



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Cucurbita* L. (CUCURBITACEAE)
USANDO SECUENCIAS DE CLOROPLASTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

LESLIE MARIEL PAREDES TORRES



DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto CONABIO KE 004, Diversidad genética de las especies de *Cucurbita* en México e hibridación entre plantas genéticamente modificadas y especies silvestres de *Cucurbita*, responsable Dr. Rafael Lira Saade, corresponsables Dr. Salvador Montes Hernández y Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, y al Proyecto CONACYT Investigación Científica Básica CB2011/ 167826 Genómica de poblaciones: estudios en el maíz silvestre, el teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mexicana*), cuyo responsable es el Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, por el apoyo económico brindado para realizar este trabajo de investigación.

A mi asesor el Dr. Luis E. Eguiarte y a la Dra. Valeria Souza por su apoyo y por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. A mis sinodales, Dr. Rafael Lira Saade, Dr. Oswaldo Téllez Valdés, Dra. Erika Aguirre Planter y Dra. Norma Rodríguez Arévalo, por todas sus observaciones que hicieron este trabajo mejor.

A el Herbario Nacional de México (MEXU) del Instituto de Biología y al Dr. David Sebastian Gernandt, Jefe del Herbario, por su atención y por permitirme tomar muestras de ejemplares de herbario. Al Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Celaya, por las accesiones de semillas proporcionadas.

Al Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Departamento de Ecología Evolutiva del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme un espacio y los materiales para realizar mi trabajo experimental y computacional. A los técnicos del laboratorio la Dra. Erika Aguirre Planter y Dra. Laura Espinosa Asuar por su ayuda y asesoramiento técnico y logístico, y al M. V. Z. Manuel Rosas por su amistad y el gran apoyo brindado en las salidas al campo. A la señora Silvia Barrientos por su ayuda técnica y a todos

mis compañeros del laboratorio por los ratos agradables que hicieron de ésta una gran experiencia. Especialmente al “Team Calabaza” por su amistad y todo su apoyo tanto moral como profesional. A la Biól. Helena Hernández, por su amistad y por enseñarme a trabajar en el laboratorio. Al M. en C. Guillermo Sánchez, por todos sus consejos y comentarios. A la Dra. Gabriela Castellanos por siempre estar para apoyarme con cualquier duda que surgió. Al Biól. Josué Barrera por toda su ayuda brindada. A las “Calabacitas Tiernas” Paulina Hernández y Karen Mondragón por su amistad y apoyo incondicional.

A toda mi familia, tios, primos y a mi abuela, por procurarme, hacerme sentir como en casa y brindarme siempre su ayuda.

A mis padres y a mis hermanas, por que son lo más importante que tengo en mi vida, por apoyarme en todo lo que se me ocurre, por estar conmigo durante todo este largo y difícil camino, porque a pesar de estar físicamente lejos siempre estuvieron a mi lado, los amo.

A mis amigos, por todas las locuras y momentos inolvidables, gracias a ellos este camino fue mucho más fácil de recorrer.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
FILOGENIAS MOLECULARES	3
GÉNERO <i>CUCURBITA</i>	8
ESTUDIOS FILOGENÉTICOS CON <i>CUCURBITA</i>	18
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVO	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	22
EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN	23
ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO	26
ESTIMACIÓN DE LOS TIEMPOS DE DIVERGENCIA	28
MITOCONDRIA	31
RESULTADOS	32
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	33
TIEMPOS DE DIVERGENCIA Y TASAS DE SUSTITUCIÓN MOLECULAR	39
MITOCONDRIA	46
DISCUSIÓN	47
RELACIONES FILOGENÉTICAS Y TIEMPOS DE DIVERGENCIA	49
TASAS DE SUSTITUCIÓN MOLECULAR Y DIVERSIFICACIÓN	55
MITOCONDRIA	58
CONCLUSIONES	61
PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	64
ANEXOS	76

RESUMEN: Dentro del género *Cucurbita* se encuentran especies de plantas comúnmente conocidas como “calabazas”. El género comprende alrededor de 20 taxa de los cuales, 15 se encuentran en México y cinco han sido domesticados, siendo estos últimos de gran importancia económica y culinaria para el país y el mundo. El objetivo de este trabajo fue estudiar las relaciones filogenéticas del género *Cucurbita* y estimar las fechas de divergencia y las tasas de sustitución molecular de sus especies. Para esto, se amplificaron y secuenciaron seis fragmentos de cloroplasto (*atpI-atpH*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *rpl20-rps12*, *matK* y *rbcl*) de 20 taxa del género. Se determinó el modelo de mutación de cada región y se generaron inferencias filogenéticas utilizando métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Las estimaciones de las fechas de divergencia y las tasas de sustitución molecular se realizaron mediante métodos bayesianos con un modelo de reloj molecular relajado. Se obtuvo una filogenia del género *Cucurbita* mejor resuelta que las reportadas previamente, con una clara definición de los grupos y altos valores de soporte de ramas. *C. lundelliana* es parte del grupo Okeechobeensis y *C. moschata* del grupo Argyrosperma, mientras que *C. ficifolia* no se afilió a algún grupo. Dentro del grupo Pepo se diferenciaron las subespecies mexicanas (subespecies *pepo* y *fraterna*) de los taxa de Estados Unidos (subespecie *ovifera*, variedades *texana* y *ozarkana*). Por otro lado, el análisis de las fechas de divergencia indicó un origen de 9.6 Ma (7.6-11.89 HPD 95%) para el género, comenzando a diversificarse en las especies que conocemos actualmente entre 1.75 Ma (0.73-3.1 HPD 95%) y 0.28 Ma (0.03-0.72 HPD 95%) aproximadamente, siendo el grupo Okeechobeensis el más reciente. La tasa de sustitución molecular del género *Cucurbita* fue de 0.0007 (sustituciones/sitio/millón de años) siendo *C. moschata* la especie con una mayor tasa de sustitución molecular (0.0018 sustituciones/sitio/millón de años). El género presento una tasa de diversificación de 0.364 spp/millón de años, posiblemente

relacionado a los eventos durante el pleistoceno y a su relación con sus polinizadores.

ABSTRACT: Within the genus *Cucurbita*, there are plant species commonly known as "pumpkins". The genus comprises about 20 taxa of which 15 are distributed in Mexico and five have been domesticated, being of great economic and culinary importance for the country and the world. The aim of this work was to study the phylogenetic relationships of the genus *Cucurbita* and to estimate divergence dates and rates of molecular substitution for each species. For this, we amplified and sequenced chloroplast fragments (*atpI-atpH*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *rpl20-rps12*, *matK* and *rbcL*) from 20 taxa of the genus. The mutation model of each region was determined and phylogenetic inferences were generated using Maximum Likelihood and Bayesian Inference methods. Estimates of divergence dates and rates of molecular substitution were performed using Bayesian methods with a relaxed molecular clock model. We obtained a better resolved phylogeny of the genus *Cucurbita* better resolved than previously reported, with a clear definition of the groups and high values of branch support. *C. lundelliana* formed part of the group Okeechobeensis and *C. moschata* of the group Argyrosperma, while *C. ficifolia* did not join any group. Within the Pepo group, Mexican subspecies (*pepo* and *fraterna*) were differentiated from the US taxa (subspecies *ovifera* and varieties *texana* and *ozarkana*). On the other hand, analysis of dates of divergence indicated an origin of 9.6 My (7.6-11.89 HPD 95%) for the genus, with diversification of current known species from approximately 1.75 My (0.73-3.1 HPD 95%) to 0.28 My (0.03 to 0.72 95% HPD), being the group Okeechobeensis the most recent. The molecular substitution rate of the genus *Cucurbita* was 0.0007 (substitutions / site / million years) and the species *C. moschata* showed the

highest rate of molecular substitution (0.0018 substitutions / site / million years). The genus has a diversification rate of 0.364 spp/ million years, possibly related to events during the Pleistocene and their relationship with their pollinators.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la teoría de la evolución, todos los organismos proviene de un ancestro común y por medio de diferentes mecanismos evolutivos como son la selección natural, mutación, deriva génica, endogamia y flujo genético, las poblaciones van cambiando sus niveles de variación genética, dando como resultado la biodiversidad que existe hoy en día (Lemey *et al.*, 2009).

Sin embargo, es difícil determinar el momento exacto de cuando se forma una especie nueva y en ocasiones diferenciar una de otra más allá de sus características morfológicas. Mayr en 1969 propuso el concepto biológico de especie como “un grupo de poblaciones que se pueden cruzar real o potencialmente y que en la naturaleza están aisladas de todos los otros grupos”, aunque este concepto no incluye a los organismos híbridos o a los procariontes que no poseen reproducción sexual. Por lo que, desde el punto de vista de la filogenética, una especie está formada por aquellos organismos que son monofiléticos y comparten una o más características únicas derivadas y por lo tanto, las especies tienen un conjunto de genes distintos, diferente morfología, fisiología y adaptación al nicho ecológico de las otras especies (Klug *et al.*, 2006).

Para investigar la evolución y la relación entre genes y organismos se utilizan diferentes tipos de datos y análisis. Una manera clásica de estimar las relaciones entre especies es comparando caracteres morfológicos. Sin embargo, en la actualidad se está utilizando cada vez más información molecular (secuencias nucleotídicas y de aminoácidos) para inferir las relaciones filogenéticas (Lemey *et al.*, 2009).

La invención de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la década de 1980 colocó al ADN como la fuente más importante de datos moleculares en estudios superiores al nivel de la especie. Debido a que los caracteres tradicionales son determinados por los genes, el uso de secuencias de ADN se puede considerar una manera más directa de observar diferencias heredables entre especies (Gernandt *et al.*, 2007; Rodríguez, 2013).

Las regiones variables o regiones no codificadoras (espaciadoras, intrones) son útiles para resolver parentescos cercanos (géneros, especies, variedades), utilizándose el genoma nuclear, el mitocondrial y, en su caso, el cloroplasto (Moreno, 2005).

El genoma del cloroplasto ha sido utilizado con frecuencia en estudios filogenéticos de plantas (Chase *et al.*, 1993; Eguiarte, 1995), ya que tiene la ventaja de poseer un alto número de copias, haciendo fácil la amplificación por PCR, incluso en muestras de ADN degradadas (Schaal *et al.*, 1998).

Así mismo, las tasas de evolución indican que los genes del cloroplasto pueden ayudar a establecer relaciones entre familias y a veces entre géneros (Chase *et al.*, 1993; Eguiarte, 1995). Debido a que se ha estimado que para sustituciones sinónimas (cambios en la secuencia de ADN que no modifican los aminoácidos), los genes del cloroplasto cambian entre 2 y 3 veces más rápido en comparación con la mitocondria, mientras que los genes nucleares entre 10 y 15 veces más rápido. En cuanto a las sustituciones no sinónimas (cambios en la secuencia de ADN que sí modifican los aminoácidos) casi no hay diferencias entre mitocondria y cloroplasto, y es sólo un poco más rápida en el núcleo (Wolfe *et al.*, 1987).

Por otro lado, se debe considerar que el genoma de cloroplasto sólo representa la historia del linaje materno. Sin embargo, la falta de recombinación

facilita los análisis moleculares, ya que los alelos sólo pueden ser generados por mutación y es posible reconstruir su genealogía, debido a que un alelo no va a surgir de otros alelos por eventos de recombinación, como sucede con los genes nucleares (Eguiarte *et al.*, 2003).

FILOGENIAS MOLECULARES

La filogenia es el estudio de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos. En los últimos años, al desarrollarse nuevos métodos experimentales ha surgido el estudio de la filogenia con métodos moleculares, es decir, el estudio de las relaciones filogenéticas basado en las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos.

El criterio general para investigar las relaciones filogenéticas son las homologías. Una homología es una característica familiar, propia del grupo, que no depende de las condiciones ambientales o del desarrollo y diversificación de una rama, sino que se mantiene inalterable en la línea desde su aparición (Meléndez *et al.*, 1997).

La obtención de filogenias moleculares se basa en la selección, amplificación y secuenciación de regiones de ADN nuclear, de cloroplasto (en plantas) y mitocondrial (de uso frecuente en animales y esporádico en algunas familias de plantas), las cuales son revisadas y alineadas en función de sus homologías y posteriormente analizadas bajo los supuestos de los distintos métodos de reconstrucción filogenética. El resultado del análisis de dichas secuencias bajo los distintos métodos de inferencia, es uno o más árboles de genes que representan las relaciones evolutivas de las muestras analizadas. A partir de estos árboles, si el muestreo taxonómico y de regiones ha sido

adecuado, se pueden realizar inferencias sobre las relaciones evolutivas de las especies (Valcárcel, s.f.).

Métodos de inferencia filogenética

Los métodos para reconstruir árboles filogenéticos basados en datos moleculares pueden agruparse de acuerdo al tipo de datos que estos utilicen (Tabla 1).

Existen dos tipos principales de métodos de reconstrucción filogenética: 1) los que utilizan distancias genéticas, siendo el método *Neighbor-joining* (NJ) de los más conocidos. Estos asumen que todas las secuencias cambian con la misma tasa evolutiva (por lo que se consideran métodos no muy fiables) generando matrices de distancia; y 2) los basados en caracteres, como los métodos de máxima parsimonia (MP), de máxima verosimilitud (MV) (en inglés, *Maximum Likelihood*) y de inferencia Bayesiana (IB). Dentro de los métodos basados en caracteres, MV e IB (a diferencia de MP) son métodos probabilísticos que tratan la inferencia filogenética como un problema estadístico, y utilizan modelos explícitos de evolución molecular para el cálculo de probabilidades (Swofford *et al.*, 1992; Lemey *et al.*, 2009).

- **Máxima Parsimonia (MP):** tiene como objetivo encontrar la topología de árbol para un conjunto de secuencias alineadas que se puede explicar con el menor número de cambios de carácter (substituciones). Para una topología particular, el algoritmo de MP infiere, para cada posición de cada secuencia, el número mínimo de cambios de carácter requeridos a lo largo de sus ramas para explicar los estados observados en los nodos terminales. La suma de esta puntuación, para todas las posiciones, se llama la longitud de parsimonia

de un árbol y ésta se calcula para diferentes topologías de árboles. Cuando se han evaluado un número razonable de topologías, el árbol que requiere el mínimo número de cambios se selecciona como el árbol de máxima parsimonia. Sin embargo, MP asume que un carácter común es directamente heredado de un ancestro común y eso sobreestima la divergencia real de los taxa relacionados (Lemey *et al.*, 2009).

- **Máxima Verosimilitud (MV):** El principio de MV se define como la probabilidad de que un modelo de evolución dado (de nucleótidos, codones o aminoácidos) y una historia evolutiva hipotética (el árbol) hayan dado lugar a los datos observados (alineamiento de secuencias). El árbol de MV es aquél que tiene la mayor probabilidad de haber generado los datos observados, y por tanto se prefiere como hipótesis filogenética, es decir, será aquél que tiene el mayor valor de verosimilitud (menor $\ln L$) entre todos los árboles evaluados durante la búsqueda heurística (Felsenstein, 1981; Swofford *et al.* 1992; Lemey *et al.*, 2009).
- **Inferencia Bayesiana (IB):** La inferencia Bayesiana (IB) se basa en el cálculo de la probabilidad posterior de un árbol, esto es, la probabilidad de que dicho árbol sea correcto de acuerdo a los datos y un modelo evolutivo. La probabilidad posterior se calcula mediante el teorema de Bayes, según el cual la probabilidad posterior de un árbol, es proporcional a su probabilidad previa, multiplicada por su verosimilitud (o probabilidad de los datos dados, un árbol y modelo evolutivo). Para estos análisis, dado que no hay una solución exacta, se utilizan algoritmos MCMC (Markov Chain Monte Carlo) con lo cual se obtiene una aproximación de la distribución de la probabilidad posterior. La

aproximación de la probabilidad posterior será más exacta cuantas más generaciones se evalúen en la cadena de MCMC. Durante las generaciones iniciales de las cadenas MCMC, los árboles suelen tener una probabilidad posterior baja, esto se conoce como la fase de *burn-in* o calentamiento. Para la estimación del árbol final es necesario descartar los árboles del *burn-in* (generalmente el 25% de los árboles generados) y el resto de árboles con probabilidad posterior elevada se resumen mediante un árbol consenso de mayoría (Hastings, 1970; Ronquist *et al.*, 2009; Lemey *et al.* 2009).

Los métodos de Máxima verosimilitud e Inferencia Bayesiana, por lo general son los más utilizados para resolver filogenias moleculares, debido a sus soporte estadístico ya que ayudan en la evaluación de la fiabilidad de la topología generada (Lemey *et al.* 2009), por lo que en este trabajo son ocupados ambos métodos.

TABLA 1. Clasificación de los métodos de análisis filogenéticos y sus estrategias.

Tomado de Lemey *et al.* (2009).

	Criterio óptimo	Agrupamiento
Basados en Carácter	Máxima Parsimonia (MP)	
	Máxima Verosimilitud (ML)	
	Inferencia Bayesiana (IB)	
Matriz de Distancias	Fitch-Margoliash	UPGMA
		Neighbor-joining (NJ)

Reloj Molecular

Entre 1962 y 1965, antes de que Kimura postulara la teoría neutral de la evolución (1968), Zuckerkandl y Pauling publicaron dos artículos fundamentales sobre las tasas evolutivas de las proteínas. Ellos observaron que la distancia genética entre dos secuencias que codificaban para la misma proteína, pero de dos especies diferentes, se incrementaba linealmente con el tiempo de divergencia entre las dos especies, esto mismo lo observaron para otras proteínas. Por lo anterior Zuckerkandl y Pauling, propusieron que la tasa evolutiva para cualquier proteína es relativamente constante a través del tiempo (Lemey *et al.*, 2009). Asumiendo esto, las diferencias entre secuencias de aminoácidos y nucleótidos de dos especies, puede servir como reloj molecular, indicando el tiempo desde que esas dos especies divergieron de un ancestro común. Según Kimura (1968), la idea de reloj molecular es consistente con la teoría neutral de la evolución, ya que las tasas de sustitución son iguales a las tasas de mutación (μ) de un locus y éstas son constantes a través del tiempo, así el tiempo esperado entre sustituciones neutras es $1/\mu$ (Hedrick, 2011). Por lo que si dos taxa comparten un ancestro común, entonces estas deben de haber acumulado más o menos el mismo número de sustituciones durante un tiempo t (Lemey *et al.*, 2009).

La hipótesis del reloj molecular proporciona una valiosa herramienta para la construcción de escalas de tiempo evolutivas, y ha servido como un modelo nulo para estudios evolutivos y de tasas de mutación en diferentes especies. Así mismo ha proporcionado un marco para la estimación de los tiempos de divergencia de las poblaciones y especies, la diversificación de las familias de genes y el origen de la variación en las secuencias de ADN (Kumar, 2003).

Tasas de diversificación

La reconstrucción de filogenias, además de permitir conocer la relación de parentesco que existe entre los seres vivos, también son utilizadas para estudiar los procesos evolutivos involucrados en la generación de la biodiversidad actual, es decir, la diversificación, el tempo y el modo de la aparición de las distintas ramas en un árbol filogenético. El análisis de la manera en que un árbol filogenético ha ramificado es crucial para entender los mecanismos que han hecho posible la generación de los distintos linajes de un grupo a lo largo del tiempo (Barraclough y Nee, 2001; Ricklefs, 2007). Por lo que, a partir de una filogenia datada, es posible estimar la tasa de diversificación, la velocidad a la que se han generado especies por unidad de tiempo en un grupo taxonómico determinado. Estas tasas pueden ser extraordinariamente diferentes en distintos grupos, fruto de sus distintas dinámicas evolutivas y ecológicas (Castresana, 2010).

