

Variabilidad de *Cucurbita maxima* en su zona de origen: un recurso de interés para la mejora de esta hortaliza

C. Esteras; A. Sifres; F. Nuez; B. Picó

Instituto para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV),
Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n, 46022, Valencia, España
(fnuez@btc.upv.es)

Palabras clave: calabazas, diversidad genética, germoplasma, AFLPs, Sudamérica

Resumen

Se ha llevado a cabo una caracterización molecular, empleando marcadores AFLP, de la diversidad genética de un conjunto de 38 entradas sudamericanas de *C. maxima*, estudiando su relación con el ancestro silvestre. Los resultados indican la existencia de distintos grados de diversidad genética en el germoplasma de esta especie recolectado en distintos países de su zona de origen y diversidad. Las entradas procedentes de Argentina son las más variables y las más parecidas al ancestro silvestre, lo que apunta a su primitivismo y/o a la ocurrencia de cruzamientos con poblaciones de la subespecie *andreana*, con las que coexiste en la actualidad. Estos resultados apoyan las suposiciones previas que señalan a Argentina como centro de origen de la especie y refuerzan la prioridad de coleccionar y conservar las entradas de este país. Sin embargo, encontramos discrepancias con referencias previas que indican una elevada diversidad genética en Bolivia y Perú. En estos países se observa una reducida diversidad, que puede ser consecuencia de la ocurrencia de un proceso de erosión genética intenso en los últimos años. Por otro lado, nuestros resultados muestran que en Ecuador todavía existe una diversidad importante de tipos, no descrita con anterioridad, que es recomendable conservar antes de que se pierdan.

INTRODUCCIÓN

Cucurbita maxima Duch. ex Lam. es una de las principales especies cultivadas del género *Cucurbita*, difundida prácticamente por todo el mundo. Tiene su origen en América del Sur, encontrándose su centro de diversidad dentro del rango de distribución de su ancestro silvestre, *C. maxima* ssp. *andreana* (Naud.) Filov que presenta poblaciones distribuidas en zonas templadas de Argentina, en las llanuras centrales de Bolivia, en Uruguay y Paraguay (Nee, 1990).

España actuó de puente entre Sudamérica y Europa en la difusión de esta hortaliza por el mundo (Decker-Walters y Walters, 2000), aunque otros tipos se llevaron directamente hasta Australia, África y Asia, donde se dio una diversificación secundaria que más tarde llegó a Europa. Durante este proceso se han generado un gran número de variedades tradicionales adaptadas a condiciones específicas y con formas distintas a las comerciales. Por el gran valor de estos cultivares y por el alto riesgo de erosión genética que presentan, los bancos de germoplasma, como el del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universidad Politécnica de Valencia, tratan de mantener colecciones cada vez más completas y mejor caracterizadas, dando especial importancia al germoplasma de la región.

Los estudios de diversidad genética en *C. maxima* se han orientado principalmente al esclarecimiento de las relaciones genéticas entre algunos cultivares con ciertas formas silvestres y con otras especies del género (Sanjur et al., 2002). Sólo algún estudio previo emplea marcadores de ADN (RAPDs, SRAPs, AFLPs y SSRs) (Katzir et al., 1996; Ferriol et al., 2003 y 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se ha llevado a cabo un estudio en profundidad del nivel de variación existente en las colecciones de germoplasma procedentes de la zona de origen, lo cual sería de enorme interés para optimizar la conservación y la utilización de la mayor diversidad genética posible en esta especie. Éste es el objetivo de este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se ha analizado la diversidad genética de un conjunto de 38 entradas de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* y ssp. *andreaana* procedentes de Sudamérica, zona de origen de la especie, y una pequeña representación de variedades tradicionales españolas pertenecientes a diferentes morfotipos (Ferriol et al., 2004). En total se han analizado, 8 entradas de Argentina, 5 de Bolivia, 12 de Ecuador, 2 de Paraguay, 8 de Perú y 3 de España. Las entradas proceden de colectas llevadas a cabo por el equipo del Banco de germoplasma del COMAV y otros bancos (Tabla 1).

Análisis molecular

Para el análisis molecular se emplearon marcadores de tipo AFLP, analizándose 5 plantas por genotipo. Las extracciones de ADN y las reacciones AFLPs se llevaron a cabo según describe Ferriol et al. (2004). Los cebadores empleados para la amplificación preselectiva fueron *EcoRI*+A y *MseI*+C, utilizándose para la selectiva 3 combinaciones de cebadores (*EcoRI*-ACC/*MseI*-CG, *EcoRI*-AAC/*MseI*-CG, *EcoRI*-AGG/*MseI*-CT) marcados con los fluoróforos FAM, NED y HEX respectivamente. Para la separación de los productos amplificados se utilizó un secuenciador automático ABI/PRISM 310 (PE Biosystems) y se visualizaron los fragmentos mediante el programa de análisis GeneScan (v.3.1.2) y Genographer (v.1.6.0).

