

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**CARACTERIZACIÓN DE CALABAZAS (*Cucurbita* spp.)
MEXICANAS COMO FUENTE DE RESISTENCIA AL
Cucumber mosaic virus (CMV)**

TESIS

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

**PRESENTA:
LOURDES CERÓN GONZÁLEZ**



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

CHAPINGO, MÉXICO. JUNIO 2010

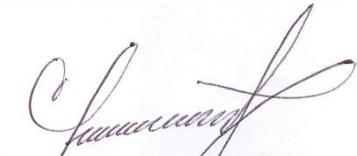


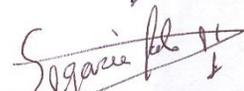
Instituto de Horticultura

Caracterización de calabazas (*Cucurbita* spp.) mexicanas como fuente de resistencia al *Cucumber mosaic virus* (CMV).

Tesis realizada por **Lourdes Cerón González** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

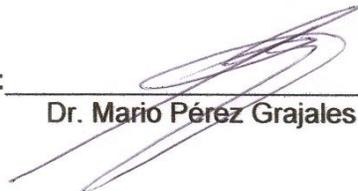
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: 
Dr. Clemente Villanueva Verduzco

ASESOR: 
Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR: 
Ph.D. Jaime Sahagún Castellanos

ASESOR: 
Dr. Daniel L. Ochoa Martínez

Lector Externo: 
Dr. Mario Pérez Grajales

Chapingo, México Junio del 2010

DATOS BIOGRÁFICOS

EL AUTOR DE LA PRESENTE TESIS NACIÓ EL 18 DE ENERO DE 1979 EN EL ESTADO DE MÉXICO. REALIZÓ SUS ESTUDIOS DE EDUCACIÓN BÁSICA EN EL DISTRITO FEDERAL. EN 1996 INGRESA A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO, DE DONDE EGRESA EN EL 2000, CON EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO. EN EL 2001 PRESTÓ SUS SERVICIOS AL COMITÉ REGIONAL DE SANIDAD VEGETAL DEL DISTRITO FEDERAL EN LAS CAMPAÑAS CONTRA MOSQUITA BLANCA Y CONTINGENCIAS FITOSANITARIAS. EN EL 2002 PRESTÓ SUS SERVICIOS A LA JUNTA LOCAL DE SANIDA VEGETAL TLAHUAC EN CAMPAÑA CONTRA MOSQUITA BLANCA, EN EL MISMO AÑO TRABAJO EN EL INVERNADERO “EL PLAN” EN EL ESTADO DE HIDALGO. HA PARTICIPADO EN DIVERSOS CURSOS, CONGRESOS, REUNIONES Y SIMPOSIOS, COMO ASISTENTE Y ORGANIZADOR. EN AGOSTO DEL 2002 INGRESA AL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA PARA INICIAR ESTUDIOS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO Y OBTIENE EL GRADO EN FEBRERO DEL 2004. EJERCIÓ COMO DOCENTE E INVESTIGADOR EN LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA, EN EL PROGRAMA DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL DE LA CARRERA DE AGRONOMÍA EN AGOSTO DEL 2004 A DICIEMBRE DEL 2007. EN ENERO DEL 2006 INICIA SUS ESTUDIOS DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA EN EL INSTITUTO DE HORTICULTURA DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA, UACH.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme permitido alcanzar el máximo grado académico

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindaron para realizar mis estudios doctorales.

Al programa de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de formar parte de este programa.

A mi comité Asesor: Dr. Clemente Villanueva Verduzco, Dr. Juan P. Legaria Solano, Dr. Jaime Sahagún Castellanos y Dr. Daniel L. Ochoa Martínez. por su tolerancia, confianza y guía en la elaboración de este trabajo.

A los profesores de este programa por compartir su conocimiento, tiempo y experiencia para mi formación académica.

Al personal que labora en el Depto. de Fitotecnia y Parasitología Agrícola en especial a Maximino Ramírez Ayala y Mario Salazar Segura por su enorme apoyo en el trabajo de campo e invernadero. A todas las personas que no he nombrado pero que de una o de otra forma contribuyeron en mi formación.

A mis compañeros de estudio y de trabajo, en especial a aquellos que lograron considerarme su amiga.

DEDICATORIA

A DIOS.

Que me ha permitido llegar y lograr mis metas.

A MIS PADRES,

Quienes me dieron la vida y la libertad para vivirla, que me han enseñado con sus hechos y convicciones que existir es madurar y que madurar es amarse uno a si mismo infinitamente.

A MIS HIJOS. Dante lojanan y David Ian

A mis peques, con todo mi amor y a modo de buen ejemplo.

A MIS HERMANOS

Con cariño y gratitud, por todo el apoyo que recibí.

CONTENIDO

	PÁG.
RESUMEN GENERAL	x
GENERAL ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA	2
LITERATURA CONSULTADA	19
CAPÍTULO I. Variabilidad genética en cuatro especies de calabaza criolla (<i>Cucurbita spp.</i>) cultivada en México	26
CAPÍTULO II. Obtención y evaluación de germoplasma de calabazas (<i>Cucurbita spp.</i>) mexicanas resistentes a <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	45
CAPÍTULO III. Caracterización agronómica y molecular de variedades de calabazas (<i>Cucurbita spp.</i>) resistentes a <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	69
DISCUSIÓN GENERAL	91
CONCLUSIONES GENERALES	93

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Patrones de bandas RAPD obtenidos usando los iniciadores OPA03, OPA13, OPD03 y OPD08 en colecciones de cuatro especies de *Cucurbita* spp. separados por electroforesis..... **36**
- Figura 2.** Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreos obtenidos de los patrones de bandeo de RAPD de colecciones de *C. argyrosperma*, *C. pepo*, *C. moschata*, y *C. ficifolia*, **38**
- Figura 3.** Dendrograma de relaciones genéticas entre especies de *Cucurbita*, obtenidas con la fórmula de Nei (1978)..... **40**

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Manejo del germoplasma de *Cucurbita* spp. durante la búsqueda de fuentes de resistencia a *Cucumber mosaic virus* (CMV)..... **51**
- Figura 2.** Síntomas de CMV observados en campo e invernadero en plantas de *Cucurbita* spp..... **58**
- Figura 3.** Incidencia acumulada de síntomas sistémicos en invernadero causados por CMV en cuatro especies de *Cucurbita* spp. **60**
- Figura 4.** Incidencia de CMV en plantas de calabaza (*Cucurbita* spp.), en tres generaciones S₀ (campo e invernadero), S₁ (campo) y S₂ (invernadero)... **60**

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Gel de azarosa 1.2% que muestra los patrones polimorficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generados por el iniciador aleatorio OPD02, evaluado en las especies de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes y susceptibles a *Cucumber mosaic virus*. **83**

Figura 2. Gel de agarosa 1.2% que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generadas por diferentes iniciadores, evaluado en mezclas de plantas de calabaza *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo*, susceptibles y resistentes a *Cucumber mosaic virus*. **83**

Figura 3. Gel de agarosa 1.2% que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPA05, evaluado en plantas de *Cucurbita pepo* resistentes y susceptibles a *Cucumber mosaic virus* (CMV). **85**

Figura 4. Gel de agarosa 1.2% que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPD18, evaluado en plantas de *Cucurbita moschata* resistentes y susceptibles a *Cucumber mosaic virus* (CMV). **85**

Figura 5. Gel de agarosa 1.2% que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPD02, evaluado en plantas de *Cucurbita argyrosperma* resistentes y susceptibles a *Cucumber mosaic virus* (CMV). **86**

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por especie y total..... **35**

Cuadro 2. Diversidad genética dentro y entre especies de *Cucurbita* spp..... **40**

CAPITULO II

Cuadro 1. Resultados de la prueba de ELISA en muestras compuestas de *Cucurbita* spp. **59**

Cuadro 2. Incidencia acumulada en cuatro especies de *Cucurbita*..... **61**

Cuadro 3. Frecuencia relativa de plantas resistentes a CMV encontradas en CB de colectas..... **62**

Cuadro 4. Segregación de la resistencia en líneas S1 resistentes a *Cucumber mosaic virus* (CMV)..... **62**

Cuadro 5. Segregación de la resistencia en líneas S₂ resistentes a CMV..... **62**

Cuadro 6. Valores promedio de cuatro caracteres agronómicos en plantas de *Cucurbita* spp, resistente a *Cucumber mosaic virus* (CMV). **64**

CAPITULO III

Cuadro 1. Valores promedio de algunos caracteres agronómicos en plantas de *Cucurbita* spp, resistente a virus mosaico del pepino..... **80**

Cuadro 2. Marcador asociados a la resistencia al Virus Mosaico del pepino en especies de *Cucurbita* spp. **84**

**Caracterización de calabazas (*Cucurbita* spp.) mexicanas como fuente de resistencia al
Cucumber mosaic virus (CMV).**

**Characterization of Mexican squash (*Cucurbita* spp.) as a source of resistance to
Cucumber mosaic virus (CMV)**

Lourdes Cerón-González¹; Clemente Villanueva Verduzco²

RESUMEN GENERAL

Se analizaron colecciones de cuatro especies de calabaza cultivada (*C. argyrosperma* Huber, *C. pepo* L., *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret, y *C. ficifolia* Bouché) con el objetivo de buscar, localizar y caracterizar agrónomica y molecularmente (RAPD) germoplasma resistente a *Cucumber mosaic virus*. El material genético base de esta investigación fue una población de amplia base genética de cada especie, proveniente de colectas que fueron previamente incrementadas y adaptadas a las condiciones de Chapingo durante cuatro ciclos. Se observó un alto porcentaje de resistencia a CMV. La caracterización molecular permitió observar baja variabilidad genética y asociar tres marcadores con la resistencia a CMV: iniciador OPA05 en *C. pepo*, OPD02 en *C. argyrosperma*, y OPD18 en *C. moschata*. Estos genotipos pueden ser usados directamente como variedades en la producción de calabaza o bien como progenitores para el desarrollo de nuevas variedades.

Palabras clave: diversidad genética, marcadores moleculares, RAPD, *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. pepo*, *C. moschata*

¹Autor de la tesis

²Director de la tesis

GENERAL ABSTRACT

Collections of four Mexican species of squash (*C. argyrosperma* Huber; *C. pepo* L.; *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret; *C. ficifolia* Bouché) were analyzed to search for, locate, and characterize agronomic and molecularly (RAPD) resistant germplasm to *Cucumber mosaic virus* (CMV). The genetic material basis in this research was a broad genetic base population of each species, obtained from collections that were previously increased and adapted to the conditions of Chapingo during four cycles. A high rate of resistance to CMV was found. Molecular characterization allowed observing low genetic variability and associating three markers with CMV resistance: initiator OPA05 in *C. pepo*, OPD02 in *C. argyrosperma*, and OPD18 in *C. moschata*. These genotypes can be used directly as varieties in the production of squash or as parents for the development of new varieties.

Keywords: genetic diversity, molecular markers, RAPD, *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. pepo*, *C. moschata*,

¹Thesis author

²Thesis adviser

INTRODUCCIÓN GENERAL

Generalmente se presta poca atención a los recursos genéticos nativos (locales) de plantas cultivadas, estos genotipos nativos, en general son poco productivos pero por su diversidad pueden contener características de evolución (o adaptación), que proporcionan tolerancia o resistencia a organismos o a condiciones climáticas adversas, lo que los hace valiosos como donadores potenciales de genes para el desarrollo o mejoramiento de variedades comerciales (Chávez *et al.*, 2003). Muchas de estas variedades se han perdido por falta de uso, han sido desplazadas por nuevas selecciones más productivas y otras se mantienen olvidadas y necesitadas de un proceso de tipificación, selección y/o mejora para integrarlas en la cadena del proceso productivo. El uso del control genético está orientado particularmente a explotar obtener y usar las variedades de plantas tolerantes o resistentes a los ataques de las enfermedades (Chávez, 1993).

En México el cultivo y consumo de la calabaza es muy popular, atribuible a la variedad de tipos criollos que existen en las diferentes regiones del país. La importancia de la calabaza se debe a su contenido de sustancias nutritivas y a las cualidades gustativas de su fruto (Villanueva, 2007); las semillas son muy ricas en grasas, proteínas y albúminas (Guenkov, 1974).

Las enfermedades virales son el principal problema que afecta el cultivo de la calabaza y en general a las cucurbitáceas, las cuales disminuyen los

rendimientos provocando pérdida que han sido estimadas de 30 a 100 %. El principal virus detectado ha sido *Cucumber mosaic virus* (Silva y Delgadillo, 1990).

Diversas investigaciones en México han encontrado resistencia en especies silvestres de *Cucurbita* y un alto nivel de tolerancia en genotipos de *C. moschata*, que han presentado incompatibilidad al cruzar con el cultivar grey zucchini. Sin embargo pueden ser utilizadas como fuente de resistencia (Garzón *et al.*, 1993).

Esta investigación tuvo como objetivos la búsqueda de resistencia a *Cucumber mosaic virus* en variedades nativas y experimentales de calabaza *Cucurbita pepo*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. argyrosperma* así como su caracterización agronómica y genética mediante análisis moleculares tipo RAPD.

REVISIÓN DE LITERATURA

El género *Cucurbita* es uno de los más importantes, cuenta con 27 especies (Whitaker, 1974; Hernández, 1978). Las especies de este género forman el grupo conocido como calabazas, de las cuales cinco han sido domesticadas: *C. pepo* L. (calabaza de india), *C. ficifolia* Bouché (chilacayote), *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret (calabaza de castilla); *C. maxima* Duchesne ex Lam (calabaza kabosha) y *C. argyrosperma* Huber (calabaza pipiana), son importantes desde el punto de vista económico, nutricional y

cultural tanto a nivel nacional como mundial. Las partes alimenticias van desde los frutos inmaduros, maduros, semillas, flores y algunas partes vegetativas. Además del uso alimenticio, las calabazas se pueden emplear con fines industriales, comerciales, medicinales y tradicionales como recipientes para artesanía (Lira-Saade, 1995; Villanueva, 2007).

Las especies silvestres y cultivadas de *Cucurbita* son plantas herbáceas, anuales, monoicas (con flores masculinas y femeninas separadas), rastreras, trepadoras o subarborescentes y arbustivas 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 en la planta, 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 y tipos de superficies (Lira-Saade, 1995; Villanueva, 2007). El número básico de cromosomas de todas las especies de *Cucurbita* es $2n=2x=40$ y los cariotipos sugieren que estas especies son de origen aloploiploide (Singh, 1979; Weeden, 1984; Lebeda *et al.*, 2007).

ASPECTOS AGRONÓMICOS DEL CULTIVO

México es uno de los principales productores de calabazas en el mundo. *C. pepo* es la única especie que se cultiva a nivel comercial en este país, en el ciclo agrícola 2008 se registró casi 26,165 ha sembradas en condiciones de temporal y riego, con un rendimiento promedio de $14.3 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Las de tipo criollo sólo registraron 2,144 ha sembradas, con un rendimiento promedio de $14 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ (SAGARPA, 2010).

El cultivo de la calabaza ha sido importante desde épocas prehispánicas en el desarrollo de las primeras civilizaciones de América, ha sido un elemento común y parte fundamental en la agricultura tradicional de subsistencia que se practica en Latinoamérica. Las diversas especies se producen en condiciones ecológicas bastante amplias, crecen desde altitudes cercanas a nivel del mar, hasta mayores a los 2,000 msnm (Lira-Saade, 1995). A México se le considera centro de origen y de distribución de las diferentes especies de esta hortaliza (Pérez *et al.*, 1998), y sólo en pequeña escala a *C. maxima*, que se encuentra en Centroamérica y parte norte de América del Sur (Hernández, 1978; Lira-

Saade, 1995). *Cucurbita pepo* parece ser una de las primeras especies en haber sido domesticadas.

La calabaza 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 5.5 a 6.8; en lo que se refiere a la salinidad, se reporta como medianamente tolerante (Valadez, 1990).

ENFERMEDADES DE LAS CALABAZAS

Como cualquier otro cultivo, las calabazas son afectadas por plagas y enfermedades que disminuyen su rendimiento y calidad de los frutos. Entre las principales enfermedades fungosas se encuentra el tizón de las cucurbitáceas (*Alternaria cucumerina*), mildiú (*Pseudoperonospora cubensis*), cenicilla (*Erysiphe cichoracearum*) y oidiopsis (*Leveillula taurica*), antracnosis (*Colletotrichum lagenarium*), pudrición radical y marchitez (*Phytophthora infestans*), ahogamiento y pudrición de la raíz (*Pythium* spp), marchitez (*Fusarium oxysporum*) y pudrición de raíz y cuello (*Rhizoctonia solani*). Las bacterias 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*, *E. aroidaeae*, *E. carnegiana*, *Pectobacterium carotovora* var. *carotovora* y *Agrobacterium rhizogenes* (Blancard *et al.*, 1991).

El principal problema fitopatológico que afecta las calabazas son las enfermedades virales, que disminuyen en gran medida el rendimiento y causan grandes pérdidas económicas. Lo característico de estas enfermedades es que en la mayoría de los casos, se encuentra más de un virus en una misma planta (Acosta y Rodríguez, 1988; Delgadillo, 1990). Los virus más frecuentes son el *Cucumber mosaic virus* (virus mosaico del pepino, CMV), *Squash mosaic virus* (virus mosaico de la calabaza, SqMV), y el *Watermelon mosaic virus* (virus del mosaico de la sandía WMV (Providenti, 1996; Garzon, 1988); *Cucumber green mottle mosaic Virus* (virus mosaico moteado verde del pepino, CGMMV), *Melon necrotic spot virus* (virus de las manchas necróticas del melón, MNSV), *Papaya ringspot virus* (virus de la mancha anular de la papaya, PRSV), *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (virus del amarillamiento de las cucurbitáceas transmitido por pulgones, CABYV), *Zucchini yellow mosaic virus* (virus del mosaico amarillo del calabacín, ZYMV), *Beet pseudoyellows virus* (virus del falso amarilleo de la remolacha, BPYV), *Cucumber vein yellowing virus* (virus del amarilleo de las venas del pepino, CVYV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas, CYSDV), *Muskmelon yellows virus* (virus del amarilleo del melón, MYV), entre otros (Blancard *et al.*, 1991).

IMPORTANCIA DEL *Cucumber mosaic virus* (CMV)

El CMV es uno de los diez virus fitopatógenos más importantes en el mundo por: su gran número de variantes; su amplia distribución geográfica y por los daños que causa a una gran cantidad de especies de plantas de interés económico (Valverde 1984; Holcomb y Valverde, 1991; Brunt *et al.*, 1996). Su infección a pepino fue reportada por primera vez en 1954 en Estados Unidos (Brunt, *et al* 1996). Actualmente ha sido reportado en todas las zonas hortícolas del país; afecta a 361 especies vegetales (Canaday, 1991) se adapta tanto a climas cálidos como templados, es transmitido fácilmente por áfidos en forma no persistente, también puede ser transmitido de manera mecánica y por semilla (Blancard *et al.*, 1991). Afecta hojas y frutos, causa infecciones sistémicas, los principales síntomas son mosaicos severos, moteados, clorosis, enanismo, necrosis y distorsión de las hojas y frutos (Provvidenti, 1996).