GÉNERO *CUCURBITA*

El género *Cucurbita* pertenece al orden Cucurbitales, a la familia Cucurbitaceae, subfamilia Cucurbitoideae, y a la tribu Cucurbiteae (Jeffrey, 1990). Dentro de la familia Cucurbitaceae se agrupan 800 especies y 130 géneros. Algunas de estas especies son de gran importancia económica, tal es el caso de la calabaza (*Cucurbita pepo*), el melón (*Cucumis melo*), la sandía (*Citrullus lanatus*), el pepino (*Cucumis sativus*), así mismo géneros también importantes como *Sechium* (chayote), *Luffa* (utilizada como esponja) y *Lagenaria* (calabaza de peregrino) (Kocyan *et al.*, 2007).

Dentro del género *Cucurbita*, se encuentran especies de plantas comúnmente conocidas con los nombres de "calabazas", "zapallos" o mediante numerosos nombres en lenguas indígenas. En los países anglosajones se les denomina "squashes", "pumpkins" o "gourds". Actualmente se reconocen como estrictamente americanas, pues todos los miembros de este género crecen espontáneamente o fueron domesticados en América (Lira *et al.*, 1995; Sanjur *et al.*, 2002).

Las plantas silvestres y domesticadas de *Cucurbita* son plantas anuales o perennes, monoicas, rastreras a trepadoras (subarbusculares en algunos cultivares comerciales). Sus flores son gamopétalas con corolas tubulares-campanuladas y muy vistosas, de color amarillo pálido a amarillo-anaranjado brillante. Las flores masculinas o estaminadas tienen estambres estructurados a manera de una columna, con filamentos libres o más o menos coherentes y anteras soldadas formando una estructura cilíndrica o angostamente piramidal. Las flores femeninas o pistiladas tienen ovario ínfero con numerosos óvulos en posición horizontal, estilos fusionados casi en toda su longitud o sólo cortamente libres en el ápice, estigmas grandes, carnosos y más o menos hendidos o lobulados. Las flores son polinizadas por especies de abejas solitarias de los géneros *Peponapis* y *Xenoglossa* (Hurd *et al.*, 1971; Lira *et al.*, 2009)

Los frutos de las especies del género *Cucurbita* son del tipo pepo y en las plantas domesticadas se producen en una gran diversidad de formas, tamaños, colores, tipos de superficies etc., mientras que en las plantas silvestres son relativamente uniformes en cuanto a su forma (globosos, ovoides o raramente piriformes), superficie (generalmente lisa o sin ornamentaciones), coloración (blancos, amarillentos o verdes con o sin manchas y/o franjas) y de tamaño comparativamente pequeño (Nee, 1990). Todas las especies de *Cucurbita* tienen

20 pares de cromosomas, y se ha propuesto que el género es un antiguo tetraploide (Whitaker y Bemis, 1965; Lira *et al.*, 2009).

El uso más importante al que se han destinado las plantas domesticadas de *Cucurbita* es el alimenticio, no sólo en Latinoamérica, sino también en muchas otras regiones del mundo. Los frutos (inmaduros y/o maduros) y las semillas de estas plantas, son las partes más comúnmente empleadas con este propósito, mientras que las flores (generalmente las estaminadas o masculinas) y las partes tiernas de los tallos (conocidas en varios países como "puntas de las guías") se utilizan en menor escala (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Este género comprende 20 taxa, de los cuales 15 se encuentran en México (Tabla 2). Por las características ecológicas de sus hábitats y por la duración de su ciclo de vida, tradicionalmente han sido divididas en dos grandes grupos: las especies xerofíticas, con raíces tuberiformes perennes de almacenamiento; y las especies de hábitats más o menos mesofíticos, anuales o perennes de vida corta, pero cuyas raíces son fibrosas. Dentro de este último grupo se incluyen cinco taxa de plantas domesticadas (*C. argyrosperma* Huber *ssp. argyrosperma*, *C. ficifolia* Bouché, *C. maxima* Duch. ex Lam. *ssp. maxima*, *C. moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poir. y *C. pepo* L. *ssp. pepo*), cuya variación morfológica, principalmente a nivel de los frutos y las semillas es extraordinaria (Anexo 1) (Whitaker y Bemis, 1965; Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

TABLA 2. Grupos y taxa del género *Cucurbita* propuestos por Lira *et al.* (1995).

En negritas los taxa domesticados, con un asterisco a los taxa perennes y en color rojo a aquellos que no están presentes en México. La adición de *C. ecuadorensis* al grupo Maxima ha sido recientemente sugerida por Sanjur *et al.* (2002).

GRUPO	TAXA
Grupo Argyrosperma	<i>C. argyrosperma</i> Huber ssp. <i>argyrosperma</i>
	<i>C. argyrosperma</i> ssp. <i>sororia</i> (L.H. Bailey) Merrick & Bates
Grupo Pepo	<i>C. pepo</i> L. ssp. <i>pepo</i>
	<i>C. pepo</i> ssp. <i>fraterna</i> (L.H. Bailey) Andres
	<i>C. pepo</i> ssp. <i>texana</i> (Scheele) I.A. Filov
Grupo Maxima	<i>C. maxima</i> Duchesne ex Lam. ssp. <i>maxima</i>
	<i>C. maxima</i> ssp. <i>andreaana</i> (Naudin) I.A. Filov
	<i>C. ecuadorensis</i> Cutler & Whitaker (informalmente sugerida como parte de este grupo)
Grupo Okeechobeensis	<i>C. okeechobeensis</i> (J.K. Small) ssp. <i>okeechobeensis</i>
	<i>C. okeechobeensis</i> ssp. <i>martinezii</i> (L.H. Bailey) Walters & Decker-Walters
Grupo Digitata	<i>C. digitata</i> A. Gray *
	<i>C. cordata</i> S. Watson *
	<i>C. palmata</i> S. Watson *
Grupo Foetidissima	<i>C. foetidissima</i> H.B. K. *
	<i>C. pedatifolia</i> L.H. Bailey *
	<i>C. scabridifolia</i> L.H. Bailey *
	<i>C. radicans</i> Naudin *
Especies sin filiación con algún grupo	<i>C. lundelliana</i> L.H. Bailey
	<i>C. ficifolia</i> Bouché
	<i>C. moschata</i> (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poir.

Grupo *Argyrosperma*

Incluye dos subespecies. La subespecie *argyrosperma* donde, se ubican todos los tipos domesticados del grupo y la cual se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta Centroamérica. Es cultivada en un intervalo altitudinal que abarca desde casi el nivel del mar hasta los 1800-1900 m, generalmente en zonas con climas cálidos y algo secos o con una estación de lluvias bien delimitada, este cultivo no es tolerante a temperaturas muy bajas. La subespecie *sororia*, que comprende a las formas silvestres o espontáneas y que corresponde al ancestro silvestre de *C. argyrosperma* subsp. *argyrosperma*, su distribución comprende desde México hasta Centroamérica, en condiciones climáticas muy similares a las descritas para su contraparte cultivada. Si se sobrepusiera la distribución ecogeográfica de las dos subespecies, sería evidente que durante largos periodos han existido numerosos sitios en los que pueden coexistir y en consecuencia que ha habido amplias posibilidades de entrecruzamiento entre ellas. Los restos arqueológicos más antiguos han sido encontrados en la cueva de Romero, Tamaulipas, México, con una fecha aproximada de 5,100 años (Smith, 1997b). Sin embargo también existen registros desde el Este y Suroeste de los Estados Unidos hasta el Centro y Sur de México, por lo que se sugieren que su domesticación debió llevarse a cabo en la región centro y sur de México (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Grupo *Pepo*

T. Andres (1987) sugiere que este grupo está constituido por tres subespecies: la subespecie *pepo* que incluye a todos los tipos cultivados comestibles y ornamentales y, las subespecies *texana* y *fraterna*, correspondientes a los

ancestros silvestres del grupo. Por otro lado Decker *et al.* (1993) propone que este grupo tiene tres subespecies: ssp. *pepo*, que incluye las razas locales y cultivares comerciales, ssp. *fraterna* y ssp. *ovifera*, sin embargo la subespecies *ovifera* se compone de tres variedades: (1) *var. ozarkana* (plantas silvestres en los estados de Illinois, Missouri, Oklahoma, Arkansas y Louisiana en los EE.UU.), (2) *var. texana* (plantas silvestres en los estados de Texas, Nuevo México, Luisiana y Mississippi en los EE.UU.), y (3) *var. ovifera* (principalmente cultivares ornamentales). Actualmente la clasificación está todavía en proceso de actualización.

Por otro lado, los restos arqueológicos más antiguos corresponden a semillas, pedúnculos, y restos de la cáscara de frutos, encontrados en la cueva de Guilá Naquitz en Oaxaca, México de alrededor de 9,000 años (Smith, 1997a). Así mismo existen evidencias arqueológicas, no tan antiguas, que indican que la subespecie *pepo* se cultivaba en los Estados Unidos y Canadá desde mucho antes de la llegada de los españoles. Sin embargo, en la actualidad en esos países sólo se manejan cultivares comerciales, mientras que el cultivo de sus razas o variedades tradicionales se restringe a México y el norte de Centroamérica. (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Grupo Maxima

El proceso de domesticación en este grupo ocurrió en América del Sur, ya que evidencias arqueológicas muestran que los restos de la subespecie *maxima* son los únicos que han sido encontrados en esa región del continente, desde Perú hasta el norte de Argentina. Actualmente el cultivo de esta especie se registra desde Brasil hasta Bolivia, sin embargo, también se dice que en México es

cultivada aunque solo a nivel local y como cultivo para exportación (Hernández-Vargas, en preparación).

Por otro lado, las especies silvestres que han mostrado mayor afinidad genética y reproductiva y/o tener más similitudes con este cultivo son *C. andreana* Naudin y *C. ecuadorensis* Cutler & Whitaker. La primera de ellas nativa de Argentina y Uruguay, donde crece en bajas altitudes principalmente como arvense o ruderal, esta parece ser el ancestro silvestre más probable y, de hecho, ya ha sido formalmente propuesta como tal, asignándosele la categoría de subespecie (*C. maxima ssp. andreana* Naudin). La inclusión de *C. ecuadorensis* en el Grupo Maxima fue propuesta por Sanjur *et al.* (2002), *C. ecuadorensis* es nativa de Ecuador donde crece en sitios perturbados de una zona de transición entre bosques secos y húmedos, entre los 0 y 400 msnm (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Grupo Okeechobeensis

Este grupo está conformado por dos taxa silvestres y anuales: La subespecie *okeechobeensis*, que es considerada como rara, endémica de los pantanos con *Annona* del suroeste del Lago Okeechobee en Florida; y la subespecie *martinezii*, que es conocida en la región dentro de la vertiente del Golfo de México, que abarca desde el sur de Tamaulipas, este de San Luis Potosí, Puebla y una buena parte de Veracruz, hasta el norte de Oaxaca y Chiapas. Prospera a orillas de arroyos o en zonas con vegetación primaria o secundaria, y desde muy cerca del nivel del mar hasta los 1500 m, además son relativamente abundantes en toda su área de distribución.

La característica más notable para distinguir a los taxa de este grupo de los restantes del género es el color amarillo muy pálido a casi blanco o crema de

las corolas de sus flores, además de que presentan semillas de color grisáceo-verdoso (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Grupo Digitata

Este grupo lo constituyen tres especies silvestres con raíces perennes (*Cucurbita digitata*, *C. palmata* y *C. cordata*), que habitan en condiciones de aridez extrema. La vegetación en esos sitios corresponde principalmente a matorrales desérticos micrófilos o crassicaules, mezquitales y bosques tropicales caducifolios. *C. digitata*, se distribuye desde el suroeste de los Estados Unidos (Arizona, Nuevo México, California) al noroeste de México (Baja California, Sonora y Chihuahua). Por su parte, *C. palmata* crece en las planicies y colinas áridas desde los Estados Unidos, en los Valles de San Joaquín y Sacramento, California al este hacia el sur de Nevada y Arizona y hacia el sur en el Desierto de Colorado, hasta México en la zona baja del Desierto Sonorense y en Baja California. Dentro de su área de distribución coexiste con algunas poblaciones de *C. digitata*. Finalmente, *C. cordata* es endémica de la región centro-sur de la Península de Baja California (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Grupo Foetidissima

En este grupo se incluyen cuatro especies perennes (*C. foetidissima*, *C. pedatifolia*, *C. radicans* y *C. x scabridifolia*). La primera de ellas, *C. foetidissima*, está ampliamente distribuida desde los Estados Unidos (Nebraska, Missouri, Kansas a Colorado y Utah a Nevada, Texas, Nuevo México y California) hasta el centro de México (desde Sonora a Tamaulipas y hasta Guanajuato, Querétaro y los alrededores de la ciudad de México). *C. pedatifolia*, es endémica de una

pequeña área de México que comprende parte de los estados de Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro y Oaxaca. Prospera en zonas secas y frías con altitudes mayores a los 1350 msnm. *C. radicans*, es también endémica de México y crece al menos en los estados de Michoacán, Jalisco y Estado de México, y en otras épocas llegó a crecer en las inmediaciones de la ciudad de México (Nee, 1990). En la actualidad prospera generalmente en sitios en los que la vegetación ha sido perturbada por diversas actividades humanas, como arvense en milpas con cultivo de maíz y especies domesticadas (*C. ficifolia*, *C. argyrosperma*, *C. moschata* y *C. pepo*). Sin embargo, aunque coexista con ellas, *C. radicans*, no parece ser capaz de hibridizar exitosamente con ninguna de las plantas domesticadas.

Finalmente, *C. x scabridifolia*, otra especie endémica de México, se distribuye en los estados de Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro e Hidalgo. Es de origen híbrido a partir de *C. foetidissima* y *C. pedatifolia*, es por ello que se incluye la “x” en su nombre científico (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Especies sin filiación con algún grupo

***Cucurbita lundelliana*:** Esta especie silvestre se distribuye desde el sur de México (Tabasco y sur de Campeche, Yucatán y Quintana Roo) hasta Centroamérica, cuando menos hasta Nicaragua. Prospera en altitudes cercanas al nivel del mar, generalmente en bosques tropicales perennifolios.

El color azul-verdoso-grisáceo de las semillas de *C. lundelliana* es una característica que sólo comparte con las dos subespecies del Grupo Okeechobeensis. Sin embargo, su distribución geográfica es completamente diferente y sus poblaciones alcanzan un límite superior altitudinal mucho menor que los taxa del Grupo Okeechobeensis (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Cucurbita moschata: En América Latina, se cultiva desde hace más de 5000-6000 años y aunque es claro que se trata de una especie domesticada en América Latina, no existe acuerdo acerca del área precisa de su domesticación. En ocasiones se ha señalado que fue domesticada en el área Mesoamericana o bien se ha sugerido a Colombia como su centro de origen. Los restos arqueológicos más antiguos de esta especie (4,900-3,500 A.C.) han sido recuperados en las cuevas de Ocampo, Tamaulipas, en el noreste de México, aunque fechamientos similares han sido registrados también para algunos sitios de Centroamérica y América del Sur; este hecho, apoya la observación de que ambas regiones son importantes centros de diversificación de este cultivo.

C. moschata se ha reportado como sumamente variable en cuanto a las características de sus frutos y semillas para varias zonas dentro de su área de distribución bajo cultivo en América (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Cucurbita ficifolia: Conocida en México como chilacayote, es una especie cultivada, principalmente en toda América Latina, ocupando zonas de altitud media a alta, en climas tanto cálidos como templados. Para esta especie, el rango de altitud (1,000-3,000 msnm) ha sido considerado un carácter distintivo, debido a que las otras especies cultivadas del género pueden ser manejadas en una mayor amplitud de condiciones ecológicas.

Es la especie menos diversa de todas las especies cultivadas de *Cucurbita* y no se sabe que existan cultivares comerciales de ella. Se encuentra en cultivares, agrosistemas y en huertos familiares, generalmente abarcando climas templados y cálido-húmedos (Lira & Montes-Hernández, 1992; Lira *et al.*, 1995).

ESTUDIOS FILOGENÉTICOS CON *CUCURBITA*

Existen varios trabajos respecto a la filogenia tanto a nivel familia como género. Wilson *et al.* (1992) estudiaron 15 especies utilizando el análisis de cloroplasto cortado con enzimas de restricción analizando la longitud de los fragmentos polimórficos (RFLP), ellos encontraron un grupo formado por los dos miembros del grupo Foetidissima (*C. foetidissima* y *C. pedatifolia*) y un gran clado en el que están ubicadas todas las plantas domesticadas y sus parientes silvestres. En la base de este gran clado está *C. ficifolia*, y le siguen tres subclados, uno de los cuales incluye a los taxa del grupo Pepo (*C. fraterna*, *C. pepo* y *C. texana*), otro en el que se ubican los taxa de los grupos Argyrosperma (*C. argyrosperma* y *C. sororia*) junto con *C. moschata*. Este estudio es de las primeras filogenias del género, sin embargo no se resuelven del todo bien las relaciones entre las especies domesticadas, además de no incluir todas las especies del grupo Digitata.

Sanjur *et al.* (2002) realizaron un estudio sobre las relaciones filogenéticas en cuanto a la domesticación del género *Cucurbita* con 6 taxa silvestres y 6 cultivadas, usando la región mitocondrial *nad1*. La topología obtenida, muestra buenos valores de soporte de ramas, sin embargo el muestreo taxonómico está incompleto, así mismo las relaciones entre las especies domesticadas aun no son muy claras.

En el 2007 Kocyan *et al.* realizaron la filogenia de la familia Cucurbitaceae utilizando 4 marcadores de cloroplasto (*rpl20-rps12*, *rbcl*, *matK*, *trnL-F*), mismos marcadores que utilizaron Zheng *et al.* (2013) para realizar la filogenia del género *Cucurbita* con 23 taxa de 13 especies. En este último estudio se incluyen casi todos los taxa del género, sin embargo aunque *C. moschata* se agrupa con las

especies del grupo *Argyrosperma* es necesaria una mejor resolución. Así mismo proponen a *C. ficifolia* dentro del grupo *Foetidissima*, lo cual no se observa en estudios anteriores.

Existe un estudio más reciente realizado por Kistler *et al.* (2015), en el cual analizaron el genoma del cloroplasto de muestras ancestrales (fósiles), taxa silvestres y taxa domesticados del género *Cucurbita*. Así mismo incluyeron muestras de mamíferos ancestrales, con el objetivo de evaluar su hipótesis de que las condiciones ambientales y la extinción de la megafauna del Holoceno impactaron severamente a las cucurbitas silvestres. Si bien, en este trabajo se realizó una filogenia, en esta no se incluyen todas las especies del género, enfocándose más en las especies mesofíticas domesticadas.

Aunque se han realizado estudios que pretenden construir la filogenia del género, aún existen relaciones (particularmente entre las cultivadas y sus contrapartes silvestres) que no se han resuelto apropiadamente, ya sea porque no incluyen a todas las especies, o porque los marcadores reportados hasta el momento no tienen suficiente resolución, por lo que esto promueve que algunas relaciones no sean concluyentes.

En cuanto al análisis sobre fechas de divergencia, en el 2008 Schaefer *et al.* realizaron una datación de fechas de divergencia para la familia Cucurbitaceae, utilizando registros fósiles de 84 Ma del grupo Fagales, grupo hermano de los Cucurbitales. Su estudio revela el origen Asiático de esta familia y sus posibles eventos de dispersión. Sin embargo, aunque utilizan algunas especies del género *Cucurbita*, no existe hasta el momento un estudio de este tipo con énfasis en este género.

JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que la mayoría de las especies de *Cucurbita* se encuentran en México, es importante tener en claro las relaciones filogenéticas que existe en este grupo, para poder manejarlas, conservarlas y seguir estudiándolas, ya que cinco de estas especies son de gran importancia económica para el país y el mundo, representando un importante recurso fitogenético.

Este trabajo pretende analizar la filogenia del género *Cucurbita* utilizando nuevos marcadores de cloroplasto que brinden una mejor resolución filogenética y de esta manera conocer mejor la situación y parentesco de las especies del género. Así mismo se propone una aproximación a las fechas de divergencia y tasas de sustitución de las especies del género para comprender mejor su biología evolutiva.

A su vez este estudio forma parte del proyecto de CONABIO (KE004) denominado: "Diversidad Genética de las especies de *Cucurbita* en México e hibridación entre plantas genéticamente modificadas y especies silvestres de *Cucurbita*" que tiene como objetivo "Analizar la diversidad genética de las especies silvestres y domesticadas de *Cucurbita* que crecen en México". Por lo que este estudio filogenético contribuye a que posteriormente se pueda diseñar un esquema experimental para evaluar el riesgo de hibridación entre plantas genéticamente modificadas y especies silvestres.

OBJETIVO

Estudiar la filogenia molecular del género *Cucurbita*, usando secuencias de cloroplasto.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener secuencias de la mayoría de los taxa del género *Cucurbita*, tanto silvestres como domesticadas, para el análisis filogenético.
- Proponer las regiones *psbD-trn-T*, *psbJ-petA* y *atpI-atpH* como marcadores de cloroplasto para la inferencia filogenética del género *Cucurbita*.
- Estimar las fechas de divergencia de las especies del género *Cucurbita*.
- Estimar las tasas de sustitución molecular de las distintas regiones de cloroplasto y los diferentes linajes.
- Estimar la tasa de diversificación del género *Cucurbita*.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron de distintas fuentes que se detallan en el Anexo 2:

- Semillas: se obtuvieron accesiones de semillas de diferentes especies, provenientes del Banco Nacional de Germoplasma del INIFAP-Celaya.
- Muestras de Herbario: Con apoyo del Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología UNAM, se tomaron pequeñas muestras de los especímenes de herbario de diferentes taxa del género *Cucurbita* que se encuentran en la institución y de los cuales no se tenía una representación de tejido fresco.
- Colectas: en el marco del proyecto al que pertenece este trabajo, se llevaron a cabo tres salidas al campo a diferentes estados del país (Anexo 2) en busca de ejemplares silvestres y domesticados, colectando tanto hojas como frutos. Las hojas se conservaron en sílica gel para su traslado al Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM. Una vez en el laboratorio, las muestras se mantuvieron a -4°C hasta extraer el ADN. En cuanto a los frutos, se extrajeron las semillas las cuales fueron germinadas siguiendo el protocolo detallado más adelante.
- Semillas Comerciales: se obtuvieron muestras comerciales de cuatro cultivares de *C. pepo subsp. pepo*, provenientes de Estados Unidos: Coczelle, Black Beauty Zucchini, Delicata Honey Boat, Early Prolific Straightneck.
- Secuencias de GenBank: se descargaron las secuencias de dos regiones de cloroplasto (*matK* y *rcbL*) reportadas por Zheng *et al.* (2013).

La siembra de semillas se realizó en un invernadero del Instituto de Ecología de la UNAM bajo condiciones de temperatura (20-30°C) y riego controlados. La cosecha de hojas para la extracción de ADN se llevó a cabo cuando la plántula tenía más de 3 hojas desarrolladas. Adicionalmente se cosecharon una o dos hojas de todos los individuos germinados, para tener un respaldo de tejido foliar, y se almacenaron en un ultracongelador REVCO a -80°C en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM. Una vez hecha la extracción y teniendo material de reserva, la plántula fue desechada.

EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Para la extracción de ADN se siguieron dos protocolos de extracción diferentes:

- 1) Para tejido fresco: se utilizaron hojas jóvenes cosechadas de las semillas germinadas, así como las hojas obtenidas de las colectas. Se siguió el protocolo mini-prep con CTAB y cloroformo de Doyle y Doyle (1987) modificando algunos pasos (Anexo 3).
- 2) Para algunas muestras de herbario se utilizó el kit comercial *DNeasy® Plant Mini Kit* (QIAGEN, Maryland USA) con el cual se obtuvo ADN de mejor calidad. Sin embargo en algunas muestras de herbario no fue posible extraer ADN debido a las condiciones de la hoja ya que esta era muy antigua o se encontraba muy seca.

Las eluciones de ADN se mantuvieron congeladas a -20°C para evitar su degradación. El ADN no utilizado se mantiene almacenado a -80°C en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM.

Mediante la técnica de PCR se amplificaron 5 regiones no codificantes de cloroplasto (Tabla 3). De las cuales, las regiones *trnL-F* y *rpl20-rps12* son reportadas como altamente variables (Taberlet *et al.*, 1990; Hamilton, 1999); así mismo, Kocyan *et al.* (2007) y Zheng *et al.* (2013) las utilizan en su análisis filogenético de la familia y del género *Cucurbita*. Por otro lado, las regiones *psbJ-petA*, *psbD-trnT*, *atpl-atpH*, fueron propuestas por Shaw *et al.* (2007) como regiones variables adecuadas para resolver relaciones filogenéticas en plantas, por lo cual en este trabajo son probadas por primera vez para el género *Cucurbita*.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 25µL, mediante las siguientes condiciones. Para las regiones *trnL-trnF* y *rpl20-rps12*, se utilizó 3X de Buffer, 2.7mM dNTP's, 1.2mM MgCl₂, 3µM de cada primer y 2U de DNA Polimerasa (PROMEGA, Madison USA), para las muestras de herbario se utilizó BSA (20µg/µL); se siguió un programa de amplificación que consistía de una temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, posteriormente 35 ciclos con fase de desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, fase de alineamiento de 40 segundos con temperatura de 55°C a 57° (dependiendo la especie) y una fase de elongación a 72°C por 1.20 minutos, finalizando con una elongación a 72°C durante 7 minutos. Para las regiones *psbJ-petA*, *psbD-trnT*, *atpl-atpH*, se utilizó 1X de Buffer, 0.2mM dNTP's, 3mM MgCl₂, 0.1µM de cada primer y 1.25U de DNA Polimerasa (PROMEGA, Madison USA), para las muestras de herbario se utilizó BSA (0.2µg/µL). El programa de amplificación que se siguió fue: temperatura inicial de 80°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, una fase de alineamiento de 40 segundos con temperatura de 50°C a 62°C (dependiendo la especie) y una

fase de elongación a 65°C durante 4 minutos, finalizando con una elongación a 65°C por 5 minutos.

Una vez amplificadas las regiones, los productos de PCR fueron revisados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE, teñido con bromuro de etidio (300 µg/L) y visualizado con luz ultravioleta. Posteriormente los productos fueron enviados al servicio de secuenciación de la Universidad de Washington (*High Throughput Sequencing Unit*, www.htseq.org) y a la empresa de secuenciación Macrogen (Macrogen USA, www.macrogenusa.com).

TABLA 3. Regiones amplificadas y secuenciadas para el análisis filogenético del género

Cucurbita. (Y=C, T; R=A, G).

Región	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>trnL-trnF</i>	TabC	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	TabF	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
<i>rpl20-rps12</i>	rpl20	TTTGTCTACGTCTCCGAGC	Hamilton (1999)
	rps12	GTCGAGGAACATGTACTAGG	
<i>psbJ-petA</i>	psbJ	ATAGGTACTGTARCYGGTATT	
	petA	AACARTTYGARAGGTTCAAT T	
<i>psbD-trnT</i>	psbD	CTCCGTARCCAGTCATCCATA	Shaw <i>et al.</i> (2007)
	trnT	CCCTTTTAACTCAGTGGTAG	
<i>atpI-atpH</i>	atpI	TATTTACAAGYGGTATTCAAGCT	
	atpH	CCAAYCCAGCAGCAATAAC	

ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se utilizó el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar que las secuencias pertenezcan a la especie y región del ADN amplificada. Sin embargo se encontró que algunas de las secuencias de la región *trnL-trnF* de cloroplasto amplificaban para la mitocondria con un query cover de 99% y 93-94% de identidad con el genoma de mitocondria de *C. pepo* ssp. *pepo* (Alverson et al., 2010), por lo que se decidió excluir esta región del análisis filogenético.

Por otro lado, debido a que no fue posible amplificar algunas de las muestras de herbario para todas las regiones, se decidió utilizar las secuencias del GenBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) reportadas por Zheng *et al.* (2013) para la región *rpl20-rps12* con el fin de realizar un análisis filogenético más completo.

Así mismo, para las especies que no fue posible obtener tejido, debido principalmente a su distribución geográfica, se extrajo de los genomas reportados por Kistler *et al.* (2015) todas las regiones utilizadas. Esto también se hizo para los grupos externos *Lagenaria siceraria* (Kistler *et al.*, 2014) y *Cucumis melo* subsp. *melo* (Rodríguez et al., 2011) (procedimiento Anexo 4); como grupo externo más cercano se utilizaron las secuencias de *Peponopsis adhaerens* de Zheng *et al.* (2013). Los números de acceso de las secuencias descargadas del GenBank se encuentran en el Anexo 5.

Las secuencias fueron ensambladas utilizando el programa Consed (Gordon y Green, 2013), y alineadas mediante el programa ClustalW 2.0 (Larkin et al., 2007), revisadas y cortadas en los extremos con Mega6 (Tamura *et al.*, 2013).

Se tomó una secuencia consenso por cada especie para cada región del cloroplasto, y considerando que las secuencias descargadas del GenBank representan el haplotipo más común de cada especie, las secuencias, tanto amplificadas como descargadas, se concatenaron con el programa DnaSP 5.10.1 (Librado y Rozas, 2009), teniendo en total un alineamiento de 6514 nucleótidos de longitud y 6 regiones de cloroplasto.

Para cada una de las regiones se determinó el modelo evolutivo utilizando el programa JModelTest 2.0 (Darriba *et al.*, 2012), siguiendo el Criterio de Información de Akaike (AIC).

La inferencia filogenética, se realizó mediante el método de Máxima Verosimilitud (ML) y el método de Inferencia Bayesiana (IB), ya que como se mencionó anteriormente estos métodos consideran modelos evolutivos y los datos son evaluados a través de pruebas probabilísticas, considerándolos modelos más confiables (Lemey *et al.*, 2009). Para el método ML se utilizó el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), llevándose a cabo 1000 réplicas de *bootstrap* para obtener los valores de soporte de cada clado, con un modelo evolutivo GTR generado del análisis con JModelTest. El método de Inferencia Bayesiana se realizó con el programa MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012), particionando cada región y utilizando el modelo evolutivo correspondiente de acuerdo al análisis con JModelTest. Se calcularon las probabilidades usando la Cadena de Monte Carlo de Markov (MCMC), el análisis se corrió 10 millones de generaciones, muestreando los árboles cada 1000 generaciones después de un *burn-in* inicial del 25% (25,000 árboles).

ESTIMACIÓN DE LOS TIEMPOS DE DIVERGENCIA

El cálculo de los tiempos de divergencia y las tasas de sustitución molecular se llevó a cabo con el programa BEAST v.1.8.3 (Drummond *et al.*, 2012). Este programa usa el método Bayesiano de Cadena de Monte Carlo de Markov (MCMC) y un muestreo de topologías, las cuales son procesadas de acuerdo a sus probabilidades posteriores, derivando en un árbol ultramétrico que es tomado para la estimación de tiempos de divergencia, y su intervalo de credibilidad de 95%.

A partir de la matriz de las seis regiones de cloroplasto, se generó un archivo XML con BEAUTI v. 1.8.3., en el cual se integraron los modelos evolutivos para cada región obtenidos con JModelTest, así como los puntos de calibración de los nodos basado en el trabajo de Schaefer *et al.* (2008) (ver Tabla 4). Estos autores realizaron una datación para la familia Cucurbitaceae basados en datos fósiles. Además se consideraron registros arqueológicos pertenecientes al género *Cucurbita* para las especies domesticadas (Tabla 4).

Se utilizó un modelo de reloj molecular relajado, el cual permite que el intervalo de confianza en los tiempos de divergencia mida la varianza de las tasas de heterogeneidad entre las ramas. Se realizaron dos corridas independientes, cada una de 20 millones de generaciones con una frecuencia de muestreo cada 1000 generaciones, posteriormente se observó con el programa Tracer v 1.6. (Rambaut *et al.*, 2014) la convergencia de las dos corridas. Las dos corridas se juntaron utilizando el programa LogCombiner v 1.7.5, para posteriormente generar un árbol consenso con Treeannotator v. 1.8.3. Se obtuvo un árbol con las fechas de divergencia y otro con las tasas de sustitución molecular, estos árboles fueron visualizados con el software FigTree v. 1.4.1.

En cuanto a la obtención de la tasa de diversificación de un clado, se requiere información explícita sobre el número de linajes que se originaron y se extinguieron durante un intervalo de tiempo. Sin embargo, en ausencia de esta información, la tasa de diversificación puede estimarse considerando la actual diversidad de especies y su edad (Magallón y Sanderson, 2001):

$$r = \log(n) / t \quad (1)$$

En donde r es la tasa de diversificación, $\log(n)$ es el logaritmo natural del número de taxa del grupo a evaluar, y t el tiempo estimado de divergencia de este grupo.

Para esta estimación, se consideraron dos taxa del género *Cucurbita* no incluidos (*C. radicans* y *C. scabridifolia*) siendo en total 22 taxa (n). En cuanto al tiempo estimado de divergencia (t) se utilizó la fecha obtenida del análisis de BEAST. La tasa de diversificación también fue calculada para los grupos Digitata, Pepo, Argyrosperma, Máxima y Okeechobeensis.

TABLA 4. Puntos de calibración para la estimación de los tiempos de divergencia del género *Cucurbita*

Nodo	Edad	Intervalos	Distribución	Descripción	Referencia
Benincaseae- Cucurbiteae	30Ma	26-34	Normal	Tiempo estimado en el que la Tribu Benicaseae, a la que pertenecen los géneros <i>Lagenaria</i> y <i>Cucumis</i> (grupos externos), y la Tribu Cucurbiteae, a la que pertenece el género <i>Cucurbita</i> , se separan.	
<i>Cucumis-Lagenaria</i>	20Ma	16-24	Normal	Tiempo estimado de divergencia del género <i>Cucumis</i> del género <i>Lagenaria</i> (grupos externos).	Schaefer <i>et al.</i> (2008)
<i>Cucurbita</i>	16Ma	9-23	Normal	Tiempo estimado en el que surge el género <i>Cucurbita</i> del género <i>Peponopsis</i> .	
<i>C. ficifolia-C. pepo</i>	7Ma	4-10	Normal	Tiempo estimado de divergencia entre las especies domesticadas <i>C. ficifolia</i> y <i>C. pepo</i> .	
<i>C. pepo</i>	9,000 B.P.	0.7-0.1	Lognormal	Fecha obtenida de la datación, con carbono radiactivo, de semillas, pedúnculos, y restos de la cáscara de frutos de <i>C. pepo ssp. pepo</i> , encontrados en la cueva de Guilá Naquitz en Oaxaca, México	Smith (1997)a
<i>C. argyrosperma</i>	4,450 B.P	0.3-0.7	Lognormal	Registro fósil encontrado en la cueva de Romero, Tamaulipas, México, perteneciente a la especie <i>C. argyrosperma</i> , con una fecha aproximada de 5,100 años.	Smith (1997)b

MITOCONDRIA

Como se mencionó antes, algunas de las secuencias amplificadas para la región *trnL-trnF* de cloroplasto corresponden a una duplicación de esta región localizada en la mitocondria (Alverson *et al.*, 2010). Sin embargo, esto sólo sucedió en algunas especies (Anexo 2).

Por lo que se decidió realizar una filogenia por separado con estas secuencias para determinar si se recupera la misma señal filogenética observada en el cloroplasto.

También se incluyeron secuencias duplicadas en la mitocondria generadas del proyecto de CONABIO (KE004) (“Diversidad Genética de las especies de *Cucurbita* en México e hibridación entre plantas genéticamente modificadas y especies silvestres de *Cucurbita*”) al que pertenece este trabajo. Estas secuencias corresponden a 6 haplotipos de *C. moschata* (de diferentes estados de la república) (Hernández-Rosales en preparación) y 3 de *C. maxima* (comerciales y colectadas) (Hernández-Vargas, en preparación).

El análisis filogenético, se realizó con el método de Máxima Verosimilitud mediante el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), llevándose a cabo 1000 réplicas de *bootstrap* para obtener los valores de soporte de cada clado, y un modelo evolutivo TVM+ Γ , generado por el programa JModelTest 2.0 de acuerdo con el criterio de Akaike (Darriba *et al.*, 2012).

RESULTADOS

Se obtuvieron secuencias de 20 taxa del género *Cucurbita* para 6 regiones de cloroplasto (*rpl20-rps12*, *matK*, *rbcL*, *psbD-petA*, *psbJ-trnL*, *atpI-atpH*) (Tabla 5), utilizando a *Peponopsis adhaerens*, *Lagenaria siceraria* y *Cucumis melo* subsp. *melo* como grupos externos.

TABLA 5. Taxa utilizados para realizar la filogenia del género *Cucurbita*.

*Especies domesticadas.

<i>Cucurbita moschata</i> *
<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>argyrosperma</i> *
<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>
<i>C. maxima</i> subsp. <i>maxima</i> *
<i>C. maxima</i> subsp. <i>andreaana</i>
<i>C. ecuadorensis</i>
<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i> *
<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>
<i>C. pepo</i> subsp. <i>ovifera</i>
<i>C. pepo</i> subsp. <i>ovifera</i> var. <i>ozarkana</i>
<i>C. pepo</i> subsp. <i>ovifera</i> var. <i>texana</i>
<i>C. ficifolia</i> *
<i>C. lundelliana</i>
<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>
<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>okeechobeensis</i>
<i>C. cordata</i>
<i>C. palmata</i>
<i>C. digitata</i>
<i>C. foetidissima</i>
<i>C. pedatifolia</i>

El concatenado de estas regiones fue de 6514 pbs. Se registraron 387 sitios con datos faltantes (*missing data*), por lo cual se analizaron 6127 pbs, de los cuales 159 sitios fueron polimórficos, 61 fueron sitios variables únicos y 98 sitios informativos de la parsimonia (Tabla 6).

En cuanto a las regiones codificantes, la región *rbcL* presentó una proporción de G+C de 0.437, se observaron 15 sustituciones nucleotídicas, de las cuales 2 fueron sinónimas y 13 no sinónimas. Para la región *matK* se registró una proporción de G+C de 0.322, se observaron 5 sustituciones nucleotídicas, siendo todas sustituciones no sinónimas.

TABLA 6. Sitios polimórficos y Modelo Evolutivo para cada región de cloroplasto.

Número de pares de bases (pbs), los sitios polimórficos (S. P.), sitios variables únicos (S.V.U.), sitios informativos de la parsimonia (S. I. P.) y el Modelo Evolutivo obtenido con JModelTest 2.0 (Darriba *et al.*, 2012) para cada región utilizada y para el concatenado.