Análisis estadístico

Se obtuvo la matriz de 1-0 (presencia-ausencia), a partir de la que se estimó el coeficiente de similitud de Dice (1945), $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$, donde S_{ij} es la similitud entre dos individuos i y j , a es el número de bandas compartidas, b y c es el número de bandas amplificadas exclusivamente en i y j , respectivamente. Con las matrices de similitud se realizó un análisis de coordenadas principales (ACP) (NTSYSpc v.2.02). Para poder establecer la relación entre las entradas, tomando cada una de ellas como una población, y teniendo en cuenta la variabilidad dentro de entrada se calculó el coeficiente de distancia de Nei (1978) obteniéndose el dendrograma correspondiente (método UPGMA) (Popgene 1.32). Los datos moleculares obtenidos con los marcadores AFLP sirvieron también para calcular la diversidad genética de Nei (1973), $D_k = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del i -ésimo alelo en un *locus* k . Se calculó la diversidad genética media para cada una de las entradas, para cada país y para el total (Popgene 1.32).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El grado de polimorfismo encontrado con marcadores AFLP en *C. maxima* fue bajo. De los 81 fragmentos AFLP amplificados, 51 resultaron polimórficos (62,9%). Este

nivel de polimorfismo es menor que el descrito para otras especies cultivadas del género, como *C. moschata* y *C. pepo*.

Como se observa en el ACP (Fig. 1) las dos entradas pertenecientes a la ssp *andreana* se separan del resto atendiendo a la 1ª coordenada, que explica un 13.63% de la variación. En la zona intermedia (con respecto a la primera y a la segunda coordenada) se agrupan tres entradas de origen argentino, que son las más similares a la subespecie *andreana* molecularmente y también morfológicamente, pues presentan algunas características primitivas, como son reducido tamaño del fruto y semillas claras con poco margen. El resto de entradas procedentes de Argentina aparecen entremezcladas junto con entradas de otros países, hecho que también viene reflejado en el dendrograma de la Fig. 2. La mayor variabilidad encontrada entre y dentro de entradas en este país (Tabla 1) y su similitud a diferentes entradas de otros países, junto con su mayor primitivismo, apoyan las suposiciones previas que señalan a Argentina como centro de origen de *C. maxima* (Sanjur et al., 2002). Las 2 entradas de Paraguay aparecen cercanas a las argentinas en el ACP, pero no se aproximan tanto a la ssp. *andreana* como las primeras, entremezclándose con algunas de Perú, Ecuador o Bolivia.

De Bolivia destaca la menor diversidad encontrada (Tabla 1), pues había sido descrito como uno de los países prioritarios para la recolección de *C. maxima* por la supuesta variabilidad existente. A excepción de dos cultivares tradicionales, el resto muestra características de cultivares modernos, tales como fruto grande y semillas más oscuras. Estos resultados pueden ser consecuencia de la ocurrencia de un proceso de erosión genética en las zonas analizadas, aunque para determinar la intensidad y extensión de este proceso haría falta analizar un mayor número de entradas de este país.

En Ecuador se encuentra un mayor nivel de variación (Tabla 1) a pesar de encontrarse fuera del rango de distribución natural del ancestro silvestre. En este país se da un mayor intercambio comercial de cultivares que en Bolivia o Perú, lo que puede haber incrementado la diversidad. Se observa también una mayor similitud de las entradas ecuatorianas, en comparación con las entradas de Bolivia y Perú, con la subespecie *andreana*, aunque no presentan características primitivas. En cualquier caso, sería adecuado priorizar las colectas de esta especie en esta zona, debido a la variabilidad de tipos encontrada.

Las entradas de Perú se agrupan entre las bolivianas y las ecuatorianas respecto a la segunda coordenada, diferenciándose las colectadas en el norte de las del sur (mayor grado de polimorfismo y diversidad genética en las primeras). En ambos casos presentan características modernas.

Los controles españoles, pertenecientes a distintos tipos morfológicos, aparecen entremezclados con las entradas menos variables de Perú y Ecuador. Esto parece indicar que durante la exportación de estos tipos a Europa ocurrió un cuello de botella y que los tipos traídos podrían proceder de estos países.

El análisis realizado ha proporcionado una información de interés sobre la variación de los recursos genéticos de *C. maxima* en la zona de origen y diversidad de la especie. Esta información será de utilidad para optimizar las estrategias de recolección y conservación del germoplasma de esta especie en Sudamérica y para el establecimiento de colecciones nucleares.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos INIA RF03-003 y RF2004-00003-00-00.