Pertenece a la familia *Bromoviridae* y al género *Cucumovirus*, las variantes de este virus han sido clasificadas en dos subgrupos, el I y II, con base en la hibridación de ARN y a su reacción a anticuerpos monoclonales específicos. El I predomina en los trópicos y subtrópicos, produce síntomas aún a temperaturas mayores a 32 °C, por lo que se le considera termorresistente. Este grupo de variantes forman subgrupos Ia y Ib por el tipo de síntomas que presentan ciertos hospedantes por transmisión mecánica. *C. pepo*, *Nicotiana glutinosa* y *V. unguiculata* manifiestan sólo mosaico cuando se inoculan con variantes del subgrupo Ia, pero las variantes del subgrupo Ib inducen lesiones locales

necróticas en *V. unguiculata*. Las variantes en el subgrupo II se encuentran en regiones templadas y causan síntomas a 25 °C, pero no a 32 °C, por lo que se consideran termosensibles. Inducen mosaico en *C. pepo*, lesiones locales necróticas severas en *N. glutinosa* y lesiones locales necróticas en *V. unguiculata* (Daniels y Campbell, 1992).

Las partículas de CMV son isométricas, aproximadamente de 29 nm de diámetro con superficies en forma de red, contienen tres fragmentos de ARN más un ARN subgenómico, el cual sirve o funciona como ARN mensajero para la producción de la cubierta proteica (Roossinck *et al.*, 1997). Un ARN satélite, usualmente de 334-342 bases de longitud, se puede encontrar asociado con el CMV. Este satélite tiene poca homología con el ARN genómico del CMV, y puede disminuir o inducir síntomas nuevos y severos, los cuales dependerán de la cepa de CMV, el satélite y el tipo de hospedero (Keatney *et al.*, 1990).

En *Cucurbita* spp. causa manchones amarillos sistémicos después de 20 días, así como mosaicos, laciniaduras, abarquillamiento ligero, manchas amarillas y reducción de la lámina foliar. En frutos produce deformaciones y protuberancias, causando disminución en rendimiento y calidad del fruto (Blancard *et al.*, 1991).

MEJORAMIENTO GENÉTICO EN CALABAZA

El mejoramiento genético de la calabaza está enfocado a:

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 para calidad y cantidad de aceite en la semilla.
4. Buscar resistencia a las principales enfermedades en calabaza
5. Para las especies que proveen semilla (*C pepo* y *C argyrosperma*), se busca obtener materiales con mayor número de frutos por planta, más semillas por fruto y mayor proporción de aceite en la semilla (Montes, 1991; Pérez *et al.*, 1998; Villanueva, 2007).

Los procedimientos de mejoramiento que se han seguido en calabaza son: autofecundación, selección y retrocruzamiento. Entre los sistemas de selección recurrente más utilizados para mejorar caracteres cuantitativos en cucurbitáceas se encuentran: el uso de líneas S1, selección masal y familiar (medios hermanos y hermanos completos) (Kohashi, 1960).

Se iniciaron trabajos de colección de germoplasma de *Cucurbita* en 1957 por el Departamento de Horticultura de la Oficina de Estudios Especiales en el Campo Agrícola Experimental el "Horno" en Chapingo, México, y se continuaron con el Departamento de Hortalizas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), y hasta la fecha en el campo Agrícola experimental Bajío en Celaya,

Guanajuato, donde a partir de 1975 se estableció el banco de germoplasma de *Cucurbita*.

A partir de 1996, la Universidad Autónoma Chapingo desarrolló un programa de caracterización y mejoramiento genético de calabazas de las cuatro diferentes especies cultivadas. 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 en la pulpa; cultivares resistentes a herbicidas, resistentes a hongos del suelo, y partenocarpia (Ayala, 2002; Aragón, 2005; Méndez, 2010). Actualmente ya se han desarrollado variedades (de semilla sin cáscara; tipo brujitas y partenocárpicas, todas arbustivas y precoces) listas para su registro (Villanueva, comunicación personal).

ESTUDIOS DE RESITENCIA A CMV

Martín (1960) (citado por Garzón *et al.*, 1993) reportó las colectas *PI* .176959 y *PI* 174192 como tolerantes al CMV, sin embargo, estos materiales no son utilizados en los programas de mejoramiento debido a que sus características fenotípicas los hacen poco atractivos comercialmente. Provvidenti y Gonsalves (1984) detectaron un alto nivel de resistencia en especies silvestres, como *C. cordata*, *C. cilindrata* y *C. digitata*, entre otras. En 1983 en "el Campo Experimental El Bajío, en Celaya, Guanajuato, evaluaron bajo condiciones de campo 165 colectas de materiales criollos nacionales de las especies *C.*

moschata, *C. máxima* y *C. mixta*; detectaron dos fenotipos de *C. moschata* (BG-389 Y BG-509) con alto nivel de tolerancia a virosis, no obstante estos presentaron incompatibilidad al cruzar con el cultivar grey zucchini (Garzón *et al.*, 1993).

Por otra parte, Rodríguez, (1988) al evaluar variedades e híbridos de calabacita encontró que algunos materiales fueron altamente tolerantes y que por lo tanto pueden ser utilizadas como fuentes de resistencia, y aunque no son atractivos comercialmente, la cruce de éstos con variedades comerciales podría generar híbridos con ambas características.

Brouwn *et al.* (2003) reportan en Estados Unidos germoplasma de *Cucurbita moschata* con resistencia monogénica y dominante al CMV.

TIPOS DE RESPUESTAS A INFECCIONES POR VIRUS

Una planta es susceptible para un virus en particular si posee todos los componentes necesarios para la replicación viral y la infección sistémica. En cambio, la resistencia resulta de factores que retardan o previenen la replicación y la infección sistémica de un virus específico (Dawson y Hilf, 1992).

Existen muchos tipos de respuesta por parte de la planta ante la infección viral, que abarcan desde la total susceptibilidad hasta una verdadera resistencia

(Cooper *et al.*, 1983). Podemos diferenciar varias clases de respuestas de la planta ante la infección viral: 1. *Susceptibilidad*. El virus puede replicarse e invadir sistémicamente a toda la planta. 2. *Respuesta hipersensible o susceptibilidad inicial*. El virus se replica y comienza a moverse, la planta responde induciendo una cascada de procesos antivirales que limitan la infección a una pequeña zona alrededor del punto de entrada del virus. La región afectada suele necrosarse, pero el resto de la planta permanece libre de virus. 3. *Susceptibilidad limitada (tolerancia)* no se alcanzan a ver síntomas debido a una reducción general de la replicación y del movimiento viral. 4. *Inmunidad real (resistencia)*. El virus es incapaz de replicarse incluso en las células inicialmente infectadas (Dawson y Hilf, 1992), esta resistencia es el resultado de la interrupción de una de las etapas del ciclo viral: (a) entrada en la célula, (b) desencapsidación del ácido nucleico, (c) expresión del genoma viral, (d) replicación del genoma viral, (e) ensamblaje de la descendencia viral y (f) movimiento del virus a nuevas células y a nuevos huéspedes. También, pueden coexistir varios tipos de respuesta ante una infección viral y ésta puede verse alterada por gran número de factores ambientales (principalmente temperatura) y por la infección simultánea con otros virus, que en algunos casos pueden actuar como auxiliares, aportando funciones necesarias para la infección (Atabekow y Taliensky, 1990).

RESISTENCIA GENÉTICA A ENFERMEDADES

En el mejoramiento genético de especies vegetales se conocen dos tipos de resistencia: la que se encuentra controlada por un gen único (monogénica) o de dos a más genes (poligénica), conocida como resistencia vertical (Robinson, 1989). Vardierplank (1968) estableció la diferencia entre resistencia monogénica y poligénica o resistencia vertical y horizontal, respectivamente.

La resistencia vertical normalmente es de tipo cualitativa, en el sentido de que está presente o ausente, sin valores intermedios. Esto significa que hay un alto nivel de resistencia de una variedad a alguna raza fisiológica de un patógeno y un nivel bajo de resistencia a otras razas (Robinson, 1989). Por otro lado, la resistencia horizontal es de tipo cuantitativa, en el sentido de que la enfermedad puede presentarse a cualquier nivel entre un mínimo y un máximo y es expresada igualmente a todas las razas conocidas del patógeno independientemente de las llaves bioquímicas que pueda poseer; lo que significa que este tipo de resistencia no puede ser acoplada, además de que es grandemente influenciada por el ambiente (Jones, 1997; Robinson, 1996).

La resistencia de las plantas está correlacionada con la capacidad de respuesta de una planta hacia un organismo potencialmente patógeno. Generalmente, los mecanismos de defensa que utilizan las plantas se dividen en: a) mecanismos de defensa pre-existentes o constitutivos, formados por las características estructurales de la pared celular y la presencia de compuestos químicos

depositados en el tejido epidérmico, y b) mecanismos de defensa inducibles, formados por la síntesis de compuestos químicos antimicrobianos (fitoalexinas) cuya síntesis se activa después de un intento de invasión vegetal por un patógeno (Staskawiez *et al.*, 1995).

Los patógenos producen una gran diversidad de señales y alguna de éstas son detectadas por las plantas. Los genes de los patógenos que producen estas señales se denominan genes de avirulencia (*Avr*) si sus productos activan una respuesta de defensa en una planta con un gen de resistencia (*R*) apropiado. El resultado de esta interacción es la manifestación de resistencia de la planta para ese patógeno específico. Sin embargo, ante cualquier modificación a esta interacción, la planta manifiesta una respuesta de sensibilidad al patógeno y se puede establecer la enfermedad (De Wit, 1992).

Estos genes de *R* codifican proteínas relacionadas con patogénesis (*PRs*), a las que se les asignan actividades enzimáticas degradativas como quitinasa glucanasas o proteasa (Michelmore, 1995).

En la naturaleza, 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 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).

MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

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 para la identificación de poblaciones de interés. La información genética que posee cada individuo es determinada por su genotipo y se refiere a la totalidad de su información genética o parte de ella (Bergmann *et al.*, 1989). Los marcadores genéticos se utilizan en la investigación vegetal básica, en mejoramiento, caracterización y conservación; etiquetado de genes; introgresión asistida de alelos favorables y protección de variedades comerciales (Henry, 2001).

Un marcador genético es una banda de ADN que puede estar asociada con un carácter agronómico si se habla de plantas (Valadez y Kahl, 2005). Los marcadores genéticos representan diferencias genéticas entre individuos o especies, generalmente no representan genes blanco pero actúan como señales o marcas ya que se encuentran cerca de los genes de interés (Collard *et al.*, 2005), revelan sitios de variación en el ADN (Jones *et al.*, 1997), producto de cambios 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. Estos cambios dan el perfil de bandas, también conocido como huellas genómicas (Valadez y Kahl, 2005)

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).

FRAGMENTOS POLIMORFICOS DE ADN AMPLIADOS AL AZAR (RAPD)

La técnica RAPD, ha sido la metodología mas utilizada para diferentes propósitos, es una amplificación enzimática diferencial de fragmentos pequeños de ADN, utiliza iniciadores de secuencias de diez pares de bases (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 taq 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 ($= 10^6$) y puede ser visualizado con electroforesis después de teñirse el gel con bromuro de etidio. Una amplificación es exitosa, sólo 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. 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 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).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un proceso *in vitro* que permite amplificar secuencias de ADN de manera exponencial que se realiza en tres pasos: el primero es una desnaturalización que sirve para separar la cadena doble de ADN en dos sencillas a 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 taq ADN polimerasa que anexa a esta molécula los desoxirribonucleótidos necesarios para formar la nueva cadena de ADN; esta enzima tolera hasta 72 °C de temperatura. Al término de dichos pasos se realiza un ciclo de amplificación. La reacción se realiza en un termociclador, el cual es un incubador pre-programado que cicla automáticamente (Valadez y Kahl, 2005). La cadena se duplica con respecto al ciclo previo; así, la concentración de moléculas de ADN de doble cadena colocadas inicialmente en el termociclador serán 2^n moléculas, donde n = al número de ciclos realizados (Valadez y Kahl, 2005).

LITERATURA CITADA

- Acosta L R y M R Rodríguez (1988)** Detección, aislamiento e identificación de virus en cucurbitáceas mediante plantas diferenciales. Rev. Mex. Fitop. 6:160-165.
- Apple J L (1978)** El papel de la resistencia de planta hospedera en los sistemas de control integrado. In: principios generales de control integrado de plagas y enfermedades con énfasis a maíz y soya. Universidad Nacional Agraria, Lima, Perú. 50-62 pp
- Aragón L R (2005)** Caracterización de materiales experimentales de calabaza (*Cucurbita spp.*) y verificación de su resistencia al Damping off. Tesis Maestría en Ciencias de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo 131p.
- Atabekow J G, M E Taliansky (1990)** Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. Adv. Virus Res.38:201-248. En: Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A (1996) Patología vegetal Tomo 1(Ed.). Mundi prensa-Phytoma, España. 77-90 pp.
- Ayala E J A (2002)** Cambios ocasionados en los parámetros genéticos por la selección participativa en una variedad local de calabaza (*Cucurbita spp.*) tipo round zucchini. Tesis Maestría en Ciencias de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo 156 p.
- Bergmann F, H R Gregorius and Scholz F (1989)** Isoenzymes, indicators of environmental impacts on plants or environmentally stable gene markers. pp. 17-28. In: Scholz FG and DHR Rudin (Eds.). Genetic Effects of Air

Pollutants in Forest Tree Populations. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. 201 p.

Blancard D, H Lecoq, M Pitrat (1991) Enfermedades de las cucurbitáceas observar, identificar y luchar. (Ed.) Mundi Prensa, Madrid, España. 301 p.

Brouwn RN, H A Bolaños, J R Myers, M M Jahn (2003) Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* 129:253-258.

Brunt, AA, K Crabtree, MJ Dallwitz, AJ Gibbs, L Watson, EJ Zurcher (1996) Plant Viruses (Eds.). Online: description and lists from the VIDE database. Versión: 16th January 1997. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide>

Canaday C H (1991) Biological and cultural tests for control of plant disease: an overview of 1991 reports. *Plant Dis.* 75(9):969-971.

Collard B C Y, M Z Z Jahufer, J B Brouwer, E C K Pang (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL), mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.

Cooper JI, Jones AT (1983) Responses of plant to viruses: proposal for the use of terms. *Phytop.* 73:127-128.

Chávez A J L (1993) Mejoramiento de plantas (ed.). Trillas, México 131 pp.

Chávez S J L, P. Collado, R Pinedo (2003) Conservación o pérdida del valor de las variedades locales de los cultivos amazonicos. In: Memoria del Seminario Permanente de Investigación Agraria (SEPIA) X. Pucallpa,

Perú. 19-22. Agosto CODESU, Universidad Nacional de UCAYALI, IBPGRI. Lima, Perú. 1-31.

Daniels J, R N Campbell (1992) Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Dis.* 76:1245-1250.

Dawson W O, M E Hilf (1992) Host-range determinants of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 43:527-555.

Delgadillo S F (1990) Enfermedades complejo causadas por virus fitopatógenos. *Rev. Méx. Fitop.* 8:99-101.

De Wit P J G M (1992) Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in the control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytop.* 30:391-418.

Garzón T J A (1988) Enfermedades causadas por virus en tomate, chile y cucurbitáceas en México. En: Delgadillo SF, Garzón JA, Vega (1989) Cucurbit virases in México. *Rev. Méx. Fitop.* 7:136-139.

Garzón T J A, Montes H S, Becerra F A (1993) Fuentes de resistencia a los virus mosaico del pepino y de la sandía-2 en calabaza (*C. moschata*) en México. *Rev. Méx. Fitop.* 11:167-171.

Guenkov G (1974) Fundamentos de horticultura cubana. Instituto cubano del libro. La Habana, Cuba. pp 169-172.

Henry R J (2001) Plant Genotyping. The DNA Fingerprinting of Plants. CABI Publishing. Wallingford, United Kingdom. 344 p.

Hernández B G (1978) Cucurbitáceas. *In:* T Cervantes S (ed.). Recursos Genéticos Disponibles a México. SOMEFI. Chapingo, México. pp: 357-367.

- Holcomb G E, R A Valverde (1991)** Identification of a virus causing a mosaic on coleus. *Plant Dis.* 75: 1183-1185.
- Jones N, H Ougham, and H Thomas (1997)** Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist* 137:165-177.
- Kohashi S J (1960)** Mejoramiento genético de la calabaza (*Cucurbita* spp.) en México. *Proceedings A.S.H.S. Región Tropical* 4: 16-19.
- Keatney C M, T A Zitter, D Gonzalves (1990)** A field survey for serogroups and satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 80:1238-1243.
- Lebeda A, M P Widrlechner, J Staub, H Ezura, J Zalapa, E Křistová (2007)** Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.) *In: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 3. Vegetable Crops.* R J Singh (Ed.). CRC. Press. Boca Raton, FL, USA. pp: 271-376.
- Lira-Saade R (1995)** Estudios taxonómicos y eco geográficos de las cucurbitáceas latinoamericanas de importancia económica. IPGRI. Roma, Italia. 281 p.
- Méndez L A (2010)** Búsqueda de partenocarpia genética en calabaza arbustiva (*Cucurbita pepo* L.) tipo round zucchini. Tesis Doctoral en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo 100 p.
- Michelmore R W (1995)** Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15:393-427.
- Molina G J D (1992)** Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa (algunas implicaciones en genotecnia). AGT, 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 González H, M Livera M (eds.). SOMEFI. Chapingo, México. pp: 239-250.
- Pérez G, Márquez M S, y Peña L A (1998)** Mejoramiento genético de hortalizas. (Ed.). Mundi-prensa. México 380 p.
- Provvidenti R, Gonsalves D. (1984)** Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut. New York. *Plants Disease* 68:443-446.
- Provvidenti R, (1996)** Diseases caused by viruses. *In: compendium of cucurbit diseases.* Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE (1996) *Compendium of cucurbit diseases.* The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 38-39 pp.
- Rodríguez E A (1988)** Evaluación de variedades e híbridos de calabacitas verdes, amarillas y grises en dos etapas de siembra. Sinaloa, México. SARH Publicación especial N. 13:176-185.
- Robinson, R A (1989)** Manejo del hospedante en patosistemas agrícolas. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
- Roossinck M J, I Kaplan, P. Palukaitis P (1997)** Support of a Cucumber mosaic virus satellite RNA maps to a single amino acid proximal to the helicase domain of the helper virus. *J. Virology* 1: 608-612.
- SAGARPA (2010)** Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Centro de Estadística Agropecuaria. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Tomo II. 765 p.

- Silva V S, Delgadillo S F (1990)** Virosis de la calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en el noroeste de Sinaloa. *Rev. Mex. Fitop.* 8:17-20.
- Singh A K (1979)** Cucurbitaceae and polyploidy . *Cytologia* 74: 897-905.
- Staskawicz B J, F M Ausubel, B J Baker, J G Ellis, L D G Jones (1995)**
Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268:661-667.
- Valadez L A (1990)** Producción de hortalizas (Ed.) Limusa, México, D.F. 223-233 pp.
- Valadez M E, Kahl G (2005)** Huellas de ADN en genomas de plantas (Teorías y protocolos de laboratorio) (Ed.) Mundi-prensa, México, D.F.
- Valverde R A (1984)** Unusual strain of cucumber mosaic virus causing flower-breaking symptoms in wild violets. *Plant Dis.* 68: 913-915.
- Vanderplank J E (1968)** Disease resistance in plants. *Epidemics and control.* Academic, New York.
- Villanueva V C (2007)** Calabazas cultivadas. Identificación de especies, caracterización y descripción varietal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 123 p.
- Weeden N F (1984)** Isozyme studies indicate that the genus *Cucurbita* is an ancient tetraploid. *Cucurbit Genetics Cooperation Reporter* 7:84-85.
- Whitaker T W (1974)** *Cucurbita*. In: *Handbook of Genetics.* R C King (ed.). Plenum Press. New York, USA. pp: 135-144.