Región	pbs	S.P.	S. V. U.	S. I. P.	Modelo Evolutivo
<i>atpI-atpH</i>	1033	66	27	39	GTR
<i>rbcL</i>	1401	5	1	4	HKY
<i>psbD-trnT</i>	1166	28	9	19	HKY+Γ
<i>psbJ-petA</i>	1002	32	11	21	HKY+Γ
<i>rpl20-rps12</i>	751	13	10	3	GTR
<i>matK</i>	1161	15	3	12	GTR+ I
Concatenado	6514	159	61	98	GTR

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

En las filogenias realizadas con ambos métodos, Máxima Verosimilitud (Figura 1) e Inferencia Bayesiana (Figura 2) se recupera la misma topología. Se observa

que los taxa del género *Cucurbita* y los taxa utilizados como grupos externos son monofiléticos, así como una clara definición de los grupos Digitata, Foetidissima, Maxima, Argyrosperma, Pepo y Okeechobeensis con altos valores de soporte de ramas (cerca de 100% de *bootstrap* y 1 de probabilidad posterior). Los grupos Pepo, Argyrosperma y Okeechobeensis comparten un ancestro común.

Así mismo se diferencian las especies xerofíticas de las mesofíticas en las que se incluyen a las especies domesticadas.

Cucurbita ficifolia no se encontró afiliada a algún grupo, con valores de soporte de *bootstrap* de 60 y de probabilidad posterior de 0.97. Por otra parte, *C. lundelliana* se encontró dentro del grupo Okeechobeensis y *C. moschata* dentro del grupo Argyrosperma, con valores de *bootstrap* y probabilidad posterior de 76% y 1, 74% y 1, respectivamente.

Dentro del grupo Pepo, se observó que los taxa se dividieron en dos clados: las subespecies que se encuentran en México (*C. pepo* ssp. *pepo* y *C. pepo* ssp. *fraterna*) y la subespecie y variedades de Estados Unidos (*C. pepo* ssp. *ovifera*, *C. pepo* ssp. *ovifera* var. *ozarkana* y *C. pepo* ssp. *ovifera* var. *texana*).

En la figura 3 se correlacionan la topología obtenida de los análisis filogenéticos con las características morfológicas, ecológicas y la distribución actual de cada taxón del género *Cucurbita*. Los grupos externos presentan diferentes orígenes, como Asiático (*Cucumis melo* ssp. *melon*), Africano (*Lagenaria siceraria*) o Americano (*Peponopsis adhaerens*).

Los grupos Digitata y Foetidissima, grupos basales, son plantas perennes, xerofíticas con raíces tuberiformes, siendo su distribución limitada al norte del continente Americano, así como una semilla pequeña, esta última característica se observó en todos los taxa silvestres del género. A partir de la rama

correspondiente a *C. ficifolia* se observa un cambio de hábito importante; ya que esta especie puede ser tanto perenne como anual, desaparecen las raíces tuberiformes, la semilla es más grande y de color negro, y se cambia de un xerofítico a mesófitico.

Por otro lado las especies domesticadas, junto con sus contrapartes silvestres, son anuales, mesofíticas, con una distribución más amplia en América y con semillas más variadas en cuanto forma, color y tamaño.

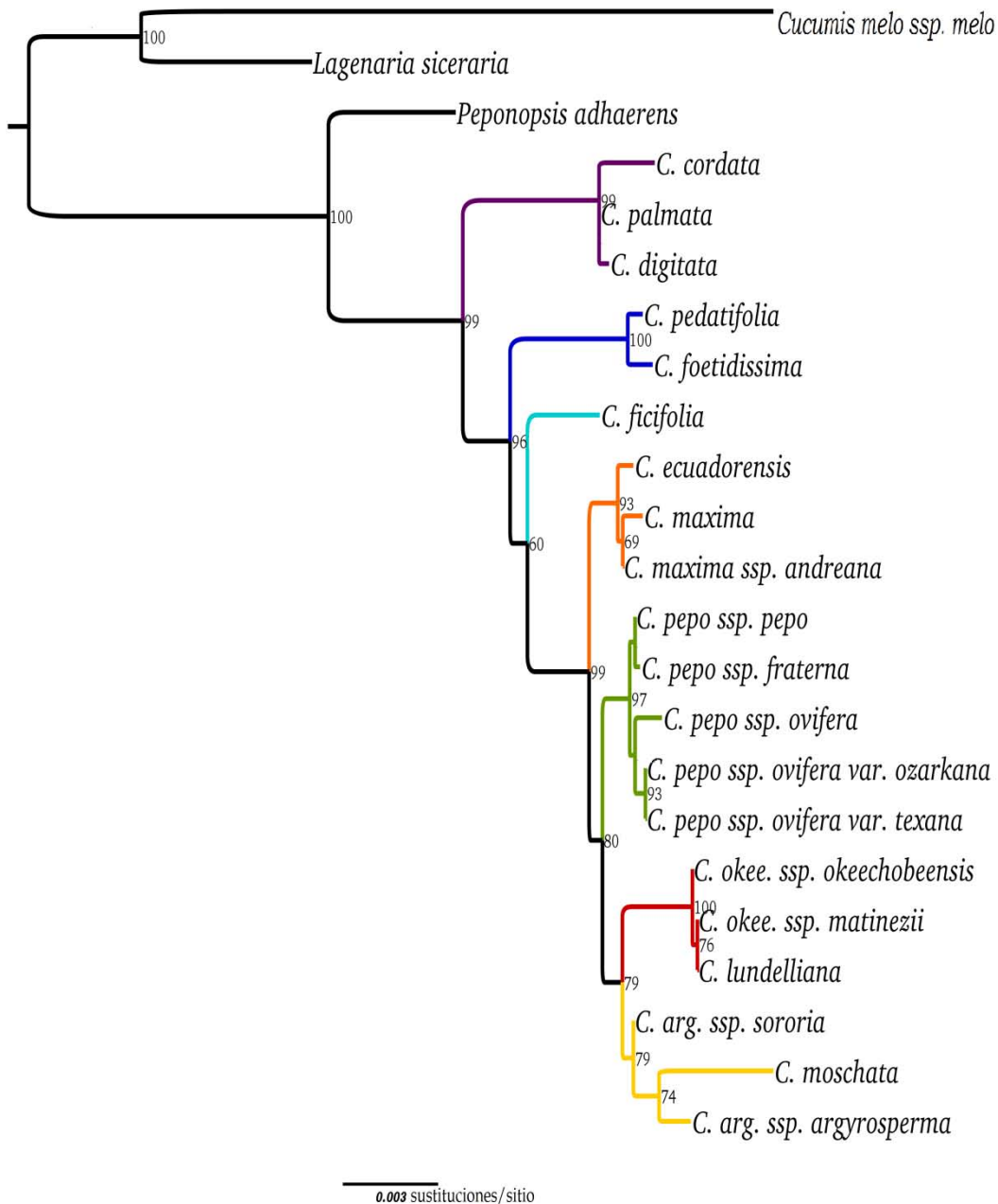


FIGURA 1. Relaciones filogenéticas del género *Cucurbita* obtenidas con el método de máxima verosimilitud (ML), con un modelo evolutivo GTR, mediante 1000 réplicas de *bootstrap*. Se observan valores de *bootstrap* arriba del 60%. Grupo Digitata (morado), grupo Foetidissima (azul rey), *C. ficifolia* (azul turquesa) grupo Maxima (naranja), el grupo Pepo (verde), grupo Okeechobeensis (rojo), grupo Argyrosperma (amarillo), los grupos externos se observan en color negro.

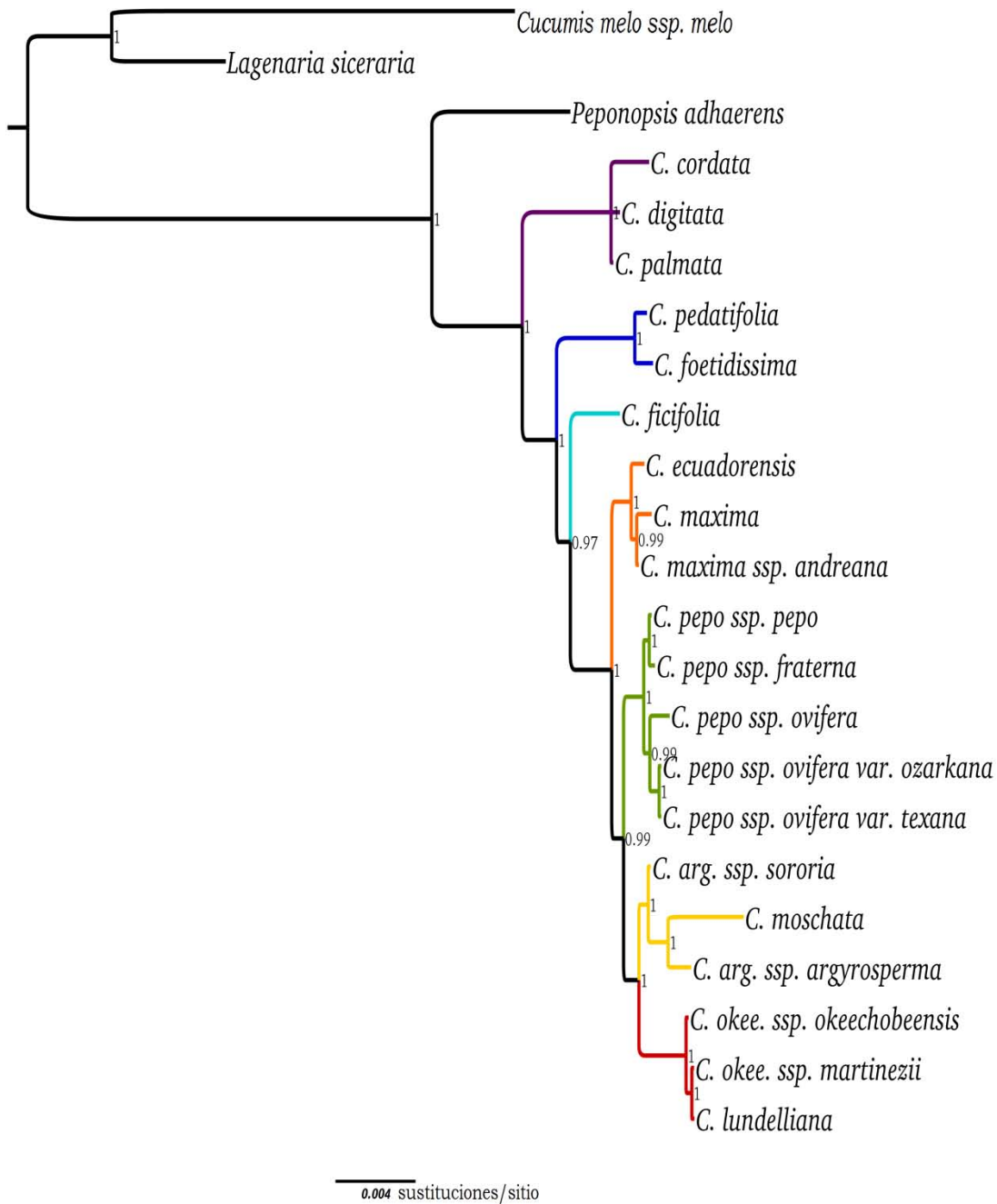


FIGURA 2. Relaciones filogenéticas del género *Cucurbita* obtenidas con el método de Inferencia Bayesiana, con 10 millones de generaciones y un *burn-in* del 25%. Grupo Digitata (morado), grupo Foetidissima (azul rey), *C. ficifolia* (azul turquesa) grupo Maxima (naranja), el grupo Pepo (verde), grupo Argyrosperma (amarillo), el grupo Okeechobeensis (rojo), los grupos externos se observan en color negro.

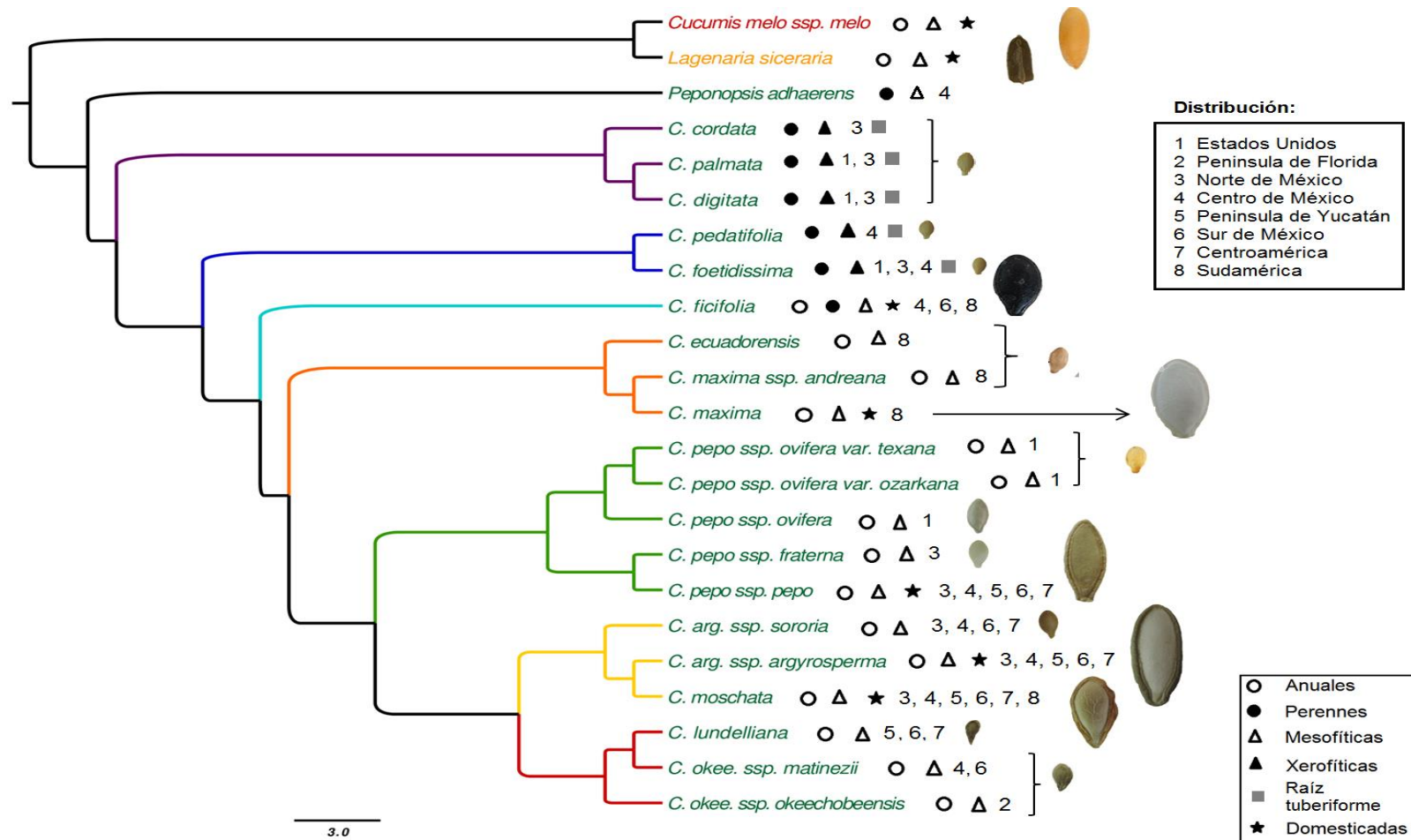


FIGURA 3. Correlación de las relaciones filogenéticas del genero *Cucurbita* con sus características morfológicas, ecológicas y su distribución. Ramas en morado Grupo Digitata, en azul rey grupo Foetidissima, en azul turquesa *C. ficifolia*, en naranja grupo Maxima, en verde grupo Pepo, en amarillo grupo Argyrosperma, en rojo grupo Okeechobeensis, los grupos externos se observan en color negro. Nombres en color verde denotan especies de origen Americano, en amarillo de origen Africano y en rojo de origen Asiático. Topología obtenida del análisis de BEAST.

TIEMPOS DE DIVERGENCIA Y TASAS DE SUSTITUCIÓN MOLECULAR

En un primer análisis (Anexo 6) generado con los puntos de calibración tanto arqueológicos como puntos previos (ver tabla 4), se observó que las corridas no convergían, así como un efecto de contracción de ramas en los clados de *C. pepo* y *C. argyrosperma*. Por lo que se hizo un segundo análisis donde se excluyeron las fechas arqueológicas, utilizando como puntos de calibración sólo las fechas previas calculadas por Schaefer *et al.* (2008).

El cronograma generado de este último análisis, donde se obtuvieron edades de nodos con probabilidades posteriores cercanas a 1, se muestra en la Figura 4. En el nodo más profundo, ente las Tribus Cucurbiteae (género *Cucurbita* y género *Peponopsis*) y Benincaseae (géneros *Lagenaria* y *Cucumis*), se registró una fecha de 29.98 Ma. Para el surgimiento del género *Cucurbita* la fecha estimada fue de 9.64 Ma. En cuanto a las cucurbitas xerofíticas, el grupo *Digitata* presento una fecha estimada de 1.75 Ma, mientras que para el grupo *Foetidissima* fue de 1.11 Ma. En cuanto a los grupos mesofíticos, donde se encuentran las especies domesticadas, las fechas fueron 6.45 Ma para *Cucurbita ficifolia*, 1.28 Ma para el grupo *Maxima*, 1.36 Ma para el grupo *Pepo*, 1.19 Ma para el grupo *Argyrosperma* y 0.28 Ma para el grupo *Okeechobeensis*. La fecha estimada más reciente fue de 0.05 Ma ubicada en el nodo de *C. lundelliana* y *C. okeechobeensis* (en la Tabla 7 se muestran las edades e intervalos de credibilidad para cada nodo).

Por otro lado, las tasas de sustitución molecular del género *Cucurbita* se observan en la Figura 5 y en las Tablas 8 y 9. De acuerdo con el análisis de ANOVA no hay diferencias significativas entre las tasas de sustitución de los taxa y las regiones, sin embargo se observó que *C. moschata* fue el taxón que presentó una tasa de sustitución mayor (0.0018 sustituciones/sitio/millón de

años) seguido por *C. cordata* (0.0009 sustituciones/sitio/millón de años), *C. maxima* y *C. pepo* ssp. *ovifera* (0.0007 sustituciones/sitio/millón de años). La región *atpI- atpH* presentó una tasa de sustitución molecular más alta en comparación con las demás regiones (0.0019 sustituciones/sitio/millón de años), mientras que las regiones codificantes se mantuvieron constantes en todas las taxa con una tasa de sustitución más baja (*rbcL* 0.0001 sustituciones/sitio/millón de años, *matK* 0.0004 sustituciones/sitio/millón de años). La tasa de sustitución molecular promedio del género *Cucurbita* fue de 0.0007 (sustituciones/sitio/millón de años) (Anexo 7).

Por otro lado la tasa de diversificación calculada para el género *Cucurbita* fue de 0.320 taxa/millón de años considerando los 22 taxa del género. Para el grupo *Digitata* fue de 0.627 taxa/millón de años, para el grupo *Máxima* de 0.858 taxa/millón de años, para el grupo *Pepo* de 1.183 taxa/millón de años, para el grupo *Argyrosperma* de 0.923 taxa/millón de años y para el grupo *Okechobeensis* de 3.923 taxa/millón de años.