Agradecemos a los bancos de germoplasma del COMAV de la UPV, NPGS de EE.UU e IPK de Alemania el material cedido.

Referencias

- Decker-Walters, D.S. and Walters, T.W. 2000. Squash. En: Kiple, K.F. y Ornelas, K.C. (eds.). The Cambridge world history of food. Cambridge University Press 1: 335-351.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 26: 297-302.
- Ferriol, M., Picó, B. y Nuez, F. 2003. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. Gen. Res. Crop Evol. 50: 227-238.
- Ferriol, M., Picó, B. y Nuez, F. 2004. Morphological and Molecular Diversity of a Collection of *Cucurbita maxima* Landraces. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129 (1): 60-69.
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U. and Cregan, P.B. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. Theor. Appl. Genet. 93: 1282-1290.
- Nee, M. 1990. The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). Econ. Bot.: 44 (3 suppl.): 56-68.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89: 583-590.
- Sanjur, O.I., Piperno, D.R., Andres, T.C. and Wessel-Beaver, L. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 435-540.

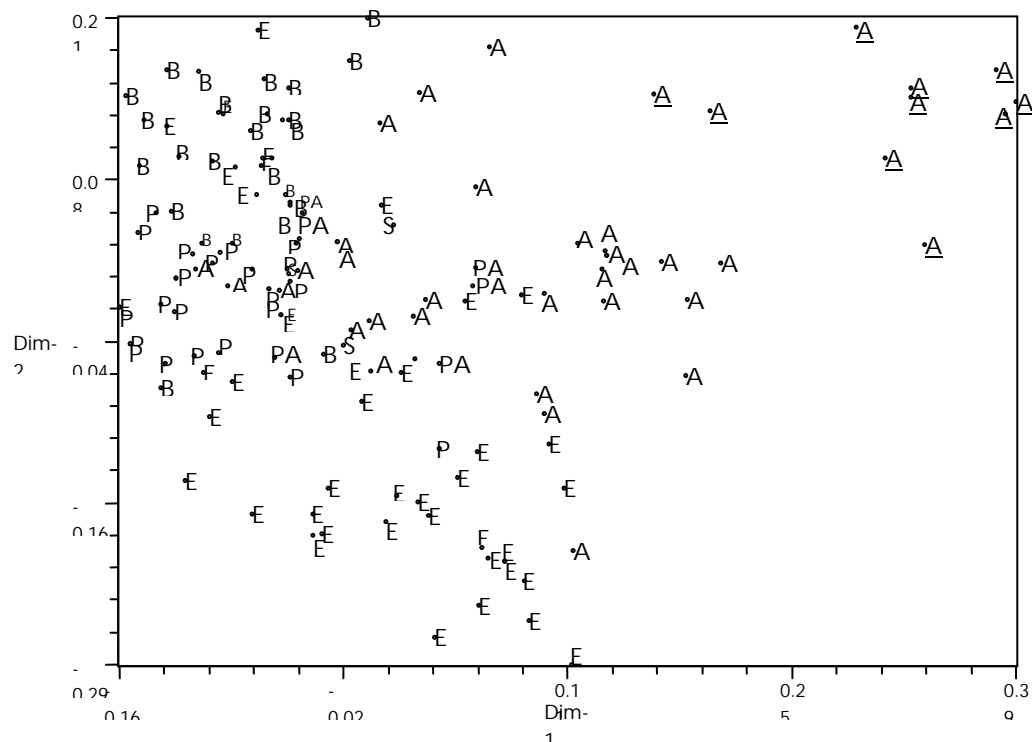


Fig. 1. Análisis de Coordenadas Principales realizado a partir de los marcadores AFLP donde se muestra la distribución de todas las entradas de *C. maxima* analizadas en este estudio. Distribución de las entradas con respecto a las coordenadas 1 (explica el 13.63% de la variación existente) y 2 (11.63%). Las entradas se representan con la letra correspondiente al país (A: Argentina, B: Bolivia, E: Ecuador, P: Perú, PA: Paraguay, S España). Subrayadas aparecen las plantas de las dos entradas pertenecientes a la subespecie *andreana*.