I. DIVERSIDAD GENÉTICA EN CUATRO ESPECIES MEXICANAS DE CALABAZA (*Cucurbita spp.*)

RESUMEN

Se analizaron colecciones de cuatro especies de calabaza cultivada (*C. argyrosperma* Huber, *C. pepo* L., *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret, y *C. ficifolia* Bouché) provenientes de la región Centro-Sur de México, para determinar la diversidad genética entre y dentro de las especies, y obtener las huellas genéticas correspondientes. Se utilizaron marcadores moleculares tipo RAPD (polimorfismos en el ADN Amplificados al azar). Se probaron 60 iniciadores y se estudió un total de 185 loci. El porcentaje de loci polimórficos entre especies fue 90.6 %. Dentro de cada especie hubo reducida variabilidad genética, con porcentajes de 14.7 % en *C. argyrosperma*, 14 % en *C. ficifolia*, 20.8 % en *C. pepo* y 37 % en *C. moschata*. El grado de flujo genético fue bajo ($Nm = 0.14$) lo que indica que hay menos de un migrante por generación entre las poblaciones de las especies. El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones ($Gst = 0.77$) indicó que las cuatro especies están altamente diferenciadas. Los marcadores RAPD agruparon las especies en cuatro grandes grupos, correspondientes a cada una de las especies. *C. argyrosperma* y *C. moschata* fueron las especies más relacionadas con un coeficiente de identidad de 0.79. *C. pepo* se relacionó con *C. argyrosperma* y *C. moschata* con coeficiente de identidad de 0.63 y 0.69, respectivamente, y la especie más alejada fue *C. ficifolia*.

Palabras clave: *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. pepo*, *C. moschata*, RAPD, variabilidad genética.

GENETIC DIVERSITY IN FOUR SPECIES OF MEXICAN SQUASH (*Cucurbita* spp.)

ABSTRACT

Collections of four Mexican species of squash (*C. argyrosperma* Huber, *C. pepo* L., *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret, and *C. ficifolia* Bouché) from Central-Southern Mexico were analyzed to determine genetic diversity among and within species, and to obtain the corresponding genetic fingerprints. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers were used. Sixty primers were tested, and 185 loci were studied. Percentage of polymorphic loci among species was 90.6 %. Low genetic variability was detected within species, accounting 14.7 % of polymorphism in *C. argyrosperma*, 14 % in *C. ficifolia*, 20.8 % in *C. pepo* and 37 % in *C. moschata*. Genetic flow was present at low level ($Nm = 0.14$), indicating the occurrence of less than one migrant per generation among populations of species. The coefficient of genetic differentiation among population ($Gst = 0.77$) showed that the four species are highly differentiated. The RAPD markers grouped the species into four large groups, each species corresponding to one group. *C. argyrosperma* and *C. moschata* were the most related species with an identity coefficient of 0.79. *C. pepo* was related to *C. argyrosperma* and *C. moschata* with identity coefficients of 0.63 and 0.69, respectively. *C. ficifolia* was the most distant species.

Index words: *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. pepo*, *C. moschata*, RAPD, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

La familia Cucurbitaceae incluye alrededor de 90 géneros y 750 especies. El género *Cucurbita* es uno de los más importantes, cuenta con 27 especies (Whitaker, 1974; Hernández, 1978) conocidas como calabazas, entre ellas están: *C. pepo* L. (calabaza de india), *C. ficifolia* Bouché (chilacayote), *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret (calabaza de castilla); *C. maxima* Duchesne ex Lam (calabaza kabosha) y *C. argyrosperma* Huber. Las calabazas se encuentran ampliamente distribuidas en México (Hernández, 1978; Lira-Saade, 1995).

El número básico de cromosomas de todas las especies de *Cucurbita* es $2n = 2x = 40$ y los cariotipos sugieren que estas especies son de origen aloploiploide (Singh, 1979; Weeden, 1984; Lebeda *et al.*, 2007).

La adaptación ambiental de las especies es la siguiente: *C. moschata* en lugares cálidos, con altitud menor de 1000 m; *C. pepo* en lugares con altitud superior a 1000 m; *C. ficifolia* en altitudes mayores de 1300 m (Whitaker, 1968), *C. máxima* en lugares con clima templado; y *C. argyrosperma* generalmente en zonas por debajo de los 1800 m, con climas cálidos y algo secos (Villanueva, 2007).

En México la variación genética de calabaza es muy amplia, principalmente en forma, tamaño y coloración del fruto, cantidad de semilla producida, calidad y cantidad de pulpa, tolerancia a enfermedades y precocidad (Kohashi, 1960; Whitaker, 1968; Montes, 1991). En nuestro país se encuentran mayor variabilidad genética en *C. pepo* y *C. moschata*, y en un nivel inferior en *C. ficifolia* y *C. mixta* (Hernández, 1978).

A pesar de su alto grado de diferenciación, ninguna de las especies del género *Cucurbita* está completamente aislada en términos reproductivos. Experimentos de hibridación revelan que entre las especies cultivadas *C. moschata* tiene el más alto grado de compatibilidad con *C. argyrosperma*. El siguiente nivel de compatibilidad se presenta entre *C. argyrosperma* y *C. pepo* y con algunos cultivares de *C. máxima* (Lira-Saade, 1995).

Estudios isoenzimáticos revelan moderada diferenciación genética dentro de *C. pepo* y *C. moschata*, mientras que poca diferenciación ha ocurrido dentro de *C. argyrosperma*, *C. ficifolia* y *C. máxima* (Andres, 1990; Decker, 1988; Decker-Walters *et al.*, 1990).

La diversidad de *C. argyrosperma* es menor que la de *C. pepo*, *C. moschata*, y *C. máxima* (Lira-Saade, 1995). *C. moschata* es una especie altamente polimórfica, con considerable diversidad morfológica en semillas y frutos (Andres, 2004). *C. maxima* y *C. pepo* muestran variabilidad molecular y morfológica semejante (Ferriol *et al.*, 2004; Decker-Walters *et al.*, 2002), mientras que la variación genética y morfológica es muy limitada en *C. ficifolia* (Andres, 1990; Lebeda *et al.*, 2007).

La caracterización de las colectas se ha basado frecuentemente en el empleo de caracteres morfológicos agronómicos. El uso de marcadores morfológicos presenta algunas limitantes en la caracterización, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos. Para los investigadores el tomar los datos de las plantas hasta alcanzar el estado adulto representa una espera que se refleja en retraso. Actualmente se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares

que superan, en la gran mayoría de casos, las limitantes de los métodos tradicionales (Azofeita – Delgado, 2006). En México se carece de estudios a nivel molecular que estimen la diversidad genética del género *Cucurbita* y de sus especies cultivadas.

El objetivo del presente trabajo fue estimar la diversidad genética presente entre y dentro de especies de *Cucurbita* cultivadas en México, así como determinar si el análisis de los patrones RAPD puede ser útil para la identificación de colecciones y especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron poblaciones base de calabaza cultivada en la forma de compuestos balanceados (100 semillas por familia incluida). Las poblaciones de calabaza se integraron con 7, 20, 3 y 20 familias (colectas originales provenientes de 1996 que fueron previamente incrementadas y adaptadas a las condiciones de Chapingo durante cuatro ciclos) de *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*, respectivamente. Las colectas originales provenían de los estados de Morelos, Nayarit, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Estado de México.

Los marcadores RAPD se obtuvieron usando 40 plantas por especie (tomadas 25 días después de la germinación) desarrolladas en invernadero. El ADN genómico se purificó con el método propuesto por De la Cruz *et al.* (1997), que consiste en: macerar en nitrógeno líquido, 0.3 g de tejido de hojas jóvenes y

frescas, sin dejar descongelar, posteriormente el pulverizado se mezcla mediante agitación por 60 s dentro de un microtubo (Eppendorf) de 1.5 mL con 600 μ L de amortiguador de extracción (20 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0, 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 20 mL NaCl 5 M, 35 μ l de β -mercaptoetanol, 40 mL de dodecil sulfato de sodio 20 %), luego se incubó a 65 °C por 10 min, con inversión ocasional de los tubos. Después, se adicionan 200 μ L de acetato de potasio 5 M, se agita por inversión y se incuba 30 min en hielo, luego se centrifuga a 15000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfiere a otro microtubo que contenga 700 μ L de isopropanol frío (2 °C). Se mezcla por inversión, se incuba en hielo durante 30 min y se centrifuga por 5 min a 10 000 rpm, a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina, se recupera el precipitado y se disuelve en 200 μ L de solución (Tris-HCl 50 mM, EDTA- Na_2 10 mM, pH 8.0).

Para eliminar el ARN se utilizaron 2 μ L de ARNasa A, a 37 °C durante 1 h. Después, se adicionaron 20 μ L de acetato de sodio a una concentración de 3 M y 200 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C por 2 h. Se centrifugó por 5 min a 10000 rpm, a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 300 μ L de etanol 70 %, se secó la pastilla y se disolvió en 100 μ L de amortiguador TE (Tris – HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, pH 8.0) a una temperatura de 4 °C.

La concentración del ADN se cuantificó en un espectrofotómetro Jenway 6305 UV/Vis® y la calidad se verificó por electroforesis en geles de agarosa a 1.2 %

(p/v). El ADN se usó para llevar a cabo las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se probaron 20 iniciadores de la serie A de Operon® (OPA01-OPA20), 20 de la serie B (OPB01-OPB20) y 20 de la serie D (OPD01-OPD20) (Operon Technologies Inc, Alameda, CA, USA.). De ellos se seleccionaron 19 que mostraron polimorfismo, y por la complejidad del patrón de bandeo de los RAPD (Cuadro 1). La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer Modelo 480®. La mezcla de reacción se hizo en un volumen total de 25 μL , que incluyó: 4.2 μL de agua bidestilada estéril, 10 μL de dNTPs (500 μM), 2.5 μL de amortiguador 10X (Tris-HCl 750 mM pH 8.8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM, Tween 20 a 1% (v/v)), 1.0 μL de MgCl_2 (50 mM), 3.0 μL del iniciador a una concentración de 10 pM, 0.3 μL de enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de 5U μL^{-1} , y 4.0 μL de ADN genómico a una concentración de 10 ng μL^{-1} .

Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 94 °C, 2 min; 38 ciclos {94 °C por 30 s, 40 °C, por 30 s, 72 °C por 90 s}; al final 72 °C por 2 min. La separación de los fragmentos amplificados se hizo por electroforesis en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1mM Na_2 EDTA), durante 3 h a 85 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL^{-1}) durante 15 min, después se eliminó el exceso de colorante con agua destilada estéril por 15 min más y se fotografiaron bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces, sin que se presentaran discrepancias entre los patrones de bandeo obtenidos.

Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo. Se asignó valor de 1 para la presencia de banda y 0 para

la ausencia. Se construyó una matriz de datos en una hoja de cálculo para obtener un dendrograma de relaciones entre las colectas utilizando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908) y el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). Se hizo un análisis de remuestreo ("Bootstrapping", 1000 repeticiones) con el fin de obtener datos numéricos de consistencia del árbol generado con el programa estadístico Free Tree versión 0.9.1.50 (Hapl *et al.*, 2001).

El porcentaje de loci polimórficos se calculó mediante la fórmula Nei (1973): Porcentaje de loci polimórficos = número de loci polimórficos/número total de loci x 100. Se consideró a un locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más frecuente fue inferior o igual a 95 %.

Cada especie fue considerada como una población para estimar parámetros de estructura poblacional, al purificar ADN de cuarenta muestras individuales de cada especie. La matriz de datos presencia/ausencia de bandas se analizó con el programa POPGENE32 (Yeh *et al.*, 1999). Los parámetros de polimorfismo estimados dentro y entre poblaciones fueron: porcentaje de loci polimórficos (P), número de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus (Ae), índice de Shannon (S), índice de diversidad genética de Nei (H), coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) y número de individuos migrantes (Nm). El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}) se calculó como: $G_{ST}=D_{ST}/H_T$, donde H_T es la diversidad genética total y D_{ST} es la proporción de la diversidad genética de las especies que está presente entre las poblaciones (Nei, 1973), este coeficiente permite determinar la proporción de diversidad genética que se distribuye entre poblaciones. El número de individuos

migrantes (N_m) se calculó como: $N_m = \frac{1}{4} (1/ G_{ST} - 1)$, donde G_{ST} es el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones. N_m da una idea del grado de flujo genético entre las poblaciones (Nei, 1973). El número efectivo de alelos por locus (A_e) es el número de alelos que determinan la heterocigosidad u homocigosidad observada, y se calcula como: $A_e = 1/\sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del i -ésimo alelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 60 iniciadores probados de las series A, B y D de Operon®, 19 presentaron productos de amplificación (Cuadro 1). La media de polimorfismo detectada por los iniciadores fue de 89.05 %. Los iniciadores OPA06, OPA09, OPA15, OPA19, OPD02, OPD12 y OPD18 revelaron 100 % de polimorfismo (Cuadro 1). El número promedio de bandas reveladas por iniciador fue de 9.73, con oscilación entre 4 y 16, y se estudió un total de 185 loci.

El análisis basado en la técnica RAPD permitió estimar la similitud y diferencia genómica entre los genotipos en estudio. En la Figura 1 se muestran los patrones de bandas obtenidos utilizando los iniciadores OPA03, OPA13, OPD03 y OPD08, donde se evidencia la existencia de variabilidad genética entre y dentro de las especies evaluadas.

En la Figura 2 se muestra un dendrograma de relaciones de similitud entre colecciones pertenecientes a diferentes especies de *Cucurbita* obtenido mediante el análisis de 1000 remuestreos con el programa Free Tree Ver.

0.9.1.50. Las colecciones de cada especie se agruparon juntas sin que ocurriera mezcla entre las mismas, lo que significa que los marcadores RAPD fueron adecuados para diferenciarlas. Los resultados muestran la formación de cuatro grupos, que corresponden a las cuatro especies evaluadas. *C. moschata* y *C. argyrosperma* fueron las especies genéticamente más emparentadas, con un coeficiente de similitud de 0.53. *C. pepo* divergió a un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.33, mientras que *C. ficifolia* fue la especie genéticamente más alejada (0.26 de coeficiente de similitud).

Cuadro 1. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por especie y total.

Iniciador	Secuencia	Productos Amplificados	Polimorfismo por especie (%)				Poli-morfismo total (%)
			<i>C. argyrosperma</i>	<i>C. ficifolia</i>	<i>C. moschata</i>	<i>C. pepo</i>	
OPA02	5'-TGCCGAGCTG-3'	10	0	10	0	0	80
OPA03	5'-AGTCAGCCAC-3'	16	18	0	6.2	6.2	87
OPA04	5'-AATCGGGCTG-3'	8	0	12.5	37	37	75
OPA05	5'-AGGGGTCTTG-3'	10	40	40	50	20	90
OPA06	5'-GGTCCCTGAC-3'	4	50	25	50	25	100
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	9	33.3	0	22	44	100
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'	10	0	20	10	10	90
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'	11	0	0	9.0	9.0	90
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'	7	0	0	42	0	100
OPA19	5'-CAGGCCCTTC-3'	4	0	25	0	0	100
OPA18	5'-AGGTGACCGT-3'	11	0	0	45	27	90
OPD02	5'-GGACCCAACC-3'	7	14	0	42	0	100
OPD03	5-GTCGCCGTC A-3	13	7.6	23	30	15	69
OPD08	5'-GTGTGCCCCA-3'	13	7.6	38	30	15	92
OPD11	5'-AGCGCCATTG-3'	10	0	10	10	10	80
OPD12	5'-CACCGTATCC-3'	5	40	0	0	20	100
OPD13	5'-GGGGTGACGA-3'	10	10	30	10	30	80
OPD18	5'-GAGAGCCAAC-3'	14	0	0	14	28	100
OPD20	5'-ACCCGGTCAC-3'	13	7.6	7.6	15	7.6	69
Promedios		9.73	12.0	12.7	22.2	15.98	89.05

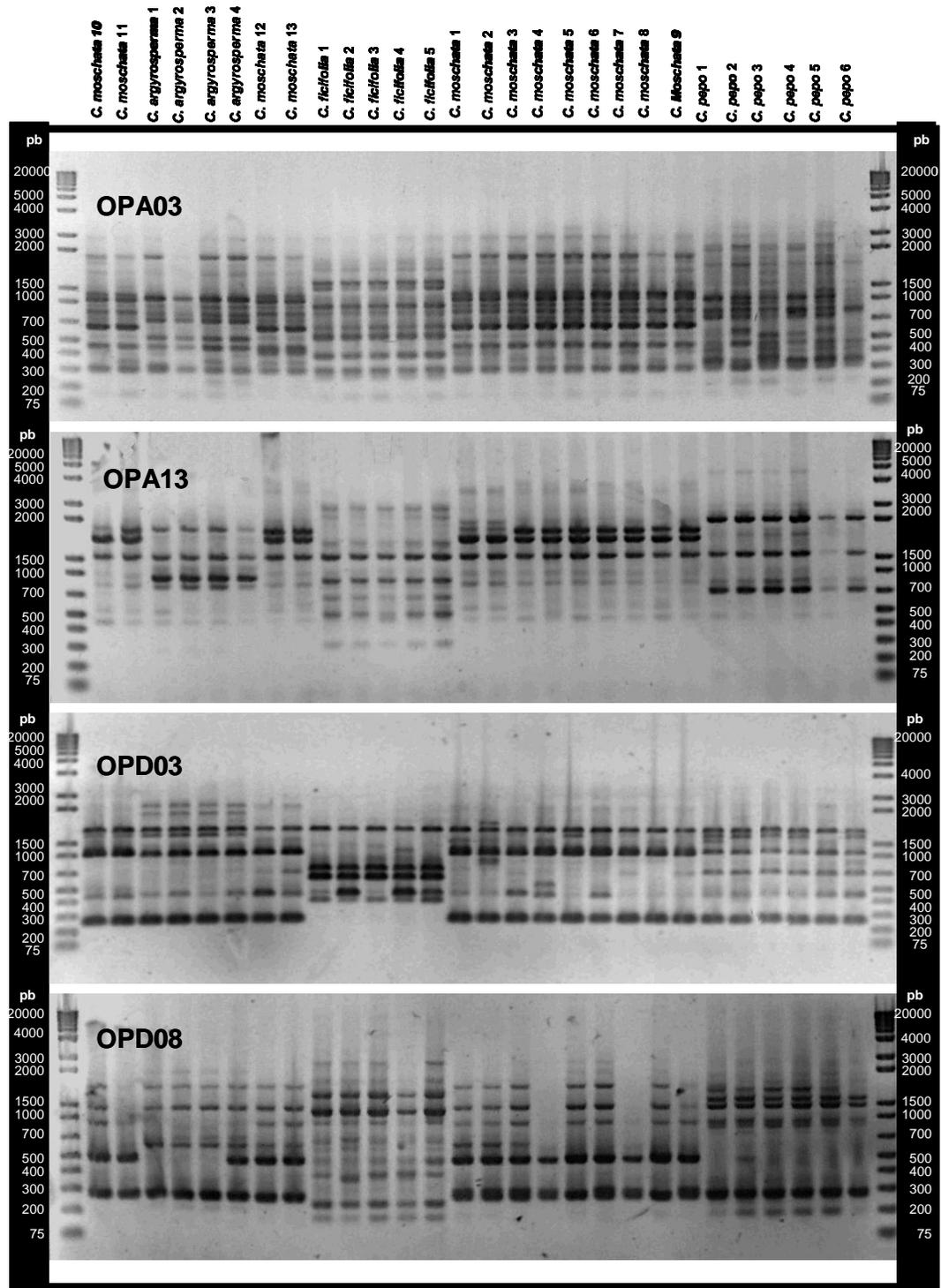


Figura 1. Patrones de bandas RAPD obtenidos usando los iniciadores OPA03, OPA13, OPD03 y OPD08 en colecciones de cuatro especies de *Cucurbita* separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

En lo referente a colecciones dentro de cada especie, las más similares correspondieron a *C. ficifolia*, *C. argyrosperma* y *C. pepo*, y las menos similares fueron las de *C. moschata* (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los de Lira-Saade (1995) y Andres (1990, 2004) para caracteres morfológicos, en lo referente a las relaciones de similitud que guardan entre sí las especies estudiadas y al grado relativo de variación dentro de cada especie.

