



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Documentación sobre la existencia de
***Cucurbita maxima* Duch ex Lam.**
(Cucurbitaceae) en México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÍCOLA

P R E S E N T A:

PAULINA HERNÁNDEZ VARGAS

ASESOR: DR. RAFAEL LIRA SAADE

CO ASESOR (S): DRA. GLORIA SOLARES DÍAZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Mi más profundo y sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en especial a la carrera de Ingeniería Agrícola por haber recibido de ella mi formación profesional gracias a los excelentes profesores que la respaldan.

Al proyecto CONABIO KE 004, Diversidad genética de las especies de *Cucurbita* en México e hibridación entre platas genéticamente modificadas y especies silvestres de *Cucurbita*.

Al Dr. Rafael Lira Saade por permitirme formar parte de este proyecto, por su dedicación, orientación, enseñanzas, apoyo y paciencia para poder lograr la culminación de este trabajo.

A la Dra. Gloria Solaes Díaz, por apoyarme durante estos 5 años, no solo como profesora sino como amiga, muchas gracias.

Al Dr. Luis Eguiarte Fruns y a la Dra. Valeria Sousa Saldívar por abrirme las puertas de su laboratorio para poder realizar gran parte de este trabajo y por el apoyo económico brindado.

Al laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, del Instituto de ecología de la UNAM, en especial a la Dra. Gabriela Castellanos Morales por su apoyo, paciencia y amistad, a los técnicos del laboratorio a la Dra. Erika Aguirre Planter y a la Dra. Laura Espinosa Asuar por brindarme un espacio y los materiales para este proyecto. Al Dr. Salvador Montes por su apoyo y colaboración a este trabajo.

Un agradecimiento especial al Team Calabaza por todo su apoyo incondicional, al M.C. Guillermo Sánchez de la Vega por sus infinitas pláticas que me llenaban de conocimiento pero sobre todo por su gran amistad, a la Biól. Helena Hernández por enseñarme todo lo que se de laboratorio, por su paciencia y amistad, a la Biól. Leslie Paredes (calabacita tierna) por todos sus consejos, apoyo, amistad y por todos los buenos momentos y a la Biól. Karen Mondragón por toda su buena vibra y amistad hacia mí. A todos mis compañeros de laboratorio por sus comentarios positivos y sus consejos.

Me gustaría que estas líneas también sirvieran para expresar mi agradecimiento a todos los herbarios que me abrieron las puertas para poder realizar este trabajo, al Banco de Germoplasma del INIFAP Celaya, por sus donaciones.

A todas las personas que colaboraron en la investigación con entrevistas, visitas guiadas a parcelas y por las donaciones de calabazas en los viajes de colecta.

Gracias

Dedicatorias

“Con la mayor gratitud, por todos tus esfuerzos, tus desvelos, tus sacrificios para que yo pudiera terminar mi carrera profesional. Por haberme dado todo y por enseñarme a luchar por lo que se quiere. Gracias por guiar mi camino y estar siempre junto a mí en los momentos difíciles”

Mi triunfo es tuyo

Quiero dedicar este proyecto de tesis a mi mamá, por todo su apoyo en cada paso que he dado, por su esfuerzo y paciencia, por enseñarme que no hay soluciones fáciles para problemas difíciles, por la confianza que ha depositado en mí para cumplir mis sueños académicos, que hoy con gran sacrificio los vemos culminados. Te amo mucho

A mis hermanos Guillermo y Lizet por que han estado conmigo siempre apoyándome incondicionalmente, por tus consejos, por todos los buenos momentos que pasamos siempre que estamos juntos, los amo.

A mi tío Corne y Lupita por ser como unos padres para nosotros, y por estar siempre ahí animándome y apoyándome.

A mi esposo por estar conmigo y compartir muchas cosas juntos, a él por su cariño y apoyo incondicional. Gracias por llegar a mi vida y hacerme muy feliz pero sobre todo por creer en mí. Te amo

A toda mi familia, porque no hay dos como ustedes, por todos sus apoyo y cariño.

A mi amiga Daniela por todos estos años de amistad y cariño, por apoyarme en todo momento y estar conmigo en las buenas y malas.

A mis amigas Mireya, Citlalmina, Laura, Selene, Arely y Paty, por todo su cariño, por hacerme reír y por hacer que el paso por la carrera fuera divertido e inigualable. Gracias por su compañía incondicional... las quiero mucho.

A Ricardo, por compartir tantas cosas juntos, por su apoyo y por darme su amistad que es lo más bonito que podemos tener.

A Chino y Cacho, por hacerme parte de su resistencia y por su amistad llena de risas y alegría.

CONTENIDO

	Página
<i>ÍNDICE DE CUADROS</i>	<i>i</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>ii</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>iii</i>
I. Introducción y Antecedentes	1
1.1 Origen y domesticación	4
1.2 Descripción botánica	5
1.3 Objetivos	6
1.4 Hipótesis	6
II. Metodología	7
2.1 Trabajo de gabinete	7
2.2 Trabajo de campo	8
2.2.1 Estados visitados y colecta	8
2.2.2 Claves de identificación y descriptores morfológicos	9
2.3 Trabajo de laboratorio	9
2.3.1 Siembra	9
2.3.2 Extracción de ADN DE Cloroplasto (cpDNA)	10
2.3.3 Alineación y análisis de la genealogía	10
III. Resultados y Discusión	15
3.1 Evidencias documentales	15
3.2 Herbarios de México	18
3.3 Colectas de <i>Cucurbita maxima</i> ssp. <i>maxima</i>	18
3.4 Descriptores morfológicos	23
3.5 Amplificación y secuenciación	26
3.6 Genealogía de <i>Cucurbita maxima</i> ssp. <i>maxima</i>	28
3.7 Variación genética	30
IV. Conclusiones	36
V. Recomendaciones	37
VI. Literatura Citada	38
ANEXOS	43

ÍNDICE DE CUADROS

	<i>Página</i>	
Cuadro 1	Grupos y taxa del género <i>Cucurbita</i> propuestos por Lira <i>et al.</i> , 1995	1
Cuadro 2	Herbarios de México que fueron consultados vía electrónica o personalmente	7
Cuadro 3	Tres pares de oligonucleótidos (forward y reverse), tamaño y secuencia para amplificar tres regiones del cloroplasto.	11
Cuadro 4	Programa utilizado en el termociclador para amplificación de la región rpl20-rps12.	12
Cuadro 5	Programa utilizado para la región trnL-trnF.	12
Cuadro 6	Programa para la región psbJ-petA, descrita por Shaw <i>et al.</i> , (2007), modificando la temperatura de hibridación.	13
Cuadro 7	Relación de los trabajos encontrados sobre <i>Cucurbita maxima</i> .	15
Cuadro 8	Muestras de <i>C. maxima</i> colectadas y donadas para el trabajo de laboratorio.	20
Cuadro 9	Porcentaje de peso, diámetro y peso de la semilla.	24
Cuadro 10	Muestras procesadas para la identificación de la semilla.	28
Cuadro 11	Estimadores de diversidad genética.	33
Cuadro 12	Matriz de divergencia genética F_{st} pareadas.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1 Mapa de viajes de colecta 1, 2 y 3 para <i>Cucurbita maxima</i> ssp. <i>maxima</i> .	8
Figura 2 Potencial canal de comercialización para semilla de <i>C. maxima</i> , estructurado de acuerdo a las entrevistas realizadas.	21
Figura 3 Mapa de muestreo nacional para <i>Cucurbita maxima</i> ssp. <i>maxima</i> . Rombos naranja sitio donde se registró la colecta.	22
Figura 4 Semillas de calabaza colectadas	23
Figura 5 Muestras colectadas, maduración de fruto, secado de la semilla y siembra en el invernadero 2 del Instituto de Ecología de la UNAM	25
Figura 6 Producto de PCR amplificando la región trnL-trnF.	26
Figura 7 Producto de PCR amplificando la región psbJ-petA.	27
Figura 8 Genealogía de las secuencias de <i>Cucurbita maxima</i> .	32
Figura 9 Árbol de diferenciación genética F_{st} para las accesiones completas de <i>C. maxima</i> .	35

Resumen

La distribución del género *Cucurbita* en México es muy extensa debido a que éstas pueden crecer en cualquier tipo de clima, altura y suelo. *Cucurbita pepo* es la especie más representativa y explotada de este género en nuestro país, sin embargo, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita argyrosperma* y *Cucurbita ficifolia* también son ampliamente cultivadas. Por su parte, la llamada en Sudamérica zapallo *Cucurbita maxima*, se dice que en los últimos años se ha cultivado en los estados de Sonora, Michoacán, Chiapas y Veracruz, tomando en cuenta que esta especie es originaria de Sudamérica y que existe poca información sobre ella en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue documentar si efectivamente existen sitios en donde se encuentra *C. maxima* ssp. *maxima* como cultivo establecido para así obtener una distribución geográfica bien referenciada de esta especie en el territorio mexicano. Esto se logró mediante investigación documental en donde se recabó información bibliográfica de la distribución de la especie y se consultaron herbarios de todo el país de manera presencial y vía electrónica. El trabajo de campo consistió en tres viajes de colecta por la parte noroeste, centro y sur del país y el trabajo de laboratorio consistió en aplicar herramientas de biología molecular para revelar la identidad de la especie colectada. Se colectó en los estados de Oaxaca y Sonora material vegetal y se obtuvieron semillas de los estados de Puebla, Guanajuato (Banco de germoplasma Celaya-Jalisco), Ciudad de México, y semillas de países como Brasil, EUA y Chile, estas tomadas como referencia. Se sembraron y posteriormente se realizó la extracción de ADN para

seguir con la amplificación y la secuenciación, y así revelar su identidad. Se obtuvieron 63 secuencias y con ellas se realizó una genealogía en la cual la topología y las longitudes de las ramas se obtuvieron por medio de un análisis de máxima verosimilitud con un modelo de Jukes- Cantor utilizando el marcador psbJ-petA y se llevaron a cabo 1000 réplicas bootstrap. Se utilizaron secuencias de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima*, *Cucurbita maxima* ssp. *andreana* y *Cucurbita ecuadorensis*, obtenidas del genoma completo de cloroplasto. La genealogía arrojó tres clados el primer clado agrupó 45 secuencias pertenecientes a Oaxaca, Chile, Brasil, Guanajuato, Sonora y a las tres tomas del genoma completo, esto sugiere que tales secuencias pertenecen a *C. maxima*. El segundo clado lo conformaron 24 secuencias en donde predominó la colecta de Brasil y tercer clado lo conformaron secuencias de *C. pepo*, estas como grupo externo. Se realizó la estimación de diversidad genética, en donde el género presentó valores 0.451 para Hd y diversidad nucleotídica de 0.00192

1. Introducción y Antecedentes

La familia *Cucurbitaceae* es un grupo vegetal que incluye 118 géneros y más o menos 825 especies (Lira *et al.*, 1995, 2002). Uno de los géneros más importantes de esta familia es *Cucurbita*, un género estrictamente americano que incluye 15 especies o agrupaciones taxonómicas que en total comprenden a 20 taxa, de los cuales 15 crecen espontáneamente o se cultivan en México (Cuadro 1) (Lira *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Grupos y taxa del género *Cucurbita* propuestos por Lira *et al.*, 1995.

