las variedades susceptibles. Además, la variedad 11 (resistente a *F. oxysporum*) presentó una banda a los 1636, diferente con el resto de las variedades resistentes y que no se presentó en las susceptibles, al igual que la variedad 12 (resistente a *P. capsici*) y

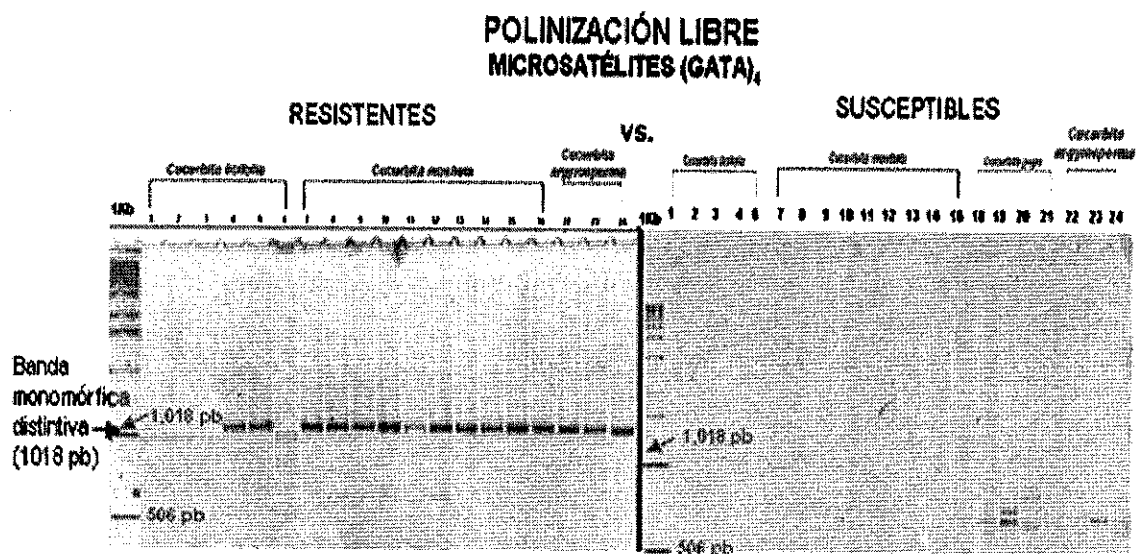
16 (resistente a la mezcla de hongos), se apreciaron 2 bandas cercanas a los 506 pb, ambas bandas representan diferencias importantes con respecto al resto de las variedades (Figura 29).



1Kb: marcador de peso molecular (Ladder, Invitrogen®); pb: pares de bases. Los números representan la variedad a la que pertenece, cada una de las muestras analizadas, agrupadas en especies.

Figura 29. Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos realizada con Microsatélites, generadas por el iniciador (GATA)₄, evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita spp.*) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de autopolinización.

Por otro lado, las variedades de PL resistentes, presentaron una fuerte diferencia con respecto a las susceptibles ya que en estas últimas no se observó mucha amplificación y no se apreciaron bandas monomórficas (Figura 30), como en el caso de las resistentes que compartieron una banda monomórfica aproximadamente a los 1018 pb. Las variedades 1, 2, 3 y 6 resistentes, presentaron bandas de menor peso molecular, que las diferenció del resto (Figura 30).



1Kb: marcador de peso molecular (Ladder, Invitrogen®); pb: pares de bases. Los números representan la variedad a la que pertenece, cada una de las muestras analizadas, agrupadas en especies.

Figura 30. Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos realizados con Microsatélites, generadas por el iniciador (GATA)₄, evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita spp.*) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de polinización libre.

4.2.2.3 Comparación entre variedades resistentes y susceptibles con perfiles de RAMP

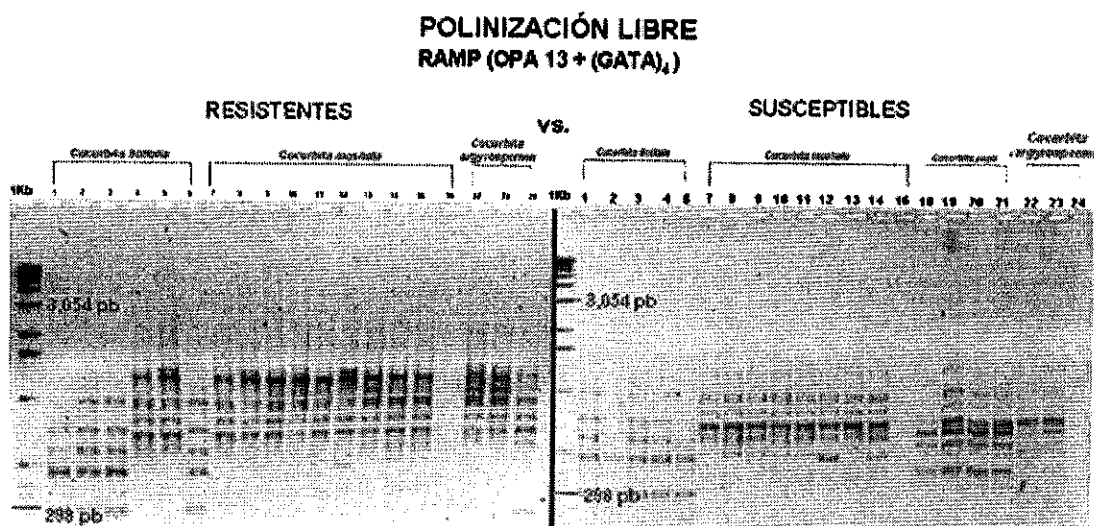
Las combinaciones de iniciadores empleadas en esta técnica correspondieron al uso de los iniciadores aleatorios de RAPD y al de microsatélites, las cuales fueron: OPA-10 + (GATA)₄, OPA-13 + (GATA)₄, OPA-15 + (GATA)₄ y OPA-19 + (GATA)₄, considerándose cada combinación como un iniciador para RAMP.

Los RAMP, empleados en ésta investigación fueron los que dieron el mayor polimorfismo (número de bandas amplificadas), con respecto a las otras dos técnicas.

El polimorfismo que se presentó en las variedades resistentes fue de 66 (en autopolinización como en PL) y en las variedades susceptibles fue de 97 bandas para autopolinización y 83 para PL, los porcentajes del polimorfismo correspondientes con respecto al total del bandeo fueron de 61.68%, 61.11%, 43.89% y 47.42%, respectivamente.

Los patrones polimórficos se presentaron en un rango amplio de peso molecular de 3054 a 298 pb; además, mostraron diferencias contundentes en cuanto a la separación de grupos de las especies, el nivel de polimorfismo detectado con esta técnica puede dar una estimación de la alta variabilidad genética existente entre de las especies de calabaza (*Cucurbita* spp) estudiadas, así como dentro de cada especie, esto es atribuido a la característica en cuanto al tipo de polinización (polinización cruzada) del género *Cucurbita* spp. Al respecto, Chávez (1993) menciona, que las plantas que se propagan por polinización cruzada como las del género *Cucurbita* spp, 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 especies estudiadas de calabaza (*Cucurbita* spp).

La técnica RAMP resultó ser buena para detectar las diferencias existentes entre las variedades resistentes y las susceptibles; no obstante con respecto a los microsatélites; con RAMP, se obtuvo un mayor número de polimorfismo que marca de manera contrastante las diferencias entre ambos tipos de variedades (resistentes vs. susceptibles; Figura 31).



1Kb: marcador de peso molecular (Ladder, Invitrogen®); pb: pares de bases. Los números representan la variedad a la que pertenece, cada una de las muestras analizadas, agrupadas en especies.

Figura 31. Gel de agarosa 1.5% que muestra los patrones polimórficos realizada con RAMP, generadas por el iniciador aleatorio OPA13 más el iniciador de Microsatélites (GATA)₄: (OPA 13 + (GATA)₄) evaluado sobre las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz, provenientes de polinización libre.

4.2.3 Análisis estadístico de marcadores moleculares RAPD, microsatélites y RAMP

Con el objeto de conocer la relación genética y las probables diferencias de bandas en el polimorfismo de las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp), resistentes y susceptibles, se realizaron las matrices binarias generada de los datos obtenidos de la presencia (1) y ausencia (0) de los fragmentos amplificados, correspondientes a las variedades tanto para autopolinización como para PL.

Cada matriz se conformó de los datos que arrojaron en su conjunto los iniciadores utilizados en cada una de las tres técnicas moleculares empleadas (RAPD, microsatélites y RAMP).

Una vez obtenida la matriz binaria, se realizaron las matrices de similitud (Cuadros 1a-8a del Anexo) correspondientes a cada grupos de variedades, tanto resistentes como susceptibles. Por medio de el paquete computacional de NTSYS 2.2R, con el coeficiente de similaridad de DICE (Dice, 1945; Nei and Li, 1979) y

por medio del método de agrupación UPGMA (Unweighted Peired Group Method with Arithmetic Averages), se realizaron los dendogramas (Figuras 1a-4a del Anexo).

Las agrupaciones generadas del análisis se realizaron con la finalidad de obtener grupos entre las variedades resistentes y susceptibles de autopolinización (Figura 32) y de PL (Figura 33) con base en la huella genómica que se evidenció en las técnicas utilizadas (RAPD, microsatélites y RAMP).

Se hizo un remuestreo por cada dendograma obtenido, por el método de bootstrapping con 2000 repeticiones, todo ello se llevo a cabo con el mismo software, con la finalidad de reducir al máximo el error al hacer las agrupaciones y corroborar estadísticamente que los agrupamientos sean fidedignos. El remuestreo consiste en la realización de las 2000 posibles formas de agrupación con los datos obtenidos de la matriz binaria y de esta forma estadísticamente se generan las probables matrices de similitud, para las 2000 copias, al final se reconstruye un árbol de agrupación promedio. Para los cuatro casos en los que se obtuvo el dendograma se apreció una robustez del 100%.

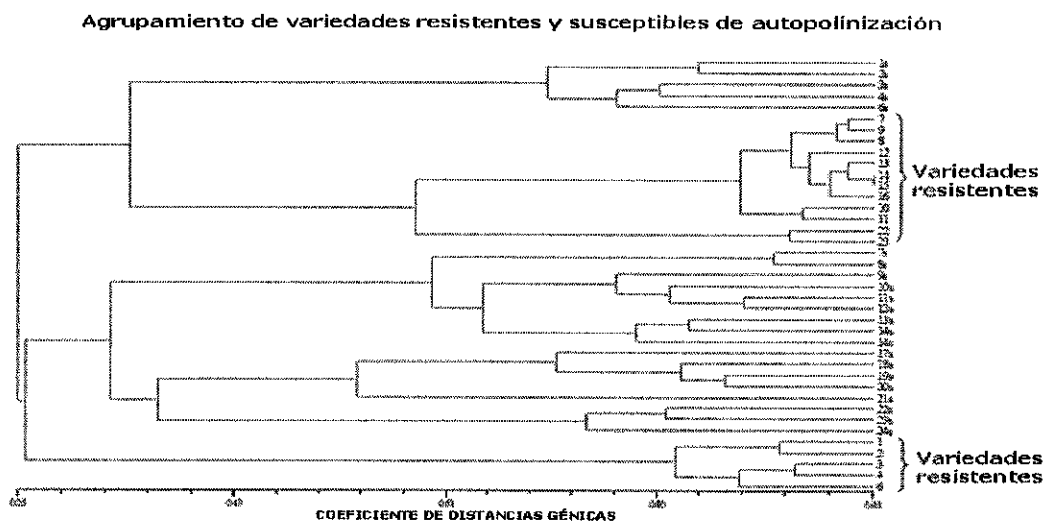
El porcentaje de consistencia de los remuestreos, que se da en cada una de las agrupaciones dentro de dendograma se obtuvo con el software de FREETREE (Hampl, *et al.*, 2001) y con TreeView (Win 32).