El porcentaje de loci polimórficos (P) entre las especies fue de 90.60 % (Cuadro 2). *C. argyrosperma* mostró un valor de polimorfismo igual a 14.77 %, *C. ficifolia* 14.09 %, *C. moschata* 37.58 % y *C. pepo* 20.81 %. Estos valores indican también que las poblaciones presentan baja variabilidad genética. Los resultados coinciden con los de Andres (2004), quien indica que *C. moschata* es una especie altamente polimórfica, y con los de Lira-Saade (1995) en el sentido de que *C. argyrosperma* presenta menor diversidad genética que *C. pepo*, *C. moschata* y *C. máxima*. Según Lira-Saade (1995) *C. argyrosperma* es menos diversa que *C. pepo*, *C. moschata* y *C. máxima*. Andres (2004) encontró que *C. moschata* muestra considerable diversidad morfológica en semillas y frutos. *C. maxima* y *C. pepo* muestran niveles semejantes de diversidad molecular y morfológica (Ferriol *et al.*, 2004; Decker-Walters *et al.*, 2002) mientras que la variación genética y morfológica es muy limitada en *C. ficifolia* (Andres, 1990).

El coeficiente de diversidad (H) de Nei (1973) para todos los loci estudiados en las cuatro especies de *Cucurbita* fue de 0.4727 (Cuadro 2); Por especie, los coeficientes fueron: 0.063 para *C. argyrosperma*, 0.058 para *C. ficifolia*, 0.116

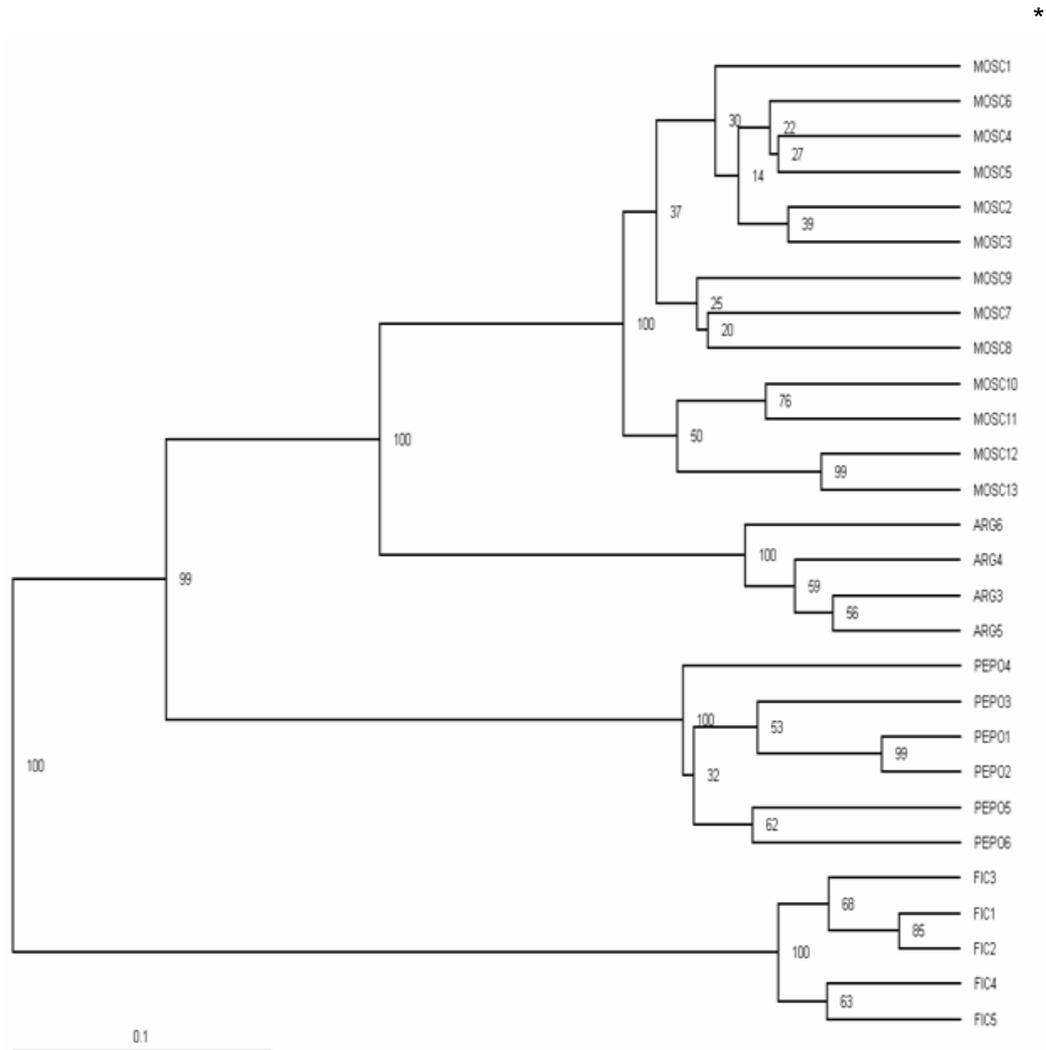


Figura 2. Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreos obtenidos de los patrones de bandeo de RAPD de colecciones de *C. argyrosperma*, *C. pepo*, *C. moschata*, y *C. ficifolia*, utilizando el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La línea inferior indica 0.1 de disimilitud entre las especies. Los valores en las ramas son las veces en que la topología de una rama particular se repite durante el análisis de robustez del árbol

*La letra indica la especie (MOSC = *C. moschata*; PEPO : *C. pepo*; FIC : *C. ficifolia*; ARG = *C. argyrosperma*) y el número indica su posición en el gel (número de ejemplar)

para *C. moschata* y 0.104 para *C. pepo*. Tanto estos valores como los porcentajes de loci polimórficos, reflejan poca diversidad genética en las poblaciones. En lo referente al número de alelos por locus (A) y al número efectivo de alelos por locus (Ae), *C. moschata* superó a las especies restantes con valores de 1.37 y 1.20, respectivamente. El bajo valor de diversidad genética de *C. argyrosperma* con respecto a *C. moschata* y *C. pepo* puede deberse a que las variedades locales de la primera especie han evolucionado en un área geográfica bastante restringida (Lira-Saade, 1995). *C. moschata*, que mostró los valores más altos de diversidad genética se cultiva en un amplio rango de alturas y debido a ello ha adquirido adaptación a varias condiciones ambientales. La baja variabilidad genética de *C. ficifolia* según Andres (2004) pudiera estar asociada con la existencia de muy pocas variedades criollas; su escasa variabilidad morfológica es consistente con su limitado grado de variabilidad isoenzimática.

El coeficiente de diferenciación genética entre las especies fue alto ($G_{ST} = 0.77$), lo que indica que aproximadamente 77 % de la variación detectada se debe a diferencias entre especies. El resto (23 %) representa diversidad genética dentro de especies. Andres (1990), Decker (1988) y Decker-Walters *et al.* (1990) también encontraron niveles de diferenciación genética de moderada a escasa dentro de cada especie de *Cucurbita*. Es posible que las especies domesticadas presenten algún grado de aislamiento reproductivo provocado por factores geográficos, genéticos, fisiológicos, morfológicos o culturales.

Cuadro 2. Diversidad genética dentro y entre especies de *Cucurbita spp.*

Población	*P(%)	A	Ae	S	H	G _{ST}	Nm
<i>C. argyrosperma</i>	14.77	1.148(0.356)	1.116(0.294)	0.091(0.222)	0.063(0.156)		
<i>C. ficifolia</i>	14.09	1.141(0.349)	1.106(0.279)	0.085(0.213)	0.058(0.149)		
<i>C. moschata</i>	37.58	1.376(0.486)	1.201(0.339)	0.176(0.261)	0.116(0.182)		
<i>C. pepo</i>	20.81	1.208(0.407)	1.113(0.259)	0.068(0.146)	0.104(0.215)		
Entre especies	90.60	1.906(0.2948)	1.527(0.317)	0.314(0.154)	0.473(0.207)	0.774	0.146

*P= porcentaje de *loci* polimórficos; A= número de alelos por locus; Ae= número efectivo de alelos por locus; S= coeficiente de diversidad de Shannon; H= coeficiente de diversidad de Nei; G_{ST}= coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; Nm= grado de flujo génico. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

Con base en el coeficiente de diferenciación genética total entre las especies (G_{ST}) el grado de flujo genético (Nm) estimado fue 0.14 (Cuadro 2). Esto significa que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, lo que podría explicar también su alto grado de diferenciación.

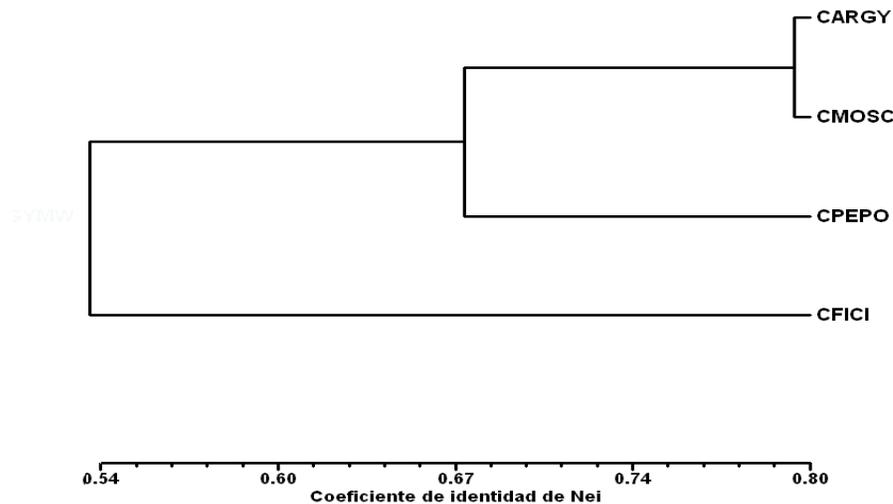


Figura 3. Dendrograma de relaciones genéticas entre especies de *Cucurbita*, obtenidas con la fórmula de Nei (1978).

*Las letras indica la especie (CMOSC = *C. moschata*; CPEPO : *C. pepo*; CFICI : *C. ficifolia*; CARG = *C. argyrosperma*)

En la Figura 3 se muestra un dendrograma de relaciones de similitud entre especies de *Cucurbita* resultante del análisis de poblaciones. *C. moschata*, *C. argyrosperma* y *C. pepo* son más similares genéticamente. *C. moschata* fue más similar con *C. argyrosperma* a un coeficiente de identidad de 0.79; con *C. pepo* 0.69; y con *C. ficifolia* 0.53. *C. argyrosperma* se relacionó con *C. pepo* y *C. ficifolia* a 0.63 y 0.50 de identidad, respectivamente, mientras que *C. pepo* y *C. ficifolia* relacionaron con un valor de 0.56.

Lo expuesto sugiere que los marcadores RAPD son eficientes para discriminar colecciones y especies de *Cucurbita*, lo que concuerda con la clasificación morfológica y molecular con marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphisms) y SRAP (sequence-related amplified polymorphisms) establecida por otros autores (Lira-Saade, 1995; Ferriol *et al.*, 2004).

CONCLUSIÓN

Existió variabilidad genética dentro y entre especies de *Cucurbita* evaluadas en este trabajo, la mayor parte de la diversidad genética detectable se encuentra entre especies y en menor proporción dentro de especies. *Cucurbita moschata* se relacionó más fuertemente con *C. argyrosperma* y la especie menos similar fue *C. ficifolia*. Las especies mostraron poca diversidad genética interna. La especie con mayor polimorfismo genético fue *C. moschata* y la que mostró más bajo fue *C. ficifolia*.

LITERATURA CITADA

- Andres T C (1990)** Biosystematics, theories on the origin and breeding potential of *Cucurbita ficifolia*. *In: Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. D M Bates (ed). Comstock Publishing Associates. Ithaca, N.Y. pp:102-119.
- Andres T C (2004)** Diversity in tropical pumpkin (*Cucurbita moschata*): a review of intraspecific classifications. *In: Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. A Lebeda, H S Paris (eds.). Olomouc, Czech Republic. pp:107-112.
- Azofeita–Delgado AA (2006)** Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agron. Mesoam.* 17:221-242.
- Decker D S (1988)** Origin(s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Econ. Bot.* 42:4-15.
- Decker-Walters D S, T W Walters, U Poluszny, P G Kevan (1990)** Genealogy and gene flow among annual domesticated species of *Cucurbita*. *Can. J. Bot.* 68:782-789.
- Decker-Walters D S, J E Staub, S M Chung, E Nakata, H D Quemada (2002)** Diversity in free-living populations of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) in North America. *Plant Syst. Evol.* 233:183-197.
- De la Cruz M, F Ramirez, H Hernández (1997)** DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:319-325.

- Ferriol M, B Picó, P Fernández de Córdoba, F Nuez (2004)** Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. *Crop Sci.* 44: 653-664.
- HAMPL V, A Pavlíček, J Flegr (2001)** Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. *Internatl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 5: 731-735.
- Hernández B G (1978)** Cucurbitaceas. *In:* T Cervantes S (ed). Recursos Genéticos Disponibles a México. SOMEFI. Chapingo, México. pp:357-367.
- Jaccard P (1908)** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44:223-70.
- Kohashi S J (1960)** Mejoramiento genético de la calabaza (*Cucurbita* spp.) en México. *Proc. A.S.H.S. R. Trop.* 4:16-19.
- Lebeda A, M P Widrlechner, J Staub, H Ezura, J Zalapa, E Křistová (2007)** Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.) *In:* Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 3. Vegetable Crops. R J Singh (ed). CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp:271-376.
- Lira-Saade R (1995)** Estudios taxonómicos y eco geográficos de las cucurbitáceas latinoamericanas de importancia económica. IPGRI. Roma, Italia. 281 p.
- Montes H S (1991)** Calabazas (*Cucurbita* spp.). *In:* Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. R Ortega P, G Palomino H, F

Castillo G, V A González H, M Livera M (eds). SOMEFI. Chapingo, México. pp:239-250.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70:3321-3323.

Singh A K (1979) Cucurbitaceae and polyploidy. Cytologia 74:897-905.

Villanueva V C (2007) Calabazas cultivadas. Identificación de especies, caracterización y descripción varietal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 123 p.

Weeden N F (1984) Isozyme studies indicate that the genus *Cucurbita* is an ancient tetraploid. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 7:84-85.

Whitaker T W (1968) Ecological aspects of the cultivated *Cucurbita*. HortScience 3:9-11.

Whitaker T W (1974) *Cucurbita*. In: Handbook of Genetics. R C King (ed). Plenum Press. New York, USA. pp:135-144.

Yeh F C, R-C Yai, T Boyle (1999) Popgene Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Edmonton, Alberta, Canada. 28 p.

II. OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE CALABAZAS (*Cucurbita* spp.) MEXICANAS RESISTENTES AL *Cucumber mosaic virus* (CMV)

RESUMEN

Se evaluó la respuesta de plantas de calabaza a la inoculación de *Cucumber mosaic virus* (CMV) en compuestos balanceados S₀, S₁ y S₂, (poblaciones base en la forma de compuestos balanceados) para seleccionar, caracterizar y autofecundar plantas resistentes a CMV. La frecuencia de plantas resistentes fue en *C. argyrosperma* 29 %, *C. ficifolia* 64 %, *C. moschata* 28 % y en *C. pepo* 31 %. Se evaluaron cuatro componentes del rendimiento: peso seco biomasa (g), número y peso de frutos (g) y peso de semilla (g). En comparación al testigo ($\alpha \leq 0.05$) *C. argyrosperma* presentó menor número de frutos por planta, *C. moschata* aumento en peso seco, *C. pepo*, incrementó su peso seco y disminuyó el peso de la semilla *C. ficifolia*, no presentó características contrarias al testigo.

Palabras claves: Incidencia, *C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata*

II. PROCURING AND EVALUATION OF GERMPLASM OF SQUASH (*Cucurbita* spp..) MEXICAN RESISTENTE AL *Cucumber mosaic virus* (CMV)

ABSTRACT

The response to inoculation of *Cucumber mosaic virus* (CMV) was evaluated in squash plant of compounds balanced S₀, S₁ and S₂, (population base in form of balanced compounds) to select, characterize and autofecundar CMV resistant plants. The frequency of resistant plant was in *C. argyrosperma* 29 % *C. ficifolia* 64 %, *C. moschata* 28 % and *C. pepo* 31 %. Assessed four components performance: weight dry biomass (g), number and weight of fruit (g) and (g) seed weight. In comparison to witness ($\alpha \leq 0.05$) *C. argyrosperma* submitted fewer fruits per plant, *C. moschata* increased weight dry, *C. pepo*, increased its dry weight and decreased the seed weight, *C ficifolia*, did not contrary to the witness characteristics.

Keywords: incidence, *C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata*

II. OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE CALABAZAS (*Cucurbita* spp.) MEXICANAS RESISTENTES AL *Cucumber mosaic virus* (CMV)

INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades virales han sido una fuerte limitante para la producción de cucurbitáceas debido a su potencial destructivo y difícil manejo. Algo característico de estas enfermedades virales es que en la mayoría de los casos se encuentra más de un virus en una misma planta (Acosta y Rodríguez, 1988). Hasta la fecha se han reportado al menos 17 virus en el ámbito mundial y en nuestro país se ha determinado la presencia de por lo menos siete en cucurbitáceas (Delgadillo, 1990). Zitter *et al.* (1996) mencionan que los virus de mayor incidencia en *C. pepo* son el *Cucumber mosaic virus* (virus del mosaico del pepino, CMV), *Papaya ringspot virus* (virus de mancha anular del papayo variante sandía, PRSV-W) y *Zucchini yellow mosaic virus* (virus mosaico amarillo del calabacín, ZYMV). El CMV, ocasiona pérdidas económicas de gran importancia (Conti *et al.*, 2000), fue reportado en pepino desde 1954 en Estados Unidos. Es transmitido principalmente de manera no persistente por más de 60 especies de la familia *Aphididae*, también se transmite por semilla; tiene genoma RNA cadena sencilla, en calabaza después de 20 días causa manchones amarillos, mosaicos, lacinaduras, reducción de la lámina foliar, en frutos produce deformaciones y protuberancias, y disminuye desde 30 hasta 50 % el rendimiento y 100 % en calidad del fruto (Blancard *et al.*, 1991), y se ha observado que las infecciones de otros virus son más severas cuando ocurren en conjunto con CMV (Lecoq *et al.*, 1981).