GRUPO	TAXA
Grupo Argyrosperma	<i>C. argyrosperma</i> Huber <i>ssp. argyrosperma</i> <i>C. argyrosperma ssp. sororia</i> (L.H. Bailey) Merrick & Bates
Grupo Pepo	<i>C. pepo</i> L. <i>ssp. Pepo</i> <i>C. pepo ssp. fraterna</i> (L.H. Bailey) Andres <i>C. pepo ssp. texana</i> (Scheele) I.A. Filov**
Grupo Maxima	<i>C. maxima</i> Duchesne ex Lam. <i>ssp. Maxima</i> <i>C. maxima ssp. andreana</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) <i>ssp. Okeechobeensis</i> ** <i>C. okeechobeensis ssp. martinezii</i> (L.H. Bailey) Walters & Decker-Walters
Grupo Digitata	<i>C. digitata</i> A. Gray * <i>C. cordata</i> S. Watson *
Grupo Foetidissima	<i>C. palmata</i> S. Watson * <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	<i>C. lundelliana</i> L.H. Bailey <i>C. ficifolia</i> Bouché <i>C. moschata</i> (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poir.

Grupos y taxa del género *Cucurbita*. En negritas se indican los grupos que incluyen taxa domesticados y sus ancestros, con un asterisco los taxa perennes y con doble asterisco aquellos que no están presentes en México. Modificado de Lira *et al.* (1995), pues la adición de *C. ecuadorensis* al grupo Maxima ha sido recientemente sugerida por Sanjur *et al.* (2002).

De acuerdo con estos autores, en cinco de estas agrupaciones se incluyen los taxa domesticados (*Cucurbita argyrosperma* Huber *ssp. argyrosperma*, *Cucurbita ficifolia* Bouché, *Cucurbita maxima* Duch. ex Lam. *ssp. maxima*, *Cucurbita moschata* Duch.

ex Lam. Duch. ex Poir. y *Cucurbita pepo* ssp. *pepo*), los cuales en muchos casos incluyen numerosas razas o variedades locales y cultivares comerciales que en otros trabajos han sido reconocidos en diferentes categorías taxonómicas como subespecies, variedades o formas.

El uso más importante al que se han destinado las plantas domesticadas del género *Cucurbita* es el alimenticio en donde la mayor parte de la planta es utilizada, como son los frutos, flores, guías y semillas (Lira *et al.*, 1995). En el Nuevo Mundo, los únicos géneros que pueden ser comparables con *Cucurbita* por el número de especies comestibles domesticadas son *Capsicum* con 3-5 especies y *Solanum* con 7 especies (Nee, 1990).

Cuatro de los cinco taxa domesticados de *Cucurbita* (*C. argyrosperma*, *C. pepo*, *C. ficifolia*, y *C. moschata*) se cultivan en México de manera tradicional, mientras que el otro taxón (*C. maxima* ssp. *maxima*) es originario de América del Sur, aunque en la actualidad es cultivada en muchas partes del mundo, como por ejemplo los Estados Unidos en donde se han desarrollado numerosos cultivares comerciales (Lira *et al.*, 1995; Lira y Rodríguez, 2006).

De todos estos taxa se han documentado numerosas variantes o razas locales que se cultivan en sus áreas de distribución. En México, esto ha sido ampliamente documentado para los cuatro taxa domesticados antes mencionados, no obstante algunos autores han señalado que *C. maxima* ssp. *maxima* también se cultiva en México en los estados de Sonora (Financiera Rural, 2011), Michoacán, Chiapas (Villanueva, 2007), Veracruz (Mera *et al.*, 2011), Guerrero y Sinaloa (Lira y Rodríguez, 2006).

Estudios realizados en diferentes épocas, hacen referencia a las altas posibilidades de entrecruzamiento entre las especies de *Cucurbita* silvestres anuales y al menos tres de las domesticadas que crecen en México (Lira *et al.*, 1995) sin contar con el ancestro silvestre ampliamente reconocido de *C. maxima* ssp. *maxima* que es

Cucurbita maxima ssp. *andreana* y que también se le relaciona con el otro taxa silvestre *C. ecuadorensis*, con el cual puede cruzarse y producir híbridos fértiles, sin embargo, estos son taxa silvestres suramericanos (Lira y Rodríguez, 2006). Lo anterior potencialmente generaría flujo genético con al menos una de las especies silvestres (*C. lundelliana*) con la que se sabe es capaz de producir frutos con semillas viables y producir plantas F1 autofértiles y que son capaces de retrocruzarse con ambos progenitores (Lira *et al.*, 1995). Esta especie silvestre, por su parte, se sabe que puede formar híbridos con otras especies domesticadas como *C. moschata* y *C. pepo* (Lira *et al.*, 1995). Considerando lo anterior, y la compatibilidad reproductiva de cada especie, se puede suponer que las posibilidades de cruzamientos entre diferentes especies son amplias en nuestro país.

Esté trabajo pretende documentar los sitios en donde se encuentra *C. maxima* ssp. *maxima* como cultivo establecido para así obtener una distribución geográfica bien referenciada de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* en el territorio mexicano y si es posible, estimar la variación genética existente dentro de esta especie en nuestro país. Para ello, se emplearon evidencias derivadas de diversas fuentes como el campo y el herbario, mercados, documentos oficiales, bibliografía científica, así como evidencias genéticas y morfológicas.

1.1 Origen y domesticación de *Cucurbita maxima* Duch Ex. Lam.

Evidencias existentes indican que el proceso de domesticación del *C. máxima* ocurrió en América del Sur. Las evidencias arqueológicas, son contundentes al respecto, pues hasta la fecha los únicos restos de esta especie han sido encontrados en esa región del continente, desde Perú hasta el norte de Argentina (Lira *et al.*, 2009). De tal manera que se considera como su centro de origen (Villanueva, 2007; Lira y Montes, 2014), en específico Perú, Colombia y Bolivia.

Las crónicas históricas, señalan que durante la época de la conquista del Río de La Plata, Argentina, la especie *maxima* fue uno de los principales cultivos de los Guaraníes del noreste de Argentina y Paraguay, además de que se sabe que ya en ese entonces, como ahora, existían numerosas variantes cultivándose en los valles andinos. Dentro del área de distribución nativa bajo cultivo de la especie *maxima* se encuentra dentro de un amplio intervalo altitudinal, el cual comprende, desde los 100 msnm (p.ej. en algunas localidades de Brasil), hasta muy cerca los 3000 msnm (p.ej. en Bolivia). (Lira *et al.*, 2009).

Las especies silvestres con mayor afinidad genética y mayor similitud con el cultivo de *C. máxima* son: *Cucurbita maxima ssp andreana* (Naudin) y *C. ecuadorensis* Cutler & Whitaker. La primera de ellas nativa de Argentina y Uruguay, parece ser su ancestro silvestre más probable y, de hecho, ya ha sido formalmente propuesta como tal, asignándosele la categoría de subespecie (*C. maxima ssp. andreana* Naudin) y *C. ecuadorensis* es nativa de Ecuador, se sugiere que más de tratarse de un taxón silvestre pudiera ser una planta que fue semi-domesticada en tiempos precolombinos pero cuyo cultivo se abandonó (Lira *et al.*, 2009).

1.2 Descripción Botánica

Plantas herbáceas, anuales, rastrera, trepadora o de hábito subarborescente. La raíz es fibrosa. Los tallos son engrosados, redondeados o ligeramente angulosos, suaves. Las hojas se encuentran sobre peciolo robusto con surcos, de tamaño muy variable, lámina de consistencia firmemente coriácea, orbicular, base cordada, ambas superficies hispidoacneladas con o sin manchas verde claro, 11-36 cm de largo, 14.5 -44 cm de ancho algunas veces aun más grandes, velloso corto, el haz con o sin manchas verde claro. Presenta zarcillos ramificados. Las flores son aromáticas. Las flores estaminadas (masculinas) se encuentran sobre pedicelos robustos de 14-18 cm de largo, el receptáculo es corto, obcónico campanulado, la corola es de color amarillo brillante, pilosa en ambas superficies y de 4.5 - 5 cm de largo; los lóbulos son anchos, usualmente reflexos con ápice cortamente mucronado, el tubo recto o ligeramente ensanchado. Los filamentos son de 5 -10 cm de largo angostos y abruptamente ensanchados hacia la base, glabros o esparcidamente pubescentes en la base; columna de 12 -16 mm de largo y 5 -10 mm de ancho. Las flores pistiladas (femeninas) se encuentran sobre pedicelos más cortos y engrosados, ovario de muy diversas formas, pubescentes, receptáculo reducido a casi nulo, columna de los estilos corta, 9-10 mm de largo; estigmas muy ligeramente bilocados. El fruto es de muy diversas formas, tamaños y su color es naranja en diversas tonalidades incluyendo también verde parduzco, rosado y rojo o rojizo-anaranjado, lisos o con costillas redondeadas tenues; cáscara dura a suave, usualmente lustrosa, algunas veces con protuberancias leñosas irregulares; pulpa de color amarillo pálido a amarillo teñido de naranja, de sabor dulce, ligeramente fibrosa; pedúnculo corto, suave o rígido; semillas gruesas, elípticas, infladas o tumescentes, 13-24 mm de largo, 8-12 mm de ancho, bronceadas (color canela), blancas a pardo claras, superficie lisa a muy ligeramente estriada o punteada, márgenes redondeados, inusualmente diferenciados en color del centro de la semilla mas las de color blanco, ápice truncado y ligeramente oblicuo, testa gruesa (Lira,1995; Villanueva, 2007).

1.3 Objetivos

- Documentar la presencia de la especie *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* (Cucurbitaceae) en México.
- Aplicar técnicas de biología molecular y bioinformáticas como herramientas para corroborar la identidad de los individuos colectados.
- Estimar la variación genética existente dentro de accesiones de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima*.