4.2.3.1 Dendogramas de comparación entre variedades resistentes con susceptibles

El análisis realizado en su conjunto entre las variedades resistentes y susceptibles dio como resultado una separación clara entre estos grupos, tanto para autopolinización como para PL, la agrupación se realizó del total de polimorfismo obtenido con las tres técnicas moleculares (RAPD, microsatélites y RAMP), considerándose 221 y 175 bandas, respectivamente.

Dentro de estas agrupaciones, se observan subgrupos entre las variedades, estos subgrupos solo se generan separándose resistentes de susceptibles (Figura 32 y

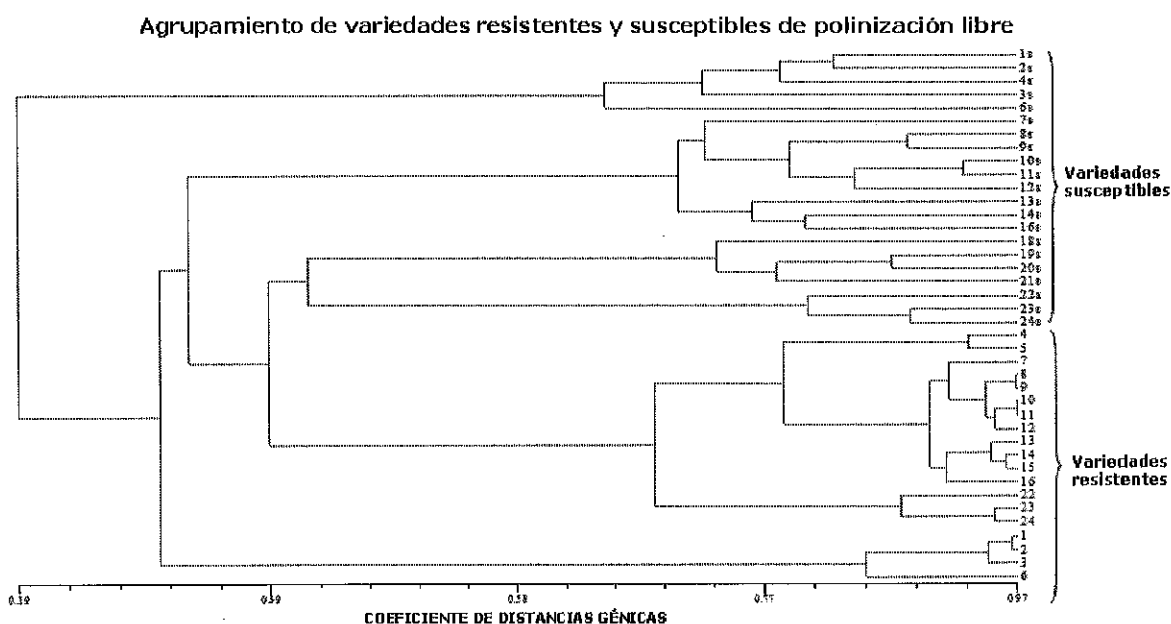
33); para el caso de las variedades de autopolinización (Figura 32), se llegan a apreciar 3 agrupaciones, pero a una distancia génica muy baja, eso indica que estas agrupaciones no son muy parecidas en cuanto a la respuesta que tuvieron hacia la inoculación de los hongos. En la primera agrupación se aprecian las variedades 1, 2, 3, 4, 6 susceptibles agrupadas, con las variedades resistentes 7 a la 23, esto se debe a que probablemente compartan algún tipo de característica que las relaciona, sin embargo son subgrupos que se pueden considerar como independientes, por la distancia génica que tienen que es aproximadamente al 0.27.



S: representa a las variedades susceptibles.

Figura 32. Dendrograma generado de la matriz de similitud promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes y susceptibles provenientes de autopolinización.

Las variedades de PL, se definieron mejor las agrupaciones separándose en forma bien definida una agrupación para las variedades resistentes y otra para las susceptibles (Figura 33)



S: representa a las variedades susceptibles.

Figura 33. Dendrograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes provenientes de polinización libre.

En general en las agrupaciones tanto de autopolinización como de PL (Figuras 32, 33), se pudo apreciar que los individuos resistentes a comparación de los susceptibles dentro de cada agrupación son muy similares entre sí, ya que sus valores de distancia génica son muy cercanos a uno, por arriba del 0.80 del valor del coeficiente de distancias génicas (Figura 32 y 33), que indica que valores cercanos a uno significa que son poblaciones muy emparentadas genéticamente, mientras que los cercanos a cero, se refiere a poblaciones poco emparentadas, según Martínez, 2008; esto significa que las variedades con un coeficiente de distancias génicas bajo, tiene características genéticas más fijadas, mientras que las variedades susceptibles tienen sus valores muy alejados del uno entre el 0.30 y el 0.40, esto se puede explicar debido al número de autopolinizaciones que tiene en las variedades (F1), y que por esta característica se puede apreciar la segregación en las agrupaciones y los caracteres fijados en las variedades (Figura 32 y 33).

4.2.3.2 Variedades de autopolinización resistentes

En las variedades de autopolinización resistentes (Figura 34) se formaron tres grupos perfectamente bien definidos, de un total de polimorfismo de 107 bandas; donde las variedades que representa cada grupo son las que corresponden a cada una de las especies (*C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. argyrosperma*). Dentro de esta agrupación, se observan subgrupos con diferentes porcentajes de consistencia en cuanto al remuestreo entre las variedades (Figura 34).

Los individuos dentro de cada agrupación son muy similares entre sí ya que sus valores de distancia génica son muy cercanos a uno, entre el 0.88 y el 0.98 del valor del coeficiente de distancias génicas (Figura 34), que indica que valores cercanos a uno significa que son poblaciones muy emparentadas genéticamente, mientras que los cercanos a cero, se refiere a poblaciones poco emparentadas, según Martínez, 2008.

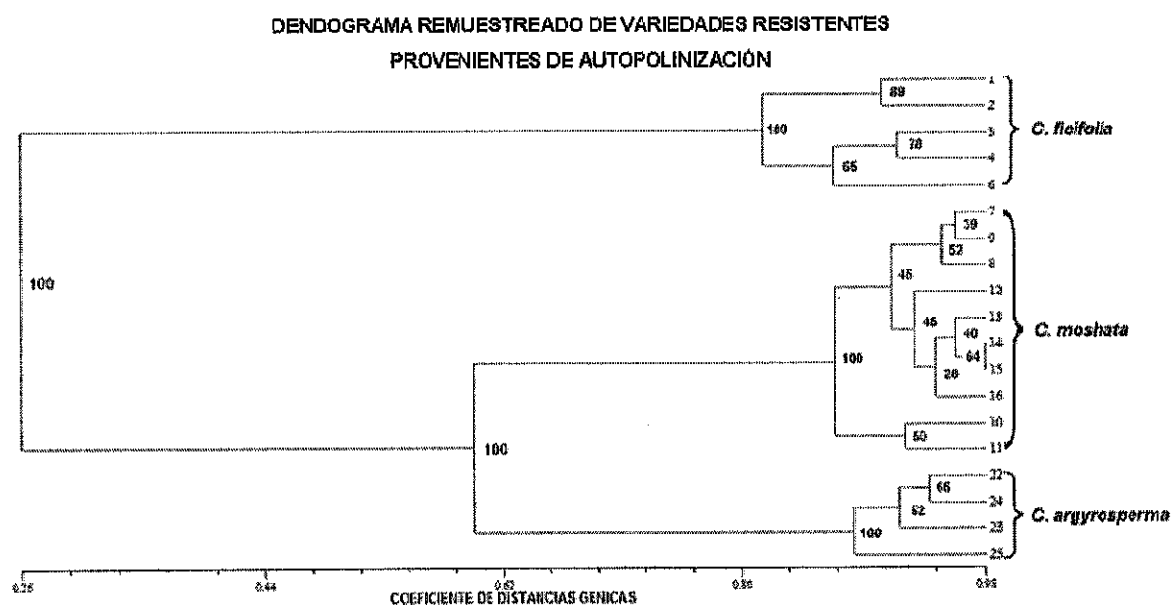


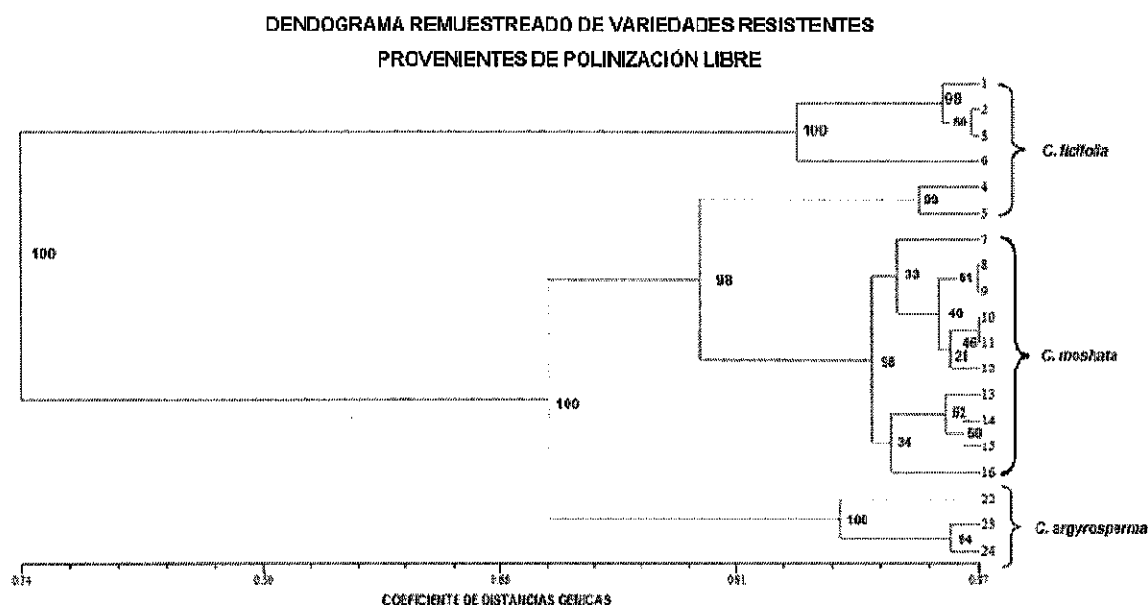
Figura 34. Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes provenientes de autopolinización.

Por otro lado, existe una consistencia del 100% de los remuestreos, entre las variedades que forman el grupo de *C. moschata* y *C. argyrosperma*, pero la similitud entre éstos dos es muy lejana al uno, con un valor del coeficiente de distancias génicas, aproximado a 0.60. La distancia génica entre los tres grupos es del 0.26, con una confiabilidad del 100%, lo que indica que cada grupo tiene diferencias distintivas molecularmente (Figura 34).

4.2.3.3 Variedades de polinización libre resistentes

En las variedades de PL resistentes, aun cuando la agrupación fenética de los datos obtenidos por medio de la codificación de fragmentos de todos los iniciadores (108 bandas polimórficas totales), en las tres técnicas moleculares empleadas, fue consistente con respecto a la agrupación de las variedades de autopolinización, se encontró diferencia en las variedades 4 y 5 (Figura 35), ya que estas se separaron completamente del grupo de *C. ficifolia* y se agruparon a la especie de *C. moschata* pero con un porcentaje de 98% de consistencia de los remuestreos, con un coeficiente de distancia génica menor a 0.81 (Figura 35), esto indica que las variedades provenientes de PL tienen menor estabilidad genética que las variedades que provienen de autopolinización.