La inducción de síntomas es el resultado de un correcto proceso de multiplicación viral en las células inoculadas y adecuado movimiento hacia células próximas (movimiento célula a célula). Se pueden observar varias respuestas de la planta ante la infección viral. La susceptibilidad, donde el virus puede replicarse e invadir sistémicamente la planta, produciendo síntomas; La resistencia donde el virus es incapaz de replicarse incluso en las células inicialmente infectadas (Dawson y Hilf, 1992), como resultado de la interrupción de alguna de las etapas del ciclo viral o el movimiento del virus en las células; Y la tolerancia en la que los virus se replican y se mueven mientras la planta permanece con una apariencia normal (Cooper y Jones, 1983). Pueden coexistir varios tipos de respuesta ante una infección viral y ésta puede verse alterada por gran número de factores ambientales y por la infección simultánea con otros virus, que en algunos casos pueden actuar como auxiliares, aportando funciones necesarias para la infección (Atabekow y Taliensky, 1990). En 1983 en el Campo Experimental “El Bajío” en Celaya, Guanajuato, se evaluaron 165 colectas de materiales criollos nacionales de las especies *C. moschata*, *C. máxima* y *C. mixta*, donde se detectaron dos fenotipos de *C. moschata* (BG-389 Y BG-509) con alto nivel de tolerancia a virosis. No obstante, estos fenotipos presentaron incompatibilidad al cruzar con el cultivar zucchini grey (Garzón *et al.*, 1993).

Por otra parte, Rodríguez (1988) evaluó variedades e híbridos de calabacita, encontró que algunos materiales fueron altamente tolerantes y que por lo tanto pueden ser utilizadas como fuentes de resistencia, ya que no son atractivos

comercialmente, la cruce de éstos materiales con variedades comerciales podrían generar híbridos resistentes y fenotípicamente aceptables.

Brouwn *et al.* (2003) encontraron en Estados Unidos germoplasma de *Cucurbita moschata* resistente al CMV y caracterizaron la resistencia como carácter monogénico y dominante.

En México, los recursos genéticos del género *Cucurbita* son muy diversos, contienen una gran variación que abarca variabilidad morfológica, fisiológica, ámbito de crecimiento, grado de resistencia a enfermedades y/o adaptación a condiciones ecológicas contrastantes como características de evolución (Kohashi, 1960; Whitaker, 1968; Montes, 1991). Esto los hace valiosos como donadores potenciales de genes para el desarrollo o mejoramiento de variedades comerciales (Chávez *et al.*, 2003). Por ello el objetivo del presente trabajo fue seleccionar y autofecundar plantas resistentes al *Cucumber mosaic virus* (CMV) de cuatro especies cultivadas de calabaza (*Cucurbita* spp.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma vegetal

En 2007, se usaron cuatro poblaciones base en la forma de compuestos balanceados (CB S₀), las poblaciones de calabaza se integraron con 7, 20, 3 y 20 familias (100 semillas por familia incluida) de *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*, respectivamente. Cada familia de calabaza se origino

de colectas de 1996 que fueron objeto de incremento y adaptación a las condiciones de chapingo durante cuatro ciclos.

En 2008, se formó un compuesto balanceado de *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*, de semillas de frutos S₁ autopolinizados cosechados en 2007 de plantas resistentes; Los compuestos se integraron con 10, 3, 8 y 2 familias (50 semillas por familia), respectivamente.

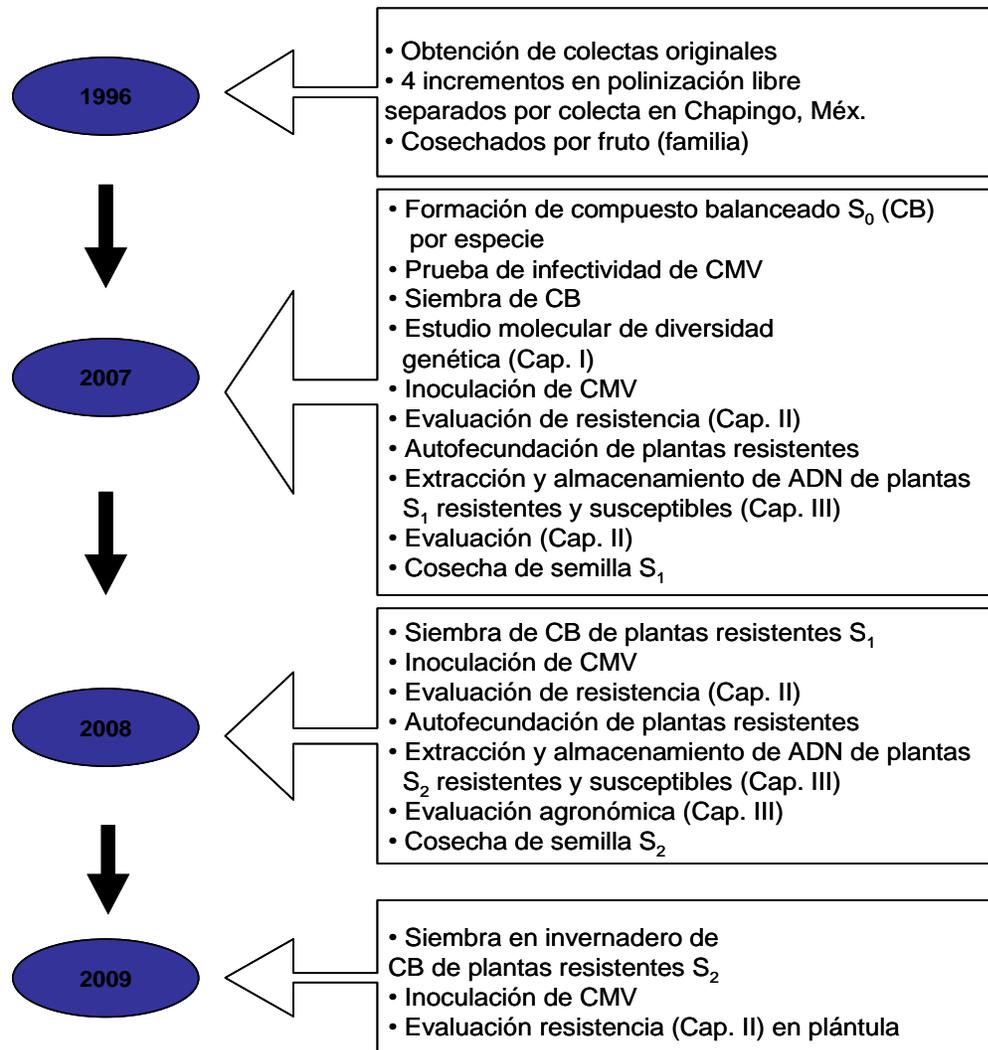
En el 2009, se formó un compuesto balanceado de cada especie con semilla de frutos S₂ autopolinizados y cosechados en el 2008 de plantas resistentes; cada compuesto se integro con 5, 4, 5 y 4 familias (50 semillas por familia) de *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*, respectivamente (figura 1).

Prueba de infectividad del virus

Se realizaron en invernadero pruebas de patogenicidad de un aislamiento de *Cucumber mosaic virus* donado por el Dr. Ochoa del laboratorio de Virología agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, con el objetivo de verificar su infectividad en invernadero. Los tratamiento quedaron constituidos con las cuatro CB S₀ con dos manejos: inoculado y no inoculados con CMV (que fueron los testigo por población); Se sembraron 40 semillas de cada especie en una charola de 27 x 40 x 9 cm de profundidad, con suelo pasteurizado y en condiciones de temperatura y humedad controladas, con tres repeticiones y un testigo. De cada especie quedaron cuatro charolas (3 inoculadas + 1 testigo) de 40 plantas (por especie).

Cuando las semillas germinaron (etapa cotiledonal), el virus fue inoculado mecánicamente.

Figura 1. Manejo del germoplasma de *Cucurbita* spp. durante la búsqueda de fuentes de resistencia a *Cucumber mosaic virus* (CMV)



Preparación del inóculo: hojas de tabaco infectadas con CMV fueron cortadas y colocadas en una bolsa de polietileno, donde se le agregó una solución amortiguadora de fosfatos + DIECA (dietilditiocarbamato de sodio 0.01 m) en

proporción de 1:10 peso/volumen el cual se maceró para la extracción del virus, hasta formar una solución.

Inoculación. Se aplicó carborundum (600 mallas) a las hojas con un cotonete empapado con el inóculo se froto la superficie foliar haciendo movimientos circulares y firmes. Con ayuda de una pizeta se lavó la planta con agua destilada estéril para eliminar residuos.

Establecimiento en campo. Durante 2007 (primera evaluación de resistencia a CMV CB S₀). Se realizó una siembra en el campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, México, en condiciones de riego, en asociación maíz-calabaza; bajo un diseño de parcelas divididas, con tres repeticiones, los tratamientos fueron los ocho combinaciones de las cuatro poblaciones con dos manejos: inoculado y no inoculados con CMV (que fueron los testigo por población). La unidad experimental fue un surco de 90 m de largo, la separación de surcos fue a 0.9 m, con 60 matas de dos plantas, separadas a 1.2 m. Se intercaló un surco de maíz entre cada surco de calabaza, de manera, que el distanciamiento real entre surcos de la misma especie fue 1.8 m. La separación entre matas de maíz fue 20 cm. De esta especie se sembraron tres semillas por sitio y se raleó a una cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura. La cosecha se realizó en noviembre 2007.

Durante 2008 (segunda evaluación de resistencia CB S₁). La siembra se realizó en el mismo campo experimental usado en 2007, durante el ciclo primavera-

verano del 2008, en condiciones de riego, en asociación maíz-calabaza; en un diseño de bloques completos al azar, con seis repeticiones. Los tratamientos fueron ocho: las cuatro poblaciones S1 (una por especie) con dos manejos: inoculado y no inoculados con CMV (que fueron los testigo por población). La unidad experimental fue un surco de 12 m de largo, la separación entre surcos fue de 0.9 m, con 9 matas de dos plantas, separadas a 1.2 m. Se intercaló un surco de maíz entre surcos de calabaza, de manera que el distanciamiento entre surcos de la misma especie fue 1.8 m, quedando 18 plantas por bloque. La separación entre matas de maíz fue 20 cm. De esta especie se sembraron tres semillas por sitio y se raleó a una cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura. La cosecha se realizó en noviembre 2008.

Las plantas resistentes se autofecundaron (flor femenina fecundada por una flor masculina de la misma planta) para fijar por homocigosis los genotipos deseados.

Durante 2009 (tercera evaluación de resistencia a CMV en CB S₂) se sembraron semillas S₂ de calabaza en vasos de unicel de 500 ml de capacidad que contenían suelo de monte esterilizado con bromuro de metilo. Se establecieron dos tratamientos por especie inoculado y no inoculado con CMV, en un diseño completamente al azar con 120 repeticiones (plantas de calabaza).

A la emergencia de las plántulas (etapa cotiledonal), se les inoculó mecánicamente, excepto a los testigos. A los 20 días después de la inoculación (ddi) se registraron datos de incidencia calculado con la formula 1.

$$I_i = \frac{\sum n_i}{N_i} \dots\dots\dots \text{Formula 1}$$

Donde:

I_i = incidencia de la enfermedad en el momento i ;

n_i = numero de plantas enfermas en el momento i ;

N_i = población total de plántulas en el momento i .

De la inoculación a la madurez fisiológica de los frutos, se realizó trampeo de áfidos alados en 24 charolas amarillas que contenían agua con jabón y también con 20 trampas amarilla con pegamento, distribuidas aleatoria y equidistantemente en el experimento, para monitorear la incidencia y densidad de los vectores.

Evaluación de la resistencia

La intensidad de daño se expresó por medio de la incidencia de la enfermedad medida con base en la proporción de plantas con síntomas de amarillamiento, mosaicos, deformación de hojas en relación a la población total de plantas. (Formula 1); las evaluaciones se hicieron después de 20 días de inoculadas (Campbell y Madden, 1990).

La evolución de la enfermedad se observó haciendo evaluaciones de incidencia en diferentes tiempos posteriores a la inoculación, en intervalos de 5 días, durante los siguientes 25 días.

La presencia de CMV en las plantas se verificó utilizando el kit® comercial de AGDIA mediante la técnica serológica de inmunoadsorción ligada a enzimas en sándwich de doble anticuerpo (DAS- ELISA) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor de los antisueros (AGDIA, USA). Se tomó lectura de la placa en un lector marca Labsystem modelo Multiskan a una longitud de onda de 405 nm, se considero positivas las muestras con una absorbancia igual o superior al testigo positivo o cuando el valor fue tres veces más alto que la absorbancia del testigo negativo. Para el análisis se hicieron muestras compuestas con tejido foliar de seis plantas de una misma variedad, las muestras positivas fueron separadas individualmente y se realizó nuevamente la ELISA a cada una para identificar directamente la o las muestras positivas (Cuadro 1).

Alfaro (1996) menciona que una forma más efectiva de medir la gravedad o severidad de las enfermedades virosas, es la medición de variables que se reflejen en la producción. Por lo que además de la incidencia se evaluaron cuatro componentes de rendimiento: peso seco (g), número y peso (g) de frutos y peso (g) de semilla. Los detalles de la evaluación fueron:

- Peso seco de la planta (g). la planta completa se colocó en una estufa, para eliminar agua y pesar la materia seca.

- Número de frutos (g). Al momento de la cosecha, se contaron los frutos de cada planta.
- Peso de fruto (g). Al momento de la cosecha, se pesaron los frutos de cada planta en una báscula digital.
- Peso de semillas (g). Se extrajo la semilla del fruto, se puso a secar, se contaron 100 semillas y se pesó con una báscula digital.

Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias Tukey para determinar la existencia de diferencias estadísticas para determinar si los tratamientos diferían en sus efectos ($\alpha \leq 0.05$). El análisis se hizo con el software del sistema de análisis estadístico (SAS) versión 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se consideró como plantas resistentes las que sobrevivieron y no presentaron síntomas de virosis, así como el resultado de ELISA negativo (Cuadro 1); y como susceptibles, a las plantas que presentaron síntomas o muerte y resultado de ELISA positivo. En este caso, es indispensable el diagnóstico serológico, ya que puede haber casos de tolerancia en los que los virus se replican y se mueven mientras la planta permanece asintomática con una apariencia normal (Cervera y García, 1994).

Los síntomas que se lograron observar fueron mosaicos y pequeñas islas de color verde oscuro con abarquillamiento ligero de la hoja y poco crecimiento en invernadero (Figura 1). En campo se observó el desarrollo de mosaicos y manchas verde oscuros, epinastia y cambios de tamaño y forma de la hoja. En algunas plantas que lograron completar su ciclo, aun con el virus, se observó la producción de frutos deformes con pérdida de color. Síntomas característicos de CMV (Blancard *et al.*, 1996).

Evaluación de la respuesta de Calabazas a CMV

La incidencia del CMV, en la prueba de infectividad en las diferentes especies, fue mayor al 50 % (excepto *C. ficifolia* que alcanzo solo 42 %). Esto significa que el aislamiento de CMV, tiene la habilidad de infectar a las cuatro especies. De acuerdo con Atabekow y Taliensky (1990) un virus puede infectar solamente un número limitado de organismos, lo que constituye la gama de hospedantes. La inducción de síntomas se presenta como el resultado de un proceso de multiplicación viral en las células inoculadas, así como de su adecuado transporte hacia células próximas (movimiento célula a célula) como a larga distancia (Cervera y García, 1994). En las plantas testigo (sin inoculación) no hubo manifestación de síntomas. A demás se corroboró, con la prueba de ELISA que las plantas testigo fueron negativas y las plantas inoculadas que presentaron síntomas fueron positivas (Cuadro 1).

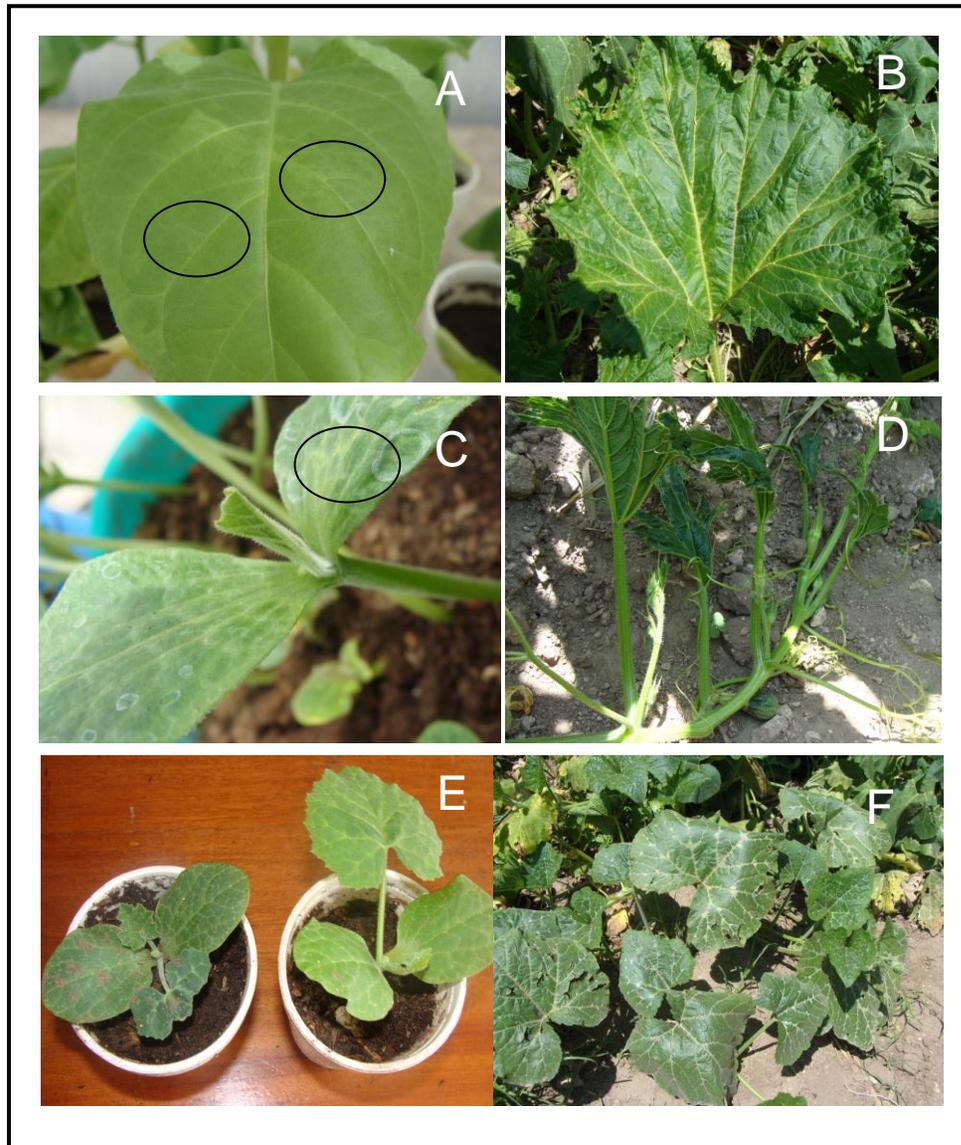


Figura 2. Síntomas asociados a CMV observados en campo e invernadero en plantas de *Cucurbita* spp. A) Pequeñas islas verdes oscuras en la hoja de tabaco para incremento de inóculo; B) Síntomas de islas verdes y abarquillamiento en área foliar de calabaza en campo; C) Inicio de clorosis y formación de mosaicos a los 3 días después de la inoculación (ddi); D) Planta de *Cucurbita pepo* con poco crecimiento: acortamiento de nudos, reducción área foliar, protuberancia en frutos tiernos, coloración amarilla; E) Cambios de coloración y disminución de crecimiento; F) Islas verdes y pérdida de turgencia de las hojas.