1.4 Hipótesis

- Dado que *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* no es originaria de México, la posibilidad de encontrarla cultivada en el país es extremadamente baja y de estar presente su cultivo deberá estar restringido a unos cuantos sitios y su diversidad genética y variación morfológica deberán ser comparativamente bajos.

2. Metodología

2.1 Trabajo de gabinete

Se recabó información bibliográfica acerca de la distribución potencial de *C. maxima* ssp. *maxima* en México, tomando en cuenta información solo referente a nuestro país. La consulta de herbarios se llevó a cabo de manera presencial y vía electrónica, utilizando la REMIB como portal de búsqueda (Cuadro 2). La consulta de herbarios se realizó para tomar en cuenta los registros que pudieran haber estado en las etiquetas de colecta y para observar la intensidad de colecta que se realiza en México para esta calabaza.

Cuadro 2. Herbarios de México que fueron consultados vía electrónica o personalmente.

Herbario	Ubicación
HUAA. Herbario del Centro Básico del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes	Aguascalientes
CHAPA. Herbario de la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo	Ciudad de México
ENCB. Herbario del Departamento de Botánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional	Ciudad de México
UAMIZ. Herbario del Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa	Ciudad de México
UAMX. Herbario del Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco	Ciudad de México
CIIDIRD. Herbario del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional.	Durango, Durango
IZTA. Herbario del Departamento de Biología Experimental, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes	Estado de México
UPAUACH. Herbario de la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo	Estado de México
CICY. Herbario del Departamento de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán.	Mérida, Yucatán
YUC. Herbario de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida.	Mérida, Yucatán
UAP. Herbario de la Universidad Autónoma de Puebla	Puebla
UJAT. Herbario de la División de Ciencias Básicas (Biología) Unidad Sierra, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.	Villahermosa, Tabasco
XAL. Herbario del Instituto de Ecología A. C. (anteriormente del INIREB)	Xalapa, Veracruz.

2.2 Trabajo de Campo

2.2.1 Estados visitados y colecta

Se realizó una colecta de material vegetal en localidades del centro, sur y suroeste del país, el cual se dividió en tres viajes. El primer viaje fue a los estados de Oaxaca, Guerrero, Puebla, Chiapas y Veracruz. El segundo viaje se realizó a los estados de Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Tabasco, respectivamente y, finalmente, el tercer viaje se realizó a los estados de Jalisco, Nayarit, Sinaloa y Sonora (Figura 1). En donde fue posible las rutas se hicieron tomando en cuenta los sitios de potencial presencia de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* reportados por la literatura. Durante los viajes se realizaron entrevistas semiestructuradas para poder obtener información sobre la calabaza estudiada.

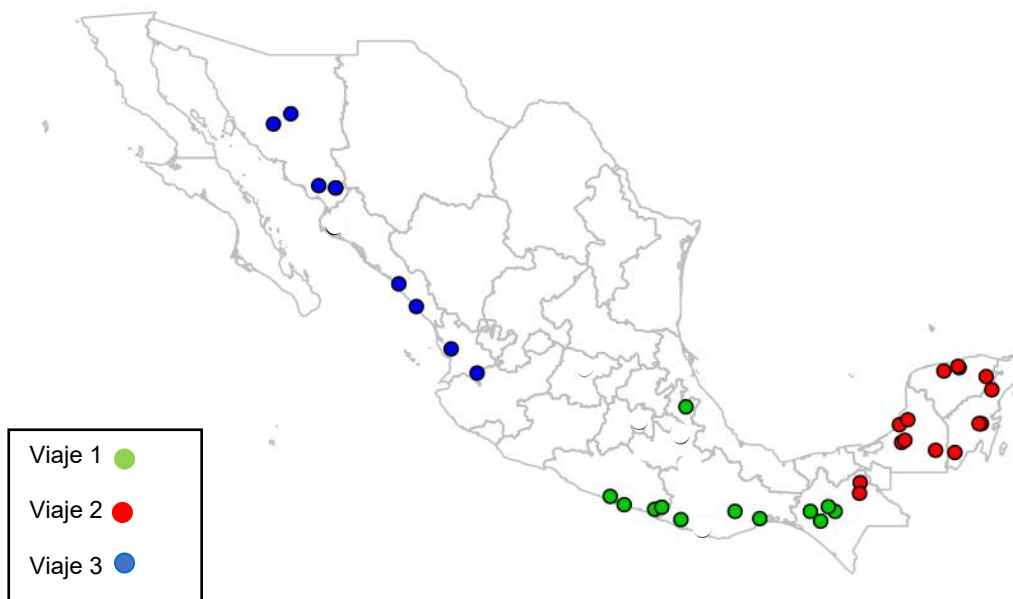


Figura 1. Mapa de viajes de colecta 1, 2 y 3 para *Cucurbita maxima* ssp. *maxima*.

Se aplicó una prueba de identificación a cada una de las personas entrevistadas para poder descartar que se estuviera tratando de otra especie de *Cucurbita*.

La prueba consistió en preguntar si la semilla tenía un borde o era toda del mismo color, posteriormente, se les mostraba una semilla y/o una fotografía para descartar algún error.

Se realizaron alrededor de 8 entrevistas semiestructuradas a productores, Ingenieros y curadores de herbario (Anexo 1) para poder obtener más información de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* como especie cultivada o algún dato comprobable de su presencia en México.

2.2.2 Claves de identificación y descriptores morfológicos

Una vez colectadas las muestras se utilizaron las claves propuestas por Lira *et al.* 1995 para la identificación de la planta colectada y/o semilla para así determinar si se trata de la especie en cuestión (Anexo 2). También se tomaron en cuenta 21 atributos del manual de descriptores para *Cucurbita* para describir morfológicamente a la planta o frutos colectados (Anexo 3).

2.3 Trabajo de laboratorio

2.3.1 Siembra

Se sembraron las semillas colectadas en el Invernadero 2 del Instituto de Ecología de la UNAM. La siembra se realizó en un vaso de cartón en el cual se colocaron tres semillas por cada vaso con el fin de tener un número considerable de individuos para poder realizar la extracción de ADN. Se optó por este método para aprovechar al máximo el espacio dentro del invernadero. Se colocó una etiqueta a cada vaso para mantener la identidad de la planta y la semilla.

Posteriormente se tomaron de 1 a 2 hojas verdaderas de todos los individuos germinados para proceder a la extracción de ADN. Las hojas restantes de la planta se cortaron y se conservaron como respaldo de tejido foliar en un ultracongelador REVCO a – 80 °C en el instituto de Ecología de la UNAM.

El proyecto inició con semillas comerciales de *C. maxima* provenientes de Estados Unidos y Brasil para ser tomadas como referencia para la identificación.

Otra accesión fue tomada del Banco de Germoplasma del INIFAP Celaya- Jalisco, esta fue colectada en el municipio de Dolores Hidalgo, Guanajuato en el año de 1997 y resguardada a -20 °C. Debido al largo tiempo de almacenamiento fue necesario realizar un tratamiento de preacondicionamiento para que la semilla germinara. Este acondicionamiento se realizó manteniendo las semillas durante 24 hrs. en un vaso de precipitado con agua y con una bomba de oxigenación.

El porcentaje de germinación de todas las muestras fue de un 60 %. Por esta razón se obtuvieron pocas muestras de las que solo se tenía poco material como, por ejemplo, Estados Unidos, Brasil y Chile.

2.3.2 Extracción de ADN de cloroplasto (cpDNA)

Se realizó la extracción de ADN de cloroplasto a 77 individuos mediante el protocolo Mini-prep propuesto por Doyle y Doyle (1987) y modificado por Vazquez (1996), obteniendo un total de 300 µl de ADN para cada uno. Se realizaron algunas adecuaciones debido al tipo de planta que se utilizó (Anexo 4).

Se evaluó la concentración y calidad del ADN total extraído mediante electroforesis en gel. Para la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 2% en buffer TAE al 0.5 % adicionado con bromuro de etidio al 0.0001 %, corriendo durante 25 minutos aproximadamente a 85 Volts, para después ser visualizados en un transluminador de luz UV.

2.3.3 Alineación y análisis de la genealogía

Se realizaron las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cyclor, para amplificar tres regiones del ADN del cloroplasto (Cuadro 3) con la finalidad de identificar si las muestras obtenidas corresponden a *Cucurbita maxima ssp. maxima* u a otra especie del género *Cucurbita* tomando como principio la Guía práctica sobre la técnica de la PCR (Espinoza, 2007).

Las reacciones de PCR fueron estandarizadas para cada región, tomando como principio lo citado por la literatura para cada uno de los tres primers utilizados en donde las regiones trnL- trnF y rpl20-rps12 son reportadas como altamente variables (Taberlet *et al.*, 1991; Hamilton 1999).

Por otro lado la región psbJ-petA propuestas por Shaw *et al.*, (2007) como una región adecuada para resolver relaciones filogenéticas en plantas por lo cual en este trabajo son probadas por primera vez para el género *Cucurbita*.

Una vez amplificadas las regiones estas fueron enviadas al servicio de secuenciación Sanger de la Universidad de Washington. Para corroborar las secuencias se utilizó el programa BLAST ya que este programa encuentra las regiones de similitud entre secuencias biológicas de la misma especie.

Cuadro 3. Tres pares de oligonucleótidos (forward y reverse), tamaño y secuencia para amplificar tres regiones del cloroplasto.

Región	Tamaño de la región amplificada pb	Secuencia de los oligonucleótidos	Fuente
trnL- trnF	900 (Aprox)	trn-L CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT trn-F GGT TCA AGT CCT TCT ATC CC	Taberlet <i>et al</i> (1991)
rpl20-rps12	884	rps12 GTC GAG GAA CAT GTA CTA GG rpl 20 TTT GTT CTA CGT CTC CGA GC	Hamilton (1999)
psbJ -petA	1269	psbJ ATA GG ACT GTA RCY GGT ATT petA AAC ART TYG ARA AGG TTC AATT	Shaw <i>et al</i> (2007)

Las reacciones de PCR fueron estandarizadas con las siguientes características:

Para la región rpl20-rps12 se utilizó una concentración final de 1x Buffer, 0.9 µM de MgCl₂, 1.2 µM de dNTP's, 0.6 µM de cada oligonucleotido (*Forward* y *reverse*),

1 μM de DNA polimerasa (Taq) y 2 μM de DNA de cada muestra, para un volumen final de 30 μM por tubo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Programa utilizado en el termociclador para la amplificación del DNACp para la región rpl20-rps12.