El porcentaje de consistencia de los remuestreos entre los grupos formados se repite como en el caso de las de autopolinización con un porcentaje del 100%, pero el coeficiente de distancias génicas es mayor que en el caso de las de autopolinización con un valor de 0.68 (Figura 35).



Los valores dentro de cada agrupación indican los porcentajes de consistencia de los remuestreos.

Figura 35. Dendrograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades resistentes provenientes de polinización libre.

La utilidad y la aplicabilidad de esta información para fines de diseño y creación de estrategias para el mejoramiento genético de calabaza (*Cucurbita* spp), con respecto a la resistencia a hongos fitopatógenos que afectan la raíz referido en este estudio, solo será posibles si se continúa con las pruebas de verificación de la resistencia en el germoplasma remanente y con la selección de los genotipos resultantes como resistentes y a si generar líneas puras por medio de autopolinización, para determinar características moleculares fijadas a cada uno de los materiales y el estudio de los genes que dan la resistencia a los patógenos que causan el complejo de damping off.

4.2.3.4 Variedades de autopolinización y polinización libre susceptibles

En cuanto a los genotipos susceptibles, el patrón de agrupamiento (Figuras 36 y 37) fue similar, entre ellos, se formaron cuatro grupos de los cuales las variedades que los conforman corresponden a las especies evaluadas en esta investigación (*C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*). Basados en 221 y 175 bandas del total del polimorfismo obtenido por las tres técnicas (autopolinización y polinización libre, respectivamente).

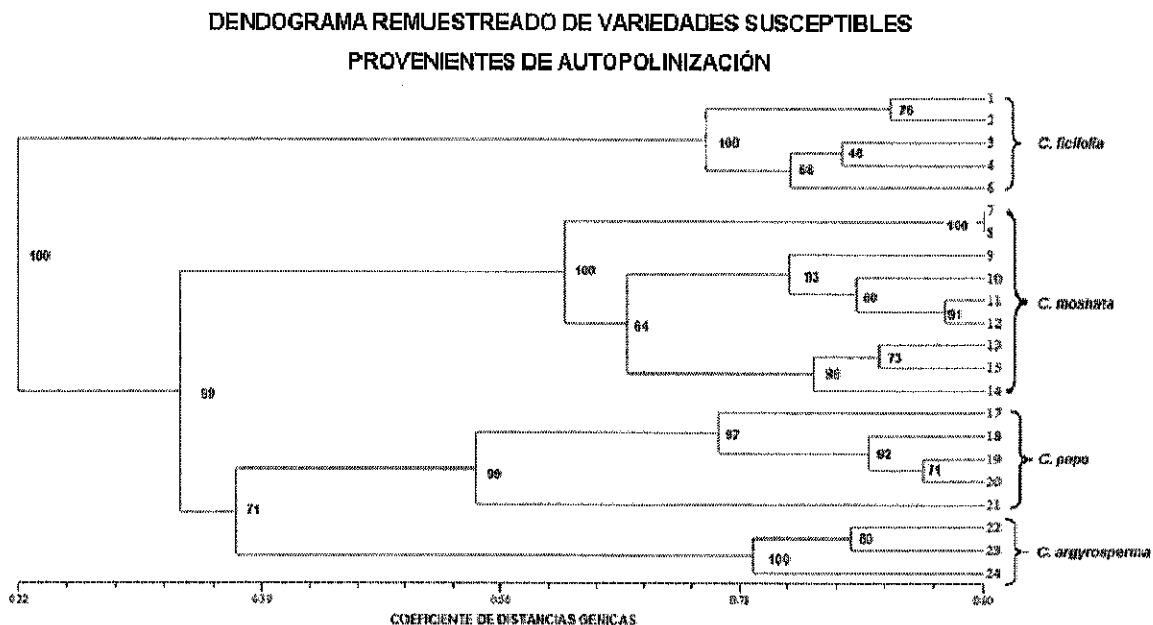
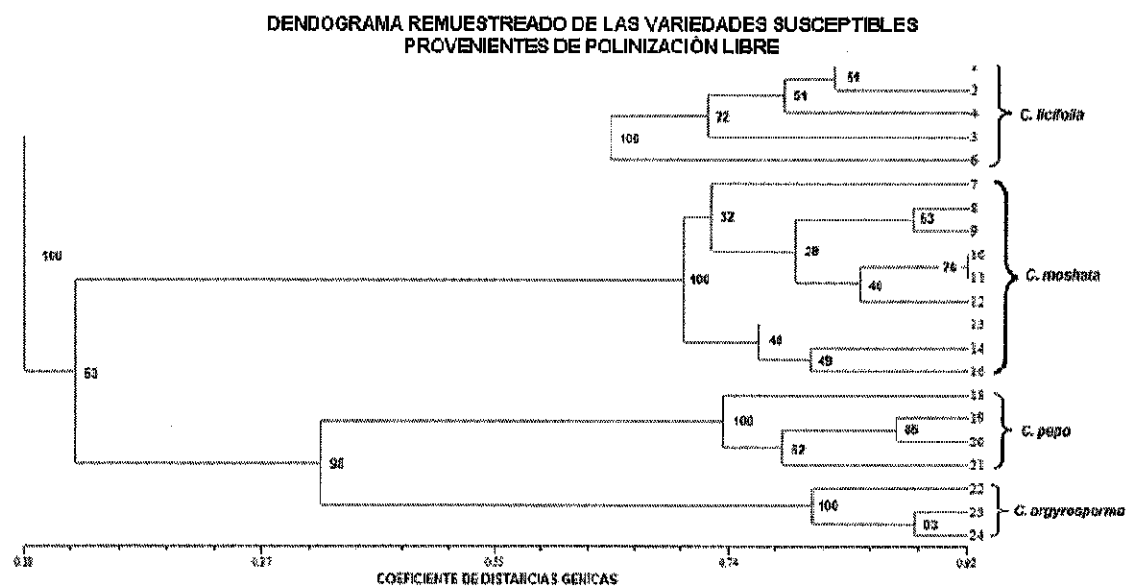


Figura 36. Dendrograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades susceptibles provenientes de autopolinización.



Los valores dentro de cada agrupación indican los porcentajes de consistencia de los remuestreos.

Figura 37. Dendrograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las variedades susceptibles provenientes de polinización libre.

Tanto para las variedades provenientes de autopolinización como PL, existe una asociación entre las variedades pertenecientes al grupo de *C. pepo* y *C. argyrosperma* con un porcentaje de consistencia en los remuestreos del 71% para y 98%, respectivamente, con un coeficiente de distancia génica aproximado a 0.37 en el primer caso y 0.41 en el segundo caso. Estos dos grupos asociados se relacionan con el grupo de las variedades pertenecientes a la especie de *C. moschata*, con un porcentaje de consistencia en las variedades de autopolinización del 99% más alta que para las de PL con 53%, pero con menor distancia génica entre éstas poco mayor a 0.21 en PL, con respecto a 0.32 en autopolinización (Figuras 36 y 37).

4.2.3.5 Confiabilidad de resultados obtenidos en los dendogramas

Los niveles de confianza con un $\alpha = 0.05$, en los dendogramas realizados antes del remuestreo (Cuadros 9a-12a, del Anexo), para las variedades resistentes de autopolinización es de 0.8621, mientras que para las de PL se tiene un 0.8765; en cuanto a las variedades susceptibles se tubo una confiabilidad de $\alpha = 0.05$, de 0.7003 y 0.7167 respectivamente.

Una vez realizados los remuestreos con el método de bootstrapping los valores de confiabilidad al 95% (Cuadros 9a-12a, del Anexo) y de cada una de las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) disminuyeron con un porcentaje de 0.11% y 0.14% para los genotipos resistentes de autopolinización y PL respectivamente, mientras que para las susceptibles se tuvieron los porcentajes de disminución de 0.32% y 0.27% respectivamente.

En términos generales los agrupamientos obtenidos en las variedades de calabaza (*Cucurbita* spp) fueron determinados por la especie y no por los hongos que se aplicaron a las variedades para corroborar su resistencia, pero los bandeos monomórficos encontrados, con algunos iniciadores pudieran dar la característica de resistencia en cada material genético.

Para verificar y cotejar que los resultados obtenidos en los dendogramas remuestreados tanto para los genotipos de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes

de autopolinización y PL, como para los genotipos susceptibles, fueran aceptables, se realizó una comparación de matrices, entre la matriz de similaridad generada con la matriz binaria y con la matriz de similaridad generada con la matriz promedio del bootstrap (remuestreos). Los resultados se aprecian en las Figuras 38-41, donde se muestra que los valores proporcionados por cada una de las matrices de similaridad que generaron los dendogramas con respecto a los valores promedio de los remuestreos forman una línea diagonal de puntos entre estas matrices, lo que indica que, no existen mucha dispersión de los valores y que estos son homogéneos.

Lo anterior se corrobora con los valores de correlación realizados con la prueba de Mantel (1967) que da el programa de NTSYS pc2.2R para el análisis, los valores de correlación para los genotipos resistentes de calabaza (*Cucurbita spp.*) de autopolinización son de $r=0.99999$, con una media de la matriz de similitud de 0.5652 y una media para la matriz de similitud promedio del remuestreo de 0.5634, con una prueba de t de Student aproximada a 10.1862.

Mientras que para los valores de las matrices en los genotipos de PL se tiene una $r=1.00000$, con una media de la matriz de similitud de 0.6511 y una media para la matriz de similitud promedio del remuestreo de 0.6484, con una prueba de t de Student aproximada a 8.0347.

En el caso de los genotipos susceptibles la correlación $r=0.99997$ se tuvo para las variedades provenientes de autopolinización y una $r=0.99998$ para los de PL con una prueba de t de Student aproximada a 14.8399 y para los valores de las variedades de autopolinización una prueba de t de Student aproximada a 14.4334.

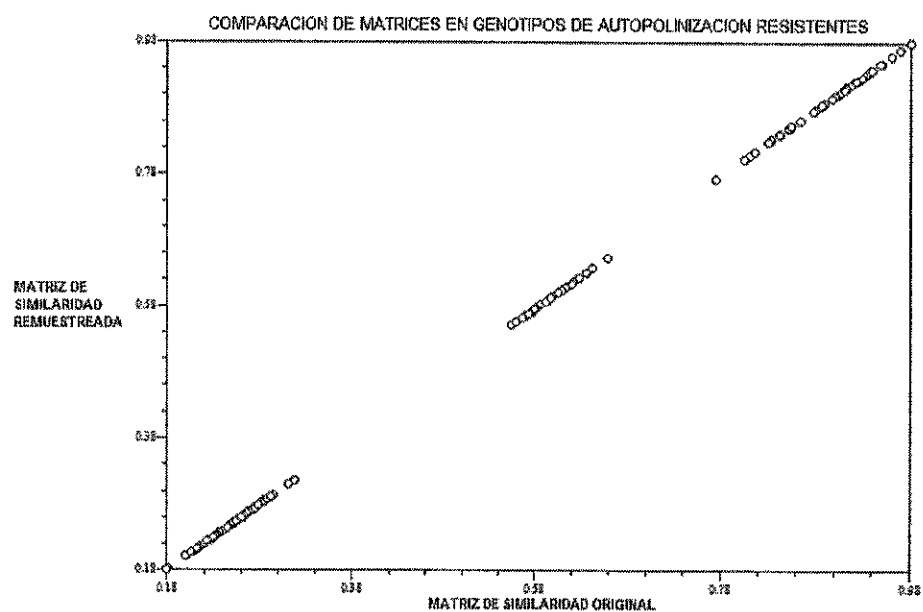


Figura 38. Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similitud remuestreada, en las variedades resistentes provenientes de autopolinización.