Cuadro 1. Resultados de la prueba de ELISA en muestras compuestas de *Cucurbita* spp.

Muestra	Primera lectura		Segunda lectura	
	R1	R2	R1	R2
BCO	0,000	0,003	0,000	-0,004
NEGATIVO	-0,004	0,000	-0,006	-0,005
POSITIVO	0,164	0,166	0,267	0,269
<i>C. argyrosperma</i>	0,168*	0,145	0,181	0,165
<i>C. argyrosperma</i> (testigo)	-0,009	-0,007	-0,009	0,002
<i>C. ficifolia</i>	-0,003	0,001	0,000	0,002
<i>C. ficifolia</i> (testigo)	0,006	0,006	0,008	-0,008
<i>C. moschata</i>	0,005	0,006	-0,004	-0,009
<i>C. moschata</i> (testigo)	0,001	0,003	-0,003	-0,008
<i>C. pepo</i>	0,150*	0,149	-0,230	-0,235
<i>C. pepo</i> (testigo)	0,006	0,006	0,008	-0,008

* Muestras compuestas que posteriormente se analizaron individualmente con ELISA.

Al evaluar la incidencia entre tratamientos (inoculado y no inoculado), en todos los casos, se encontró diferencias ($\alpha \leq 0.05$). Comparando la respuesta entre las cuatro especies de calabaza, se observa que en *C. ficifolia* la aparición de los síntomas fue más lento (Figura 3). Al respecto; Apple (1978) menciona que en la naturaleza se presentan plantas que exhiben ciertos grados de resistencia; es decir, resultan menos dañadas que otras en condiciones similares de contacto con la enfermedad.

En general, no hubo diferencias estadísticas ($\alpha \leq 0.05$) en la incidencia, respecto a las diferentes generaciones evaluadas (S_0 , S_1 y S_2), el comportamiento en cada especie ante la enfermedad fue similar.

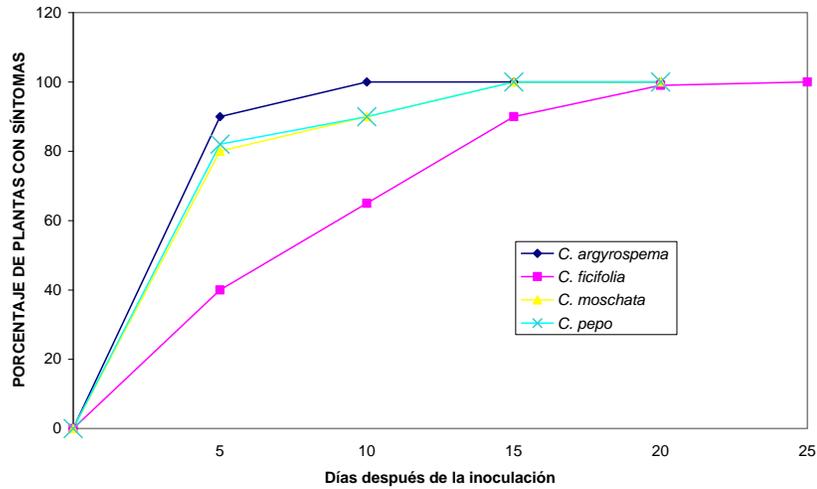


Figura 3. Incidencia acumulada de plantas con síntomas de virosis en invernadero causados por CMV en cuatro especies de *Cucurbita* spp.

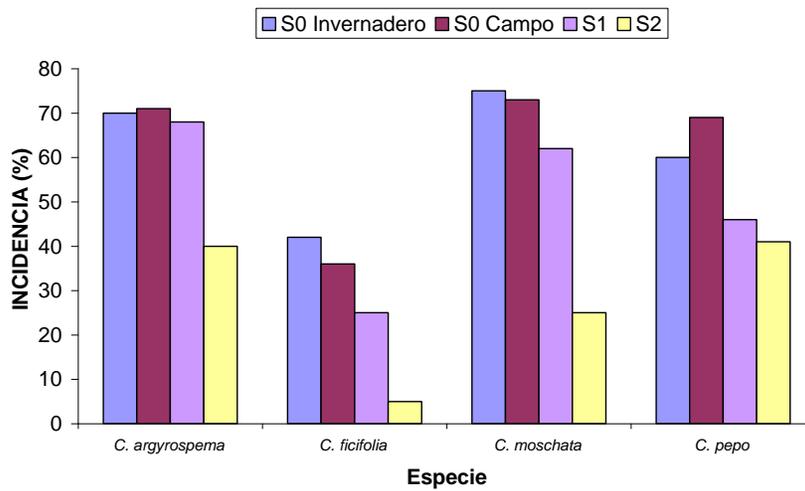


Figura 4. Incidencia de plantas de calabaza (*Cucurbita* spp.) inoculadas con CMV que mostraron síntomas en tres generaciones S₀ (campo e invernadero), S₁ (campo) y S₂ (invernadero).

Cuadro 2 Incidencia acumulada de la enfermedad en cuatro especies de Cucurbita inoculadas con CMV

Especie	Etapa	DDI						Comparación entre ssp.
		0	5	10	15	20	X*	
<i>C. argyrosperma</i>	S ₀ (invernadero)	0	0.95	1.0	1.0	1.0	0.82a	0.80a
	S ₀ (campo)	0	0.90	1.0	1.0	1.0	0.81a	
	S ₁ ⊗ (campo)	0	0.88	1.0	1.0	1.0	0.81a	
	S ₂ ⊗ (invernadero)	0	0.95	1.0	1.0	1.0	0.82a	
<i>C. ficifolia</i>	S ₀ (invernadero)	0	0.45	0.70	0.90	1.0	0.67a	0.66b
	S ₀ (campo)	0	0.40	0.65	0.90	0.90	0.65a	
	S ₁ ⊗ (campo)	0	0.50	0.70	0.80	0.90	0.65a	
	S ₂ ⊗ (invernadero)	0	0.40	0.80	0.90	1.0	0.68a	
<i>C. moschata</i>	S ₀ (invernadero)	0	0.88	0.90	1.0	1.0	0.79a	0.79a
	S ₀ (campo)	0	0.80	0.90	1.0	1.0	0.78a	
	S ₁ ⊗ (campo)	0	0.80	0.90	1.0	1.0	0.78a	
	S ₂ ⊗ (invernadero)	0	0.85	1.0	1.0	1.0	0.80a	
<i>C. pepo</i>	S ₀ (invernadero)	0	0.80	1.0	1.0	1.0	0.80a	0.79a
	S ₀ (campo)	0	0.82	0.9	1.0	1.0	0.78a	
	S ₁ ⊗ (campo)	0	0.80	0.95	1.0	1.0	0.79a	
	S ₂ ⊗ (invernadero)	0	0.85	1.0	1.0	1.0	0.82a	

*valores con la misma letra no presentaron diferente significativamente; Tukey al 95% de confiabilidad

En la Figura 4 se observa cómo disminuye la frecuencia de plantas susceptibles en las generaciones S₁ y S₂. Esto se debe a que la autopolinización de las plantas produce un incremento en la homocigosis y al carácter monogénico de la resistencia (Brouwn, 2003).

La frecuencia de la resistencia en el S₀ fue de 29, 64, 28 y 31 % en *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. pepo*, respectivamente (Cuadro 3); después de una autopolinización se observó que la frecuencia de plantas resistentes aumentó 10, 17, 35 y 76 % respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 3. Frecuencia relativa de plantas resistentes a CMV encontradas en CB de colectas en 2007

Especie	Plantas inoculadas	Plantas resistentes	Frecuencia de plantas resistentes %
<i>C. argyrosperma</i>	300	87	29
<i>C. ficifolia</i>	300	192	64
<i>C. moschata</i>	300	82	27.3
<i>C. pepo</i>	300	93	31

Cuadro 4. Segregación de la resistencia en líneas S₁ de plantas S₀ resistentes a CMV autofecundadas en 2008

Especie	Plantas S ₁ inoculadas	Plantas S ₁ resistentes	Frecuencia de plantas resistentes %
<i>C. argyrosperma</i>	108	35	32(10**)
<i>C. ficifolia</i>	108	81	75(17)
<i>C. moschata</i>	108	42	38(35)
<i>C. pepo</i>	108	59	54.6(76)

*Fenológicamente y por ELISA

**Aumento en porcentaje en comparación a la generación anterior.

Cuadro 5. Segregación de la resistencia en líneas S₂ de plantas resistentes a CMV autofecundadas en 2009

Especie	Plantas S ₂ inoculadas	Plantas S ₂ resistentes	Frecuencia de plantas resistencia %
<i>C. argyrosperma</i>	120	64	60(100**)
<i>C. ficifolia</i>	120	114	95(48)
<i>C. moschata</i>	120	81	75(67)
<i>C. pepo</i>	120	70	59(90)

*Fenológicamente y por ELISA

**Aumento en porcentaje en comparación a la generación pasada

La frecuencia de plantas con resistencia fue mayor en CB S₂, en las cuatro especies evaluadas: *C. pepo* presentó 59 %, *C. argyrosperma* 60 %, *C. ficifolia* 95 % y *C. moschata* 75 %; 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 acoplen y en algún momento venzan la resistencia de la planta (Apple, 1978).

Evaluación de germoplasma de calabaza

En la evaluación de las cuatro variables del rendimiento se encontró que las plantas resistentes a CMV de *C. argyrosperma*, en comparación al testigo (Cuadro 6) no mostraron diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) en biomasa, peso de fruto y semilla; sin embargo, sí muestran menor número de frutos por planta (el testigo presenta un promedio de siete frutos por planta, mientras las plantas resistentes mostraron 2-3 frutos por planta). Los valores promedio son cercanos a los reportados por Aragón (2005), quienes caracterizaron morfológicamente las variedades cultivadas de esta especie.

Las plantas de *C. ficifolia* resistentes a CMV no mostraron diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$, Cuadro 6), en comparación al testigo, no se observó disminución de peso seco (172 g), número de frutos (15 frutos por planta), peso de frutos (mayor de 1 kg) y peso de 100 semillas (50 g).

Cuadro 6. Valores promedio de cuatro caracteres agronómicos en plantas de *Cucurbita* spp, resistentes a CMV en S₀.

Especie		VARIABLES			
		BPS	NF	PF	PS
<i>C. argyrosperma</i>	\bar{y} Resistentes*	93.27a	2.60b	557.4a	42.00a
	\bar{y} Testigo	158.87a	6.66a	710.13a	75.00a
<i>C. ficifolia</i>	\bar{y} Resistentes*	172.4a	15.13a	1171.3a	54.60a
	\bar{y} Testigo	203.3a	13.86a	1214.7a	56.86a
<i>C. moschata</i>	\bar{y} Resistentes*	284.37a	15.3a	1342a	55.20a
	\bar{y} Testigo	172.40b	16.93a	1201a	81.26a
<i>C. pepo</i>	\bar{y} Resistentes*	301.5a	12.13a	1404.6a	34.53b
	\bar{y} Testigo	266.90b	10.06a	1388.33a	56.53a

BPS: biomasa (peso seco) (g); **NF:** número de frutos por planta; **PF:** peso de fruto (g); **PS:** peso de 100 semillas (g); \bar{y} : medias.

*Valores con la misma letra no presentaron diferencia significativa (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

Las plantas de *C. moschata* resistentes a CMV superaron en 60 % al de las del testigo en peso seco, sin embargo, en número de frutos y peso de fruto y semilla no hubo diferencia estadística ($\alpha \leq 0.05$, Cuadro 6).

Las plantas de *C. pepo* resistentes a CMV mostraron diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$, Cuadro 6), en comparación al testigo, presentaron disminución en el peso de semilla, y aumento de peso seco, con respecto a esto en campo se observó aumento del tamaño del follaje, comportamiento diferente al reportado, dado que por la inoculación del virus, uno de los efectos de este patógeno en la

planta es una disminución del crecimiento en plantas de calabaza (Agrios, 2004).

El uso de variedades resistentes es una estrategia orientada particularmente en explotar las variedades de plantas tolerantes o resistentes a los ataques de patógenos (Apple, 1978). Estas características de resistencia los hace valiosos como donadores potenciales de genes para el desarrollo o mejoramiento de variedades comerciales (Chávez *et al.*, 2003).

CONCLUSIÓN

Se encontraron plantas resistentes al *Cucumber mosaic virus* (CMV) en las especies de *C. argyrosperma* (29 %), *C. ficifolia* (64 %), *C. moschata* (28 %) y *C. pepo* (31 %), en germoplasma de colectas nativas mexicanas, que de acuerdo a la evaluación, son fuente de genes de resistencia, ya que se ve afectado su desarrollo al ser inoculadas con el virus.

LITERATURA CITADA

- Agrios G N (2004)** Plant pathology 5th (Ed.) Academic Press. San Diego, California, USA. 952 p.
- Alfaro G A (1996)** Epidemiología de las virosis. In: Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A (1996) Patología vegetal Tomo 1(Ed.). Mundi prensa-Phytoma, España. 77-90 pp.

- Apple J L (1978)** El papel de la resistencia de planta hospedera en los sistemas de control integrado In: principios generales de control integrado de plagas y enfermedades con énfasis a maíz y soya. Universidad Nacional Agraria, Lima, Perú.
- Aragón L R (2005)** Caracterización de materiales experimentales de calabaza (*Cucurbita spp.*) y verificación de su resistencia al Damping off. Tesis Maestría en Ciencias de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo 131p.
- Atabekow J G, M E Taliansky (1990)** Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus Res.*38:201-248. En: Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A (1996) *Patología vegetal Tomo 1*(Ed.). Mundi prensa-Phytoma, España. 77-90 pp.
- Blancard D, H Lecoq, M Pitrat (1991)** Enfermedades de las cucurbitáceas observar, identificar y luchar. (Ed.) Mundi Prensa, Madrid, España. 301 p.
- Brouwn R N, H A Bolaños, J R Myers, M M Jahn (2003)** Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* 129:253-258.
- Campbell C L, V L Madden (1990)** Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 532 p.
- Cervera M T, J A García (1994)** Patogénesis de virus de plantas. In: Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A (1996) *Patología vegetal Tomo 1*(Ed.). Mundi Prensa-Phytoma, España. 77 pp.
- Conti M, D Gallitelli, V Lisa, O Lovisolo, G P Martelli, A Ragozzino, G L Rana, C Volvas (2000)** Principales virus de las plantas hortícolas.

Traducido al español de J M Mateo Box. (Ed.) Mundi Prensa. España 206 p.

Cooper J I, A T Jones (1983) Responses of plant to viruses: proposal for the use of terms. *Phytopathology* 73:127-128.

Chávez A J L (1993) Mejoramiento de plantas (ed.). Trillas, México 131 pp.

Cháves S J L, P. Collado, R Pinedo (2003) Conservación o pérdida del valor de las variedades locales de los cultivos amazónicos. In: Memoria del Seminario Permanente de Investigación Agraria (SEPIA) X. Pucallpa, Perú. 19-22. Agosto CODESU, Universidad Nacional de UCAYALI, IBPGRI. Lima, Perú. 1-31.

Daniels J, R N Campbell (1992) Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Dis.* 76:1245-1250.

Dawson W O, M E Hilf (1992) Host-range determinants of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 43:527-555.

Delgadillo S F (1990) Enfermedades complejo causadas por virus fitopatógenos. *Rev. Méx. Fitop.* 8:99-101.

Garzón T J A (1988) Enfermedades causadas por virus en tomate, chile y cucurbitáceas en México. In: Delgadillo SF, Garzón JA, Vega (1989) Cucurbit viruses in Mexico. *Rev. Méx. Fitop.* 7:136-139.

Garzón T J A, H S Montes, F A Becerra (1993) Fuentes de resistencia a los virus mosaico del pepino y de la sandía-2 en calabaza (*C. moschata*) en México. *Rev. Méx. Fitop.* 11:167-171.

Kohashi S J (1960) Mejoramiento genético de la calabaza (*Cucurbita* spp.) en México. *Proceedings A.S.H.S. Región Tropical* 4: 16-19.

- Lecoq H, M Pitrat, M Clement (1981)** Identification, et caracterisation d'un potivirus provoquant la maladie du rabougrissement jaune du melon. *Agronomie* 1:827-834. En:
- Montes H S (1991)** Calabazas (*Cucurbita* spp.). *In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México*. R Ortega P, G Palomino H, F Castillo G, V A González H, M Livera M (eds.). SOMEFI. Chapingo, México. pp: 239-250.
- Rodríguez E A (1988)** Evaluación de variedades e híbridos de calabacitas verdes, amarillas y grises en dos etapas de siembra. Sinaloa, México. SARH Publicación especial N. 13:176-185.
- Whitaker T W (1968)** Ecological aspects of the cultivated *Cucurbita*. *HortScience* 3(1): 9-11.
- Zitter T A, D L Hopkins, C E Thomas (1996)** Compendium of cucurbit diseases The American Phytopathological Society. USA. 88p.

III. CARACTERIZACIÓN AGRÓNOMICA Y MOLECULAR DE VARIEDADES EXPERIMENTALES DE CALABAZA (*Cucurbita* spp.) RESISTENTES A Cucumber mosaic virus (CMV)

RESUMEN

Se caracterizaron agronómicamente plantas S1 (compuesto balanceado obtenidas de semilla proveniente de plantas resistentes a CMV en 2007) de cuatro especies de calabazas resistentes a CMV (*C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*). Se evaluó: días a floración femenina y masculina, peso de fruto (g), peso de semillas (g), grosor de pulpa (cm), sabor de pulpa y color de pulpa; en un diseño en bloques completos al azar. *C. argyrosperma* presentó un decremento general en el rendimiento del número de frutos, el peso de semilla y el grosor de pulpa; *C. moschata*, presentó precocidad en la floración masculina y mostró menor rendimiento de semilla; *C. pepo* tuvo mayor número de días para la floración (masculina y femenina) y presentó menor rendimiento en semilla; y en *C. ficifolia*, solo se redujo el grosor de la pulpa. Se evaluaron plantas S₁ S₂ resistentes y susceptibles a CMV mediante RAPD, con 19 iniciadores y 3 estuvieron asociados a la resistencia a CMV: en *C. pepo*, se asociaron con la presencia del locus OPA05-11; en *C. argyrosperma* con locus OPD02-6 y *C. moschata* con locus OPD18-2 con un peso molecular de 380, 500 y 2500 pb respectivamente.