	Temperatura °C	Tiempo
35 Ciclos	95	5 min
	95	45 seg.
	60	40 seg.
	72	50 seg.
	72	5 min.

Las condiciones para la región trnL- trnF fueron estandarizadas y modificadas para su amplificación, utilizando una concentración de 1 x Buffer, 1.2 μM de MgCl_2 , 0.75 μM de dNTP's, 0.8 de cada oligonucleótido (*Forward* y *reverse*), 1 μM de DNA polimerasa (Taq) y 2 μM de DNA de cada muestra (Cuadro 5).

Cuadro 5. Programa utilizado para la región trnL-F.

	Temperatura °C	Tiempo
25 Ciclos	95	5 min
	95	44 seg.
	60	44 seg.
	72	1.20 min
	72	5 min.

Para la última región a amplificar psbJ-peA, se utilizó una concentración de 1xBuffer, 3 μM de MgCl_2 , 0.5 μM de dNTP's, 0.65 μM de cada oligonucleótido

(*Forward y reverse*), 1 μ M de DNA polimerasa (Taq) y 2 μ M de DNA de cada muestra (Cuadro 6).

Cuadro 6. Programa para la región psbJ-peA, descrita por Shaw *et al.*, (2007), modificando la temperatura de hibridación.

	Temperatura °C	Tiempo
25 Ciclos	80	5 min
	95	60 seg.
	65	60 seg.
	64	4 min
	65	5 min.

Las secuencias recibidas fueron ensambladas con CONSED (Ewing *et al.*, 1998) para obtener las secuencias consenso. Posteriormente, las secuencias consenso fueron alineadas con Clustal 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) habilitado en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Se utilizó una secuencia de referencia de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* obtenida del genoma completo del cloroplasto (Kistler *et al.*, 2015) también se tomaron secuencias de *C. moschata* (Hernández, 2016), *C. argyrosperma* (Sánchez, 2016) y *C. pepo* (Castellanos y Mondragón, 2016) como grupo externo.

La genealogía para la revelación de la identidad de las muestras se llevó a cabo con el método de Máxima Verosimilitud. Para este análisis se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). El árbol inicial se formó con el modelo Jukes-Cantor, el cual se llevó a cabo con 1000 réplicas bootstrap para obtener los valores de soporte en cada clado de la genealogía.

La variación se estimó utilizando el programa DNAsp v. 5 (Librado y Rozas, 2010) en donde se obtuvieron: secuencias polimórficas (P), diversidad nucleotídica (π),

diversidad haplotípica (H_d) y Theta de Watterson (θ_w). Se corroboraron las distancias genéticas (F_{st} pareada) representadas en un árbol de distancias realizado con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) a partir de la matriz de estas distancias, dicha matriz se realizó con el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2010).

3. Resultados y Discusión

3.1 Evidencias documentales

En el Cuadro 7 se muestran los documentos en los cuales se reporta la presencia o ausencia de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* en México. En total se encontraron 7 reportes de la presencia y 3 reportes sobre la ausencia de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* en México. Los estados en los que se reportó la presencia de esta especie son: Michoacán, Chiapas y Veracruz.

Cuadro 7. Relación de los trabajos encontrados sobre *Cucurbita maxima*.

Referencia bibliográfica	Título	Resultado
Lira <i>et al.</i> , 1995.	Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica	Cultivada ampliamente en América del Sur. Ausente en México y Centro América.
Villanueva, 2007	Calabazas cultivadas. Identificación de especies, caracterización y descripción varietal.	En México se desconocen razas locales. Se encuentran tipos locales en los estados de Michoacán y Chiapas. “Pepita Rusa “ Venta de semilla para consumo humano en comercios ambulantes en la ciudad y valle de México Cultivares de <i>C. maxima</i> en Michoacán.
Mera <i>et al.</i> , 2011	Documento de diagnóstico de las especies cultivadas de <i>Cucurbita L.</i>	Cultivada en Sinaloa para exportación por contrato a Japón. Referencia de 4 ejemplares pertenecientes al Herbario de Xalapa, Ver.
Whitaker y West, 1979	Prehistoric Cultivated Cucurbits from the Viru Valley, Peru.	Lugar de domesticación: América del Sur, Perú, sin extenderse a Centro América ni sur de México

Continuación Cuadro 7

Servicio Nacional de Inspección Y Certificación de Semillas. México, 2011	Resúmenes ejecutivos. Ejercicio fiscal.	La domesticación de <i>C. maxima</i> se inició en Sudamérica.
Manzanilla y Serra, 1987	Aprovechamiento de recursos de origen biológico en la cuenca de México (2500 a.c. – 1500 d.c)	Es conocida por su nombre común como “pepita rusa”. No hay evidencias arqueológicas en México, sin embargo, se cultiva actualmente en la zona norte del País.
CONABIO, Portal de la Biodiversidad Mexicana. http://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/que_es.htm , 2015	Informe: “Calabazas y Chilacayotes”	Dieta alimenticia para el México prehispánico consistía de frijol, calabaza (<i>Cucurbita</i> spp., <i>pepo</i> , <i>maxima</i> y <i>ficifolia</i>), chile y algunas hierbas. Reconoce los nombres comunes para <i>C. maxima</i> como: Kabocha y calabaza de semilla o chihua. Amplia adaptación 100-3000 msnm. En México se cultivan algunas variedades comerciales.
Bank of Cucurbita_CONABIO, 2015	Colectas de Herbarios	35 Colectas en diferentes herbarios de Estados Unidos y uno solo de Argentina.
SIAP http://www.siap.gob.mx/ , 2015	Producción 2014	Reconoce a <i>C. maxima</i> con nombre común: Calabaza o semilla chihua
Guerrero, 2011	Producción de kabochas en la costa de Hermosillo	Calabaza kabocha en Hermosillo Sonora

Los reportes encontrados indicaron la poca información e investigación que existe de esta especie en nuestro país haciendo más difícil la identificación y la búsqueda como un cultivo establecido en México.

Para el 2014 el SIAP reportó la producción por cultivo y por estado abarcando todo el país. Reporto la producción de calabaza y calabaza o semilla chihua, en donde se le denomina a la calabaza con el nombre científico *Cucurbita maxima*, sin

embargo, no se sabe cuál es el sustento para definir el nombre científico de la especie en cuestión.

En su portal de Biodiversidad Mexicana en un informe electrónico “Calabazas y Chilacayotes”, CONABIO describe a las calabazas domesticadas en México y menciona el nombre común por el cual se les conoce a estas calabazas, llamando a *Cucurbita maxima*: Kabocha y calabaza de semilla o Chihua. Esto nos sugiere que la calabaza de la que se tiene los registros en SIAP, es *Cucurbita maxima*, basándonos en los nombres comunes que le han dado diferentes autores (CONABIO, 2015 y Villanueva, 2007), sin embargo en los viajes de colecta por el sur del país, a *Cucurbita argyrosperma* se le da el nombre común de calabaza o semilla chihua en los estados de Campeche, Yucatan, Quintana Roo y Tabasco.

Pese a los datos obtenidos de estas fuentes y los viajes que se realizaron a los estados y municipios que marca SIAP, no se encontró ningún ejemplar de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* ni algún dato de relevancia para este trabajo.

En comunicación personal con el Ing. Cosme Guerrero, mencionó que Sonora es un estado que en los últimos 25 años la llamada calabaza kabocha se ha sembrado como cultivo de exportación para el mercado oriental y para los agricultores mexicanos la producción de kabocha representa una opción de producción para mejorar su nivel de vida. Indicó que entre las variedades producidas en la costa de Hermosillo se encuentra la Delica, Super Nishiki y Unebi Ebisu, que actualmente se siembran en la costa y otras variedades las definen los compradores existiendo una buena cantidad de híbridos desarrollados en Japón en donde los frutos pueden pesar hasta 3.5 kg. Las semillas son de color blanco o café pálido.

Otros autores igualmente describen que la distribución de la kabocha es la costa de Sonora y que comercialización va dirigida hacia Japón (Arvayo *et al.*, 2014; Garza, 2014).

En varios estados del centro del país la semilla de *C. maxima* se encuentra a la venta todo el año en mercados de acuerdo a la investigación esta puede ser vendida a granel o empaquetadas para consumo humano siendo la central de abastos el primer distribuidor de esta semilla.

3.2 Herbarios de México

Mera *et al.* (2010), reportan la presencia de un ejemplar en el herbario de Xalapa, el cual fue visitado para corroborar dicho registro, lo cual no fue posible pues no se encontró dicho espécimen.

3.3 Colectas de *Cucurbita maxima ssp maxima*.

Se realizó la colecta física del material vegetal en los estados de Oaxaca, Sonora y Puebla (Anexo 6). En muchos lugares visitados los datos o lugares que mencionaban pequeños productores o personas cercanas al cultivo de calabaza no eran ciertamente reales como fue el caso de Mayatecum-Buctzotz en Campeche, en donde la Sra. Lucia Mayorga indicó que en la localidad se sembraba de manera intensiva este cultivo para venta de semilla, sin embargo, no se encontró ningún dato reportable que pudiera ayudar a la investigación.

Otro dato reportado fue el de Jiquipilas, Chiapas, en donde el reporte que se obtuvo fue por parte del productor Martin Vilchis quien en comunicación personal señaló que siembra esta calabaza desde hace 5 años con un sistema de producción bien definido aún que no tan similar al que se tiene con las calabazas Kabochas en el estado de Sonora, que es la única colecta comparable tomada como base para las otras colectas.

Debido a problemas logísticos no se obtuvo ningún ejemplar, sin embargo, el Dr. Oscar Ferrera Sarmiento, profesor de la Universidad de Chiapas, afirma la existencia de *Cucurbita maxima ssp. maxima* en este lugar.

La Doctora Rosa Laura Andrade, perteneciente a la asociación Azul Natural señaló que *C. máxima* se encuentra como cultivo establecido en los estados de Durango, Zacatecas, Nuevo León y Tamaulipas, sin embargo, fue muy difícil realizar la visita a estos estados, incluyendo Michoacán debido a la situación actual del país en esta región.

En el Cuadro 8 se observa el número de colectas que se realizó con un total de 81 individuos, detallando la fecha de colecta, lugar de procedencia y la parte de planta que se pudo obtener ya que en Oaxaca y Sonora se pudo obtener 6 y 5 frutos respectivamente.

En los demás sitios solo se logró la obtención de semilla, algunas en grandes cantidades, pero otras como las procedentes de Santiago de Chile, solo enviaron 10 semillas.