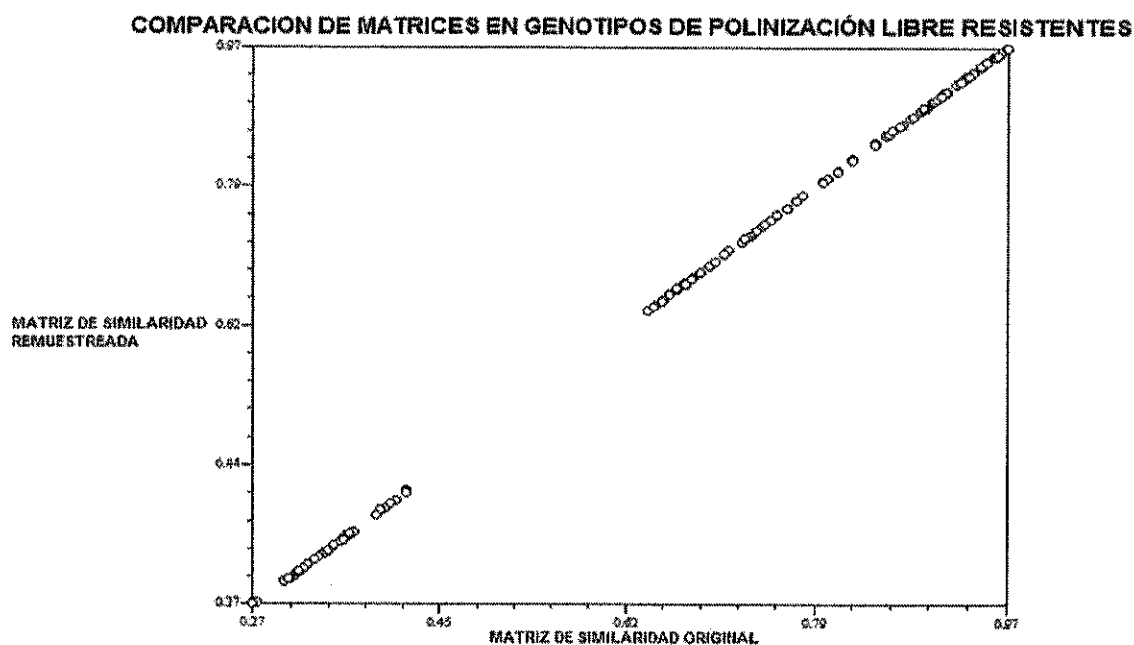


Figura 39. Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similitud remuestreada, en las variedades resistentes provenientes de polinización libre.

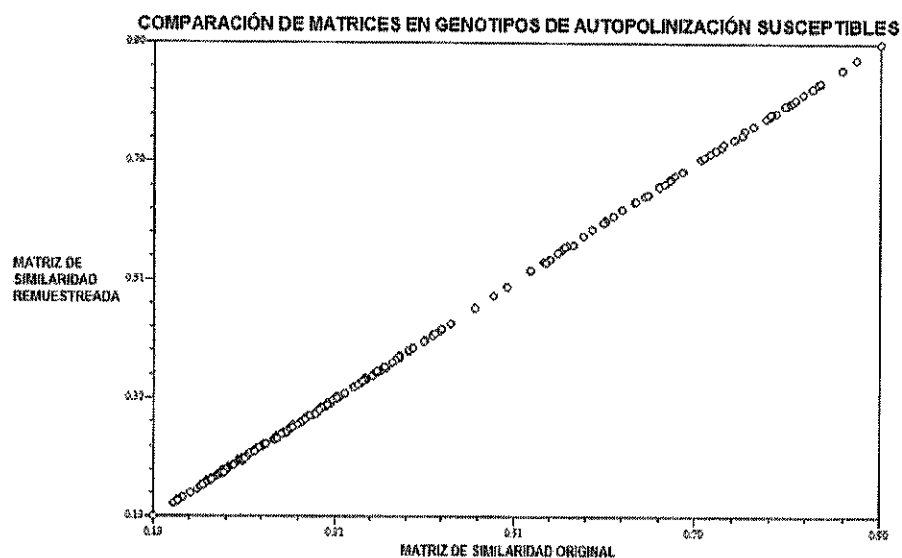


Figura 40. Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similitud remuestreada, en las variedades susceptibles provenientes de autopolinización.

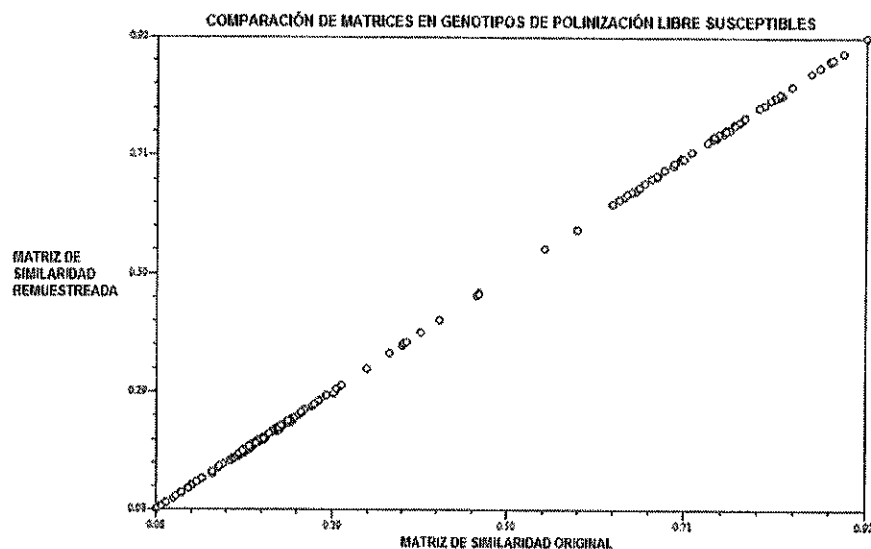


Figura 41. Comparación entre la matriz de similitud originada con la matriz binaria con respecto a la matriz de similitud remuestreada, en las variedades susceptibles provenientes de polinización libre.

Al contrastar los gráficos de comparación de matrices (Figuras 38-41), con los gráficos que se obtienen de cada uno de los remuestreos (Figura 5a-8a del Anexo), donde se compara la matriz de similitud generada de la matriz básica de datos o matriz binaria con cada una de las matrices de los 2000 remuestreos (para casos prácticos se tomó de regencia el primer remuestreo proporcionado por el programa para realizar este análisis), se aprecia que existen diferencias

contundentes al realizar los remuestreos que cuando no se hacen, pues tanto la dispersión de los valores de correlación son totalmente diferentes y mas bajos con respecto a los que se tienen una vez hechos los remuestreos ($r=0.99600$ para los valores de los genotipos provenientes de autopolinización resistentes y $r=0.99314$ para los de PL y a su vez una $r=98577$ para los genotipos provenientes de autopolinización susceptibles como $r=97806$ para los de PL).

V. CONCLUSIONES

Phytophthora capsici fue el patógeno inoculado que provocó mayor incidencia en las variedades de calabaza seleccionadas anteriormente como resistentes, tanto en las provenientes de autopolinización (68.4%) como de polinización libre (71.9%).

En *Cucurbita pepo* no se logró recuperar plantas resistentes a ninguno de los patógenos inoculados (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* y la mezcla de los cuatro hongos) en la verificación de la resistencia, ya que fue tanto las de autopolinización como las de polinización libre presentaron 100% de incidencia y 100% de plantas muertas, sugiriendo que las plantas resistentes se habían escapado al daño de dichos hongos.

Los marcadores moleculares RAPD, Microsatélites y RAMP fueron útiles para detectar bandas que permitieron diferenciar variedades experimentales de calabaza resistentes y susceptibles a hongos que afectan la raíz del cultivo.

De las técnicas moleculares utilizadas en la caracterización de la resistencia de las calabazas (RAPD, Microsatélites y RAMP), los Microsatélites fueron las que marcaron mejores diferencias entre variedades resistentes y susceptibles. En 19 variedades resistentes de autopolinización (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 24 y 25) y en 15 variedades de polinización libre (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23 y 24), fue donde se marcaron las mayores diferencias con respecto a las susceptibles.

La técnica combinada RAMP (RAPD + Microsatélites) detectó diferencias en cuanto a la separación de grupos por su reacción a los hongos (resistentes y susceptibles dentro de especies de calabaza); pero debido a que evidenció alto polimorfismo (alta variabilidad genética) entre las variedades experimentales de calabaza evaluadas, no se consideró eficiente para caracterizar a las variedades resistentes en contraste con las susceptibles.

VI. LITERATURA CITADA

- Adams, D., Kim, J., Jensen, R., Les, M. Slice E., D. and Walker, J. 2008. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.20r. Exeter Software, new York, U. S. A.
- Agrios N., G. 2007. Fitopatología. Segunda edición. Noriega Editores. México, D. F. 838p.
- Agrios G., N. 1996. Fitopatología. Segunda edición. Ed. UTEHA. México, D.F. 838 p.
- Aguilar R., M. y Medina L., Ma. G. 2003. Resistencia genética de calabazas (*C. argyrosperma* var. *Argyrosperma* y *C. argyrosperma* var. *Sternosperma* Hubert), a damping off. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Anaya R., S. y Romero N., J. 1999. Hortalizas. Plagas y enfermedades. Ed. Trillas. México, D.F. 544p.
- Anrens, 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.
- Apple J., L. 1978. El papel de la resistencia de la planta hospedera en los sistemas de control integrado en Principios Generales de Control Integrado de Plagas y Enfermedades con énfasis en maíz y soya. Universidad Nacional Agraria. Lima-Perú.
- Aragón L., R. 2005. Caracterización de materiales experimentales de calabaza (*Cucúrbita spp*) y verificación de su resistencia al damping off. Tesis (Maestría). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 131 p.

- Arnold, C.; Rossetto, M.; McNally, J.; Henry R., J. 2002. The applications of ISSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. Am. J. Bot. 89:22-28.
- Ayala E., J. A. 2002. Cambios ocasionados en los parámetros genéticos por la selección participativa en una variedad local de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) tipo "round zucchini". Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura. Fitotecnia, UACH. México. 156 p.
- Balbás, P. 2002. De la Biología Molecular a la Biotecnología. Editorial Trillas. México D. F.
- Berumen C., J. 1993. El análisis del ácido desoxirribonucleico –DNA- en la identificación de individuos. Ciencia y Desarrollo. No 111: 34-42.
- Blancard, D.; Lecoq, H.; Pitrat, M. 1991. Enfermedades de las Cucurbitáceas. Observar, Identificar, Luchar. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. Pág. 301.
- Bruce C., R.; Maynard D., N. and Wessel-Beaver, L. 1999. Tropical pumkin hybrid development: landraces to hybrid cultivars. Acta hort. 510:95-100.
- Caperton, J. 1986. Efeccts of *Fusarium* inoculum density and root-knot nematodes. Mundi prensa. Madrid, España.
- Chávez A., J. L. 1993. Mejoramiento de plantas. Ed. Trillas. 2ª ed. México. 131 p.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic assosiation between species. Ecology, 26:297-302.
- Dunn, G. and B. S. Everitt. 1982. An introduccion to mathematical taxonomy. Cambridge. New York. 152 pp.