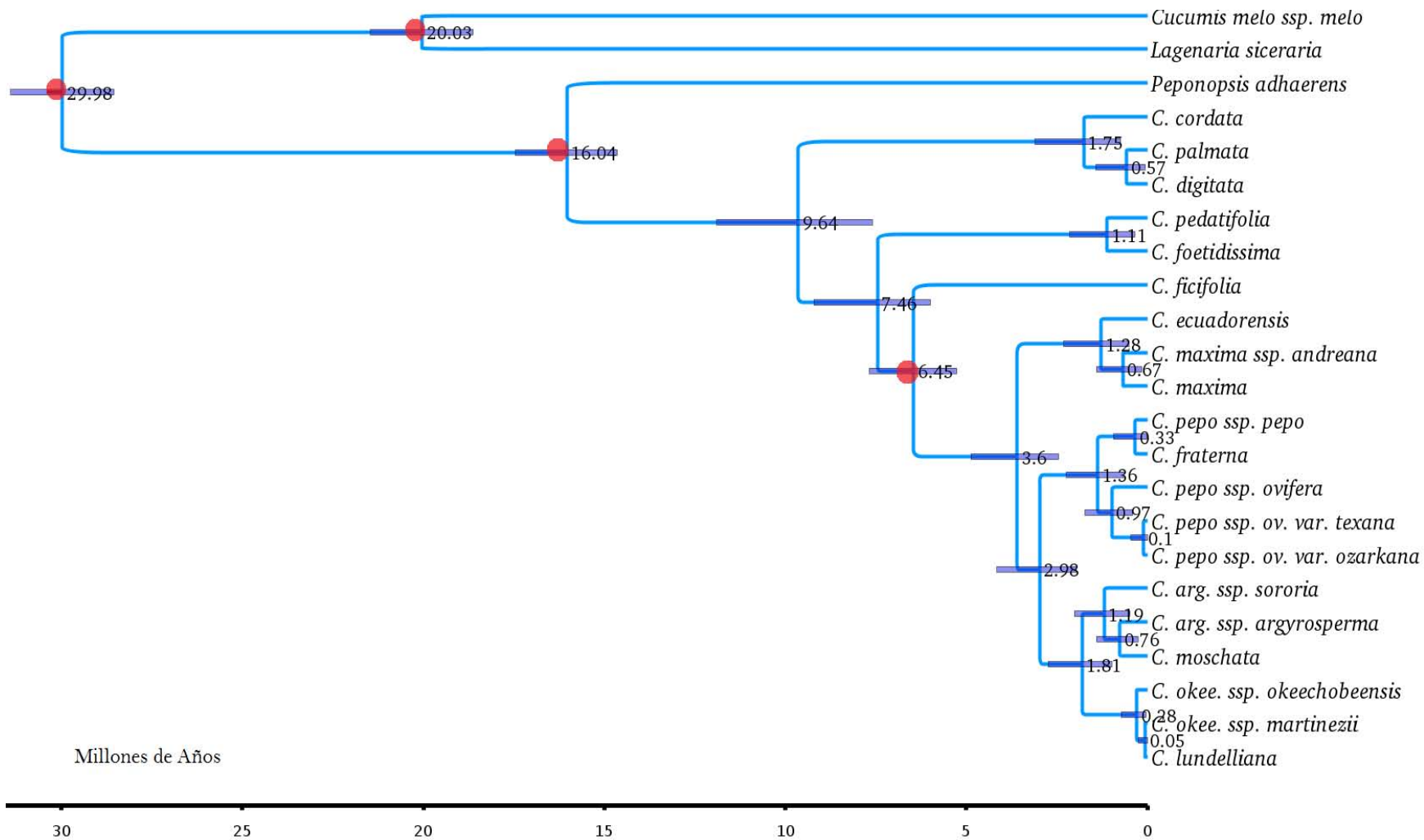


FIGURA 4. Cronograma de tiempos de divergencia estimados para el género *Cucurbita*. Las fechas se muestran en Millones de años, intervalos de credibilidad (95%) barras moradas; puntos de calibración (Schaefer *et al.*, 2008) con círculos rojos.

TABLA 7. Tiempos de divergencia en Millones de años e intervalos de credibilidad (HPD) 95% del género *Cucurbita*.

Nodo	Fecha (Ma)	HPD (95%)
Raiz	29.98	28.55-31.4
<i>Lagenaria siceraria- Cucumis melo</i>	20.3	18.63-21.46
<i>Peponopsis adhaerens-Cucurbita spp.</i>	16.04	14.64-17.46
<i>Cucurbita spp.</i>	9.64	7.6-11.89
Grupo Cordata	1.75	0.73-3.1
<i>C. digitata-C. palmata</i>	0.57	0.05-1.42
Grupo Foetidissima	1.11	0.35-2.14
<i>C. ficifolia</i>	6.45	5.26-7.68
Grupo Maxima	1.28	0.5-2.3
<i>C. maxima- C. maxima ssp. andreana</i>	0.67	0.15-1.4
Grupo Pepo	1.36	0.65-2.23
<i>C. p. ssp. o. var. ozarkana- C. p. ssp. o. var. texana</i>	0.1	0-0.45
<i>C. pepo ssp. fraterna- C. pepo ssp. pepo</i>	0.33	0-0.93
<i>C. pepo ssp. ovifera</i>	0.97	0.4-1.72
Grupo Argyrosperma	1.19	0.47-2.01
<i>C. moschata- C. argyrosperma</i>	0.76	0.26-1.4
Grupo Okeechobeensis	0.28	0.03-0.72
<i>C. lundelliana-C. okee. ssp. martinezii</i>	0.05	0-0.25

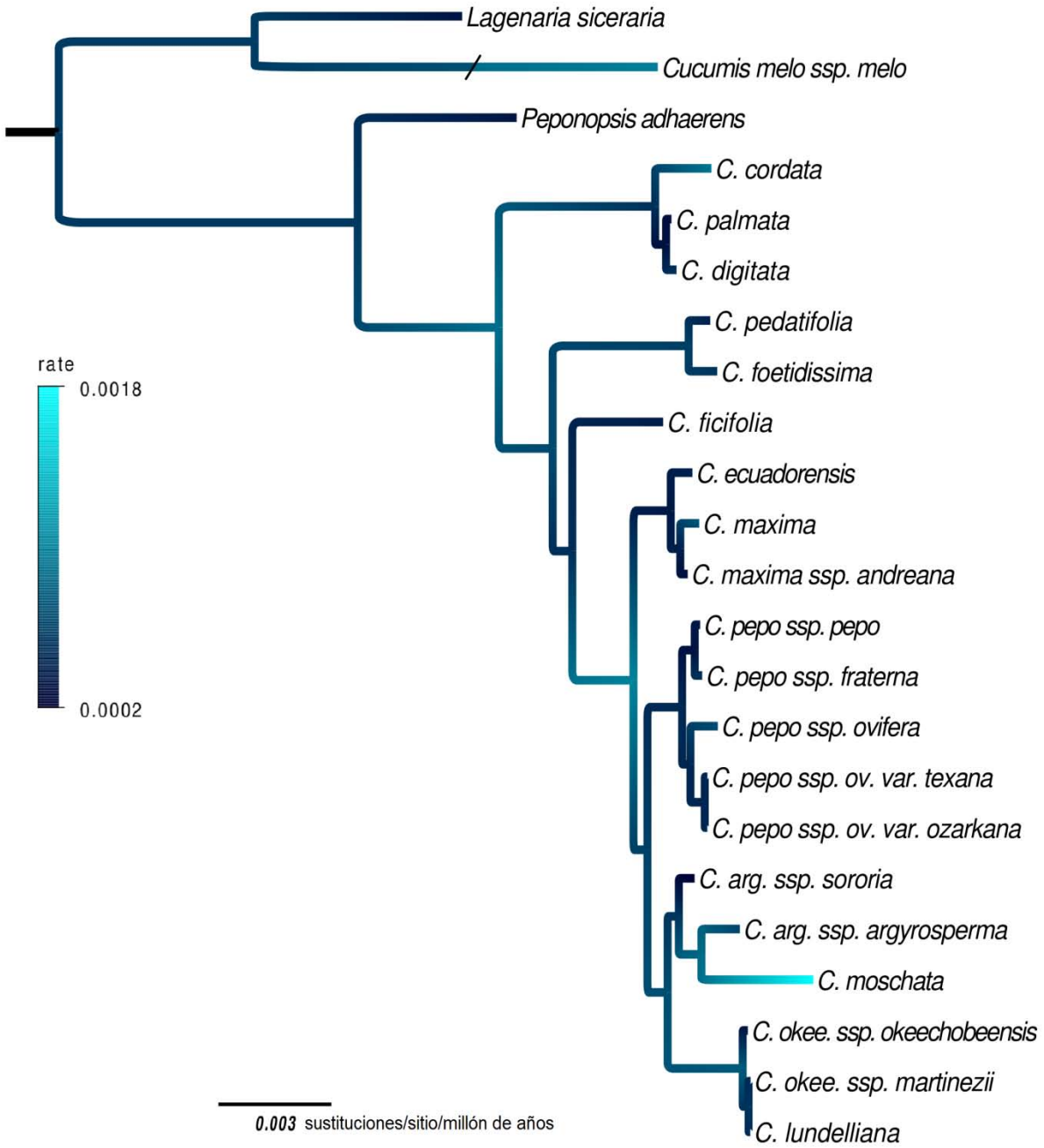


FIGURA 5. Árbol con las tasas de sustitución molecular. Se observa un gradiente de color, azul claro tasa de sustitución más alta, azul oscuro tasa de sustitución menor.

TABLA 8. Tasas de sustitución molecular (sustituciones/sitio/millón de años) e Intervalos de credibilidad (HPD) 95% del género *Cucurbita*.

No se observaron diferencias significativas.

Taxa	Tasa de sustitución (media)	HPD (95%)
<i>C. lundelliana</i>	0.0004	0-0.0011
<i>C. o. ssp. martinezii</i>	0.0005	0-0.0011
<i>C. o. ssp. okeechobeensis</i>	0.0003	0-0.0007
<i>C. moschata</i>	0.0018	0.0007-0.0032
<i>C. a. ssp. argyrosperma</i>	0.0006	0.0002-0.0011
<i>C. a. ssp. sororia</i>	0.0002	0-0.0003
<i>C. pepo ssp. ovifera</i>	0.0007	0.0001-0.0014
<i>C. pepo ssp. fraterna</i>	0.0005	0-0.0011
<i>C. p. ssp. o. var. texana</i>	0.0004	0-0.001
<i>C. p. ssp. o. var. ozarkana</i>	0.0004	0-0.001
<i>C. pepo ssp. pepo</i>	0.0003	0-0.0008
<i>C. maxima</i>	0.0007	0.0001-0.0017
<i>C. maxima ssp. andreana</i>	0.0003	0-0.0006
<i>C. ecuadorensis</i>	0.0004	0.0001-0.0008
<i>C. ficifolia</i>	0.0004	0.0002-0.0005
<i>C. pedatifolia</i>	0.0004	0.0001-0.0008
<i>C. foetidissima</i>	0.0005	0.0001-0.0011
<i>C. digitata</i>	0.0005	0-0.0011
<i>C. palmata</i>	0.0003	0-0.0006
<i>C. cordata</i>	0.0009	0.0002-0.002
<i>Peponopsis adhaerens</i>	0.0003	0.0001-0.0004
<i>Cucumis melo ssp. melo</i>	0.001	0.0008-0.0011
<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0003	0.0002-0.0004

TABLA 9. Tasas de sustitución molecular (sustituciones/sitio/millón de años) promedio para cada región de cloroplasto.

No se observaron diferencias significativas.

Región del cloroplasto	Tasa de sustitución promedio
<i>atpI-atpH</i>	0.0019
<i>rbcL</i>	0.0001
<i>psbD-trnL</i>	0.0007
<i>psbJ-petA</i>	0.0007
<i>rpl20-rps12</i>	0.0003
<i>matK</i>	0.0004

MITOCONDRIA

En el análisis filogenético realizado con las secuencias de mitocondria, se observó nuevamente la definición de los grupos Pepo y Okeechobeensis con altos valores de soporte de ramas (superior al 60% de *bootstrap*). *Cucurbita maxima* se agrupó con los haplotipos de *C. moschata*, dentro del grupo *Argyrosperma*, con buenos valores de *bootstrap* (Figura 6).

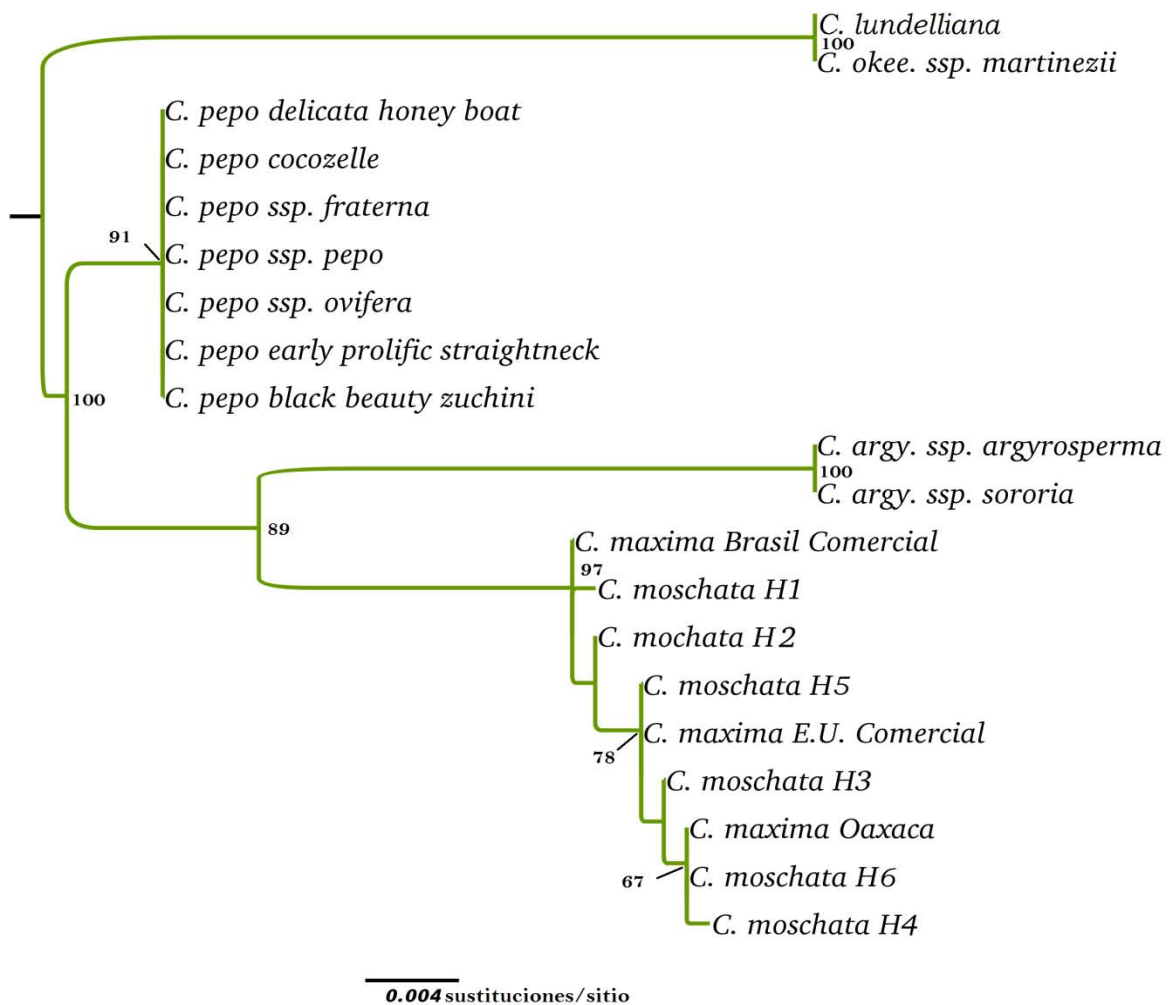


FIGURA 6. Filogenia de la región *trnL-F* duplicada en mitocondria. Se realizó mediante ML, con un modelo evolutivo TVM+ Γ y con 1000 réplicas de *bootstrap*. Se muestran valores de *bootstrap* superiores al 60%.

DISCUSIÓN

En este estudio se obtuvieron secuencias de 20 taxa de los 22 reportados para *Cucurbita*, faltando *C. radicans* y *C. x scabridifolia*, especies endémicas del territorio mexicano, que pertenecen al Grupo Foetidissima y que a la fecha no se han incluido en ningún estudio de este tipo debido a que son raras y poco colectadas. A pesar de que se visitaron, durante las salidas al campo, varios puntos donde se ha registrado *C. radicans*, no fue encontrada, posiblemente debido al corto tiempo destinado para esto. Por otro lado, se utilizaron seis regiones de cloroplasto, tres de ellas previamente utilizadas por Zheng *et al.* (2013), ya que se descartó la región *trnL-trnF* debido a su duplicación en mitocondria, y tres más propuestas para estudios filogenéticos por Shaw *et al.* (2007) y por primera vez utilizados en el género *Cucurbita*.

Las topologías obtenidas de los análisis filogenéticos tienen semejanzas a las obtenidas por Wilson *et al.* (1992), Zheng *et al.* (2013) y Kistler *et al.* (2015), ya que se observa que se mantiene la misma formación de los grupos de las especies del género, sin embargo en este trabajo se definen mejor las relaciones dentro de cada clado con valores de soporte de ramas altos (*bootstap* y probabilidad posterior), utilizando tanto Máxima Verosimilitud como Inferencia Bayesiana, lo cual está estrechamente relacionado con los nuevos marcadores utilizados con mejor resolución (*atpI-atpH*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*) y a la cantidad de regiones de cloroplasto incluidas, ya que esto refleja mejor la historia del genoma del cloroplasto, dando como resultado una filogenia mejor resuelta (Soltis *et al.*, 1998). Además de incluir 20 taxa de 22 pertenecientes al género, por lo que la inferencia está mucho más completa y robusta.

Por otro lado, al mapear la filogenia con algunas características de cada taxón, se observó, de manera general, que los taxa silvestres más basales presentaron características similares (el ser perennes, xerofíticas y con distribución nortea) incluso

con su pariente más cercano, *Peponopsis adhaerens*. Mientras que en los demás grupos las especies son anuales y mesofíticas. La característica que más resaltó fue el tamaño de la semilla, observándose más pequeña en especies silvestres y más grande, y con características propias, en las especies domesticadas, la cual se considera una característica que permite diferenciar entre especies domesticadas. Esto también se observó en los grupos externos *Cucumis melo* ssp. *melo* y *Lagenaria siceraria*, los cuales también son especies domesticadas. Así mismo, las especies domesticadas de *Cucurbita* presentaron una mayor distribución a comparación de las especies silvestres, ya que la mayoría de especies silvestres tiene distribución restringida, mientras que las cultivadas son de amplia distribución. Esto está claramente relacionado a su papel como especies cultivadas y de importancia económica y refleja la importancia del hombre en la evolución y la domesticación de estas especies.

Las semillas de las especies de *Cucurbita* fueron apreciadas en la época prehispánica, pues son relativamente abundantes, representan una fuente eficiente de proteínas y son susceptibles de almacenarse por lapsos prolongados sin apenas sufrir deterioro. Estas cualidades de las pepitas ayudan a explicar el proceso que llevó a que la calabaza fuera una de las plantas que los grupos nómadas buscaban constantemente, recolectando frutos más grandes y menos amargos, situación que paulatinamente fue modificando las características de la planta como su mecanismo de dispersión, así como su capacidad para adaptarse a otros ambientes, haciéndola más apta para las necesidades humanas asegurándoles un recurso alimenticio (Vela, 2010; Lira *et al.*, 2016).