Palabras claves: *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. pepo*, *C. moschata*, RAPD, Resistencia

**CHARACTERIZATION AGRÓNOMICA AND MOLECULAR OF VARIETIES
SQUASH EXPERIMENTALES (*Cucurbita* spp.) RESISTENTES A
Cucumber mosaic virus (CMV)**

ABSTRAC

Agronomically characterized plant S1 (balanced compound obtained from seeds of plants resistant to CMV in 2007) of resistant squash to CMV (*C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* and *C. argyrosperma*). Was evaluated: days to flowering male and female weight fruit (g) weight of seeds (g), thickness of flesh (cm), taste and color of pulp; in a randomized complete block design. *C. argyrosperma* presented an overall decrease in the number of fruits, seed weight and thickness of flesh; performance *C. moschata*, presented earliness in flowering male and showed reduced performance of seed ; *C. pepo* had greater number of days to flowering (male and female) and I present lower performance in seed; and *C. ficifolia*, only reduced the thickness of the flesh. Assessed plant S1 resistant and susceptible to CMV using RAPD, whit 19 primers and only three primers were associated with resistance to CMV: in *C. pepo*, partnered with the presence of locus the OPA05-11; *C. argyrosperma* with locus OPD02-6 and *C. moschata* with locus OPD18-2 with a molecular weight of 380, 500-2500 pb respectively.

Keywords: *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. pepo*, *C. moschata*, RAPD, Resistencia,

III. CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA Y MOLECULAR DE VARIEDADES EXPERIMENTALES DE CALABAZA (*Cucurbita* spp.) RESISTENTES AL *Cucumber mosaic virus* (CMV)

INTRODUCCIÓN

La caracterización de poblaciones de plantas puede basarse en el uso de variables de carácter agronómico y molecular. Al caracterizar una especie se estima la variabilidad existente en el genoma vegetal del conjunto de individuos que la conforman; así, la información codificada por los genes puede establecer su identidad morfológica (Franco e Hidalgo, 2003). Los marcadores moleculares desempeñan un papel cada vez más importante en el mejoramiento genético y han producido formas novedosas y potencialmente más eficiente para analizar y manipular las variaciones genéticas naturales, ha permitido identificar el ADN de los cultivares y del germoplasma silvestre. Actualmente se dispone de varios tipos de marcadores genéticos que difieren en su facilidad de uso y en la cantidad de información que suministran (Michelmore, 1995). Un marcador genético es una banda de ADN que puede estar asociada con un carácter agronómico de interés (resistencia). Los marcadores tipo RAPD (polimorfismos en el ADN ampliados al azar) proporcionan un método rápido para generar mapas genéticos, provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas. Estos 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).

Con frecuencia se ha omitido la capacidad de las plantas para defenderse de las patógenos (fenotipos no comerciales), por selecciones de tipos en los que se busca fundamentalmente mejorar el rendimiento y calidad, pero que resultan particularmente muy susceptibles y que requieren condiciones de protección que muchas veces no están al alcance de los agricultores (Apple, 1978).

Las enfermedades virales son de gran importancia en la producción comercial de la calabaza (*Cucurbita pepo* L.) debido a su potencial destructivo y difícil manejo (Zitter *et al.*, 1996). El *Cucumber mosaic virus* (virus mosaico del pepino, CMV) es uno de los 10 virus fitopatógenos más importantes en el mundo por: su gran número de variantes; su amplia distribución geográfica y por los daños que causa a una gran cantidad de especies de plantas de interés económico (Valadez 1990; Holcomb y Valverde, 1991; Brunt *et al.*, 1996), ha sido reportado en todas las zonas hortícolas del país; afecta a 361 especies vegetales (Canaday, 1991). El CMV afecta a la calabaza ocasionando pérdidas económicas de gran importancia (Conti *et al.*, 2000), causa manchones amarillos sistémicos después de 20 días, así como mosaicos, laciniaduras, abarquillamiento ligero, manchas amarillas y reducción de la lámina foliar. En frutos produce deformaciones y protuberancias, causando disminución en rendimiento y calidad del fruto (Blancard *et al.*, 1991).

Diversos estudios han encontrado material de *Cucurbita* spp. resistente a virus que debido a sus características no son utilizadas en los programas de mejoramiento: poco atractivas comercialmente (Rodríguez, 1988);

incompatibilidad en cruzas con el cultivar grey zucchini (Garzón, 1993; Provvidenti y Gonsalves, 1984), Por lo que es necesario entender los aspectos biológicos y morfológicos de la especie.

Los marcadores moleculares ayudan a identificar nuevas fuentes de resistencia a partir de diferentes genotipos y es posible combinar estas resistencias puesto que los genes de resistencia están agrupados normalmente en el genoma, al analizar la segregación de la resistencia en una F_2 ; proveniente de una crusa sencilla de progenitores con tres genes de resistencia a mildiu cada uno; permitieron identificar nuevas combinaciones de genes de resistencia en el mismo cromosoma. La identificación de recombinaciones entre marcadores que flanquean un gen de resistencia puede ayudar a romper la asociación de las características hortícolas no deseables que pueden estar genéticamente relacionadas con resistencia que podrían impedir su uso (Milcheltmore, 1991).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar agronómica y molecularmente germoplasma de calabazas resistente a CMV buscando un marcador molecular asociado a la resistencia al CMV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización agronómica.

Germoplasma vegetal. Se formó un compuesto balanceado de *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo* y *C. argyrosperma*, con semillas de frutos S_1

autopolinizados y cosechados en 2007 de plantas resistentes (Capítulo II); Los compuestos se integraron con 10, 3, 8 y 2 familias (50 semillas por familia), respectivamente.

Establecimiento en campo. La siembra se realizó en el campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, México en el ciclo primavera - verano 2008, con riego. Se usó un diseño de bloques completos al azar con 6 repeticiones. Los tratamientos fueron ocho las combinaciones de las cuatro poblaciones con dos manejos: inoculado y no inoculados con CMV (testigo por población). La unidad experimental fue un surco de 12 m de largo. La separación entre surcos fue de 0.9 m, con nueve matas de dos plantas, separadas a 1.2 m quedando 18 plantas por bloque. Se intercaló un surco de maíz por cada uno de calabaza, por lo que el distanciamiento real entre surcos de la misma especie fue de 1.8 m. La separación entre matas de maíz fue 20 cm. Se sembraron tres semillas por sitio y se raleó a una cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura. La cosecha se realizó en octubre del 2008.

Para corroborar que las plantas de calabaza a caracterizar agronómica y molecularmente fueran realmente resistentes a CMV se realizó la inoculación mecánica del virus a la emergencia de las plántulas, excepto los testigos. A los 20 días después de la inoculación (ddi) se eliminaron todas las plantas con síntomas que aparecieron debido a la segregación de plantas resistentes

heterocigóticas originalmente autofecundadas cuando se detectaron como resistentes en 2007.

Preparación del inóculo: se cortaron hojas de planta de tabaco infectadas con CMV y se colocaron en una bolsa de polietileno, donde se agregó una solución buffer de fosfatos + DIECA (dietilditiocarbamato de sodio 0.01 M), en proporción de 1:10 peso/volumen y se maceró para la extracción del virus.

Inoculación. Cuando aparecieron las hojas cotiledonales se les aplicó carborundum (600 mallas) y con un cotonete previamente empapado con el inóculo se hicieron movimientos circulares y firmes para raspar la superficie foliar. Con ayuda de una pizeta, se lavó con agua destilada estéril el área tratada de la planta para eliminar residuos.

Diagnóstico. La ausencia de CMV en las plantas resistentes, se verificó con la técnica serológica de inmunoabsorción ligada a enzimas en sándwich de doble anticuerpo (DAS- ELISA) Utilizando el kit® de AGDIA Inc.. Al término del proceso la placa se analizó en un lector marca LabSystem modelo Multiskan a una longitud de onda de 405 nm, considerando positivas las muestras con una absorbancia igual o superior al testigo positivo o cuando el valor fue tres veces más alto que la absorbancia del testigo negativo.

De cada parcela de 18 plantas se obtuvieron tres muestras compuestas de seis plantas, procurando agrupar plantas con síntomas o sin síntomas de CMV al interior de cada muestra. Cada muestra compuesta se analizó con ELISA, y aquellas que resultaron positivas se analizaron nuevamente por ELISA pero

ahora de manera individual para cada planta de la muestra compuesta, para detectar la planta susceptible a descartar. Si el resultado en la muestra compuesta fue negativo se considero que todas las plantas eran resistentes y por tanto seleccionables como fuente de resistencia, mismas que fueron objeto de la caracterización molecular en este trabajo.

Variables evaluadas.

- Días a floración femenina y masculina. Se registraron como los días transcurridos a la fecha en que el 50 % de las plantas presentó al menos una flor masculina y femenina abierta, respectivamente.
- Peso de fruto (g). Al momento de la cosecha, se pesaron los frutos de cada planta en una báscula digital.
- Peso de semillas (g). Se extrajo la semilla del fruto, se puso a secar, se contaron 100 semillas y se pesó con una báscula digital.
- Grosor de pulpa (cm). Se partió el fruto por la mitad y se midió con regla milimétrica el grosor de la pulpa desde la placenta hasta donde inicia la cáscara.
- Sabor de pulpa. El sabor se determinó degustando personalmente una porción de la pulpa en crudo, bajo la clasificación de la siguiente escala 1: insípido, 2: dulce intermedio, 3: muy dulce
- Color de pulpa. Se observó y registró el color que presentaba la pulpa de cada fruto, de acuerdo con la siguiente escala 1: blanco, 2: amarillo, 3: anaranjado.

El análisis de las variables se realizó con base en el modelo de un diseño en bloques completos al azar, con un $\alpha= 0.05$, y una comparación de medias Tukey con el software sistema de análisis estadístico (SAS) versión 8.

Caracterización molecular

Los marcadores RAPD se obtuvieron de diez plantas resistentes y diez plantas susceptibles por especie. El muestreo de tejido se realizó a los 20 ddi, posterior a la evaluación de la incidencia, para coleccionar material resistente y material susceptible antes de su muerte o eliminación dirigida, con el fin de tener puntos de comparación entre resistentes y susceptibles.

El ADN fue extraído con el método propuesto por De la Cruz *et al.* (1997). Se probaron 19 iniciadores OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA06, OPA09, OPA11, OPA13, OPA15, OPA19, OPA18, OPD02, OPD03, OPD08, OPD11, OPD12, OPD13, OPD18, OPD20, sintetizados por Operon Technologies Inc, Alameda, CA, EE.UU.

Hubo 20 muestras individuales y 2 muestras compuestas (una mezcla de las diez plantas resistentes y una mezcla de las diez plantas susceptibles) por especie para realizar simultáneamente la reacción RAPD en las 88 muestras totales.

Las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador Perkin Elmer Modelo 480 por duplicado en eventos independientes, en un volumen final de 25 μL . La mezcla de reacción para RAPD consistió de 4.2 μL de agua bidestilada estéril, 10 μL de dNTPs (500 μM), 2.5 μL de amortiguador $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$

(10X), 2.0 μL de MgCl_2 (50 mM), 3.0 μL del iniciador (10 pM), 0.3 μL de enzima *Taq* ADN polimerasa (5U μL), y 4.0 μL de ADN genómico (10 ng μL^{-1}). El programa de termociclaje consistió de 1 ciclo a 94 °C, 2 min; 38 ciclos [94 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min] al final del programa se incluyó un ciclo de extensión a 72 °C (2 min, 30 s). La separación de los fragmentos amplificados se hizo por electroforesis en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1mM Na_2EDTA), durante 3 h a 85 V. Como referencia para estimar el peso molecular de los productos de PCR, se incluyó el marcador de peso molecular de 1 kb (DNA Ladder Plus) en los extremos de cada gel. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL^{-1}) durante 15 min, después se eliminó el exceso de colorante con agua destilada estéril por 15 min más y se fotografiaron bajo luz UV con una cámara Kodak Digital Science 1D 2.0.

Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo en plantas resistentes y plantas susceptibles (Michelmore *et al.*, 1995)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se consideraron como plantas resistentes aquellas que sobrevivieron a la inoculación del virus y no presentaron síntomas de virosis y que además fueron negativas en la prueba de ELISA; y como susceptibles a las plantas que

presentaron síntomas o muerte y fueron positivas en la prueba de ELISA. El diagnóstico serológico se consideró indispensable ya que puede haber casos de tolerancia en donde los virus se replican y se mueven mientras la planta permanece asintomática (Cervera y García, 1994).

Caracterización agronómica

Las plantas resistentes a CMV de *C. argyrosperma*, en comparación al testigo (Cuadro 1) no mostraron diferencia en los días a floración masculina (requirieron en promedio 88 días para su producción) en el caso de la producción de flores femeninas, el testigo presentó un promedio de 99.5 días, mientras que las plantas resistentes a CMV necesitaron en promedio 94 días, es decir requirió menos días, acercándose al inicio de floración masculina, lo que resulta óptimo, ya que en la familia de las cucurbitáceas primero aparecen las flores masculinas y días después las flores femeninas (Lira-Saade, 1995; Valadez, 1990), por lo que existe la posibilidad de incrementar el número de frutos. Sin embargo presentó disminución de 33 % en el número de frutos por planta, en comparación al testigo, asociado tal vez, al aborto excesivo de frutos tiernos que se observó en campo. Resultó contradictorio que, aunque el peso de la semilla y el grosor de la pulpa disminuyeron en 17 y 5 % respectivamente, el peso del fruto no se vio afectado presentando en promedio un peso de 1177 gramos. El sabor y color de pulpa no presentaron alteración, en comparación al testigo y los valores promedios son cercanos a los reportados por Aragón

(2005), quien caracterizó morfológicamente variedades cultivadas de esta especie.

Cuadro 1. Valores promedios de algunos caracteres agronómicos en plantas de *Cucurbita* spp, resistentes a CMV (plantas inoculadas sin síntomas y reacción de ELISA negativo) en comparación al testigo (plantas sin inocular).

Variable*		C.	C.	C.	C.
		<i>argyrosperma</i>	<i>ficifolia</i>	<i>moschata</i>	<i>pepo</i>
DFM	μ Resistente	88.20a**	95.80a	100.03b	72.50a
	Testigo	87.73a	96.10a	104.5a	70.85b
	CV	0.48	0.75	0.68	0.431
DFF	μ Resistente	93.76b	104.7a	108.46a	77.53a
	Testigo	99.50a	105.1a	108.36a	74.40b
	CV	0.36	0.38	0.50	0.795
NF	μ Resistente	3.71b	15.36a	10.11a	14.20a
	Testigo	5.50a	15.20a	10.76a	14.18a
	CV	16.79	1.84	5.85	3.50
PF	μ Resistente	1201.6a	1433.3a	2646.6a	2006.17a
	Testigo	1153.3a	1501.17a	2564.1a	2030.8a
	CV	2.90	3.21	2.16	5.76
PS	μ Resistente	37.83b	38.45a	52.15b	47.20b
	Testigo	45.50a	38.33a	55.10a	51.93a
	CV	3.37	1.86	2.48	1.143
GP	μ Resistente	1.64b	1.38b	2.53a	2.16a
	Testigo	1.71a	1.42a	2.56a	2.15a
	CV	2.69	1.88	2.26	1.91
SP	μ Resistente	2.45a	1.23a	2.56a	2.13a
	Testigo	2.50a	1.33a	2.56a	2.40a
	CV	6.939	15.18	6.03	12.26
CP	μ Resistente	2.45a	1.0a	2.83a	2.26a
	Testigo	2.43a	1.0a	2.60a	2.13a
	CV	7.19	0	6.08	12.64

*DFM: días a floración masculina; DFF: días a floración femenina; NF: número de frutos por planta; PF: peso del fruto en gramos; PS: peso de 100 semillas en gramos; GP: grosor en pulpa en cm; SP: sabor de la pulpa escala 1: insípido, 2: dulce intermedio, 3: muy dulce; CP: color de la pulpa escala 1: blanco, 2: amarillo, 3: anaranjado.

**Valores con la misma letra no presentaron diferencias significativamente; Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Las plantas resistentes a CMV de *C. ficifolia* presentaron características agronómicas deseables (Cuadro 1), excepto que mostró disminución en el grosor de la pulpa del 10 %± en comparación al testigo, característica de mucha importancia, ya que el mayor uso que se le da a esta especie es para la elaboración de dulce cristalizado, y aunque el consumo de fruto tierno existe, es casi nulo (Lira-Saade, 1995).

Las plantas resistentes a CVM obtenidas en *C. moschata*, en comparación al testigo, son precoces en la floración masculina, ya que requirieron 100 días promedio para su aparición, este parámetro no influyó en las demás variables evaluadas, ya que no presentaron diferencia en comparación del testigo. Las plantas resistentes presentaron en promedio 108 días en floración femenina, diez frutos por planta, con un peso de 2.6 kg, grosor de pulpa mayor a 2.5 cm, sabor de pulpa dulce de color amarillo- anaranjado. En cuanto al peso de la semilla, el testigo presentó un peso en 100 semillas de 55 g mientras, las semillas provenientes de las plantas resistentes solo 52 g, y la diferencia fue significativa ($\alpha \leq 0.05$). El peso de la semilla es importante ya que existe correlación entre peso y calidad de la semilla (Aragón, 2005).

Las plantas resistentes a CMV en *C. pepo* presentaron retraso en los días a floración masculina y femenina, el testigo necesitó 70 y 74 días respectivamente, mientras las plantas resistentes 72 y 77 días, respectivamente. Las características promedio fueron 14 frutos por planta, un

peso de 2 kg/ fruto, con un grosor de pulpa mayor a 2 cm, de color amarillo y sabor dulce intermedio. Presentó disminución en el peso de semilla, tal vez como resultado del aumento del tamaño del follaje en la planta, característica que también se presentó en la evaluación de la resistencia 2007, en la evaluación de peso seco (Cap. II).

C. ficifolia, presentó menor variación (días a floración, número y peso de frutos, sabor y color de la pulpa y peso de semilla), debido posiblemente que es la especie con menor relación genética con las otras especies de calabaza (Lira-Saade, 1995).

Caracterización molecular

Los 19 marcadores moleculares usados amplificaron en las cuatro especies y en cada uno de los perfiles de electroforesis se observó una separación bien definida de las bandas para cada especie y en su mayoría muestra casi nula diferenciación entre plantas resistentes y susceptibles (Figura 1) lo que confirma los resultados del Capítulo I donde se observó reducida variabilidad genética, con porcentajes de 14.7 % en *C. argyrosperma*, 14 % en *C. ficifolia*, 20.8 % para *C. pepo* y 37 % en *C. moschata*, con un grado de flujo genético bajo ($Nm=0.14$) indicando que hay menos de un migrante por generación entre las poblaciones de las especies.

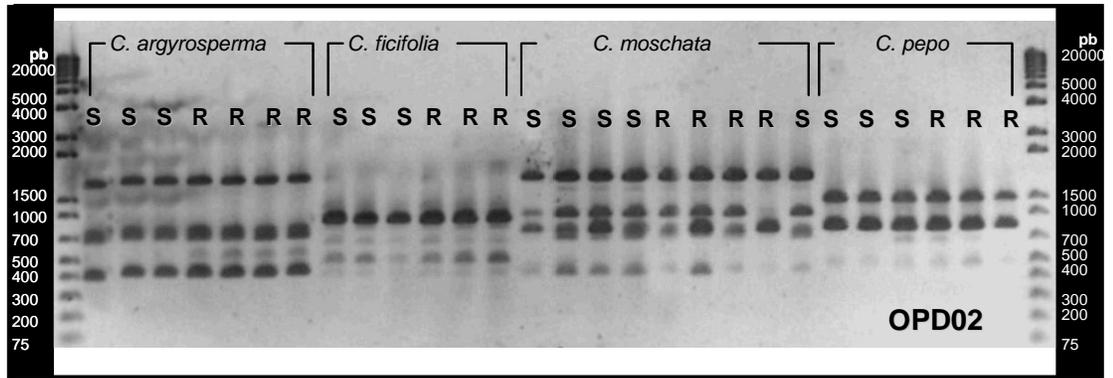


Figura 1. Gel de agarosa 1.2 % mostrando los patrones polimorficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generados por el iniciador aleatorio OPD02, evaluado en cuatro especies de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes y susceptibles a *Cucumber mosaic virus*.