El primer grupo de semillas que se obtuvo fue por parte del Banco de Germoplasma del INIFAP Celaya-Jalisco. Estas semillas fueron colectadas por el Dr. Montes en el mercado del municipio de Dolores Hidalgo, Guanajuato en 1997, registrada con el ID BG756 en la base de datos del INIFAP Celaya.

En el estado de Oaxaca, en la localidad de Los Nanches, se obtuvieron cinco frutos de calabaza, inicialmente identificadas como *Cucurbita moschata*, sin embargo, al utilizar las claves de identificación (Lira *et al.*, 1995) y al observar la semilla se determinó que pudiera ser tomada como una probable accesión de *C. maxima* y de esta manera se tomó en cuenta para aplicar técnicas moleculares e identificar el grupo al que se incluirían las plantas de dicho fruto.

El siguiente grupo de semillas fue colectado en el mercado de la Merced en la Ciudad de México. La presencia de la semilla, como ya se mencionó anteriormente, es muy basta en el centro de la república mexicana en específico en la Ciudad de México y Estado de México, por lo tanto, se tomó una pequeña muestra de estas

semillas. Para la accesión colectada en la Ciudad de México se realizó un esquema del posible canal de comercialización por el cual pasan estas semillas.

Cuadro 8 . Muestras de *C. maxima* colectadas y donadas para el trabajo de laboratorio.

No.	Pais o Estado	Herbario/BG/Colecta Localidad	Fecha de colecta	Coordenadas de colecta	Semilla, fruto u hoja	No. Semillas germinadas
1	Ciudad de México	Mercado de la Merced	Septiembre de 2014	N 19.44 W- 99.12	Semilla	3
2	EUA	Arizona	Octubre de 2014	SD	Semilla	10
3	EUA	Arizona	Octubre de 2014	SD	Semilla	10
4	Guanajuato	BG Celaya y Jalisco	Octubre de 2014	N 21.16W – 100.9	Semilla	13
5	Oaxaca	Los Nanches	Noviembre de 2014	N 15.95 W - 97.08	Frutos	15
6	Brasil	Brasil	Mayo de 2015	SD	Semilla	10
7	Basil	Brasil	Mayo de 2015	SD	Semilla	12
8	Puebla	Acatzingo	Julio de 2015	N 18.98 W - 97.78	Semilla	8
9	Chile	Chile	Agosto de 2015	SD	Semilla	2
10	Sonora	Miguel Alemán	Noviembre de 2015	N 2,88 W - 111,5	Frutos	4

Nota: SD= Sin datos, BG= Banco de germoplasma

Para la accesión colectada en la Ciudad de México se realizó un esquema del posible canal de comercialización por el cual pasan estas semillas (Figura 2).

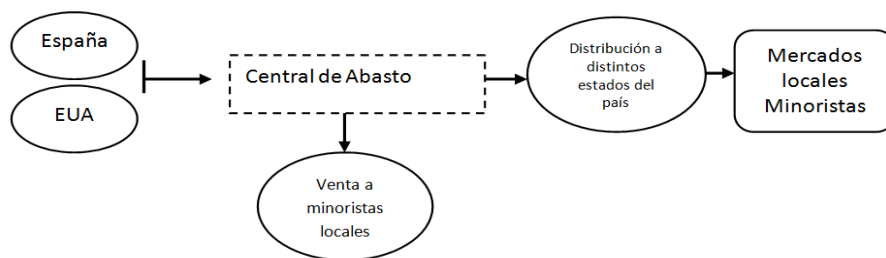


Figura 2. Potencial canal de comercialización para semilla de *C. maxima*, estructurado de acuerdo a las entrevistas realizadas.

Se realizó una visita al estado de Puebla en donde se encontró semilla en el mercado del municipio de Acatzingo. Se tomó una muestra de semillas para poder tener representantes de este estado.

Se obtuvieron semillas provenientes de Santiago, Chile esto fue para tener una mayor cobertura de la especie y así poder compararla con las semillas que ya se tenían colectadas. Donadas por la Lic. Jessica Páez Arancidia, FES-Cuautitlán.

Las últimas accesiones que se obtuvieron para este trabajo fueron colectadas en el municipio de Miguel Alemán, Sonora, pertenecientes a la productora Agrosil, se les reconoció como Kabochas, nombre común que se le da a *Cucurbita maxima* en el estado de Sonora y que en japonés significa calabaza.

En comunicación personal con el Ingeniero Rafael indicó que no solo en Miguel Alemán se siembra “de esta calabaza” y que la agricultura que se tiene es por contrato en donde su principal comprador es E.U.A, sin embargo, por el cambio climático llegan las heladas con anticipación y esto ha afectado el cultivo de calabaza, por lo que en muchos lugares se dejó de sembrar a gran escala.

Reporto que en la Asociación Agrícola Local Ejidal de Valle-Carrizo se siembran 1,500 ha de calabaza Kabocha, en donde la siembra se lleva a cabo en los meses de septiembre a noviembre y se cosecha a finales de diciembre principios de febrero, el riego que se utiliza es rodado o por gravedad.

En comunicación personal con Yuriko Kitagawa, la calabaza Kabocha entro al mercado japonés desde 1985, proveniente de las costas de Hermosillo, iniciando con 20 toneladas mensuales (aproximadamente) que fueron distribuidas a los mercados locales, contando con poca aceptación en aquel tiempo.

En la Figura 3 se muestra un mapa con los municipios en donde se obtuvieron las colectas descritas anteriormente.

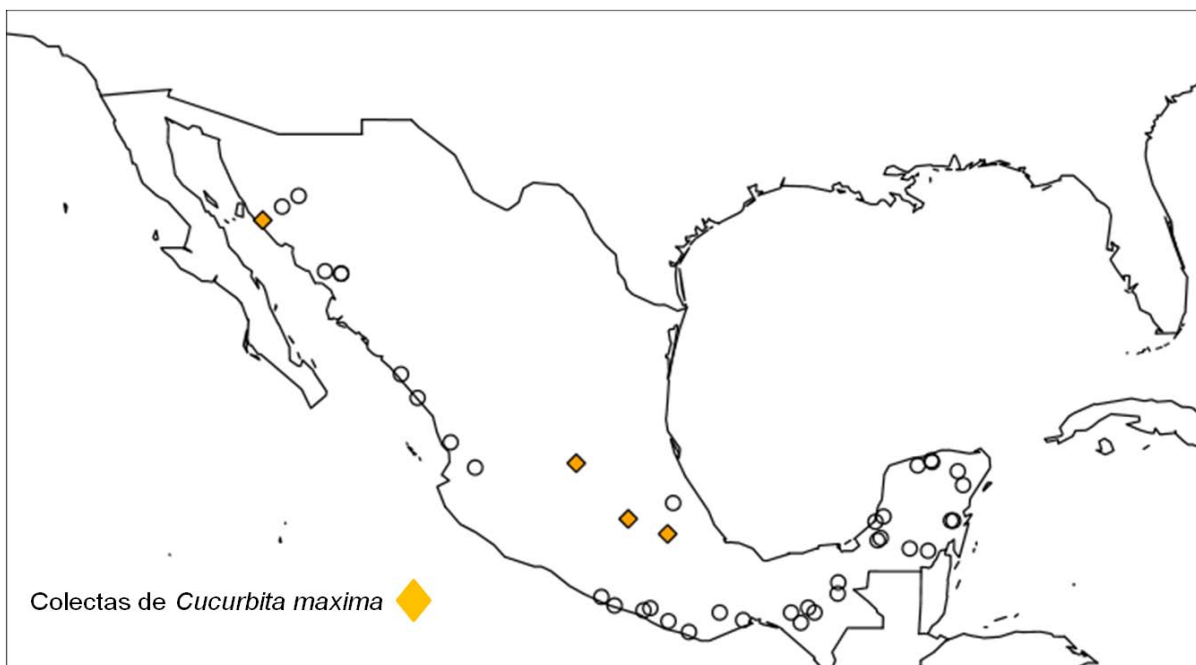


Figura 3. Mapa de muestreo nacional para *Cucurbita maxima* ssp. *maxima*. Rombos naranja sitio donde se registró la colecta.

La Figura 4 muestra las semillas obtenidas en la colecta y las que fueron donadas, en la cual la única que no se muestra es la accesión de EUA Lakota (*Cucurbita maxima*), debido a que solo se contaba con diez semillas y fueron utilizadas para la identificación de la especie.



Figura 4. Semillas de calabaza colectadas, a) Go_E.U.A, b) Ab_Brasil, c) Ka_Sonora, d) Cm_DF, e) Na_Oaxaca, f) Bg_Guanajuato, g) Cm_Chile , h) Acg_Puebla

La característica que más resaltó en las semillas fue el tamaño, en donde la semilla traída de Chile presento características propias, es decir, de coloración dorado con el margen bien diferenciado de color beige y de tamaño promedio de 2.3 cm. Otra semilla que presento diferencia fue la colectada en Oaxaca en donde el margen de la semilla estaba ausente a diferencia de las demás.

Las semillas más chicas fueron las de Estados Unidos midiendo en promedio 1.6 cm de largo, sin embargo, compartieron el mismo color con las colectas de la Ciudad de México, Puebla, Brasil y las donadas por el Banco de germoplasma. La semilla en comparación con otras semillas de calabazas domesticadas en México es grande semejándose en tamaño a *Cucurbita argyrosperma* (Figura 4).

3.4 Descriptores morfológicos

Los frutos colectados en Sonora llegaron al laboratorio con la coloración de cascara verde oscuro, sin embargo, se dejaron madurar 2 semanas para después realizar la identificación.

Se realizó la caracterización morfológica a los individuos colectados en Sonora (calabaza kabocha) y en Oaxaca, para ello se tomaron en cuenta los descriptores utilizados por el Dr. Salvador Montes Hernández en los cuales se describen

detalladamente las características de los frutos, sin embargo, solo fue posible tomar en cuenta los puntos correspondientes a el fruto y la semilla, ya que no se tenía ninguna otra parte de la planta (Anexo 3).

La colecta de Sonora se mostró completamente homogénea mientras que en la colecta de Oaxaca los frutos tenían algunas diferencias mínimas en cuanto al tamaño, se puede pensar que es debido al manejo que recibe cada una ya que el cultivo de sonora es para exportación y se siembra de manera intensiva en donde las semillas provienen de Japón y las de Oaxaca el cultivo es de traspatio sembradas bajo el sistema tradicional milpa. Para ambas la distribución del color primario es evidente, no hay un color terciario en la epidermis y la inserción del pedúnculo es recta para ambas.