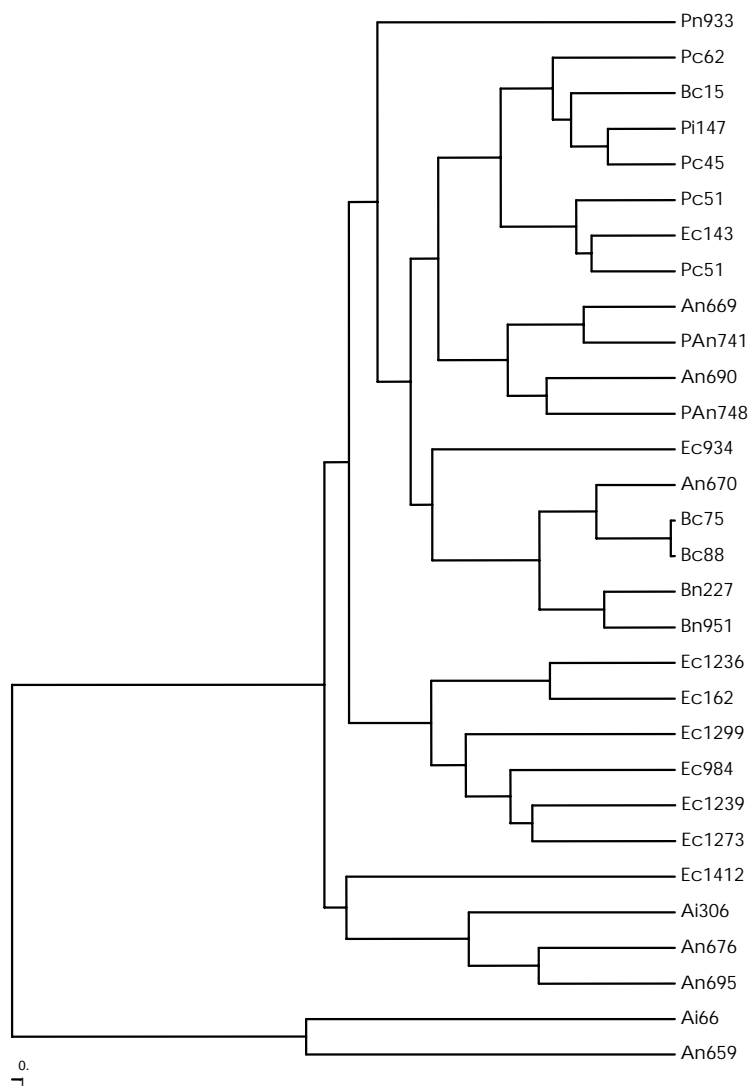


Fig. 2. Dendrograma obtenido utilizando cada entrada como una población, empleando la distancia genética de Nei (1978) y el método UPGMA a partir de las tres combinaciones AFLP empleadas, para las entradas sudamericanas. Se puede ver cómo las dos entradas pertenecientes a la subespecie *andrea* se agrupan en un cluster diferente al resto.

Tabla 1. Diversidad genética de Nei (1973) y error estándar de las entradas analizadas en este estudio con 3 combinaciones de marcadores AFLP.

Argentina		Bolivia		Ecuador		Perú	
Ai306 ¹ (MAX306/98) ²	0,0917± 0,0201	Bc15(BOL15)	0,0316± 0,0117	Ec1236 (ECU1236)	0,0384± 0,0141	Pc620 (ECU620)	0,0256± 0,0111
An669 (PI458669)	0,0278± 0,0105	Bc75 (BOL75)	0,0429± 0,0145	Ec1239 (ECU1239)	0,0484± 0,0153	Pi147 (MAX147/89)	0,0157± 0,0092
An670 (PI458670)	0,0687± 0,0169	Bc88 (BOL88)	0,0293± 0,0121	Ec1273 (ECU1273)	0,0474± 0,0150	Pc459 (PER459)	0,0671± 0,0163
An676 (PI458676)	0,0193± 0,0097	Bn227 (PI543227)	0,0438± 0,0146	Ec1299 (ECU1299)	0,0499± 0,0153	Pc515 (PER515)	0,0431± 0,0147
An690 (PI458690)	0,0231± 0,0100	Bn951 (PI560951)	0,0698± 0,0180	Ec1412 (ECU1412)	0,0844± 0,0197	Pc517 (PER517)	0,0226± 0,0107
An695 (PI458695)	0,0955± 0,0216			Ec143 (ECU143)	0,0416± 0,0140	Pn933 (PI470933)	0,0189± 0,0098
Ai66 (MAX66/95)	0,0235± 0,0096			Ec162 (ECU162)	0,0255± 0,0114		
An659 (PI458659)	0,1303± 0,0239			Ec934 (ECU934)	0,0431± 0,0210		
				Ec984 (ECU984)	0,0312± 0,0120		
Total Argentina ³	0,1059± 0,0176	Total Bolivia	0,0658± 0,0143	Total Ecuador	0,1070± 0,0178	Total Perú	0,0670± 0,0150
GENERAL				0,1222±0,0164			

¹ La primera letra corresponde al país (A: Argentina, B: Bolivia, E: Ecuador, P: Perú) y la segunda al banco de germoplasma donante (c: COMAV, n: NPGS, i: IPK).

² Códigos originales de los correspondientes bancos.

³ En el total de Argentina no se incluyen Ai66 y An659 (ssp. *andreana*).