- Erwin C., D. and O. Ribeiro, K. 1996. *Phytophthora: diseases worldwide*, American Phytopathological Society. APS_PRESS. St. Paul. Minnesota, USA.
- Estrada D., E. 2000. Selección de germoplasma de calabaza (*C. argyrosperma* var. *argyrosperma* Huber) por tolerancia a herbicidas selectivos a maíz (atrazina, linuron y simazina) en condiciones de invernadero e hidroponia.
- Evans, C. R. 1990. Biobidamic cucurbits in the World Tropics. In biology and utilization of cucurbitaceae. Bates M. D.; R. Robinson, W. Jeffrey. Cornell University. U. S. A.
- FAO, 1998. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. ¿Que es el manejo integrado de plagas (MIP)? <http://www.fao.org/NOTICIAS/1998/ipm-s.htm>. Revisada el 5 de noviembre del 2008.
- FAO, 2006. Anuario de producción. Vol. 51. Roma Italia. Pp. 130-131.
- 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.
- Garzón T., J. A. 1978. El cultivo de la calabacita en el Estado de Hidalgo. INIA CIAMEC, México, D. F.
- Gómez G., R. A. 2005. Efecto de enraizadores y bioactivadores en el rendimiento de 3 cultivos hortícolas (pepino, calabacita y tomate de cáscara). Chapingo, México.
- Goodman, D. M. 1991. Biological control of dollar spot of creeping bentgrass. *Phytopathology* 81: 1438-1446.

- 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/>. Revisada el 3 de noviembre del 2008.
- Hartl, L. y Seefelder, S. 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theor Appl Genet* (1998) 96 : 112-116.
- Jeffreys A., J.; Wilson, V. and Thein L., S. 1985. Hipervariable "minisatelite" regions in human DNA. *Nature* 312:67-73.
- INIFAP. 2004. Enfermedades del algodnero en Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua.
- Lancaster M., E. 2000. Damping off and rot. <http://edis.ifas.ufl.edu/PG055> (visitada el 28 de octubre del 2008).
- Lee I., M.; Davis E., R. and Hiruki, C. 1991. Genetic Interrelatednes among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Enviromental Microbiology*. 57: 3565-3569.
- León G., H. 1978. Enfermedades de los cultivos en el Estado de Sinaloa. CIAPA. Culiacán, Sinaloa. 213pp.
- León J., 1987. Botánica de los cultivos Tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 2ª ed. 445 p.
- Lindsey, K. y Jones M., G. K. 1992. Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 276 p.

- Lira S. R. 1995. Estudios taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de importancia económica. IPGRI. Roma, Italia. 218 p.
- Lira S. R., Montes-Hernández S. 1992. Cucurbits (*Cucurbita* spp.) Neglected crops: 1492 from a different perspective. FAO. Roma pp. 63-77.
- 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.
- Lucas G., B.; Campbell L., C. and Lucas T., L. 1985. Introduction to plant disease: Identification and Management. The AVI Publishing Company Inc. Westport Connecticut, U. S. A.
- Mantel N., A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res., 27:209 # 220.
- Mendoza Z., C. 1999. Diagnóstico de enfermedades fungosas. UACH. Chapingo, Méx. 168p.
- Mendoza Z., C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Mendoza, Z., C. 1990. Fungicidas sistémicos y su modo de acción. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 75-78.
- Mendoza Z., C. y Pinto C., B. 1985. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 311.
- Montalvo H., L. 1998. Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Tesis (Maestría). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 111p.

- Montiel H., D. I. 2003. Resistencia genética al damping off en una variedad criolla de calabaza (*C. pepo* L.) procedente de Oriental, Puebla. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- 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. Gonzáles, H. y M. Livera M. (eds.) Sociedad Mexicana de Citogenética. Pp. 239-250.
- Nei, M. and Li H., M. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 76:5269-5273.
- Pérez M., A. 2002. Obtención y utilización de resistencia genética en calabazas (*Cucurbita* spp) al damping off. Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Pérez G., M.; Márquez S., F. y Peña L., A. 1997. Mejoramiento Genético Hortalizas. UACH. 380 p.
- Pollak, A. 2001. The green revolution of agriculture. New York Time. May 15..<http://cuke.hort.ncsu.edu/>. Revisada en 3 de septiembre del 2008.
- Ramírez V., J. 1991. Enfermedades de hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa. 105 p.
- Ramos L. A. 1976. Combate químico de la roya del haba *Uromyces fabae* pers. Memorias del VII Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, S. A. 92-93 pp.
- Ristaino J., B.; Larkin R., P.; Campbell C., L. 1994. Spatial dynamics of disease symptom expression during *Phytophthora* epidemics in bell pepper. Phytopathology 84:47-55.

- 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.
- Robinson R., A. 1999, "La Aceptación de la Resistencia Horizontal en los Cultivos." *Monitor de Biotecnología y Desarrollo*, Compendio 1995-1997, p. 54-56.
- 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.
- Romero T., A. 1998. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 85 p.
- Romero C., S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Romero C., S. 1988. Hongos fitopatógenos. Patronato Universitario. UACH. Chapingo, Méx.
- SAGARPA. 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Centro de Estadística Agropecuaria (1999-2005).
- Sánchez H., E. y Velásquez E., M. C. 1999. Selección de germoplasma de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y chilacayote (*C. Ficifolia* Bouché) para resistencia al Damping off. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México. 71p.
- Santos Z., C. 2003. Selección en calabaza (*Cucurbita moschata* Dunch) por resistencia a hongos del suelo causantes de damping off. Tesis Profesional.

- Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Smith I., M.; Dunez, J.; Phillips D., H.; Lelliott R., A.; Archer S., A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi Prensa. Bilbao, España. 671p.
- Teodoro J., M. 2005. Cultivo de Calabazas. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Tingey, V. S. and Tufo del P., J. 1993. Genetic analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiology*. 101: 349-352.
- Tlapal B., B. 2004. Curso de micología agrícola. Verano-otoño, 2004. UACH. Chapingo, México. s/p.
- Valadez L., A. 1990. Producción de hortalizas. Editorial De Limusa, México, D. F. 223-233 pp.
- 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.
- Whitaker W., T. and Davis, N. G. 1962. Cucurbitis, Botany, Cultivation and Utilization. Edit interscience Publishers, Inc. Londres, Inglaterra.
- Zavaleta-Mejía, E. 2000. Alternativa de manejo de las enfermedades de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 17 (3):201-207.
- Zitter T., A. 1998. Compendium of Cucurbit Diseases. The American Phytopathological Society. APS Press. USA. 87 p.

VII. ANEXOS

Cuadro 1a. Matriz de similitud de las variedades de autopolinización resistentes.

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	22	23	24	25
1	1.000																		
2	0.904	1.000																	
3	0.810	0.775	1.000																
4	0.816	0.805	0.916	1.000															
6	0.853	0.842	0.854	0.886	1.000														
7	0.214	0.235	0.264	0.295	0.253	1.000													
8	0.235	0.233	0.261	0.292	0.273	0.948	1.000												
9	0.238	0.235	0.242	0.273	0.276	0.958	0.948	1.000											
10	0.256	0.253	0.235	0.244	0.272	0.911	0.901	0.933	1.000										
11	0.265	0.262	0.289	0.230	0.256	0.842	0.833	0.863	0.921	1.000									
12	0.259	0.256	0.283	0.315	0.250	0.907	0.878	0.887	0.879	0.833	1.000								
13	0.241	0.238	0.267	0.299	0.256	0.947	0.917	0.926	0.899	0.851	0.938	1.000							
14	0.262	0.259	0.264	0.295	0.276	0.938	0.928	0.917	0.889	0.842	0.928	0.968	1.000						
15	0.286	0.282	0.284	0.295	0.299	0.917	0.907	0.917	0.889	0.842	0.907	0.947	0.979	1.000					
16	0.289	0.286	0.289	0.322	0.279	0.905	0.896	0.884	0.876	0.830	0.938	0.936	0.947	0.947	1.000				
22	0.282	0.278	0.282	0.293	0.296	0.556	0.571	0.578	0.595	0.584	0.615	0.562	0.600	0.622	0.584	1.000			
23	0.219	0.216	0.225	0.234	0.237	0.588	0.581	0.588	0.608	0.595	0.581	0.595	0.612	0.612	0.595	0.911	1.000		
24	0.187	0.184	0.220	0.228	0.205	0.575	0.568	0.575	0.593	0.581	0.636	0.581	0.598	0.598	0.581	0.938	0.921	1.000	
25	0.211	0.234	0.217	0.225	0.228	0.636	0.629	0.614	0.610	0.598	0.607	0.621	0.659	0.659	0.644	0.854	0.909	0.886	1.000

Cuadro 2a. Matriz de similitud promedio del remuestreo de las variedades de autopolinización resistentes.

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	22	23	24	25
1	1.000																		
2	0.903	1.000																	
3	0.809	0.774	1.000																
4	0.814	0.804	0.915	1.000															
6	0.851	0.840	0.852	0.885	1.000														
7	0.213	0.234	0.263	0.294	0.252	1.000													
8	0.234	0.232	0.260	0.291	0.272	0.948	1.000												
9	0.237	0.234	0.241	0.271	0.274	0.958	0.947	1.000											
10	0.255	0.252	0.235	0.243	0.270	0.910	0.900	0.932	1.000										
11	0.264	0.260	0.288	0.229	0.255	0.841	0.832	0.862	0.921	1.000									
12	0.258	0.255	0.281	0.313	0.249	0.906	0.877	0.886	0.879	0.832	1.000								
13	0.240	0.238	0.265	0.297	0.255	0.947	0.916	0.925	0.898	0.849	0.937	1.000							
14	0.261	0.258	0.263	0.294	0.275	0.937	0.927	0.916	0.888	0.840	0.927	0.968	1.000						
15	0.285	0.282	0.263	0.293	0.297	0.916	0.907	0.916	0.883	0.840	0.907	0.947	0.979	1.000					
16	0.288	0.285	0.288	0.320	0.278	0.904	0.895	0.883	0.876	0.828	0.938	0.936	0.947	0.947	1.000				
22	0.280	0.277	0.281	0.291	0.295	0.552	0.588	0.574	0.592	0.581	0.611	0.558	0.596	0.619	0.581	1.000			
23	0.218	0.215	0.224	0.232	0.235	0.584	0.577	0.584	0.604	0.591	0.577	0.591	0.607	0.607	0.591	0.911	1.000		
24	0.186	0.184	0.219	0.227	0.205	0.570	0.564	0.570	0.588	0.577	0.631	0.576	0.593	0.593	0.577	0.938	0.921	1.000	
25	0.210	0.234	0.217	0.224	0.227	0.632	0.624	0.608	0.605	0.593	0.602	0.615	0.654	0.654	0.639	0.854	0.909	0.885	1.000

Cuadro 3a. Matriz de similitud de las variedades de polinización libre resistentes.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	22	23	24
1	1.000																	
2	0.962	1.000																
3	0.925	0.962	1.000															
4	0.415	0.395	0.415	1.000														
5	0.390	0.395	0.390	0.929	1.000													
6	0.847	0.857	0.847	0.414	0.414	1.000												
7	0.329	0.310	0.306	0.782	0.805	0.356	1.000											
8	0.310	0.313	0.310	0.744	0.814	0.360	0.921	1.000										
9	0.313	0.341	0.337	0.753	0.800	0.386	0.909	0.966	1.000									
10	0.333	0.361	0.357	0.767	0.814	0.404	0.899	0.932	0.966	1.000								
11	0.353	0.333	0.329	0.782	0.828	0.400	0.933	0.944	0.932	0.966	1.000							
12	0.337	0.341	0.337	0.776	0.847	0.364	0.909	0.943	0.930	0.943	0.955	1.000						
13	0.306	0.333	0.353	0.759	0.805	0.356	0.889	0.899	0.909	0.921	0.911	0.932	1.000					
14	0.315	0.341	0.337	0.747	0.813	0.362	0.872	0.882	0.891	0.903	0.894	0.913	0.936	1.000				
15	0.306	0.333	0.329	0.759	0.828	0.356	0.911	0.899	0.909	0.921	0.911	0.932	0.956	0.957	1.000			
16	0.318	0.345	0.341	0.733	0.800	0.366	0.860	0.870	0.879	0.891	0.882	0.901	0.903	0.907	0.925	1.000		
22	0.301	0.304	0.323	0.674	0.674	0.347	0.653	0.639	0.646	0.660	0.673	0.667	0.714	0.667	0.673	0.653	1.000	
23	0.273	0.276	0.273	0.733	0.733	0.323	0.710	0.696	0.725	0.739	0.731	0.725	0.731	0.701	0.729	0.891	1.000	
24	0.315	0.318	0.315	0.681	0.681	0.362	0.660	0.645	0.674	0.688	0.681	0.674	0.681	0.653	0.680	0.863	0.948	1.000