Otras características que también fueron modificadas, como consecuencia de la domesticación, fue la disminución de sus defensas físicas y químicas reflejadas en el cambio de tamaño y forma de los fitolitos y pelos silicificados en las hojas, tallos y

frutos, la disminución o eliminación de las sustancias amargas y tóxicas (por ejemplo, cucurbitacinas) en el fruto; el aumento en la velocidad de germinación; el cambio en la asignación de recursos a través del aumento de la fruta y tamaño de la semilla y, al mismo tiempo, la disminución en el número de frutos por planta y semillas por fruto; el cambio en el hábito de crecimiento, desde indeterminada arrastrándose a determinada semi-arborescente o roseta (Lira *et al.*, 2016).

RELACIONES FILOGENÉTICAS Y TIEMPOS DE DIVERGENCIA

Debido a que no existen estudios previos sobre la datación de la divergencia del género *Cucurbita* las fechas generadas son una primera aproximación, teniendo como base las fechas usadas para calibrar el análisis.

Aunque se consideraron las fechas arqueológicas existentes para las especies domesticadas, los árboles resultantes de este análisis mostraron un colapso de las ramas, por lo que la estimación de las fechas en los grupos *Argyrosperma* y *Pepo*, se vieron severamente influenciadas por estos puntos de calibración, posiblemente debido a que los relojes moleculares utilizados para estimar el tiempo de los eventos recientes con base en fuentes paleontológicas, arqueológicos o biogeográficas, con frecuencia entran en conflicto con las fechas obtenidas (Loewe y Scherer, 1997).

Además se debe tener presente que al utilizar fechas arqueológicas para calibrar relojes moleculares, estas proporcionan estimaciones de edad mínima y en ocasiones incorporan muchos sesgos al análisis (Soltis *et al.*, 2002).

También es importante considerar que las fechas moleculares de especies domesticadas, obtenidas con reloj molecular, reflejan el tiempo en el que se dividieron los múltiples linajes silvestres y de los cuales paulatinamente ocurrió la domesticación (Jansen *et al.*, 2002).

Por lo anterior, basamos nuestra interpretación de resultados, discusión y conclusiones en los árboles obtenidos excluyendo los puntos de calibración basados en fechas arqueológicas y considerando solo las fechas previamente generadas por Schaefer *et al.* (2008).

De acuerdo con el análisis de tiempos de divergencia, el género *Cucurbita* surgió durante el Mioceno hace aproximadamente 9.64 Ma, al igual que otras plantas como el género mexicano *Agave* (entre 7.8 y 10.1 Ma), el género *Yucca* (entre 13 y 18 Ma) (Good-Avila *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006) y el género *Acacia* (14.88 Ma) (Gómez-Acevedo *et al.*, 2010). Durante el mioceno existieron varios eventos geológicos importantes con consecuencias para la biota de las tierras bajas del centro de México, lo cual pudo haber impulsado su diversificación (Gómez *et al.*, 2016). Así mismo el género *Cucurbita* es relativamente reciente, en comparación con otros grupos de plantas como *Abies* (84 Ma) (Aguirre *et al.*, 2012), *Bursera* (48 Ma) (De-Nova *et al.*, 2011), Cactaceae (30 Ma) (Hernández *et al.*, 2014).

Por otro lado, los grupos del género comienzan a diversificar durante el Pleistoceno, apareciendo las especies domesticadas a finales de este.

Se ha propuesto que durante el Pleistoceno muchas regiones sufrieron de gran inestabilidad climática y ecológica, derivada del avance y retracción de glaciares, provocando cambios severos sobre las comunidades vegetales, sin embargo algunas zonas de México y zonas adyacentes de Belice y Guatemala, actuaron como refugios de especies durante las épocas más desfavorables (Toledo, 1976 y 1982). Según esta teoría, el aislamiento que sufrieron las especies en estos refugios dio origen al surgimiento de nuevas especies, ya que, cuando los glaciares se retiraban, mejoraba la temperatura cambiando los patrones de lluvia (fenómeno que ocurrió muchas veces de manera cíclica) ocasionando que las especies extendieran o cambiaran su área de distribución. Este proceso produjo un considerable incremento en el número de

especies (Hewitt, 2000). Estos procesos climáticos y biogeográficos pudieron tener consecuencias que dieron lugar a los linajes de *Cucurbita* actuales, por lo cual es importante estudiar la distribución ancestral de las especies del género *Cucurbita* y como ha cambiado actualmente para conocer mejor su evolución.

En cuanto a las relaciones filogenéticas, los clados basales que se observaron fueron dos. El Grupo Digitata, con un tiempo estimado de 1.75 Ma en el que surgió *C. cordata* y posteriormente *C. palmata* y *C. digitata* (570 mil años). El otro grupo basal fue el grupo Foetidissima registrando un tiempo de divergencia entre *C. foetidissima* y *C. pedatifolia* de 1.11 Ma. Estos dos grupos basales comparten algunas características, ya que ambos son grupos xerofíticos, perennes, con raíces tuberiformes y cuya distribución se limita a ambientes áridos al suroeste de E. U. y el norte de México (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

Si bien, el desarrollo de raíces tuberiformes podría ser una adaptación asociada al tipo de ambiente árido en el que crecen estas especies (Granados-Sánchez y López-Ríos, 1999), el ser perenne es una característica en común con *Peponopsi adhaerens* (grupo externo), endémica de México y perteneciente al género hermano de *Cucurbita* (Lira 2001; Lira and Caballero, 2002). Por lo que la historia de vida perenne podría ser una característica ancestral del género, siendo los linajes de los grupos Digitata y Foetidissima los más ancestrales y de los cuales derivaron los linajes anuales (Wilson *et al.*, 1992).

La relación encontrada por Zheng *et al.* (2013) con respecto a *C. ficifolia* y las especies xerofíticas *C. pedatifolia* y *C. foetidissima*, difiere con lo encontrado en este trabajo, posiblemente debido a que en este trabajo se incluyeron nuevos marcadores moleculares que nos permitieron reflejar una mejor historia del cloroplasto, donde *C.*

ficifolia se observa sin afiliación con algún grupo, registrando un tiempo de divergencia estimado de 6.45 Ma.

Sanjur *et al.* (2002) y Wilson *et al.* (1992) sugieren a *C. ficifolia* como especie probablemente basal de las especies mesofíticas, ya que aunque *C. ficifolia* es considerada como especie anual, se ha observado que puede sobrevivir más tiempo (Lira *et al.*, 2009), pudiendo conservar ciertas características de plantas perennes. Así mismo, aunque es una especie domesticada, presenta notables diferencias (tanto morfológicas como moleculares) con respecto a todos los taxa del género, lo cual ha conducido a proponer que su pariente silvestre pudiera corresponder a una especie no descrita (o quizás extinta) que posiblemente prospere (o haya prosperado) en la región oriental de Los Andes (Nee, 1990; Lira *et al.*, 2009).

En cuanto a la relación dentro del grupo Maxima, se encontró que la diversificación de sus linajes fue hace 1.28 Ma, perfilándose el linaje de *C. ecuadorensis* como basal del de *C. maxima* y *C. maxima ssp. andreana*, siendo estas dos últimos hermanos y cuyos linajes divergieron hace 670 mil años. Esto difiere de otros estudios ya que se ha propuesto a *C. maxima ssp. andreana* como ancestro de la especie domesticada *C. maxima*. Sin embargo existen registros de fitolitos que datan de alrededor de 11000 y 10000 años B.P. posiblemente de *C. ecuadorensis* (Piperno *et al.*, 2000), además se tiene evidencia de que algunas poblaciones de *C. ecuadorensis* dieron lugar a formas semidomesticadas de la especie (Sanjur *et al.* 2002). Así mismo el grupo Máxima es el único grupo restringido a la zona de América del sur, por lo que la domesticación de *C. maxima* estuvo restringida a esta área.

Las relaciones filogenéticas dentro del grupo Pepo han sido de las más estudiadas, ya que se ha sugerido dos eventos independientes de domesticación. La domesticación inicial se cree que fue en el noreste de México, posiblemente siendo la subespecie

silvestre *fraterna* (endémica de Tamaulipas y Nuevo León, México) el taxón ancestral que dio origen a la subespecie domesticada *C. pepo* ssp. *pepo*. Adicionalmente se ha propuesto a la subespecie silvestre *ovifera* (endémica del noreste de E. U. A. y que incluyen a los tipos cultivados y utilizados como ornamentales) como ancestro de las variedades *ozarkana* y *texana* de E.U.A. (Decker, 1990; Smith, 1997a; Sanjur *et al.*, 2002; Smith, 2006).

En las topologías de los análisis filogenéticos de este trabajo se observa la clara separación de las subespecies mexicanas y las subespecies y variedades de Estados Unidos. Sin embargo, en cuanto a la relación de las subespecies *pepo* y *fraterna*, se encontró que son especies hermanas cuyos linajes divergieron entre sí hace unos 330 mil años, mientras que la separación de los linajes del grupo de Estados Unidos del grupo de México fue hace bastante más tiempo, unos 1.36 Ma.

Esto podría sugerir que el representante ancestral del grupo Pepo pudo haberse extinguido, y a pesar de que Kistler *et al.*, (2015) propone esta extinción durante el Holoceno, los resultados de este trabajo sugieren que posiblemente fue durante el Pleistoceno. Sin embargo es importante realizar estudios poblacionales dentro de este grupo, para conocer mejor la relación más actual y considerando también el linaje paterno ya que este trabajo refleja solo la historia del cloroplasto heredado vía materna.

Otra especie controversial es *C. moschata* ya que presenta gran diversidad morfológica, y debido a que su cultivo se extiende desde el norte de México hasta Centroamérica, aún no se llega a un acuerdo formal de su ancestro o su origen. En la filogenia generada en este trabajo, *C. moschata* se agrupó dentro del grupo *Argyrosperma*, lo cual coincide con lo reportado en todos los trabajos previos (Wilson *et al.*, 1992; Sanjur *et al.* 2002; Montes y Eguiarte, 2002; Zheng *et al.*, 2013, Kistler *et al.*, 2015), así mismo las fechas de divergencia para estos dos linajes donde se encuentran las especies domesticadas fue de 760 mil años, mientras que para el linaje de la

subespecies silvestre *sororia* fue de 1.19 Ma. Estos resultados sugieren una estrecha relación evolutiva entre *C. moschata* y el grupo *Argyrosperma*. Sin embargo, son necesarios estudios a nivel poblacional y nivel nuclear para comprender mejor esta relación ya que se ha sugerido que el ancestro de *C. moschata* derivó de un taxa silvestre cercanamente relacionado con *C. argyrosperma ssp. sororia* posiblemente en América del sur o cercana a la región de Colombia (Nee, 1990; Wessel-Beaver, 2000; Sanjur *et al.*, 2002).

Por otro lado, es bien sabido que *C. argyrosperma ssp. sororia* es el pariente silvestre de *C. argyrosperma ssp. argyrosperma* (Nee, 1990; Lira *et al.*, 1995; Sanjur *et al.*, 2002), lo cual también es corroborado en este estudio filogenético. Así mismo su distribución está estrechamente ligada por lo que se ha propuesto que su centro de domesticación fue en la zona sur de México (Lira *et al.*, 2009), donde se han encontrado registros arqueológicos más antiguos para esta especie, en la cueva de Romero, Tamaulipas, México, con una fecha aproximada de 5,100 años (Smith, 1997b).

La especie *C. lundelliana* quedó dentro del grupo *Okeechobeensis*. Esta relación difiere con lo encontrado por Walters y Dekker (1993) quienes indican que *C. lundelliana* es una especie distinta del grupo *Okeechobeensis* y se relacionan estrechamente con los otros taxa del género. Sin embargo, la relación filogenética de este grupo coincide con las topologías de los trabajos de Wilson *et al.* (1992), Zheng *et al.* (2013) y Kistler *et al.* (2015).

Estos últimos autores sugieren que el grupo *Okeechobeensis* posiblemente sufrió una reciente fragmentación de una población contigua, ya que encontraron que estos tres taxa difieren únicamente en seis variantes nucleótidas a lo largo de todo el genoma de cloroplasto (156.6 Kb). Esto concuerda con los resultados de la estimación de los tiempos de divergencia ya que se encontró que el grupo *Okeechobeensis* es el

más reciente del género *Cucurbita*, divergiendo del grupo *Argyrosperma* hace 2 Ma de años, surgiendo el linaje de *C. o. ssp. okeechobeensis* hace 280 mil años y los linajes de *C. lundelliana* y *C. o. ssp. martinezii* hace 50 mil años.

Así mismo, este grupo presenta características particulares en cuanto a la forma y color de la semilla, la cual es grisáceo-verdoso, y *C. okeechobeensis* presenta un color más claro en la corola de la flor. Por otro lado, *C. o. ssp. okeechobeensis* es una especie restringida a la península de Florida en Estados Unidos, mientras que *C. o. ssp. martinezii* crece en la región de Veracruz y algunas partes de Chiapas, y *C. lundelliana* se encuentra en la península de Yucatán y Centroamérica (Nee, 1990; Lira *et al.* 1995), por lo que su población ancestral posiblemente se distribuía a lo largo del golfo de México. Por lo tanto sería importante reevaluar a *C. lundelliana* como parte del grupo *Okeechobensis* y si es posible considerarla como subespecie.

En este trabajo se obtuvo una mejor resolución filogenética y una aproximación del tiempo en el que las especies del género divergieron, sin embargo es necesario realizar estudios que reconstruyan la posible distribución en el pasado y la filogeografía de los taxa del género *Cucurbita* para entender mejor su historia evolutiva, así como el proceso de domesticación que dio lugar a las especies que conocemos hoy en día.

TASAS DE SUSTITUCIÓN MOLECULAR Y DIVERSIFICACIÓN

A pesar de que la variación en las tasas de evolución molecular es poco entendida, particularmente en plantas, se ha observado que existen diferencias en las tasas de sustitución entre mitocondria, cloroplasto y núcleo, y se ha sugerido que los rasgos de historia de vida se correlacionan con la tasa de evolución molecular, y que difiere entre grupos taxonómicos (Wolfe *et al.*, 1987). Esto ha llevado a observar diferencias en las tasas de sustitución entre las plantas anuales y perennes (Gaut *et al.*, 1992; Eguiarte *et*

al., 1994; Laroche y Bousquet, 1999) y entre leñosas y herbáceas, mostrando estas últimas una mayor varianza en las tasas de sustitución (Gaut *et al.*, 1992; Laroche *et al.*, 1997).

En este trabajo se observó que las tasas de sustitución fueron heterogéneas entre las diferentes regiones analizadas y entre las diferentes especies en el género, sin encontrarse diferencias significativas. Sin embargo la tasa de sustitución de la región *atpI-atpH* (la cual es una región no codificante y altamente variable) fue mayor, mientras que en las regiones codificantes (*rbcL* y *matK*) su tasa se mantuvo más baja y constante.

Aunque no se registraron diferencias significativas, *Cucurbita moschata* presentó la tasa de sustitución molecular más alta, de 0.0018 sustituciones por sitio por millón de años, lo cual, en un principio, podría estar relacionado a su forma de vida anual u otras características de su ciclo de vida y ecología (Gaut *et al.* 2011). Otro factor a considerar es el manejo intensivo de su cultivo y su gran diversidad morfológica, ya que se ha observado que existe una correlación entre la tasa de sustitución, los cambios morfológicos y las tasas de diversificación en distintas familias de angiospermas, lo cual sugiere que la tasa de evolución a nivel molecular puede influenciar la evolución a nivel morfológico (Barraclough y Savolainen, 2001).

Cucurbita cordata fue la segunda especie más alta, aunque mucho más baja que *C. moschata*, (con 0.0009 sustituciones por sitio por millón de años) la cual es una especie perenne, silvestre y restringida a la península de baja California. También se observó que en algunos taxa anuales la tasa de sustitución fue mucho menor o igual en comparación con algunos taxa perennes, por lo que estos resultados no correlacionaron con la forma de vida o distribución. Sin embargo, esto podría estar indicando casos independientes para cada taxón ya que existen otros factores que pueden estar influenciando las tasas de sustitución molecular, como lo son la deriva

génica y la selección natural, que de acuerdo con la teoría casi neutral de Otha, si el tamaño efectivo de una población es grande, las mutaciones casi neutrales van a ser purgadas por selección natural, pero si el tamaño efectivo es pequeño las mutaciones pueden fijarse por deriva genética, por lo que esta teoría indica una relación inversa entre las tasas de sustitución y el tamaño efectivo de la población (Otha, 1996). También se ha propuesto que las tasas de sustitución se ven influenciadas por la variación en los mecanismos de reparación del ADN ya que estos varían entre distintos linajes y por factores como la radiación UV y la temperatura (Britten, 1986).

Por lo anterior, y considerando que estos resultados solo son a nivel cloroplasto, es importante analizar más a fondo las tasas de sustitución nucleotídica, tanto de mitocondria como de núcleo, para conocer si los diferentes factores antes mencionados están correlacionados ya que esto nos podría dar una idea de los atributos de historia de vida que están influyendo en la diversificación en los diferentes taxa del género *Cucurbita*.

En cuanto a la tasa de diversificación, esta fue de 0.320 spp. por millón de años, que es similar al género *Acacia* (0.340 spp./Ma) (Gómez-Acevedo *et al.*, 2010), intermedia en comparación con el género *Agave* (0.452 spp./Ma) y el género *Yucca* (0.266 spp./Ma) (Good-Avila *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006), pero es alta en comparación con el género *Abies* (0.0205 spp./Ma) (Aguirre *et al.*, 2012) y el género *Bursera* (0.0833 spp./Ma) (De-Nova *et al.*, 2011). Dentro del género *Cucurbita*, el grupo con una mayor tasa de diversificación fue *Okeechobeensis* (3.923 spp./Ma) posiblemente debido a que es el grupo más reciente, seguido del grupo *Pepo* (1.183 spp./Ma) el cual posee la mayor cantidad de taxa del género. Los grupos *Argyrosperma* y *Maxima* presentaron tasas similares, 0.923 spp./Ma y 0.858 spp./Ma respectivamente, ambos grupos poseen especies domesticadas.

Estas tasas de diversificación podría estar relacionada con la especiación durante el periodo cuaternario en el Pleistoceno, del que se habló anteriormente, en el que se registró el surgimiento de los grupos actuales de *Cucurbita*.

La diversificación del género *Cucurbita* también estar relacionada a la aparición de polinizadores de los géneros *Peponapis* y *Xenoglossa*, los cuales están especializados en la polinización de las plantas de calabaza, ya que se ha estudiado que estas abejas tienen distribuciones similares y están adaptadas a la floración y a la forma del polen (Hurd *et al.*, 1971).

Así mismo, se ha observado que ciertas especies de *Peponapis* comparten nicho con algunas especies de *Cucurbita*, principalmente las especies que se encuentran en los desiertos como *C. palmata* y *C. digitata* (Giannini *et al.*, 2011). Por otro lado, el tiempo de divergencia estimado para la tribu *Eucerini*, a al que pertenecen estos géneros de abejas, fue estimada entre 7.45 y 9.26 Ma (Cardinal y Danforth, 2013) edad similar a la calculada en este estudio para el género *Cucurbita*.

Por lo anterior, este estudio sugiere que la diversificación del género está más asociada a los polinizadores que a los posibles dispersores (Megafauna de Norteamérica) que propone Kistler *et al.* (2015). Por lo que podría haber una coevolución entre el género *Cucurbita* y los polinizadores de los géneros *Peponapis* y *Xenoglossa*, lo cual sería interesante estudiar para comprender mejor esta cercana asociación y su importancia en la conservación y diversificación del género.