En el Cuadro 9 se muestran los datos obtenidos para las poblaciones de Oaxaca y Sonora, tomado en cuenta únicamente peso, diámetro, longitud y peso de la semilla (100 semillas), esto se tomó de 5 frutos por colecta.

Cuadro 9. Porcentaje de peso, diámetro y peso de la semilla

Población	Peso (kg) Fruto	Diámetro (cm) Fruto	Peso de 100 semillas (gr)	Medida de pulpa de fruto (cm)
Nanches, Oaxaca	2.098	71.46	0.996	3.64
Miguel Alemán, Sonora	1.354	49.98	0.944	2.54

Existen algunas diferencias significativas de acuerdo con la caracterización morfológica realizada a las accesiones de Sonora y Oaxaca, siendo el peso la principal y diferente característica, ya que en promedio de los 5 frutos obtuvo mayor peso la accesión de Oaxaca, tomado en cuenta que esta fue tomada de un cultivo de traspatio en donde el manejo es menor a diferencia de las de Sonora que es un cultivo intensivo y pertenece a una variedad en el que se pudieran tomar en cuenta solo características favorables para la venta de esta calabaza.



Figura 5. Muestras colectadas, maduración de fruto, secado de la semilla, siembra en el invernadero 2 del Instituto de Ecología de la UNAM.

Otra característica notable es el grosor de la cáscara, particularmente la especie *C. maxima* presenta una cáscara suave rara vez dura, sin embargo los frutos de Oaxaca presentan una cáscara muy gruesa, característica que se presenta con mayor frecuencia en los frutos de *C. moschata* (Lira, 1995; Villanueva, 2007) pero hay que tomar en cuenta que *C. maxima* es una de las especies con mayor cantidad de híbridos existentes

3.5 Amplificación y secuenciación

Se obtuvieron 63 secuencias que fueron utilizadas para realizar los análisis de identificación molecular y para la estimación de la variación genética. Se utilizó el juego de primer correspondiente a la región rpl 20 –rps 12 sin embargo, no se obtuvo la variación esperada para ninguna de las especies del género *Cucurbita* que se están trabajando en el Laboratorio de Evolución molecular y experimental, como son *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita argyrosperma* y algunas especies silvestres del género (Figura 6).

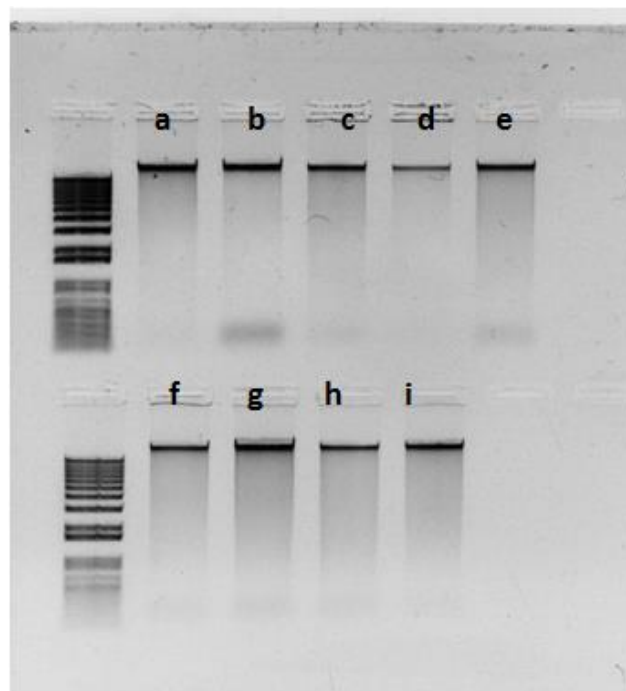


Figura 6. Producto de PCR amplificando la región rpl20-rps12, aplicado a 9 de 10 colectas, en donde: a) Ciudad de México, b) Brasil, c) Sonora, d) Puebla, e)Chile, f) Oaxaca, g) EUA, h) Brasil, i) EUA y j) Guanajuato.

Posteriormente se amplificó la región trnL-F, sin embargo, al estandarizar, amplificar y corroborar la región esperada, se determinó que 93% de identidad de las secuencias amplificadas corresponden a una duplicación de la región que se encuentra reportada para la mitocondria (Alverson *et al.* 2010) y era difícil identificar si las secuencias que se encontraban reportadas para esta región pertenecían a cloroplasto o mitocondria, por tal motivo se decidió no utilizar este marcador para realizar la genealogía (Figura 7).

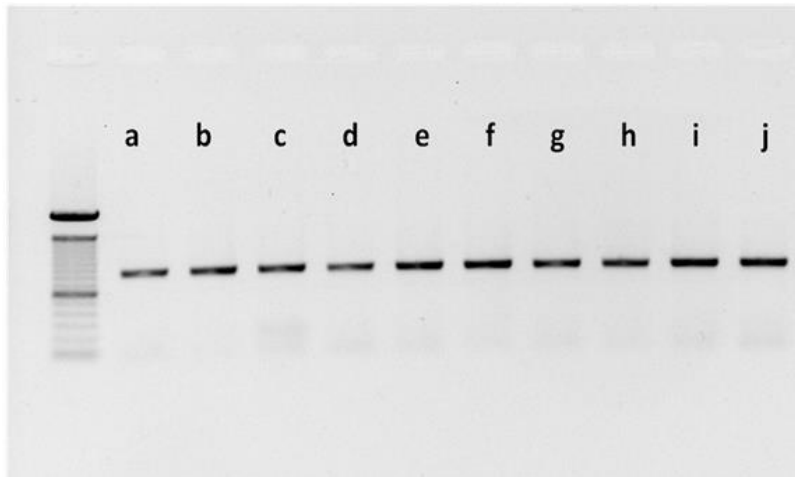


Figura 7. Producto de PCR amplificando la región trnL-trnF, aplicado a 9 de 10 colectas, en donde: a) Ciudad de México, b) Brasil, c) Sonora, d) Puebla, e)Chile, f) Oaxaca, g) EUA, h) Brasil, i) EUA y j) Guanajuato.

Finalmente se amplifico la región psbJ- petA (Kistler *et al.*, 2015), en donde los pares de primers amplificaron de manera satisfactoria (1200 pb) para realizar la amplificación, secuenciación y la genealogía (Figura 7).

El Cuadro 10 muestra el ID asignado para cada secuencia utilizadas para identificarlas en la genealogía.

Cuadro 10. Muestras procesadas *C. maxima* para la identificación de la semilla, con un total de 77 individuos.

No.	ID	Herbario/BG/Colecta Localidad	Nº de individuos
1	BG756	BG Celaya y Jalisco	13
2	Ab	Brasil	10
3	Va	Brasil	12
4	Na	Los Nanches, Oaxaca	15
5	Acg	Acatzingo, Puebla	8
6	Cm_Chile	Chile	2
7	Cm_Df	Mercado de la Merced, CDMX	3
8	Kab	Miguel Alemán, Sonora	hoja
9	Gol	Arizona, EUA	10
10	Lok	Arizona, EUA	4
Total			77

3.6 Genealogía de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima*

Se realizó el análisis del BLAST en GenBank para corroborar que las secuencias de cloroplasto obtenidas coincidían con la especie esperada teniendo un 93% de identidad con 4 especies, entre ellas *C. maxima* ssp. *maxima*.

Se realizó una genealogía para observar las relaciones existentes dentro de la región. En la figura 8 se muestra la genealogía construida con secuencias de cloroplasto obtenidas de cada individuo colectado y con secuencias obtenidas del genoma completo de cloroplasto con el marcador psbJ- petA (Kistler *et al.*, 2015) y usando secuencias de referencia obtenidas en el laboratorio de evolución molecular

y experimental de las especies *Cucurbita moschata* (Hernández, 2016), *Cucurbita argyrosperma* (Sánchez, 2016), *C. pepo* (Mondragón, 2016).

En el clado 1 se agruparon 45 secuencias pertenecientes a las 10 poblaciones evaluadas (Figura 8), tanto de la República Mexicana como en las del extranjero.

Dichas secuencias se agruparon en el mismo clado con las secuencias de *C. maxima*, *C. maxima* ssp. *andreana* y *C. ecuadorensis* en donde *C. andreana* se reconoce como el ancestro silvestre de *C. máxima* (Nee, 1990; Lira *et al.*, 1995) esto nos da un indicio de cómo se comportan las secuencias con respecto a su ancestro silvestre y a *C. ecuadorensis* sugiriéndonos así, que las secuencias incluidas en este clado pertenecen a *C. maxima*.

Pese a que no hay una genealogía reportada para esta especie Paredes (2016) reporta una filogenia completa del género *Cucurbita* en donde incluye a *Cucurbita maxima* ssp. *maxima*, *Cucurbita maxima* ssp. *andreana* y *Cucurbita ecuadorensis*, secuencias que también se utilizaron para este trabajo en donde existe una similitud en la formación de las ramas ya que las tres secuencias se agrupan en un mismo clado.

En el segundo clado se agruparon 6 de las 10 accesiones colectadas. Este clado está conformado por 25 secuencias y predominaron las muestras comerciales de Brasil, (Va). Cabe señalar que dentro de este grupo se agrupan tres secuencias pertenecientes a *C. pepo*, *C. moschata* y *C. argyrosperma*.

El ultimo clado está conformado por secuencias de *C. pepo*, que como se esperaba se encuentran aisladas del resto de las secuencias y agrupadas entre ellas.

Estos clados no se resuelven de la manera que se esperaría ya que el marcador (oligonucleótido) no es capaz de definir entre especies ni dentro de la especie, es

por esta razón que algunas de las muestras se agrupan al mismo clado que *C. moschata*, *C. argyrosperma* y *C. pepo*.

La accesión de Oaxaca se muestra en los dos clados, esto podría entenderse como una mezcla entre *C. maxima* y *C. moschata* sin embargo esto no puede ser comprobable solo con las secuencias de cloroplasto, pero hay que tomar en cuenta que las semillas donadas ya listas para la siguiente siembra por la Sra. Alfonsina H., correspondían perfectamente a *C. moschata*, testa bien definida en la semillas por el color dorado, esto pudiera decirnos que pudiese tratarse de una introgrección entre *C. moschata* y *C. maxima* debido a que en estudios anteriores demuestran que esto puede ser posible (Lira *et al.*, 1995) y por esta razón las semillas muestran características propias de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima*.

Las topologías obtenidas para la genealogía no pueden ser comparadas o igualadas con alguna otra filogenia de la especie debido a no existen estudios previos en México sobre alguna genealogía de esta especie ya que es poco estudiada sin embargo este trabajo define las relaciones dentro de cada clado, resolviendo de manera satisfactoria la identidad de las colectas pese a la baja resolución que el marcador utilizado presenta para esta especie.