Cuadro 4a. Matriz de similitud promedio del remuestreo de las variedades de polinización libre resistentes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	22	23	24
1	1.000																		
2	0.961	1.000																	
3	0.924	0.962	1.000																
4	0.412	0.392	0.411	1.000															
5	0.387	0.392	0.388	0.928	1.000														
6	0.846	0.856	0.846	0.411	0.410	1.000													
7	0.326	0.305	0.302	0.780	0.803	0.352	1.000												
8	0.306	0.309	0.306	0.742	0.812	0.355	0.920	1.000											
9	0.309	0.338	0.334	0.750	0.798	0.382	0.908	0.965	1.000										
10	0.329	0.358	0.354	0.765	0.812	0.400	0.898	0.931	0.965	1.000									
11	0.350	0.329	0.326	0.780	0.826	0.396	0.933	0.943	0.931	0.966	1.000								
12	0.333	0.337	0.333	0.774	0.845	0.359	0.907	0.941	0.929	0.942	0.954	1.000							
13	0.302	0.329	0.349	0.756	0.802	0.351	0.887	0.897	0.908	0.920	0.909	0.930	1.000						
14	0.310	0.337	0.333	0.744	0.810	0.357	0.869	0.879	0.889	0.901	0.891	0.910	0.935	1.000					
15	0.302	0.329	0.326	0.756	0.826	0.351	0.909	0.897	0.908	0.920	0.909	0.930	0.955	0.956	1.000				
16	0.314	0.341	0.337	0.730	0.797	0.361	0.857	0.867	0.877	0.889	0.879	0.898	0.901	0.905	0.923	1.000			
22	0.299	0.302	0.320	0.671	0.670	0.344	0.651	0.636	0.644	0.658	0.671	0.664	0.712	0.664	0.671	0.650	1.000		
23	0.270	0.273	0.270	0.730	0.730	0.320	0.707	0.693	0.722	0.737	0.729	0.722	0.728	0.697	0.728	0.726	0.890	1.000	
24	0.312	0.315	0.312	0.677	0.677	0.358	0.657	0.642	0.671	0.685	0.678	0.670	0.677	0.649	0.677	0.677	0.862	0.948	1.000

Cuadro 5a. Matriz de similitud de las variedades de autopolinización susceptibles.

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1.000																					
2	0.832	1.000																				
3	0.642	0.782	1.000																			
4	0.678	0.788	0.800	1.000																		
6	0.607	0.731	0.784	0.744	1.000																	
7	0.220	0.267	0.225	0.289	0.312	1.000																
8	0.212	0.255	0.213	0.299	0.321	0.897	1.000															
9	0.234	0.238	0.150	0.218	0.265	0.618	0.667	1.000														
10	0.219	0.237	0.182	0.198	0.286	0.529	0.566	0.797	1.000													
11	0.189	0.204	0.180	0.158	0.274	0.543	0.563	0.734	0.817	1.000												
12	0.209	0.243	0.188	0.222	0.314	0.586	0.641	0.756	0.803	0.872	1.000											
13	0.188	0.224	0.228	0.242	0.306	0.683	0.651	0.559	0.673	0.680	0.692	1.000										
14	0.154	0.184	0.203	0.198	0.306	0.610	0.628	0.610	0.665	0.720	0.710	0.778	1.000									
15	0.185	0.220	0.222	0.258	0.276	0.595	0.568	0.567	0.679	0.608	0.642	0.826	0.783	1.000								
17	0.127	0.154	0.194	0.214	0.205	0.347	0.354	0.288	0.311	0.258	0.300	0.434	0.361	0.471	1.000							
18	0.207	0.207	0.206	0.257	0.233	0.360	0.346	0.353	0.391	0.288	0.320	0.426	0.352	0.491	0.752	1.000						
19	0.206	0.205	0.184	0.273	0.231	0.297	0.286	0.292	0.326	0.235	0.270	0.367	0.294	0.432	0.725	0.835	1.000					
20	0.203	0.186	0.182	0.246	0.224	0.283	0.256	0.322	0.340	0.260	0.304	0.364	0.264	0.390	0.667	0.806	0.857	1.000				
21	0.187	0.205	0.174	0.247	0.213	0.306	0.316	0.259	0.280	0.222	0.268	0.425	0.300	0.366	0.575	0.551	0.545	0.505	1.000			
22	0.154	0.184	0.177	0.198	0.188	0.390	0.372	0.288	0.345	0.280	0.318	0.444	0.311	0.435	0.386	0.389	0.385	0.347	0.375	1.000		
23	0.190	0.206	0.205	0.240	0.213	0.418	0.400	0.331	0.370	0.312	0.345	0.444	0.323	0.416	0.370	0.427	0.373	0.400	0.382	0.808	1.000	
24	0.190	0.227	0.179	0.200	0.167	0.346	0.306	0.222	0.275	0.202	0.264	0.404	0.225	0.374	0.366	0.374	0.352	0.350	0.304	0.764	0.714	1.000

Cuadro 6a. Matriz de similitud promedio del remuestreo de las variedades de autopolinización susceptibles.

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1.000																					
2	0.832	1.000																				
3	0.640	0.779	1.000																			
4	0.676	0.785	0.798	1.000																		
6	0.605	0.728	0.782	0.742	1.000																	
7	0.219	0.264	0.224	0.287	0.310	1.000																
8	0.211	0.253	0.212	0.296	0.318	0.896	1.000															
9	0.234	0.238	0.149	0.217	0.264	0.516	0.565	1.000														
10	0.220	0.237	0.181	0.197	0.284	0.527	0.565	0.796	1.000													
11	0.190	0.203	0.179	0.188	0.272	0.541	0.561	0.733	0.814	1.000												
12	0.208	0.242	0.187	0.221	0.312	0.584	0.639	0.755	0.801	0.870	1.000											
13	0.188	0.224	0.228	0.242	0.305	0.681	0.649	0.556	0.668	0.675	0.688	1.000										
14	0.154	0.184	0.203	0.198	0.305	0.609	0.626	0.607	0.651	0.717	0.707	0.774	1.000									
15	0.185	0.220	0.222	0.257	0.276	0.594	0.567	0.565	0.674	0.605	0.640	0.824	0.782	1.000								
17	0.127	0.153	0.193	0.212	0.204	0.342	0.350	0.285	0.306	0.254	0.297	0.430	0.357	0.466	1.000							
18	0.208	0.206	0.205	0.255	0.233	0.356	0.343	0.351	0.388	0.286	0.318	0.422	0.349	0.487	0.749	1.000						
19	0.206	0.204	0.183	0.271	0.231	0.293	0.282	0.290	0.322	0.232	0.266	0.363	0.290	0.428	0.722	0.833	1.000					
20	0.203	0.185	0.181	0.245	0.224	0.279	0.253	0.320	0.337	0.256	0.301	0.360	0.261	0.385	0.662	0.803	0.855	1.000				
21	0.186	0.203	0.171	0.245	0.210	0.301	0.310	0.255	0.275	0.217	0.264	0.420	0.294	0.361	0.570	0.545	0.540	0.500	1.000			
22	0.153	0.182	0.176	0.196	0.187	0.386	0.368	0.285	0.341	0.277	0.315	0.440	0.308	0.431	0.382	0.386	0.381	0.343	0.369	1.000		
23	0.190	0.204	0.203	0.239	0.211	0.414	0.396	0.327	0.365	0.308	0.342	0.441	0.320	0.411	0.365	0.424	0.369	0.378	0.369	0.805	1.000	
24	0.188	0.224	0.178	0.198	0.165	0.341	0.302	0.220	0.272	0.199	0.262	0.400	0.222	0.370	0.363	0.371	0.349	0.347	0.299	0.762	0.712	1.000

Cuadro 7a. Matriz de similitud de las variedades de polinización libre susceptibles.

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	20	21	22	23	24
1	1.000																				
2	0.826	1.000																			
3	0.758	0.655	1.000																		
4	0.821	0.750	0.765	1.000																	
6	0.586	0.680	0.629	0.700	1.000																
7	0.212	0.172	0.231	0.294	0.229	1.000															
8	0.132	0.088	0.182	0.205	0.150	0.818	1.000														
9	0.125	0.083	0.174	0.195	0.190	0.761	0.882	1.000													
10	0.123	0.082	0.194	0.193	0.188	0.710	0.816	0.897	1.000												
11	0.127	0.085	0.198	0.198	0.193	0.681	0.752	0.838	0.925	1.000											
12	0.133	0.090	0.207	0.208	0.177	0.667	0.701	0.752	0.824	0.860	1.000										
13	0.121	0.103	0.179	0.206	0.229	0.641	0.636	0.674	0.667	0.659	0.713	1.000									
14	0.107	0.090	0.184	0.208	0.228	0.690	0.701	0.752	0.745	0.740	0.771	0.782	1.000								
16	0.113	0.095	0.193	0.192	0.187	0.651	0.645	0.722	0.776	0.771	0.761	0.747	0.804	1.000							
18	0.243	0.212	0.233	0.211	0.231	0.186	0.208	0.240	0.218	0.182	0.211	0.209	0.189	0.242	1.000						
19	0.232	0.184	0.224	0.186	0.182	0.131	0.188	0.215	0.213	0.217	0.224	0.150	0.190	0.196	0.783	1.000					
20	0.244	0.195	0.235	0.196	0.191	0.137	0.196	0.224	0.222	0.226	0.234	0.157	0.198	0.224	0.745	0.870	1.000				
21	0.243	0.182	0.233	0.184	0.179	0.163	0.208	0.240	0.218	0.202	0.211	0.186	0.189	0.220	0.681	0.748	0.818	1.000			
22	0.229	0.226	0.220	0.194	0.243	0.244	0.239	0.271	0.247	0.232	0.242	0.268	0.242	0.299	0.333	0.378	0.377	0.422	1.000		
23	0.240	0.209	0.207	0.182	0.228	0.253	0.268	0.297	0.255	0.240	0.271	0.276	0.271	0.304	0.379	0.466	0.468	0.547	0.813	1.000	
24	0.216	0.182	0.186	0.158	0.205	0.256	0.229	0.260	0.218	0.202	0.211	0.256	0.232	0.286	0.362	0.383	0.400	0.468	0.800	0.884	1.000

Cuadro 8a. Matriz de similitud promedio del remuestreo de las variedades de polinización libre susceptibles