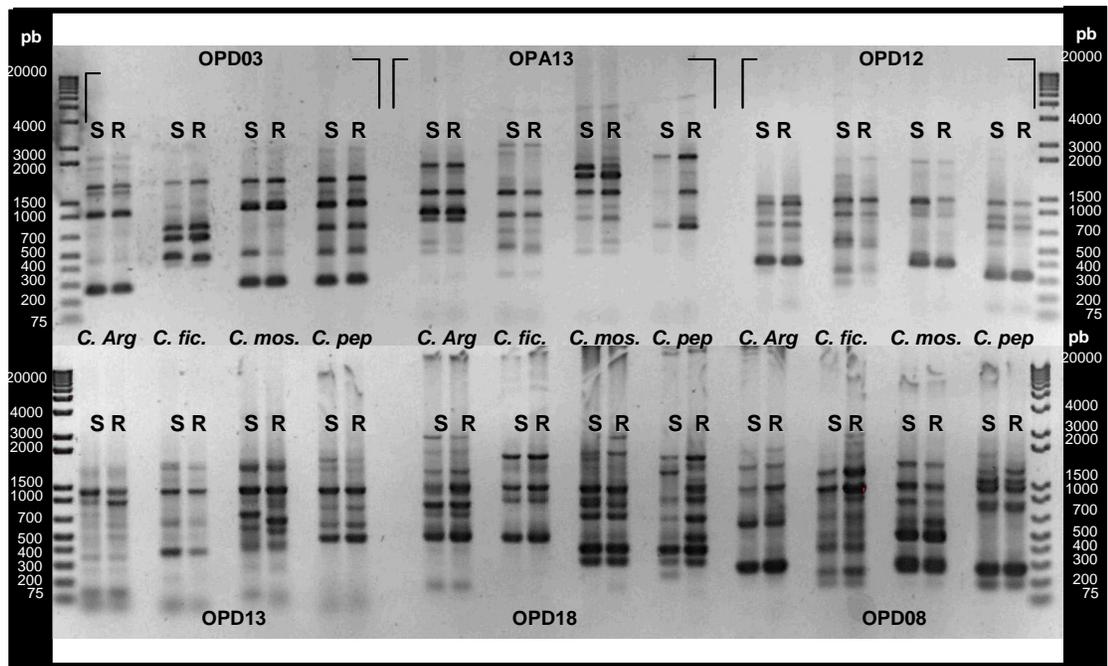


Figura 2. Gel de agarosa 1.2 % mostrando los patrones polimorficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generadas por diferentes iniciadores, evaluado en mezclas de plantas de *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. pepo*, susceptibles y resistentes a *Cucumber mosaic virus*.

En la Figura 2 se comparan los patrones de bandeo entre plantas susceptibles y resistentes. Se puede observar que coinciden con el estudio de variabilidad genética entre y dentro de poblaciones (Capítulo I). La técnica de RAPD identificó poca variabilidad genética entre variedades resistentes y susceptibles que permita diferenciarlas, lo que sugiere la existencia de mínimas diferencias dentro de cada grupo de plantas resistentes y susceptibles. Gwanama *et al.* (2006), reportan que los RAPD generan poca diferencia entre genotipos de *C. moschata*.

Cuadro 2. Marcadores asociados al Cucumber mosaic virus en tres especies de *Cucurbita* spp.

ESPECIE	INICIADOR	SECUENCIA	BANDA	P. MOLECULAR pb
<i>C. argyrosperma</i>	OPD02	5'-GGACCCAACC-3'	OPD02-6	500
<i>C. moschata</i>	OPD18	5'-GAGAGCCAAC-3'	OPD18-2	2500
<i>C. pepo</i>	OPA05	5'-AGGGGTCTTG-3'	OPA05-11	380

No se encontró un iniciador común asociado a la resistencia para las cuatro especies; sin embargo, tres iniciadores se asociaron a la resistencia en tres especies (Cuadro 2): en *C. pepo* el iniciador OPA05 (Figura 3), en *C. argyrosperma* el OPD02 (Figura 4), y *C. moschata* iniciador OPD18 (Figura 5), donde se pudo apreciar solamente una banda polimórfica distintiva entre plantas resistente y plantas susceptibles, bandas que se observaron tanto en reacción individual como en mezcla (fig. 3,4 y 5). La resistencia del germoplasma de *Cucurbita moschata* al CMV, fue reportado como resistencia monogénica y dominante (Brouwn *et al.*, 2003). Usualmente la técnica de RAPD 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).

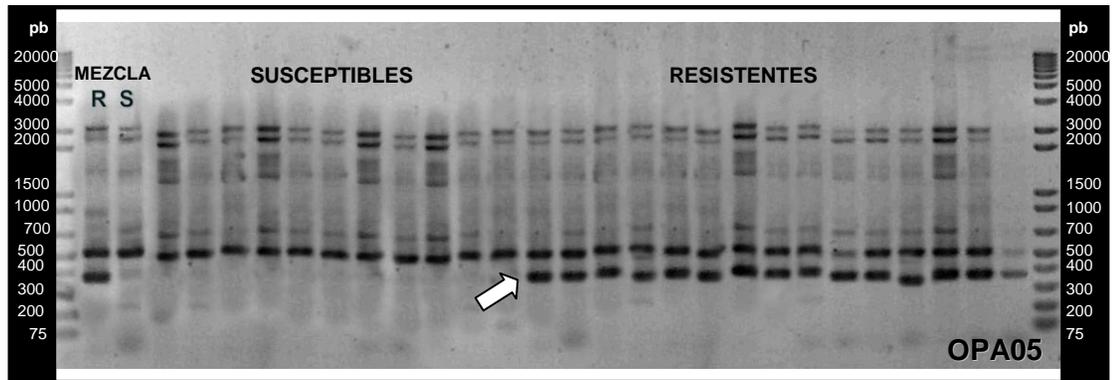


Figura 3. Gel de agarosa 1.2 % que muestra los patrones polimorficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generados por el iniciador aleatorio OPA05, evaluado en plantas de *Cucurbita pepo* resistentes y susceptibles a CMV.

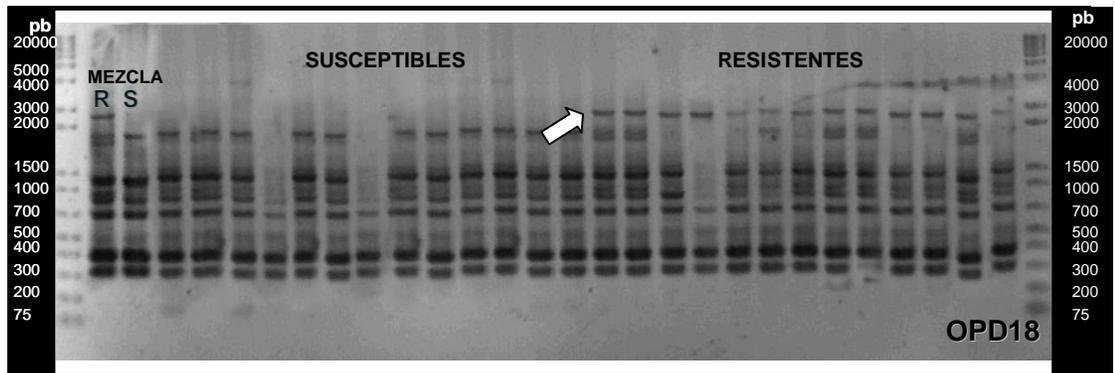


Figura 4. Gel de agarosa 1.2 % que muestran los patrones polimorficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generados por el iniciador aleatorio OPD18, evaluado en plantas de *Cucurbita moschata* resistentes y susceptibles a CMV.

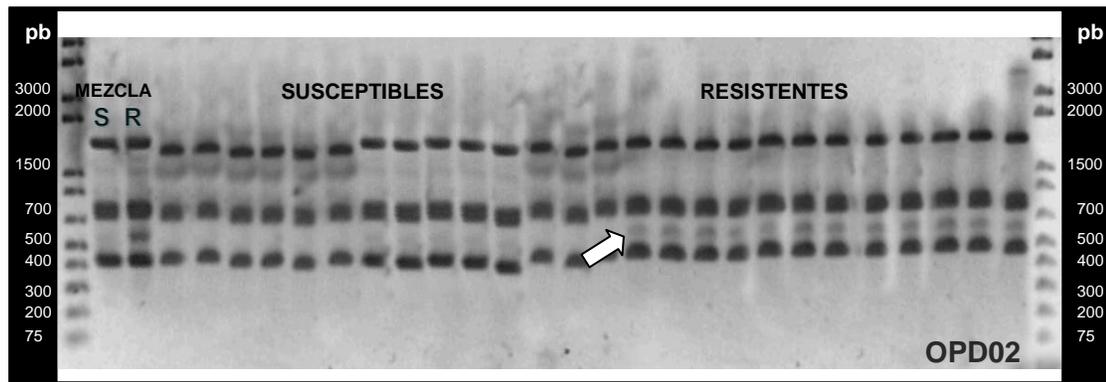


Figura 5. Gel de agarosa 1.2 % mostrando los patrones polimorficos de ADN amplificados al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPD02, evaluado en plantas de *Cucurbita argyrosperma* resistentes y susceptibles a CMV.

Las plantas de *C. pepo* resistentes a CMV, con el iniciador OPA05 presentaron en el loci OPA05-11 una banda de 380 pb, que en plantas susceptibles no se observo (Cuadro 2).

Las plantas de *C. argyrosperma* resistentes a CMV, con el iniciador OPD02, presentaron una banda de peso molecular aproximado de 500 pb, en el locus OPD02-6, ausente en las muestras de las plantas susceptibles (Cuadro 2).

Las plantas de *C. moschata* resistentes a CMV, con el iniciador OPD18, en el loci OPD18-2, presentaron una banda diferente a las plantas susceptibles, con un peso molecular de 2500 pb (Cuadro 2).

El mejoramiento genético es un proceso a largo plazo, sobre todo con el uso de las metodologías tradicionales, este tipo de trabajos son de gran utilidad para disminuir recursos y tiempo ya que pueden predecir el comportamiento de las poblaciones. Pueden aplicarse en la identificación y elección de progenitores para la creación de híbridos tanto en generaciones tempranas como avanzadas. La técnica RAPD es rápida, fácil de realizar, comparativamente barata y se aplica a diferentes organismos, y requiere solamente pequeñas cantidades de ácido nucleico (Bernardo, 1994; Balzarini, 2002).

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 acoplen y en algún momento rompan la resistencia de la planta. 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 (± 4 genes) (Apple, 2000).

CONCLUSIONES

Los materiales de calabazas cultivadas encontrados como resistentes a CMV, presentaron las siguientes características: *C. argyrosperma* presento, un decremento general en el rendimiento del número de frutos, el peso de semilla y el grosor de pulpa; *C. moschata*, presentó precocidad en la floración masculina y mostró menor rendimiento de semilla; *C. pepo*, resulto con mayor numero de días para la floración (masculina y femenina) y presento menor rendimiento en

semilla; y en *C. ficifolia*, solo se redujo en el grosor de la pulpa. Lo que permite utilizar directamente las especies o bien como fuente de genes de resistencia a CMV.

La caracterización molecular de las plantas resistentes y susceptibles, permitió asociar tres marcadores con la resistencia a CMV: iniciador OPA05 en *C. pepo*, OPD02 en *C. argyrosperma*, y OPD18 *C. moschata*.

LITERATURA CITADA

Apple J L (1978) El papel de la resistencia de planta hospedera en los sistemas de control integrado In: principios generales de control integrado de plagas y enfermedades con énfasis a maíz y soya. Universidad Nacional Agraria, Lima, Perú p 10.

Aragón L R (2005) Caracterización de materiales experimentales de calabaza (*Cucurbita spp.*) y verificación de su resistencia al Damping off. Tesis Maestría en Ciencias de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo 131p.

Balzarini M (2002) Applications of mixed models in plant breeding. In: Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding. Ed. M. S. Kang. CAB International.

Bernardo R (1994) Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. Crop Sci. 34:20-25.

Blancard D, H Lecoq, M Pitrat (1991) Enfermedades de las cucurbitáceas observar, identificar y luchar. (Ed.) Mundi Prensa, Madrid, España. 301 p.

- Broun R N, H A Bolaños, J R Myers, M M Jahn (2003)** Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* 129:253-258.
- Brunt, A A, K Crabtree, M J Dallwitz, A J Gibbs, L Watson, E J Zurcher (1996)** Plant Viruses (Eds.). Online: description and lists from the VIDE database. Versión: 16th January 1997. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid>
- Canaday C H (1991)** Biological and cultural tests for control of plant disease: an overview of 1991 reports. *Plant Dis.* 75(9):969-971.
- Cervera M T, J A García (1994)** Patogénesis de virus de plantas. In: Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A (1996) *Patología vegetal Tomo 1*(Ed.). Mundi Prensa-Phytoma, España. 77 pp.
- Conti M, D Gallitelli, V Lisa, O Lovisolo, G P Martelli, A Ragozzino, G L Rana, C Volvas (2000)** Principales virus de las plantas hortícolas. Traducido al español de J M Mateo Box. (Ed.) Mundi Prensa. España 206 p.
- De la Cruz M, F Ramirez, H Hernandez (1997)** DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:319-325.
- Franco t, L E Hidalgo (2003)** Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogénéticos. Boletín técnico número 8, Instituto Internacional de Recursos fitogénéticos (IPGRI), Cali, Colombia 89 p.
- Garzón T J A, Montes H S, Becerra F A (1993)** Fuentes de resistencia a los virus mosaico del pepino y de la sandía-2 en calabaza (*C. moschata*) en México. *Rev. Méx. Fitop.* 11:167-171.

- Gwanama C Labuschangne MT y Botha MA (2006)** Analysis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by RAPD markers. <http://www.springerlink.com/content/m42086272q173980/> revisada el 03 noviembre 2008.
- Holcomb G E, R A Valverde (1991)** Identification of a virus causing a mosaic on coleus. *Plant Dis.* 75: 1183-1185.
- Lira-Saade R (1995)** Estudios taxonómicos y eco geográficos de las cucurbitáceas latinoamericanas de importancia económica. IPGRI. Roma, Italia. 281 p.
- Michelmore R W (1995)** Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15:393-427.
- Michelmore, R W, I Paran, R V Kesseli (1991)** Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- Provvidenti R, D Gonsalves. (1984)** Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from coneccticut. New York. *Plants Disease* 68:443-446.
- Rodríguez E A (1988)** Evaluación de variedades e híbridos de calabacitas verdes, amarillas y grises en dos etapas de siembra. Sinaloa, México. SARH Publicación especial N. 13:176-185.
- Valadez L A (1990)** Producción de hortalizas (Ed.) Limusa, México, D.F. 223-233 pp.

Valadez M E, G Kahl (2005) Huellas de ADN en genomas de plantas (Teorías y protocolos de laboratorio) (Ed.) Mundi-prensa, México, D.F.

Zitter T A, D L Hopkins, C E Thomas (1996) Compendium of cucurbit diseases
The American Phytopathological Society. USA. 88p.

DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de evaluación de germoplasma de calabaza mexicana permitió establecer que las cuatro especies *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. pepo* son fuente de resistencia a virus mosaico del pepino.

En base al manejo y formación de poblaciones en la caracterización de calabazas mediante RAPD se observó que la variabilidad genética en las cuatro especies es mayor entre las especies que dentro de cada especie; esto pudiera estar determinado por la existencia de muy pocas variedades criollas y/o las variedades han evolucionado en un área geográfica restringida.

Aun cuando la variabilidad genética fue baja (14.77 % en *C. argyrosperma*, 14.09 % en *C. ficifolia*, 37.58 % en *C. moschata* y 20.81% en *C. pepo*), fue posible encontrar plantas resistentes en las cuatro especies, *C. argyrosperma* (29 %), *C. ficifolia* (64 %), *C. moschata* (28 %) y *C. pepo* (31 %), aumentando la resistencia en posteriores generaciones (S_1 y S_2), contribuido por el carácter monogénico y dominante de la resistencia reportado.

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 en algún momento venzan la resistencia de la planta.

Las reacciones a la inoculación del CMV en las plantas de calabaza en las cuatro especies fueron diferentes igual o menor al testigo, sin embargo plantas resistentes no difieren agrónomicamente con materiales de calabazas ya cultivados y evaluados por Ayala y Aragón.

La caracterización molecular de plantas resistentes a CMV mediante marcadores moleculares tipo RAPD (polimorfismos en el ADN amplificado al azar), mostró que 3 iniciadores asociaron con la resistencia a CMV, las plantas de *C. pepo* resistentes a CMV, se asociaron con la presencia del locus RAPD OPA05-11; en *C. argyrosperma* con locus OPD02-6 y *C. moschata* con locus OPD18-2 con un peso molecular de 380, 500 y 2500 pb respectivamente. La aplicación de este tipo de asociaciones puede ayudar en la identificación de progenitores resistentes de estas especies para mejoramiento genético, disminuyendo tiempo y recursos.

CONCLUSIONES GENERALES

Las cuatro especies de *Cucurbita* evaluadas en esta investigación mediante RAPD mostraron poca variabilidad genética dentro y entre especie, detectable principalmente entre las especies. Las relaciones genéticas fueron estrechas entre *C. moschata*, *C. argyrosperma* y *C. pepo*; la especie más alejada entre las cuatro fue *C. ficifolia*.

Se encontraron plantas resistentes a *Cucumber mosaic virus* (CMV) en las 4 especies de calabaza: *C. argyrosperma* (29 %), *C. ficifolia* (64 %), *C. moschata* (28 %), y *C. pepo* (31 %), en germoplasma de colectas nativas mexicanas.

Las plantas resistentes encontradas se autofecundaron y presentaron segregación (hubo plantas resistentes y susceptibles) para reacción a la inoculación artificial en generaciones S₁ y S₂, sugiriendo que la resistencia es dominante.

La evaluación agronómica de las plantas de calabaza resistentes a CMV, indicó que: *C. argyrosperma* presentó menor número de frutos, de peso de semilla y el grosor de pulpa; *C. moschata* presentó precocidad en la floración masculina y mostró menor rendimiento de semilla; *C. pepo*, resultó con mayor número de días a floración (masculina y femenina) y presentó menor rendimiento de

semilla; y en *C. ficifolia*, sólo se redujo el grosor de la pulpa; todo con respecto a las plantas testigo.

La caracterización molecular de plantas resistentes a CMV mediante marcadores tipo RAPD, mostró que 3 iniciadores se asociaron a la resistencia a CMV: *C. pepo* en el locus OPA05-11; *C. argyrosperma* en locus OPD02-6 y *C. moschata* en el locus OPD18-2, los cuales presentaban un peso molecular de 380, 500 y 2500 pb, respectivamente.

La caracterización agronómica de los genotipos de calabaza resistentes a CMV de *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. pepo*, indicó que: *C. ficifolia*, *C. moschata* y *C. pepo* por su rendimiento similar a los testigos, éstas se pueden avanzar en su número de autofecundaciones para después recombinarse dentro de especie y formar nuevas variedades resistentes a virus.