3.7 Variación genética

Estudios previos sobre variación genética en *C. maxima* han sido realizados con poblaciones de distintos países y utilizando marcadores moleculares como RAPD y AFLPs con muestras de Argentina, Perú y Ecuador de donde es originaria *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* en donde la diversidad haplotípica (H_d) oscila entre 0.1059 para poblaciones de Argentina (Ferriol *et al.*, 2003; Esteras *et al.*, 2012). Sin embargo, para este trabajo se utilizaron únicamente secuencias de cloroplasto abarcando únicamente la región psbJ-petA del genoma de cloroplasto y muestras obtenidas del país.

Se realizó el análisis de estimadores de diversidad genética, en donde el número de haplotipos obtenidos fueron dos, con un total de 4 sitios segregantes, los cuales no se encuentran presentes en todas las secuencias y podemos observar que la colecta de Sonora no presentan variación con un valor de cero para todos los parámetros, tomando en cuenta que es un cultivo extensivo y que todos los frutos presentan homogeneidad unos con otros, es decir que no muestran variación morfológica y en este caso ni genética (Cuadro 11).

La diversidad haplotípica (H_d) fue de 0.451 para el total de las secuencias y la diversidad nucleotídica (π) total fue de 0.00192, sin embargo, en trabajos recientemente presentados *Cucurbita pepo* tiene una $H_d = 0.388$ y π de 0.0033 (Mondragón, 2016) en donde las colectas de *C. maxima* presentan mayor diversidad haplotípica tomando en cuenta que las poblaciones de *C. pepo* solamente fueron secuencias utilizadas de colectas de los estados de Chihuahua y Sonora y las de *C. maxima ssp. maxima* abarcan todo el país.

Al calcular los estimadores de diversidad para cada colecta por separado se puede observar que algunas accesiones comparten el mismo haplotipo y se observa mayor diversidad haplotípica y nucleotídica en la accesión del D.F., a diferencia de las accesiones de Sonora, Guanajuato y Chile, que no presentan variación (Cuadro 11).

Tomando los datos entre colectas, la colecta de Oaxaca obtuvo una mayor $H_d = 0.54545$, no es el valor más alto pero se considera debido a que fue una colecta en campo, esto pudo ser debido a que proviene de una parcela en donde se cultiva con el sistema tradicional milpa, en el cual de acuerdo con Mera *et al.* (2011), las calabazas se han desarrollado y domesticado al interior de los sistemas agrícolas tradicionales mesoamericanos conocidos como "milpa" en donde se cultivan en forma asociada maíz-frijol-calabaza o maíz-calabaza y este representa un escenario interesante para el estudio de la diversidad genética de los cultivos participantes en estas asociaciones (Montes, 2002).

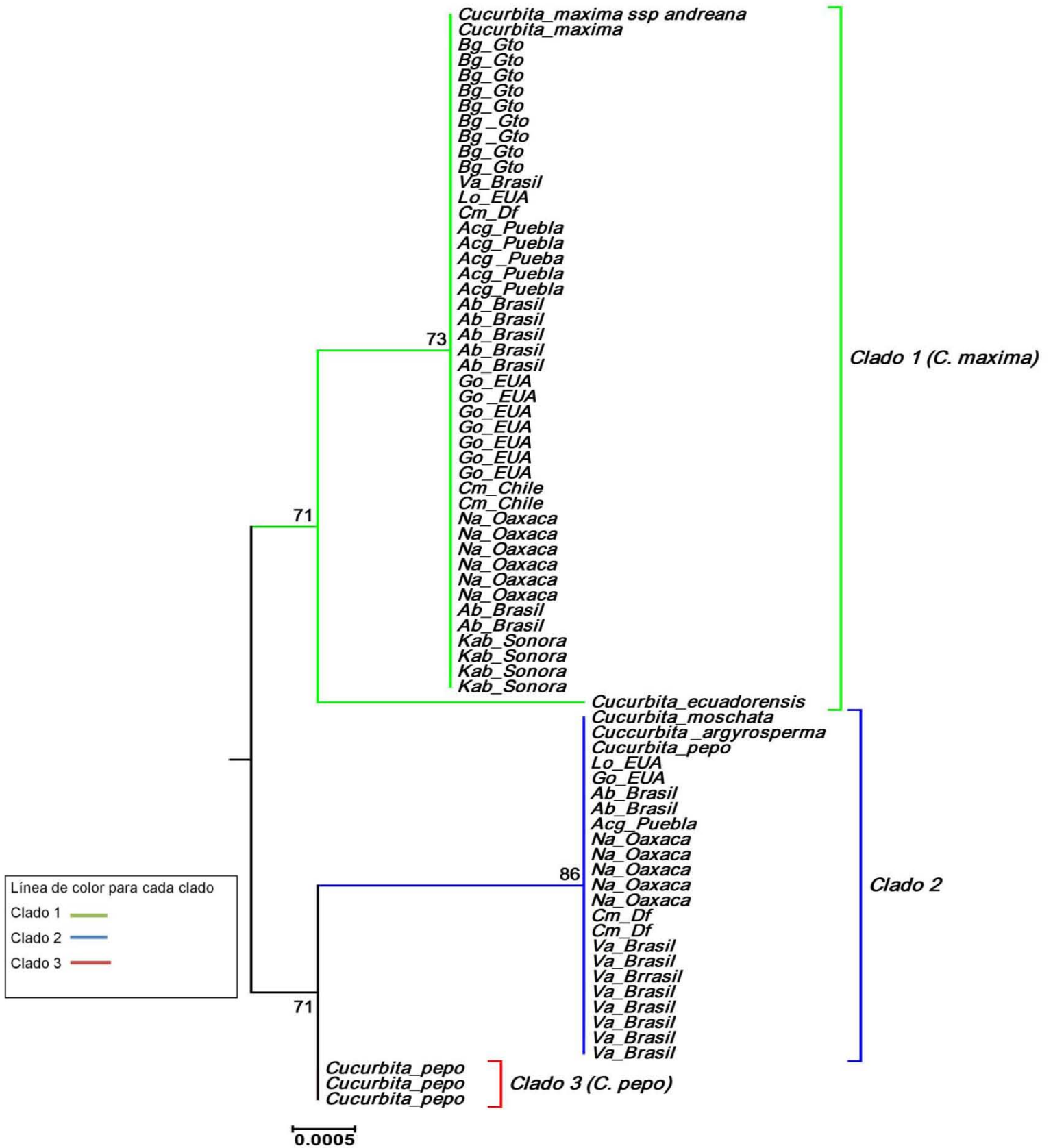


Figura 8. Genealogía de las secuencias *C. maxima* ssp. *maxima*. La topología y las longitudes de las ramas se obtuvieron por medio de un análisis de máxima verosimilitud con un modelo de Jukes-Cantor utilizando el marcador psbJ- petA. Se llevaron a cabo 1000 réplicas bootstrap.

Cuadro 11. Estimadores de diversidad genética donde n= número de individuos, h= número de haplotipos, s = sitios segregantes, Hd= diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica y θ_w = theta de Watterson.

Accesión	N	H	S	Hd	π	θ_w
Na_Oaxaca	11	2	4	0.54545	0.000233	0.00146
Ka_Sonora	4	1	0	0.0	0.0	0.00000
Cm_DF	3	2	4	0.66667	0.00284	0.00284
Bg_Guanajuato	8	1	0	0.0	0.0	0.00000
Acg_Puebla	6	2	4	0.33333	0.00142	0.00187
Ab_Brasil	9	2	4	0.38889	0.00166	0.00157
Va_Brasil	11	2	4	0.18182	0.00078	0.00146
Go_E.U.A	8	2	4	0.25000	0.00107	0.00164
Lo_E.U.A	2	2	4	1.00000	0.00426	0.00426
Cm_Chile	2	1	0	0.00000	0.00000	0.0
Total	63	2	4	0.451	0.00192	0.0009

La diferenciación genética estimada a partir de F_{st} pareadas entre accesiones de *C. maxima* ssp. *maxima*, indica las similitudes de algunas secuencias con otras (Cuadro 12).

Los valores de F_{st} pareadas muestran que las calabazas comerciales de Va_Brasil son las que se encuentran altamente diferenciadas particularmente respecto a las Kabochas de Sonora, las del banco de germoplasma de Guanajuato y las de Chile. Las secuencias de Lo_EUA no se encuentran diferencias de las accesiones colectadas en México, ya que todos los valores obtenidos fueron de 0.

En la matriz de divergencia se observa que las secuencias de la accesión de Sonora son muy distintas a las secuencias de Brasil y obteniendo valores considerables para tomarla como no tan semejante a las demás secuencias y las secuencias de Estados Unidos (Lo) son semejantes a todas las accesiones. Son valores confiables en los que nos indica la similitud de las secuencias y que pertenecen a una sola especie (Cuadro 12).

Cuadro 12. Matriz de divergencia genética F_{st} pareadas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.Va Brasil										
2.Kab Sonora	0.900									
3.Cm Df	0.000	0.500								
4.Go EUA	0.732	0.000	0.267							
5. Ab Brasil	0.608	0.125	0.109	0.000						
6. Bg Gto.	0.900	0.000	0.500	0.000	0.125					
7.Na Oaxaca	0.323	0.400	0.000	0.146	0.016	0.400				
8.Lo EUA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
9.Cm Chile	0.900	0.000	0.500	0.000	0.125	0.000	0.400	0.000		
10.Cm Puebla	0.667	0.000	0.182	0.000	0.000	0.000	0.065	0.000	0.000	

A partir de la matriz de distancias genéticas pareadas que se obtuvieron para las secuencias de cada colecta se construyó un árbol de distancia mediante el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) que se muestra en la Figura 9.

En este se pueden observar tres grupos de colecta en donde se encuentran dos ramas muy diferenciadas, siendo Va_Brasil la colecta más lejana a las demás.

Otro grupo está conformado por las accesiones de Cm_Df y Na_Oaxaca compartiendo la misma rama esta la otra colecta de Brasil Ab_Brasil y tercer grupo está compuesto por el resto de las accesiones en donde se juntaron las colectadas en México y Estados Unidos.