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	20	21	22	23	24
1	1.000																				
2	0.821	1.000																			
3	0.754	0.649	1.000																		
4	0.819	0.746	0.760	1.000																	
6	0.581	0.676	0.625	0.696	1.000																
7	0.209	0.168	0.227	0.289	0.221	1.000															
8	0.131	0.087	0.179	0.202	0.145	0.816	1.000														
9	0.124	0.082	0.173	0.192	0.186	0.759	0.882	1.000													
10	0.123	0.081	0.193	0.190	0.184	0.707	0.814	0.895	1.000												
11	0.126	0.083	0.197	0.195	0.188	0.678	0.751	0.836	0.924	1.000											
12	0.132	0.088	0.206	0.204	0.174	0.664	0.699	0.751	0.823	0.859	1.000										
13	0.120	0.102	0.178	0.202	0.225	0.638	0.634	0.671	0.664	0.656	0.708	1.000									
14	0.106	0.088	0.182	0.204	0.223	0.687	0.699	0.751	0.743	0.737	0.769	0.779	1.000								
16	0.111	0.094	0.191	0.188	0.183	0.649	0.644	0.719	0.774	0.768	0.757	0.745	0.803	1.000							
18	0.239	0.207	0.230	0.207	0.228	0.186	0.208	0.240	0.218	0.217	0.210	0.210	0.191	0.242	1.000						
19	0.228	0.181	0.223	0.183	0.180	0.130	0.188	0.215	0.213	0.217	0.224	0.150	0.190	0.196	0.781	1.000					
20	0.241	0.191	0.233	0.193	0.189	0.137	0.196	0.224	0.222	0.226	0.234	0.157	0.198	0.224	0.743	0.870	1.000				
21	0.239	0.177	0.230	0.180	0.177	0.163	0.208	0.240	0.218	0.202	0.211	0.186	0.190	0.220	0.678	0.746	0.816	1.000			
22	0.229	0.226	0.220	0.194	0.244	0.242	0.237	0.269	0.246	0.230	0.240	0.266	0.241	0.297	0.332	0.377	0.376	0.420	1.000		
23	0.240	0.209	0.207	0.181	0.228	0.252	0.268	0.297	0.255	0.239	0.270	0.275	0.270	0.303	0.380	0.465	0.467	0.546	0.812	1.000	
24	0.217	0.183	0.187	0.158	0.206	0.255	0.228	0.260	0.217	0.201	0.209	0.255	0.232	0.285	0.361	0.382	0.398	0.466	0.798	0.884	1.000

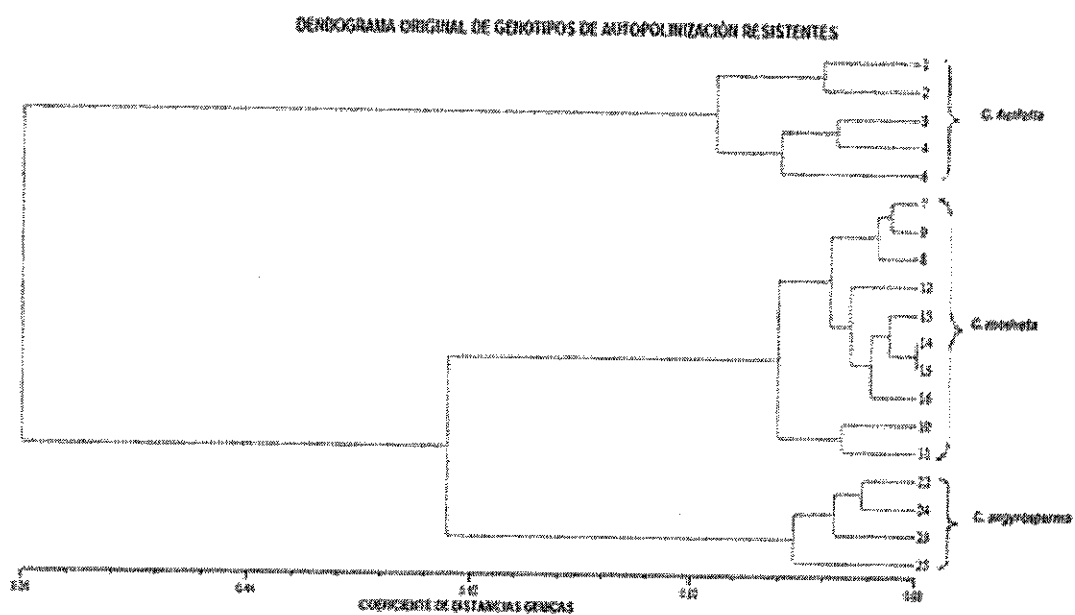


Figura 1a. Dendrograma generado de la matriz de similaridad sin remuestreo para las variedades provenientes de autopolinización resistentes.

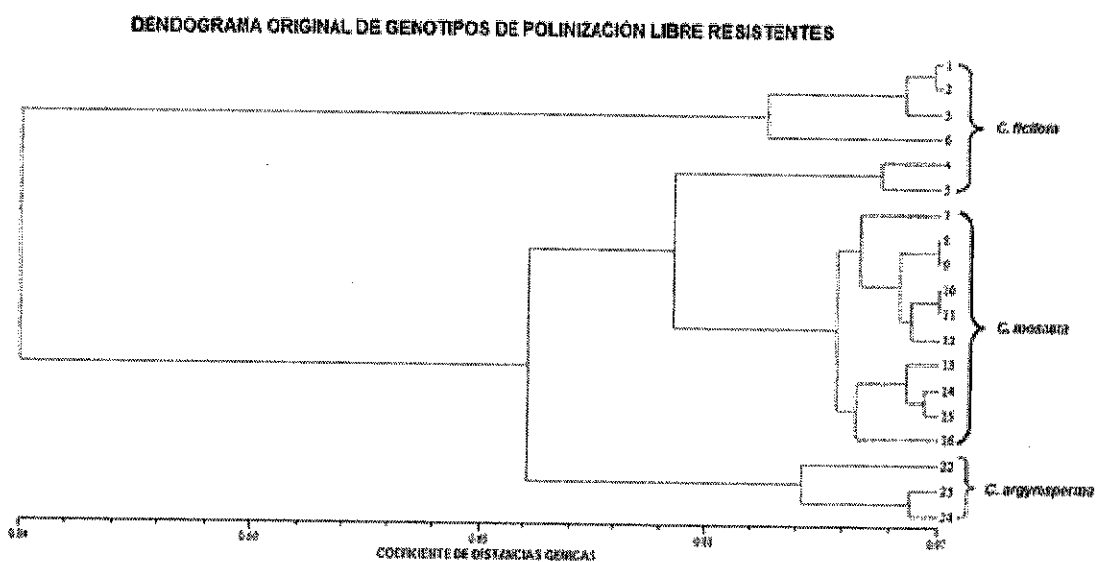


Figura 2a. Dendrograma generado de la matriz de similaridad sin remuestreo para las variedades provenientes de polinización libre resistentes.

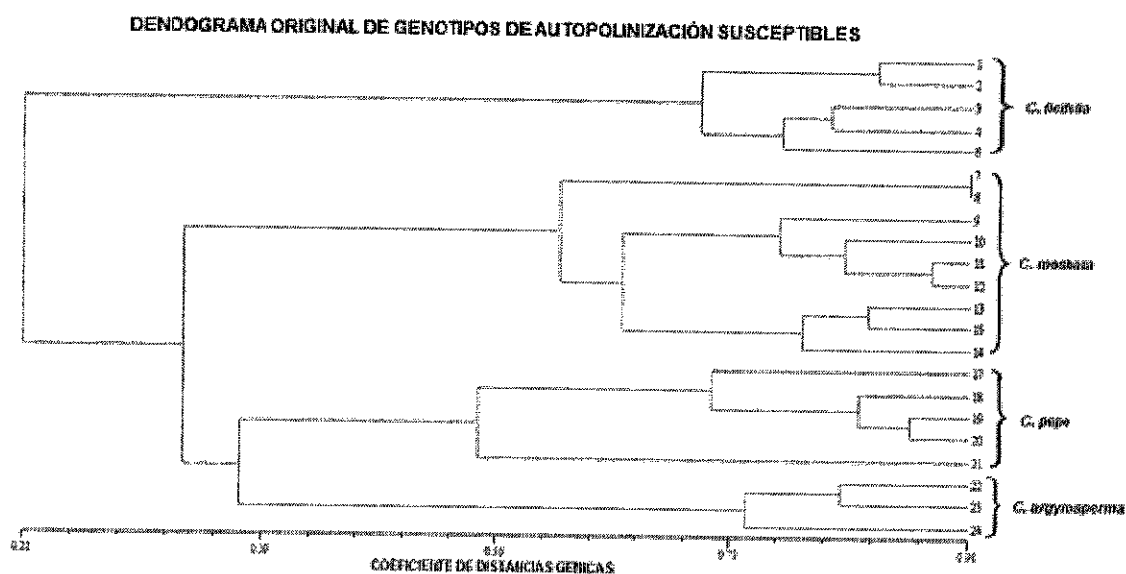


Figura 3a. Dendograma generado de la matriz de similaridad sin remuestreo para las variedades provenientes de autopolinización susceptibles.

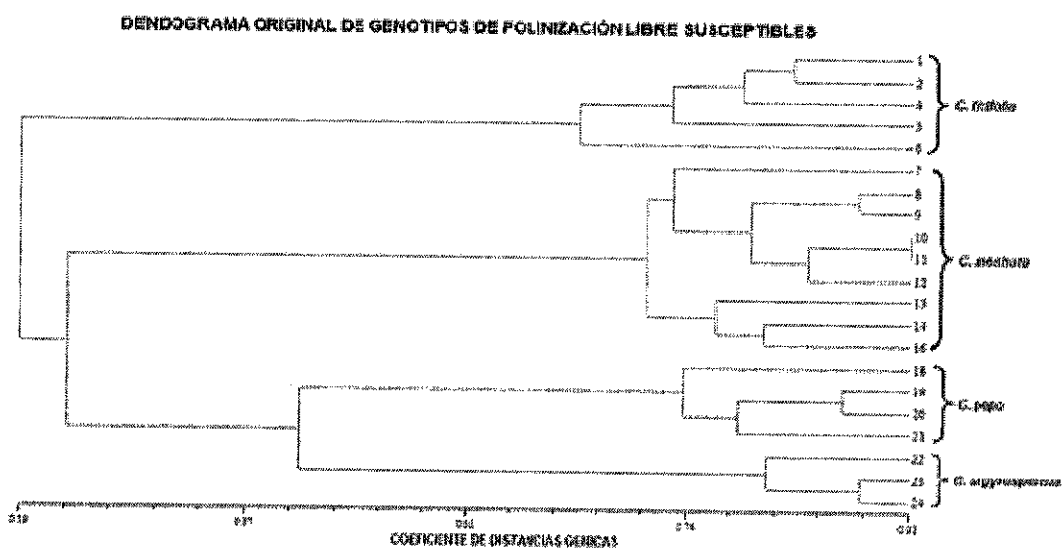


Figura 4a. Dendograma generado de la matriz de similaridad sin remuestreo para las variedades provenientes de polinización libre susceptibles.

Cuadro 9a. Niveles de confianza con un $\alpha = 0.05$ de cada una de la variedades provenientes de autopolinización resistentes, generados mediante el análisis de agrupación, al generarse los dendogramas.

Variedad	Nivel de confianza ($\alpha = 0.05$)	
	Matriz de similaridad original	Matriz de similaridad remuestreada
1	0.9041	0.9026
2	0.8169	0.8152
3	0.9157	0.9149
4	0.8699	0.8685
6	0.2570	0.2559
7	0.9583	0.9575
9	0.9485	0.9477
8	0.9113	0.9104
12	0.9275	0.9271
13	0.9579	0.9573
14	0.9792	0.9790
15	0.9436	0.9431
16	0.8697	0.8686
10	0.9213	0.9206
11	0.5997	0.5953
22	0.9383	0.9383
24	0.9162	0.9163
23	0.8829	0.8824
25	-----	-----
Promedio	0.86211111	0.86115

Cuadro 10a. Niveles de confianza con un $\alpha = 0.05$ de cada una de la variedades provenientes de polinización libre resistentes, generados mediante el análisis de agrupación, al generarse los dendogramas.