MITOCONDRIA

En el 2010 Alverson *et al.* secuenciaron el genoma mitocondrial de *Cucurbita pepo* ssp. *pepo* y de *Citrullus lanatus* (pepino). Ellos encontraron que el genoma mitocondrial de *C. pepo* contiene más secuencias de cloroplasto (alrededor de 29 regiones no codificantes) que lo que sucede en las mitocondrias de otras angiospermas. Dentro de

estas regiones duplicadas se encuentra la región *trnL-trnF*. Misma que en este trabajo se amplificó accidentalmente en la mitocondria en algunos de los taxa del género *Cucurbita*, siguiendo las condiciones de PCR reportadas previamente para cloroplasto.

Esto tiene fuertes implicaciones al momento de realizar análisis filogenéticos ya que esta región se encuentra altamente conservada en el cloroplasto mientras que en la mitocondria se encuentra invertida y probablemente no sea una región funcional.

Los métodos filogenéticos asumen que dos genes son homólogos, por lo que el utilizar secuencias no homólogas sesga la topología del árbol y las estimaciones del tiempo de divergencia, ya que a lo largo del tiempo la similitud de dos genes puede ser erosionada de manera que los datos de la secuencia en sí no tienen suficiente información acerca de la relación entre los dos genes, así mismo puede acumular demasiada variación ocasionando una sobreestimación de la variación presente en cada especie (Lemey *et al.*, 2009).

Sin embargo es difícil identificar si las secuencias reportadas previamente en el GenBank para esta región corresponden a mitocondria o cloroplasto, motivo por el cual se decidió descartar el uso de este marcador en la filogenia del cloroplasto.

La inversión de la región *trnL-trnF* sucedió solamente en los taxa de los grupos Pepo, *Argyrosperma* y *Okeechobeensis*, los cuales, de acuerdo con la filogenia de cloroplasto son de divergencia reciente y comparten un ancestro común. Sin embargo también ocurrió algunas secuencias de *C. maxima* comerciales y una colectada en Oaxaca.

En la topología generada para este marcador se observó que las secuencias de *C. maxima* se agruparon con los haplotipos de *C. moschata*, lo que podría deberse al manejo de estas especies domesticadas, a una mala identificación de semillas o a una posible hibridación entre estas dos especies (P. Hernández-Vargas, en preparación), por lo que se sugiere utilizar marcadores nucleares para poder corroborar la identidad

de estas muestras. En cuanto a los demás taxa, se observó la diferenciación de los tres grupos (Pepo, *Argyrosperma*, *Okeechobeensis*) como en la generada por el cloroplasto. Aunque no fue suficiente la resolución dentro del grupo Pepo, posiblemente a su reciente divergencia o a la baja resolución de este marcador.

Sin embargo, no hay que descartar del todo a esta región de la mitocondria ya que podría ser utilizada en estudios filogeográficos para evaluar diferencias entre poblaciones de distintas especies del género *Cucurbita*.

CONCLUSIONES

1. Los marcadores de cloroplasto *atpI-atpH*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA* aportaron una buena resolución para el estudio de las relaciones filogenéticas del género *Cucurbita*.
2. Se generó una filogenia molecular de cloroplasto mejor resuelta que las previamente publicadas, en la que se observó una clara definición de los grupos pertenecientes al género *Cucurbita* con altos valores de soporte de ramas.
3. Dentro del grupo Pepo, se observó la diferenciación de las subespecies mexicanas de las subespecies y variedades de E. U. A., lo cual soporta los dos eventos de domesticación en este grupo.
4. *C. moschata* y *C. lundelliana* se observaron dentro de los grupos *Argyrosperma* y *Okeechobeensis*, respectivamente, por lo que se propone su inclusión formal a estos grupos y su reevaluación como posibles subespecies.
5. Se obtuvo una fecha de divergencia estimada de aproximadamente 9.64 Ma para el género *Cucurbita*. Similar al de otros taxa endémicos de América y al de sus polinizadores, lo que sugiere un proceso de coevolución polinizador-planta.
6. Los grupos actuales del género *Cucurbita*, divergieron durante el Pleistoceno, entre 1.75 Ma y 280 mil años atrás.
7. El grupo *Okeechobeensis* es el grupo más reciente del género *Cucurbita* de acuerdo con las fechas estimadas de divergencia con 280 mil años.
8. La región no codificante y altamente variable *atpI-atpH* presentó la mayor tasa de sustitución en comparación con las regiones codificantes *rbcl* y *matK*.
9. *C. moschata* presentó una tasa de sustitución molecular más alta seguida de *C. cordata*. Aunque no se observó una correlación con su ciclo de vida o distribución, es posible que esté relacionado a su diversidad morfológica o su manejo intensivo.

10. La tasa de diversificación del género *Cucurbita* fue de 0.320 spp/Ma, similar a otros géneros de la flora mexicanas.
11. La región *trnL-trnF* originaria del cloroplasto se encontró duplicada la mitocondria en los taxa que pertenecen a los grupos mesofíticos Pepo, *Argyrosperma* y *Okeechobeensis*. Encontrándose la misma topología que con el cloroplasto.

PERSPECTIVAS

1. Incluir las especies *C. radicans* y *C. x scabridifolia* al estudio de las relaciones filogenéticas del género. Así como utilizar preferentemente material fresco en próximos estudios de amplificación de ADN.
2. Realizar las inferencias filogenéticas incluyendo ADN mitocondrial y ADN de núcleo, ya que el cloroplasto solo refleja la historia del linaje materno.
3. Evaluar las tasas de sustitución molecular en función a los posibles factores que las pudieran influenciar como temperatura, selección, deriva génica, diversificación etc. y analizar si correlacionan con alguno de estos.
4. Realizar estudios de coevolución entre el género *Cucurbita* y los polinizadores del género *Peponapis* y *Xenoglossa*.
5. Hacer reconstrucciones de las distribuciones ancestrales de las especies del género para inferir su historia de su evolutiva, por ejemplo, identificar sitios de refugio y diversificación de las especies silvestres.
6. Realizar estudios a nivel poblacional de las especies domesticadas en relación a sus parientes silvestres más cercanos.
7. Investigar más a fondo la duplicación de secuencias de cloroplasto en mitocondria y si esto podría tener implicaciones de selección o algún cambio de hábito en el género *Cucurbita*.

REFERENCIAS

- Aguirre-Planter, E., Jaramillo-Correa, J. P., Gómez-Acevedo, S., Khasa, D. P., Bousquet, J. and Eguiarte, L. E. (2012). Phylogeny, diversification rates and species boundaries of Mesoamerican firs (*Abies*, Pinaceae) in a genus-wide context. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 263–274.
- Alverson, A. J., Wei, X., Rice, D. W., Stern, D. B., Barry, K. y Palmer, J. D. (2010). Insights into the Evolution of Mitochondrial Genome Size from Complete Sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Molecular Biology And Evolution*, 27 (6):1436–1448.
- Andres, T. C. (1987). *Cucurbita fraterna*, the closest wild relative and progenitor of *C. pepo*. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 10: 69-71.
- Bailey, N. T. J. (1964). The elements of stochastic processes with applications to the natural sciences. Wiley, New York.
- Barraclough, T. G. and Savolainen, V. (2001). Evolutionary rates and species diversity in flowering plants. *Evolution* 55 (4): 677-683.
- Barraclough T. G. and Nee S. (2001). Phylogenetics and speciation. *Trends Ecol Evol*, 16:391-399.
- Britten, R. J. (1986). Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science*, 231 (4744):1393-1398.
- Cardinal, S. and Danforth, B. N. (2013). Bees diversified in the age of eudicots. *Proc R Soc B*, 280: 20122686.

- Castresana, J. (2010). Reconstrucción filogenética, diversificación y especiación. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, 165: 20-22.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G. (1993). Phylogenetics of seed plants an analysis of nucleotide-sequences from the plastid gene *rbcl*. Ann. Miss. Botanical Gard. 80: 528-580.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772 p.
- De-Nova, J. A., Medina, R., Montero, J. C., Weeks, A., Rosell, J. A., Olson, M. E., Eguiarte, L. E. and Magallón, S. (2011). Insights into the historical construction of species-rich Mesoamerican seasonally dry tropical forests: the diversification of *Bursera* (Burseraceae, Sapindales). New Phytologist, 193 (1): 276–287.
- Decker, W. D. (1990). Evidence for Multiple Domestications of *Cucurbita Pepo*. in Biology and Utilization of the Cucurbitaceae, eds. Bates, D. & Jeffrey, C. (Cornell Univ. Press, Ithaca, New York), pp.96–101.
- Decker, D.S., Walters, T.W., Cowan, C.W. and Smith, B.D. (1993). Isozymic chacterization of wild populations of *Cucurbita pepo*. Journal of Ethnobiology. Vol. 13: 55-72.
- Doyle, J.J. y Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19:11-15.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 Molecular Biology And Evolution 29:1969-1973.
- Eguiarte, L. E., Duvall, M. R., Learn, G.H., Jr. and Clegg, M.T. (1994) The systematic status of the Agavaceae and Nolinaceae and related Asparagales in the

- Monocotyledons: An analysis base on the *rbcl* gene sequence. Boletín de la Sociedad Botánica de México 54: 35-56.
- Eguiarte, L. E. (1995). Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de las familias Agavaceae sensu Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. Boletín de la Sociedad Botánica de México 56: 45-56.
- Eguiarte, L., Castillo, A. y Souza, V. (2003). Evolución molecular y genómica en angiospermas. Interciencia. Asociación Interciencia Venezuela, 28(3): 141-147.
- Felsenstein, J. (1981). "Evolutionary trees from dna sequences: a maximum likelihood approach," Journal of Molecular Evolution, 17: 368–376.
- Gaut, B. S., Muse, S. V., Clark, W. D. and Clegg, M. T. (1992). Relative Rates of Nucleotide Substitution at the *rbcl* Locus of Monocotyledonous Plants. Journal of Molecular Evolution, 35 (4): 292-303.
- Gaut, B., Yang, L., Takuno, S., and Eguiarte, L. E. (2011). The patterns and causes of variation in plant nucleotide substitution rates. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 42: 245-266.
- Gernandt, S., Flores O. y Goyenechea I., (2007). Inferencia filogenética mediante secuencias de DNA: un ejemplo con los pinos piñoneros. En: A. Contreras-Ramos, C. Cuevas, I. Goyenechea y U. Iturbe (eds.). La Sistemática: base del conocimiento de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. Pp. 55-65 Recuperado de: http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_SistBioAnimal/Irene_Mayer/GerZerG2007Inferencia.pdf

- Giannini, T.C., Lira-Saade, R., Ayala, R., Saraiva, A.M., Alves-dos-Santos, I. (2011). Ecological niche similarities of *Peponapis* bees and non-domesticated *Cucurbita* species. *Ecological Modelling*, 222: 2011–2018.
- Gordon and Green (2013). Consed: A Graphical Editor for Next-Generation Sequencing. *Bioinformatics*. 29 (22):2936-2937.
- Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. and Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS*, 103 (24): 9124–9129.
- Gómez-Acevedo, S., Rico-Arce, L., Delgado-Salinas, A., Magallón, S. and Eguiarte, L. E. (2010). Neotropical mutualism between Acacia and Pseudomyrmex: Phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 393–408.
- Granados-Sánchez, D. y López-Ríos, G. F. (1999). Un recurso forestal de zonas áridas: Calabacilla loca (*Cucurbita foetidissima* H.B.K.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 5(1): 35-40.
- Guindon, S., Gascuel, O. (2010). “A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood”. *Systematic Biology* 52 (5): 696-704.
- Hamilton, M. B. (1999). Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Blackwell Science Ltd, Molecular Ecology* 8:521-523.
- Hastings, W. K. (1970). “Monte Carlo sampling methods using Markov Chains and their applications,” *Biometrika* 57(1): 97–109.
- Hedrick, P. W. (2011). *Genetic of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts. pp. 295-432.

- Hernández-Hernández, T., Brown, J. W., Schlumpberger, B. O., Eguiarte, L. E. and Magallón, S. (2014). Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist*, 202 (4): 1382–1397.
- Hernández-Vargas, P. (en preparación). Documentación sobre la existencia de *Cucurbita maxima* Duch Ex Lam (Cucurbitaceae) en México. Tesis de Licenciatura inédita. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Estado de México.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-912.
- Hurd, P. D., JR., E. G. Linsley, y T. W. Whitaker (1971). Squash and gourd bees (Peponapis, Xenoglossa) and the origin of the cultivated *Cucurbita*. *Evolution* 25: 218–234.
- Jansen, T., Foster P., Levin, M. A., Oelke, H., Hurles, M., Renfrew, C., Weber, J., Olek, K. (2002). Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (16): 10905–10910.
- Jeffrey, C. (1990). Systematics of the Cucurbitaceae: An overview. In *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. D.M. Bates, R.W. Robinson and C. Jeffrey (eds.), Cornell University Press, Ithaca, New York. pp. 3-9.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217(5129):624-626.
- Kistler, L., Montenegro, A., Smith, B.D., Gifford, J.A., Green, R.E., Newsom, L.A. and Shapiro, B. (2014). Transoceanic drift and the domestication of African bottle gourds in the Americas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(8): 2937-2941.

- Kistler, L., Newsoma, L. D., Ryana, T. M., Clarke A. C., Smith, B. C., and Perrya, G. H. (2015). Gourds and squashes (*Cucurbita spp.*) adapted to megafaunal extinction and ecological anachronism through domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(49): 15107-15112.
- Kocyan, A., Zhang, L-B, Schaefer, H., Renner, S.S. (2007). A multilocus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 553–577
- Klug, W. S., Cummings, M. R. y Spencer, C. A. (2006). *Conceptos de Genética*. Pearson Educación, S. A., Madrid. 920 p.
- Kumar, S. (2003). Molecular clocks: four decades of evolution. *Nature Rev. Genet.* 6(8): 554-566.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Laroche, J., Li, P., Maggia, L., Bousquet, J. (1997). Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (11): 5722–5727.
- Laroche, J., Bousquet, J. (1999). Evolution of the mitochondrial rps3 intron in perennial and annual angiosperms and homology to nad5 intron 1. *Mol. Biol. Evol.* 16 (4): 441-452.
- Lemey, P., Salemi, M. y Vandamme, A. (2009). *The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press. 723p.

- Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Lira, R., Andres, T. C. and Nee, N. (1995). *Cucurbita* L. In *Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica: Cucurbita, Sechium, Sicana y Cyclanthera*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 9, R. Lira (ed.), International Plant Genetic Resources Institute, Rome. pp. 1-115.
- Lira, S. R. (2001). Flora del bajío y de regiones adyacentes. Cucurbitaceae. Unidad de Biotecnología y Prototipos Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala Tlalnepantla, Méx. 120 p.
- Lira, R. and Caballero, J. (2002). Ethnobotany of the wild mexican Cucurbitaceae. *Economic Botany* 56(4): 380–398.
- Lira, R., Eguiarte F., L. y Montes H., S. (2009). Proyecto Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros *Cucurbita* y *Sechium* que crecen y/o se cultivan en México, Informe Final. CONABIO, México, D.F. 107 p.
- Lira, S. R., Montes-Hernández, S. (1992). Cucurbits (*Cucurbita spp.*) Neglected crops: 1492 from a different perspective. pp. 63-77.
- Lira, R., Eguiarte, L., Montes, S., Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-García Marín, P., Quesada, M. (2016). *Homo sapiens–Cucurbita* interaction in Mesoamerica: Domestication, Dissemination, and Diversification. Editors Lira, R., Casas, A. and Blancas, J. *Ethnobotany of Mexico. Interactions of People and Plants in Mesoamerica*. Springer Science+Business Media. New York. pp. 389-399.

- Loewe, L. and Scherer, S. (1997). Mitochondrial Eve: the plot thickens. *Trends Ecol. Evol.* 12(11): 422-423.
- Magallón, S. and Sanderson, M. J. (2001). Absolute diversification rates in angiosperm clades. *Evolution*, 55 (9):1762–1780.
- Mayr, E. (1969). The biological meaning of species. *Biological Journal of the Linnean Society*. 3 (1): 311–320.
- Meléndez-Hevia, E., Raposo, R. R., Meléndez, R., Cabezas, H. (1997). Revisión de los Métodos Filogenéticos de Secuencias: Una Crítica a la Teoría de Kimura sobre el neutralismo de la Evolución Molecular. *Revista de la Academia Canaria de Ciencias*, 9: 65-86.
- Moreno, M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sec. Biol.)*, 100 (1-4): 57-58.
- Nee, M. (1990). The Domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44(3): 56-68.
- Otha, T. (1996). The current significance and standing of neutral and nearly neutral theories. *BioEssays* 18 (8): 673-677.
- Piperno, D. R., Andres, T. C. and Stothert, K. E. (2000). Phytoliths in *Cucurbita* and other Neotropical Cucurbitaceae and their Occurrence in Early Archaeological Sites from the Lowland American Tropics. *Journal of Archaeological Science*. 27:193–208.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. & Drummond, A.J. (2014). Tracer v1.6. Recuperado de: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16 (6): 276-277.

- Ricklefs, R. E. (2007). Estimating diversification rates from phylogenetic information. *Trends Ecol Evol*, 22: 601-610.
- Rocha, M., Good-Ávila, S., Molina-Freaner, F., Arita, H. T., Castillo, A., García-Mendoza, A., Silva-Montellano, A., Gaut, B. S., Souza, V. and Eguiarte, L. E. (2006). Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso, Rancho Santa Ana Botanic Garden*, 22: 329–344.
- Rodríguez-Moreno, L., Gonzalez, V.M., Benjak, A., Marti, M.C., Puigdomenech, P., Aranda, M.A. and Garcia-Mas, J. (2011). Determination of the melon chloroplast and mitochondrial genome sequences reveals that the largest reported mitochondrial genome in plants contains a significant amount of DNA having a nuclear origin. *BMC Genomics* 12(1): 424.
- Rodríguez, E. (2013). Conceptos básicos de filogenética molecular. Informe final. CINVESTAV Tamaulipas. Recuperado de: http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/Cursos2RMBF/PDFs/C1/Tema1_Intro2MolPhylo.pdf
- Ronquist, F., Teslenko, M., P. van der Mark, Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. and Huelsenbeck. J. P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3):539–542.
- Sanjur, O.I., D.R. Piperno, T.C. Andres and L. Wessel-Beaver (2002). “Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin”, *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 99: 535-540.

- Schaal, B. A., D.A., Hayworth, K. M., Olsen, J. T., Rauscher y W. A. Smith (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- Schaefer, H., Heibl, C. and Renner, S. S. (2008). Gourds afloat: a dated phylogeny reveals an Asian origin of the gourd family (Cucurbitaceae) and numerous oversea dispersal events. *Proceedings The Royal Society B*. 276: 843–851.
- Shaw J., Lickey E., Schilling E. y Small R. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94(3): 275–288.
- Smith, B.D. (1997)a. The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science*, 276: 932–934.
- Smith, B.D. (1997)b. Reconsidering the Ocampo caves and the era of incipient cultivation in Mesoamerica. *Latin American Antiquity*, 8 (4): 342-383.
- Smith, B. D. (2006). Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (33): 12223-12228.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doley, J. J. (1998). *Molecular Systematics of plants II: DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, U. E. A. pp. 7-15.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E., Savolainen, V., Crane, P. R. and Barraclough, T. G. (2002). Rate heterogeneity among lineages of tracheophytes: Integration of molecular and evidence for molecular living fossils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (7): 4430-4435.

- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. and Hillis, D. M. (1992). Phylogenetic inference. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, pp. 407–514.
- Taberlet, P., Gielly L., Pautou G. y Bouvet J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.
- Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Toledo, V. (1976). Los cambios climáticos del Pleistoceno y sus efectos sobre la vegetación tropical cálida y húmeda de México. Tesis, maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 73 p.
- Toledo, V. (1982). Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. In *Biological diversification in the tropics*. Editor Prance, G. T. Proceedings of the fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology. Columbia University Press, New York. p. 93-111.
- Valcárcel, V. (s.f.). TEMA 1. ¿QUÉ ES UNA FILOGENIA MOLECULAR Y PARA QUÉ SIRVE? Manual para análisis filogenéticos moleculares. Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado de: https://www.uam.es/docencia/ocw/cursos/valcarcelfilogenia/1_W_Text_1.pdf
- Vela, E. (2010). La calabaza, el tomate y el frijol. *Arqueología Mexicana*. Catálogo especial 36, pp. 14-41
- Gámez, N., Nihei, S., Scheinvar, E., Morrone, J. (2016). A temporally dynamic approach for cladistic biogeography and the processes underlying the biogeographic patterns

of North American deserts *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* (sin publicar).

Walters, T. W. and Dekker-Walters, D. S. (1993). Systematics of the Endangered Okeechobee Gourd (*Cucurbita okeechobeensis*: Cucurbitaceae). *Systematic Botany*. 18 (2): 175-187.

Wessel-Beaver, L. (2000). Evidence for the Center of Diversity of *Cucurbita moschata* in Colombia. *Cucurbit Genetics Cooperative, Report 23*: 54–55.

Wilson, H.D., Doebley, J. and Duvall, M. (1992). Chloroplast DNA diversity among wild and cultivated members of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 84: 859-865.

Whitaker, T. W. y W. P. Bemis (1965). Evolution in the genus *Cucurbita*. *Evolution* 18: 553-559.

Wolfe, K. H., Li, W. H., and Sharp, P. M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.. USA*, 84 (24): 9054-9058.

Wolfe, K. H., Gouy, M. L., Yang, Y. W. (1989). Date of the monocot dicot divergence estimated from chloroplast dna-sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci.. USA* 86: 6201-6205.

Zheng, Y. H., Alverson A. J., Wang Q. F. and Palmer J. D. (2013). Chloroplast phylogeny of *Cucurbita*: Evolution of the domesticated and wild species. *Journal of Systematics and Evolution* 51 (3): 326–334.

ANEXOS

Anexo 1. Fotos e imágenes de las especies del género *Cucurbita*.

(* Fotos tomadas por Dr. Gabriela Castellanos, M. en C. Guillermo Sánchez y Leslie Paredes)

Grupo Digitata



Grupo Foetidissima





C. ficifolia



Grupo Maxima





Grupo pepo



Grupo Argyrosperma





Grupo Okeechobeensis



Anexo 2. Taxa y tipo de muestras obtenidas para la amplificación de ADN de cloroplasto.

En rojo los taxa que amplificaron para mitocondria con la región *trnL-F* de cloroplasto.

Taxa	Accesión	Individuos procesados	Tipo de muestra	Localidad
<i>C. ecuadorensis</i>	1139559	2	herbario	Michigan E.U.
<i>C. maxima andreana</i>	1145347	1	herbario	Michigan E.U.
<i>C. maxima andreana</i>	1307809	1	herbario	New York E.U.
<i>C. pepo ovifera</i>	1139579	1	herbario	Michigan E.U.
<i>C. pepo ovifera</i>	654196	1	herbario	E.U. comprada en D.F.
<i>C. pepo texana</i>	975511	2	herbario	Texas E.U.
<i>C. lundelliana</i>	838534	1	herbario	Campeche Calakmul
<i>C. lundelliana</i>	1159948	1	herbario	Michigan E.U.
<i>C. lundelliana</i>	798181	1	herbario	Othon P. Blanco, Q. Roo
<i>C. lundelliana</i>	Lun1	1	colectada	Pueblo de Morelia, Campeche
<i>C. lundelliana</i>	Lun2	1	colectada	Chinchonal, Campeche
<i>C. palmata</i>	107343	1	herbario	San Felipe, Baja California
<i>C. cylindrata</i>	866756	1	herbario	Baja California Sur
<i>C. cordata</i>	1366873	1	herbario	Baja California Sur
<i>C. pedatifolia</i>	302141	1	herbario	Guanajuato
<i>C. pedatifolia</i>	1161736	1	herbario	San Luis Potosi
<i>C. pedatifolia</i>	698225	2	herbario	Oaxaca

<i>C. pedatifolia</i>	peda	1	colectada	San Juan Raya, Puebla
<i>C. o. martinezii</i>	Okee	1	colectada	Coatepec, Veracruz
<i>C. maxima</i>	BG756	5	B.G. Celaya Jalisco	Guanajuato
<i>C. pepo pepo</i>	BG569	10	B.G. Celaya Jalisco	Ojuelos, Jalisco
<i>C. pepo pepo</i>	PpCh	5	Colectada	San Cristobal de las Casas Chiapas
<i>C. ficifolia</i>	BG869	10	B.G. Celaya Jalisco	Chihuahua
<i>C. ficifolia</i>	BG761	10	B.G. Celaya Jalisco	Jalisco
<i>C. ficifolia</i>	Ftlax1	5	colectada	Tlaxcala
<i>C. ficifolia</i>	FCh	3	colectada	San Cristobal de las Casas Chiapas
<i>C. ficifolia</i>	FSA	1	colectada	San Andres Chiapas
<i>C. a. sororia</i>	BG955	1	B.G. Celaya Jalisco	Sinaloa
<i>C. a. sororia</i>	BG654	1	B.G. Celaya Jalisco	Chiapas
<i>C. a. sororia</i>	BG687	1	B.G. Celaya Jalisco	Jalisco
<i>C. foetidissima</i>	foeti	5	Colectada	Bocoyna, Chihuahua

<i>C. pepo fraterna</i>	fra 633	27	B.G. Celaya Jalisco	Tamaulipas
<i>C. pepo</i> cult. cocozelle	Ppc	2	comercial	E. U.
<i>C. pepo</i> cult. early prolific satraightneck	Peps	2	comercial	E. U.
<i>C. pepo</i> cult. black beuty zuchini	Pbbz	2	comercial	E. U.
<i>C. pepo</i> cult. delicata honey boat	Pdhb	2	comercial	E. U.
<i>C. palmata</i>	pal	1	colectada	Sonora
<i>C. digitata</i>	digi	1	colectada	Sonora
<i>C. moschata</i>	BG803	1	B.G. Celaya Jalisco	San Luis Potosi
<i>C. moschata</i>	BG228	1	B.G. Celaya Jalisco	Tamaulipas
<i>C. moschata</i>	cm	1	colectada	Oaxaca
<i>C. a. argyrosperma</i>	BG218	1	B.G. Celaya Jalisco	San Luis Potosi
Total		120		

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN de cloroplasto mini-prep con CTAB y cloroformo, Doyle y Doyle (1987) modificando.

1. Colocar alrededor de 1g de tejido fresco en un tubo ependorf de 2ml, poner dos balines, uno abajo y otro arriba del tejido (balín - tejido - balín).
2. Preparar un stock de CTAB 2X + Mercaptoetanol (25ml CTAB + 75µl mercapto para 25 muestras). Agregar a la solución 5 µl de ARNasa por muestra.
3. Agregar 900µl de CTAB-Mercapto-ARNasa a cada muestra.
4. Colocar tubos en el Tissue Lyser y activar para moler el tejido. Rotar los tubos cada 3 minutos, recorriéndolos una línea cada vez.
5. Incubar a 60° C durante 20 minutos.
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 ml. Cuidando que no se pasen los balines y tratando de recuperar la mayor cantidad de líquido posible.
7. Agregar 600 µl de cloroformo: octanol 24:1 a temperatura ambiente y agitar.
8. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4° C.
9. Trasladar el sobrenadante a un tubo recuperando de 450 µl.
10. Agregar 300 µl del volumen final de isopropanol frio para un tubo de 1.5 ml.
11. Dejar reposar de 2 hrs a 24 hrs en el Revco a -20° C.
12. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
13. Lavar la pastilla (pellet) con 500 µl de etanol frio a 60%, agitar levemente en vortex.
14. Centrifugar 13000 rpm por 5 minutos (repetir pasos 12 y 13, 2 veces).
15. Dejar secar la pastilla en la campana.
16. Resuspender la pastilla con 300 µl de agua irradiada (guardar en el refrigerador toda la noche).

Anexo 4. Procedimiento de extracción de secuencias de genomas reportados.

Se descargaron los genomas de las especies de interés (ver Anexo 5). Posteriormente se generó una base de datos de BLAST con los genomas de cloroplasto, utilizando el programa formatdb del paquete BLAST legacy. Se utilizó el programa blastn del paquete BLAST+ para realizar una búsqueda de cada secuencia con respecto a la base de datos generada, es decir, los genomas de cloroplasto. Generando coordenadas dentro de cada genoma donde se alinearon las secuencias de referencia, la cual fue una secuencia de *C. pepo* ssp. pepo para cada marcador. Para la búsqueda de BLAST se restringieron los resultados a aquellos alineamientos que tuvieran un e-value $< 1e-10$. Esto permitió eliminar resultados falsos y solo obtener los alineamientos entre secuencias homólogas. Finalmente, se utilizó el programa extractseq del paquete EMBOSS (Rice *et al.*, 2000) para extraer las regiones de interés dentro de cada genoma, utilizando las coordenadas obtenidas por el análisis de BLAST.

Anexo 5. Secuencias utilizadas para realizar la filogenia de cloroplasto del género *Cucurbita*.

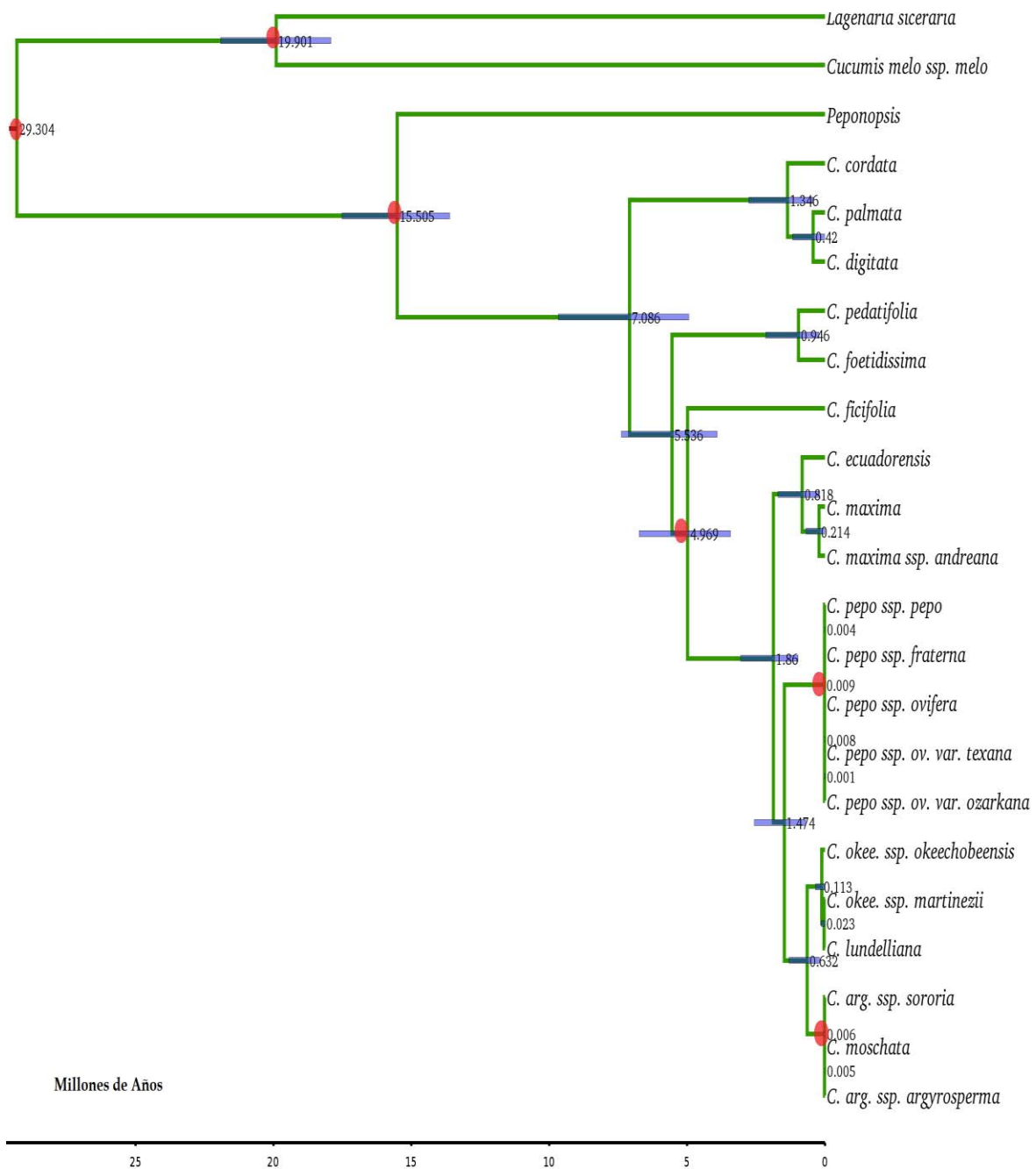
Con puntos negros, secuencias amplificadas; en rojo secuencias tomadas del genebank (Zheng et al., 2013); secuencias con * en azul extraídas del genoma de cloroplasto: *Cucurbita spp.* (Kistler et al., 2015), *Lagenaria siceraria* (Kistler et al., 2014) *Cucumis melo ssp. melo* (Rodríguez et al., 2011).

Taxa	<i>psbD-trnT</i>	<i>psbJ-petA</i>	<i>aptI-aptH</i>	<i>rpl20-rps12</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
<i>Cucurbita moschata</i>	•	•	•	•	HQ438603	HQ438614
<i>C. argyrosperma ssp. argyrosperma</i>	•	•	•	•	HQ438592	HQ438617
<i>C. argyrosperma ssp. sororia</i>	•	•	•	•	HQ438595	HQ438616
<i>C. maxima ssp. maxima</i>	•	•	•	•	HQ438602	HQ438627
<i>C. maxima ssp. andreana</i>	G 29254*	G 29254*	G 29254*	HQ438652	G 29254*	G 29254*
<i>C. ecuadorensis</i>	•	•	•	•	HQ438598	HQ438630
<i>C. pepo ssp. pepo</i>	•	•	•	•	HQ438611	HQ438623
<i>C. pepo ssp. fraterna</i>	•	•	•	•	HQ438608	HQ438622
<i>C. pepo ssp. ovifera</i>	•	•	•	•	HQ438609	HQ438626
<i>C. pepo ssp. ozarkana</i>	Ames 26890*	Ames 26890*	Ames 26890*	HQ438649	Ames 26890*	Ames 26890*
<i>C. pepo ssp. texana</i>	PI 614689*	PI 614689*	PI 614689*	HQ438648	PI 614689*	PI 614689*
<i>C. ficifolia</i>	•	•	•	•	HQ438599	HQ438631

<i>C. lundelliana</i>	•	•	•	•	HQ438601	HQ438619
<i>C. okeechobeensis</i> <i>ssp. martinezii</i>	•	•	•	•	HQ438604	HQ438621
<i>C. okeechobeensis</i> <i>ssp. okeechobeensis</i>	N/A (LAN, sample no. S-600)*	N/A (LAN, sample no. S-600)*	N/A (LAN, sample no. S-600)*	HQ438644	N/A (LAN, sample no. S-600)*	N/A (LAN, sample no. S-600)*
<i>C. cordata</i>	•	•	•	•	HQ438597	HQ438635
<i>C. palmata</i>	•	•	•	•	HQ438606	HQ438634
<i>C. digitata</i>	•	•	•	•	DQ536664	HQ438636
<i>C. foetidissima</i>	•	•	•	•	HQ438600	HQ438632
<i>C. pedatifolia</i>	•	•	•	•	HQ438607	HQ438633
<i>Peponopsis adhaerens</i>	---	---	---	DQ536580	DQ536716	DQ535766
<i>Lagenaria siceraria</i>	KJ399882.1*	KJ399882.1*	KJ399882.1*	KJ399882.1*	KJ399882.1*	KJ399882.1*
<i>Cucumis melo subsp.</i> <i>melo</i>	NC_015983*	NC_015983*	NC_015983*	NC_015983*	NC_015983*	NC_015983*

Anexo 6. Cronograma de tiempos de divergencia estimados para el género *Cucurbita* (Ma), utilizando fechas fósiles.

Los puntos de calibración se muestran en círculos rojos (ver Tabla 4).



Anexo 7. Tasas de sustitución molecular (sustituciones/sitio/millón de años) para cada taxón del género *Cucurbita* y cada región del cloroplasto.

En rojo la tasa de sustitución molecular promedio para el género

Taxa	Región de cloroplasto						Promedio
	<i>atpI- atpH</i>	<i>rbcL</i>	<i>psbD- trnL</i>	<i>psbJ- petA</i>	<i>rpl20- rps12</i>	<i>matK</i>	
<i>C. lundelliana</i>	0.0005	0.0002	0.0008	0.0007	0.0003	0.0004	0.0005
<i>C. o. ssp. martinezii</i>	0.0005	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0004	0.0005
<i>C. o. ssp. okeechobeensis</i>	0.0003	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0004	0.0004
<i>C. moschata</i>	0.0251	0.0002	0.0008	0.0006	0.0002	0.0004	0.0046
<i>C. a. ssp. argyrosperma</i>	0.0071	0.0002	0.0008	0.0006	0.0002	0.0004	0.0016
<i>C. a. ssp. sororia</i>	0.0002	0.0002	0.0008	0.0006	0.0002	0.0004	0.0004
<i>C. pepo ssp. ovifera</i>	0.0002	0.0002	0.0009	0.0006	0.0005	0.0004	0.0005
<i>C. pepo ssp. fraterna</i>	0.0003	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0005	0.0005
<i>C. p. ssp. o. var. texana</i>	0.0004	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0004	0.0005
<i>C. p. ssp. o. var. ozarkana</i>	0.0004	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0004	0.0005
<i>C. pepo ssp. pepo</i>	0.0003	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0004	0.0004
<i>C. maxima</i>	0.0009	0.0002	0.0009	0.0007	0.0002	0.0004	0.0006
<i>C. maxima ssp. andreana</i>	0.0003	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0004	0.0004
<i>C. ecuadorensis</i>	0.0002	0.0002	0.0007	0.0008	0.0002	0.0004	0.0004
<i>C. ficifolia</i>	0.0003	0.0002	0.0008	0.0006	0.0002	0.0004	0.0004
<i>C. pedatifolia</i>	0.0002	0.0002	0.0007	0.0007	0.0008	0.0004	0.0005
<i>C. foetidissima</i>	0.0013	0.0002	0.0007	0.0009	0.0002	0.0004	0.0006
<i>C. digitata</i>	0.0003	0.0002	0.0008	0.0008	0.0002	0.0005	0.0005
<i>C. palmata</i>	0.0003	0.0002	0.0008	0.0007	0.0002	0.0004	0.0004
<i>C. cordata</i>	0.0002	0.0001	0.0008	0.0009	0.0022	0.0004	0.0008
Promedio	0.0019	0.0002	0.0008	0.0007	0.00035	0.0004	0.0007