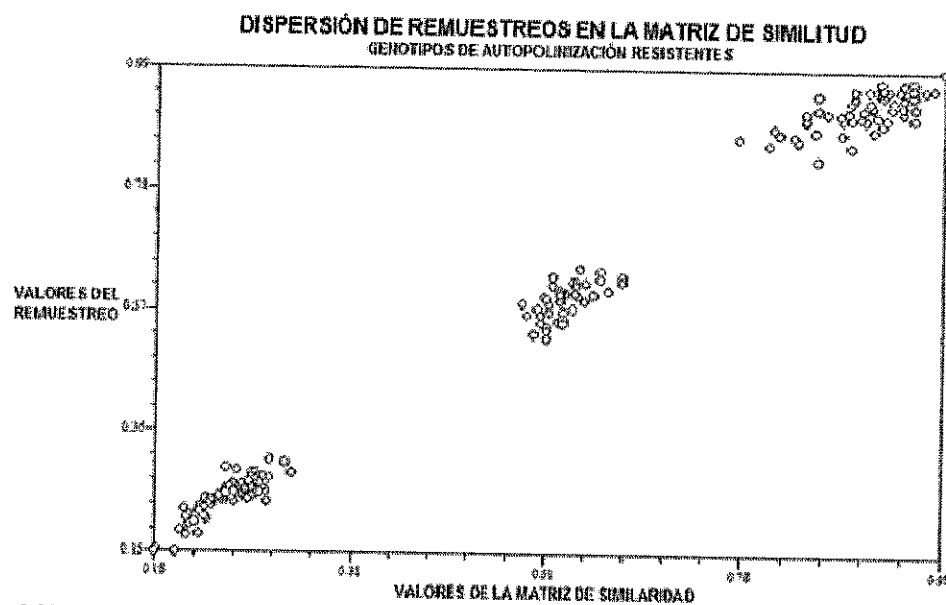
Variedad	Nivel de confianza ($\alpha = 0.05$)	
	Matriz de similaridad original	Matriz de similaridad remuestreada
1	0.9620	0.9425
2	0.9435	0.9616
3	0.8504	0.8494
6	0.3429	0.3393
4	0.9286	0.9278
5	0.7877	0.7855
7	0.9143	0.9132
8	0.9655	0.9651
9	0.9410	0.9402
10	0.9663	0.9656
11	0.9485	0.9477
12	0.8993	0.8972
13	0.9459	0.9447
14	0.9574	0.9560
15	0.9117	0.9095
16	0.6877	0.6846
22	0.8769	0.8760
23	0.9485	0.9478
24	----	----
Promedio	0.87656111	0.87520556

Cuadro 11a. Niveles de confianza con un $\alpha = 0.05$ de cada una de la variedades provenientes de autopolinización susceptibles, generados mediante el análisis de agrupación, al generarse los dendogramas.

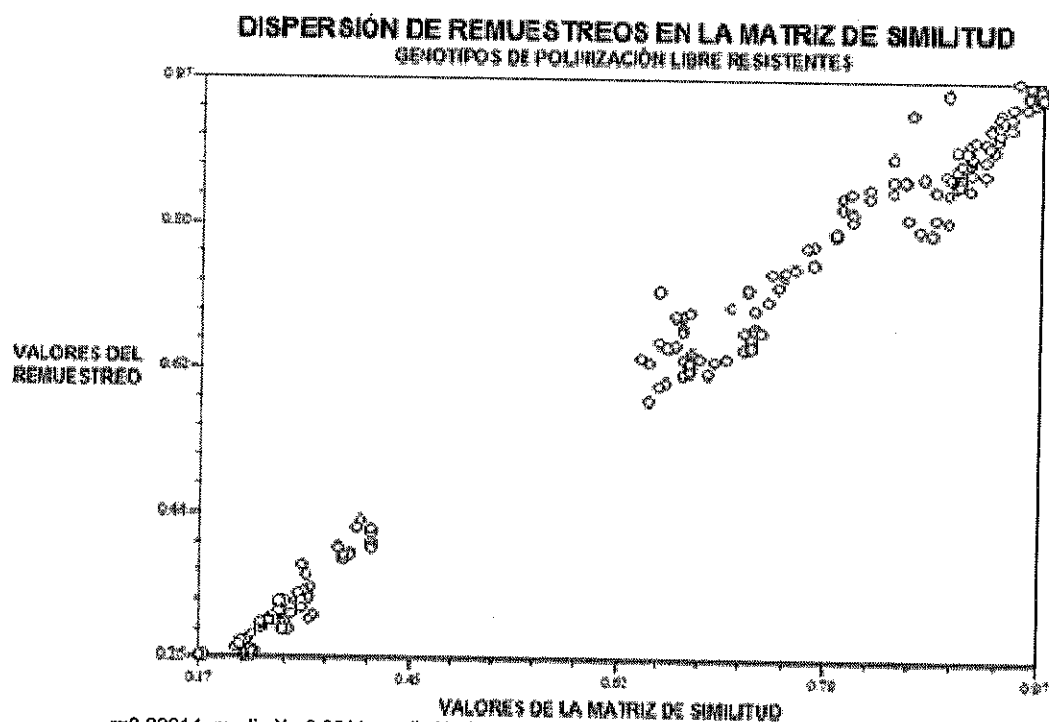
Variedad	Nivel de confianza ($\alpha = 0.05$)	
	Matriz de similaridad original	Matriz de similaridad remuestreada
1	0.8320	0.8318
2	0.7045	0.7022
3	0.8000	0.7978
4	0.7640	0.7618
6	0.2177	0.2166
7	0.8974	0.8965
8	0.6034	0.6017
9	0.7623	0.7613
10	0.8099	0.8077
11	0.8718	0.8702
12	0.6495	0.6461
13	0.8261	0.8244
15	0.7802	0.7784
14	0.3324	0.3287
17	0.7149	0.7111
18	0.8202	0.8177
19	0.8571	0.8552
20	0.5441	0.5388
21	0.3719	0.3681
22	0.8081	0.8051
23	0.7392	0.7368
24	----	----
Promedio	0.70031905	0.698

Cuadro 12a. Niveles de confianza con un $\alpha = 0.05$ de cada una de la variedades provenientes de autopolinización resistentes, generados mediante el análisis de agrupación, al generarse los dendogramas.

Variedad	Nivel de confianza ($\alpha = 0.05$)	
	Matriz de similaridad original	Matriz de similaridad remuestreada
1	0.8261	0.8209
2	0.7857	0.7825
4	0.7258	0.7210
3	0.6487	0.6445
6	0.1854	0.1833
7	0.7273	0.7248
8	0.8824	0.8819
9	0.7928	0.7910
10	0.9245	0.9236
11	0.8418	0.8409
12	0.7063	0.7037
13	0.7643	0.7620
14	0.8043	0.8034
16	0.2243	0.2239
18	0.7363	0.7341
19	0.8702	0.8701
20	0.7830	0.7814
21	0.4153	0.4142
22	0.8066	0.8050
23	0.8842	0.8837
24	-----	-----
Promedio	0.716765	0.714795



$r=0.99600$, media $X=0.5652$, media $Y=0.5676$; $SSx=13.5925$, $SSy=15.0529$ y $t=10.3665$
Figura 5a. Dispersión de remuestreos de la matriz de similitud en las variedades de autopolinización resistentes.



$r=0.99314$, media $X=0.6511$, media $Y=0.6284$; $SSx=10.0885$, $SSy=10.1918$ y $t=8.1608$
Figura 6a. Dispersión de remuestreos de la matriz de similitud en las variedades de polinización libre resistentes.

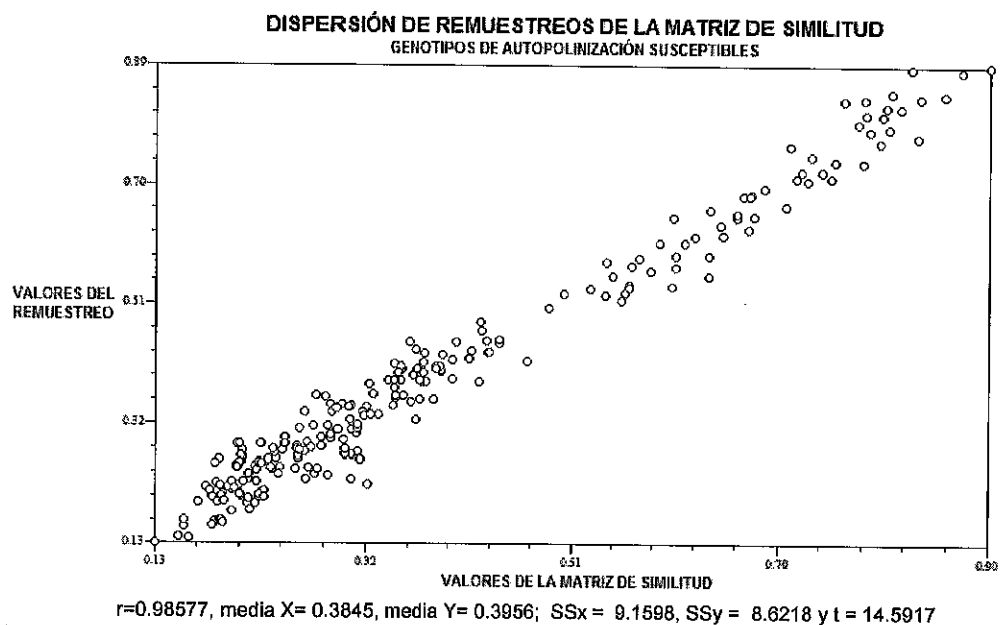


Figura 7a. Dispersión de remuestreos de la matriz de similitud en las variedades de autopolinización susceptibles.

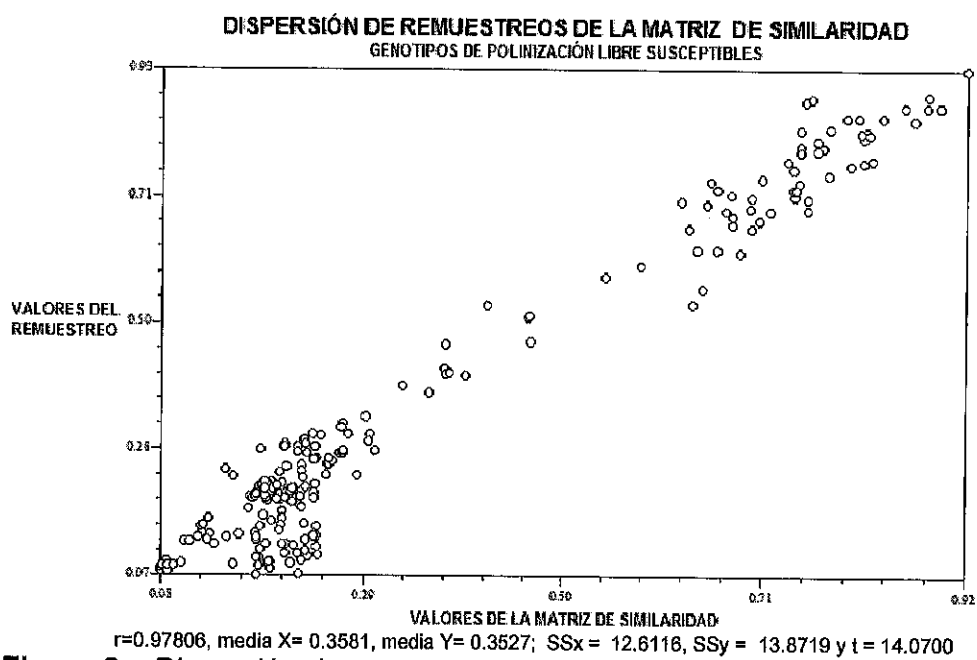


Figura 8a. Dispersión de remuestreos de la matriz de similitud en las variedades de polinización libre susceptibles.