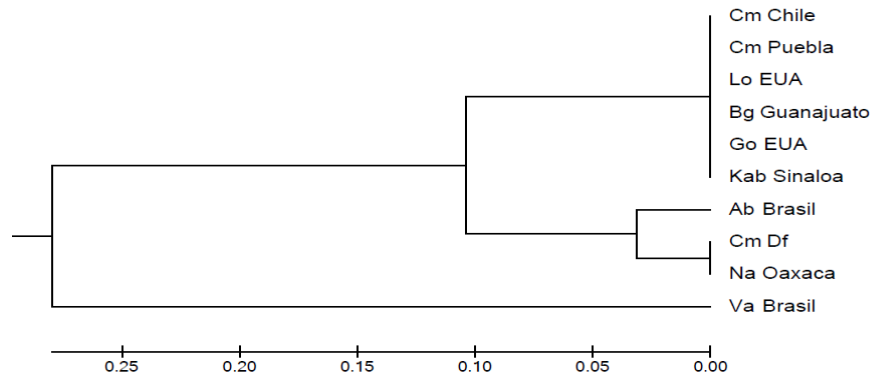


Figura 9. Árbol de diferenciación genética F_{st} para las accesiones completas de *C. maxima*.

4. Conclusiones

1. A lo largo de este estudio se pudo obtener información sobre la distribución de *C. maxima* dejando evidencia en donde no había registros y otros continuaron siendo sitios de referencia para la localización de esta especie como lo es la costa de Sonora.
2. El análisis de los datos obtenidos de todas las fuentes de información, sugiere que, a) las semillas de *Cucurbita maxima* ssp. *maxima* si se comercializan en México y, b) su cultivo no está difundido de manera amplia en el país.
3. Las técnicas morfológicas y moleculares son un complemento esencial para la determinación o identificación de una especie de la cual se conoce muy poco y de esta manera obtener resultados confiables para sustentar que el material encontrado durante el trabajo campo pertenecen a *Cucurbita maxima* ssp *maxima*.
4. La genealogía resolvió las dudas acerca de las accesiones, si bien no se obtuvo una resolución como se esperaba existe evidencia genética de que las secuencias utilizadas en este trabajo corresponden a *C. maxima*.
5. Los niveles de variación genética encontrados de acuerdo con la literatura son altos en conjunto para todas las colectas, sin embargo, hay mayor variación genética dentro de cada colecta como lo es en los estados de Oaxaca y la Ciudad de México.

5. Recomendaciones

- Continuar con la búsqueda de esta especie por el resto del país, ya que tres viajes no fueron suficientes para cubrir algunos estados como es el caso de Michoacán, Nuevo León, Zacatecas y Tamaulipas debido a la situación actual del país.
- Utilizar los tres pares de oligonucleótidos restantes citados por Shaw *et al.*, 2007, para probar si alguno de ellos muestra más variación en las secuencias y de esta manera obtener una genealogía más robusta para estas secuencias.
- Continuar la investigación morfológica para cubrir los aspectos faltantes de los descriptores morfológicos, ya que para estas accesiones solo fue posible mantenerlas hasta 20 días después de su emergencia.

6. Literatura Citada

1. Alverson, J. A., Wei, X., Rice, W. D., Stein, B. D., Barry, K., Palmer, D. J. 2010. Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequence of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Evolution of plant mitochondrial genome size*. 26 (6):1436- 1448.
2. Arvayo O, R., Garza O, S., Yahia E. 2014. Respuesta en postcosecha de Calabaza Kabocha (*Cucurbita maxima* Duch) a temperatura, tiempo de almacenamiento y tratamiento de agua. Informe Final. México
3. Barrera, R. 2015. Producción de calabaza cabocha en Miguel Aleman, Sonora. Asociacion Agricola local ejidal de Valle–Carrizo. [Entrevista]. México 2 de Noviembre.
4. Biodiversidad Mexicana, Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. (En línea). Consultado 14/10/15 http://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/que_es
5. Biodiversidad Mexicana, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. (En línea). Consultado 28/11/15. <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/vargenetica.html>
6. BLAST. Local Alignment Search Tool. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
7. Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *EUA. Phytocemistry Bulletin* 19: 11-15.
8. Espinoza, A. L. 2007. Ecología Molecular, Quinta sección: Las herramientas moleculares, Guía práctica sobre la técnica PCR. Compiladores Eguiarte, *et al.* (2007). México. Instituto Nacional de Ecología. Vol. 17: 519.
9. Esteras, C., Sifres, A., Nuez, F., Picó, B. 2012. Variabilidad de *Cucurbita maxima* en su zona de origen: un recurso de interés para la mejora de esta

hortaliza. España. Instituto de la conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana (CONAV): 1284-1290

10. Ewing, B., Green, P., Hillier, L., Wendl, M. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
11. Ferriol, M., Picó, B., Nuez, F. 2003. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 50: 227-238.
12. Financiera Rural. 2011. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. México. (En línea). Consultado 15 de enero. <http://www.fiancierarural.org.mx/informacionsectorrural.pdf>
13. Garza, O. S. 2014. *Cucurbita maxima*, Calabaza kabocha en Sonora. México. (Entrevista). 25 de mayo
14. Guerrero, R.C. 2010. Características y producción de calabaza kabocha. (En línea). Consulta 27 de junio. <http://www.hortalizas.com/cultivos/cucurbitaceas/caracteristicas-y-produccion-delcultivo-de-cabaza-kabocha>.
15. Hamilton, B, M. 1999. Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenetic regions with intraspecific variation. E.U.A. Blackwell Science, *Molecular Ecology*, 8: 513-525.
16. Hernández, R. H. 2016. Genética de poblaciones y filogeografía de *Cucurbita moschata* Duch. en México. Tesis de Doctorado inédita (en preparación). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología. México.
17. Kistler, L., Newson, L. A., Ryan, M. T., Clarike, A., Smith, D, Bruce., Perry, H. G. 2015. Courds and squashes (*Cucurbita* spp.) adapted to megafaunal extinction and ecological anachromist through domestication. E.U.A. University Oklahoma, Editorial Board: 4-11.

18. Kitagawa, Y. 2016. Aduana internacional, Tokio Japón. Comunicación personal.
19. 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. y Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
20. Lira, S. R., Andres, T. C., Nee, N. 1995. 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: 1-115.
21. Lira, S. R., Caballero, J. 2002. Ethnobotany of the wild mexican Cucurbitaceae. *Economic Botany* 56 (4): 380-398.
22. Lira S. R., I. Rodríguez Arévalo. 2006. Catalogo de la familia Cucurbitaceae de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIB-COABIO proyecto DS002. México D.F.
23. Manzanilla, L., Serra, M.C. 1987. Aprovechamiento de los recursos de origen biológico en la cuenca de México (2500 antes de Cristo- 1500 después de Cristo). Instituto de Investigaciones Biológicas Antropológicas, UNAM. *Geof. Int.*, Vol. 26 -1: 15-28. México.
24. Mera, O. L. M, Bye, B. R. A, Villanueva, V. C., Luna M, A. 2011. Documento de diagnóstico en las especies cultivadas de *Cucurbita* L. UNAM, Instituto de Biología. SNICS, SINAREFI Y SAGARPA. México
25. Mondragón, R. K. 2016. Filogeografía de *Cucurbita pepo* spp. *pepo* en México. Tesis de licenciatura inédita (en preparación). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México.

26. Montes, H.S. 2002. Flujo génico en Calabazas (spp) dentro del sistema milpa en el occidente de México. Tesis Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
27. Nee, M. 1990. The Domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44 (3): 56-68.
28. Paredes, T. L. 2016. Filogenia molecular del género *Cucurbita* L. (CUCURBITACEAE) usando secuencias de cloroplasto. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
29. Rozas, J., Librado, P., Sánchez, J.C., Rozas, R. 2010. DNA Sequence Polymorphism Version: 5.10.1. España. Universidad de Barcelona.
30. SAGARPA. SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2015. (Consulta en línea). <http://www.siap.gob.mx> (Consultado el 14 abril de 20014, el 20 de octubre de 2014, el enero de 21015 y en noviembre de 2015)
31. Sánchez, de la V. G. 2016. Diversidad y flujo génico entre la variedad cultivada y silvestre de *Cucurbita argyrosperma* (Cucurbitaceae) inédita (en preparación). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología. México
32. Sanjur, O.I., Piperno, D.R., Andres, T. C., Wessel-Beaver, L. 2002. "Phylogeetic 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. EUA.* 99: 535-540.
33. Shaw, J., Lickey, E., Schilling, E., Small, R. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: The tortoise and the hare III. *E.U.A. American Journal of Botany* 94 (3): 275- 288.

34. Taberlet, P, Gielly, L, Pautou, G., Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non- coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105- 1109.
35. Tamura, K, Stecher, G, Peterson, D, Filipski, A., Kumura, S. 2013 MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725- 2729. <http://www.megasoftware.net>
36. Vazquez, L. A. 1996. Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus L.*: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias. México.
37. Villanueva, V. C. 2007. Calabazas cultivadas: Identificación de especies, caracterización y descripción varietal. México. Universidad Autónoma de Chapingo: 27-29
38. Whitaker, T. W., West. 1987. Prehistoric Cultivated Cucurbits from the Viru Valley, Perú. Vol. 33: 275-279.

ANEXOS

Anexo1. Entrevistas semiestructuradas



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Ingeniería Agrícola

Municipio: Fecha: Coordenadas Geográficas:
Localidad:
Msnm:
Nombre del entrevistador: Paulina Hernández
Nombre del entrevistado:
Nombre común del cultivo:

¿Cuál es su fecha de siembra y el tiempo para la cosecha (fruto en verde o madura)? Siembra-junio y

Densidad de siembra:

Cultivo:

- a) traspatio b) comercialización

Cómo obtuvo la semilla:

- a) Compra b) Selección del ciclo anterior c) Intercambio

Observaciones:

¿Asociación con otros cultivos y cuáles son?

¿Es para venta o autoconsumo?

¿Qué partes de la planta se comercializa y/o utiliza en mayor cantidad?

¿A qué precio se comercializa la calabaza?

A dónde la comercializa:

- a) Mercado local b) regional c) Estatal

¿Existen algún tipo de calabaza diferente que conozca y cuáles son sus nombres comunes?

¿Realiza algún cruzamiento y cuál es su método?

Anexo 2. Claves de Identificación.

1a. Plantas domésticas, raramente persistentes como escapadas más de una generación en hábitats perturbados tales como orillas de arroyos, caminos, basureros o en los alrededores de sitios habitados y en campos agrícolas; hábito rastrero o trepador de tipo subarborescente, los tallos generalmente de 3- 10 cm de diámetro; frutos generalmente de más de 10 cm de diámetro, algunas veces mucho más grandes, lisos o diversamente verrucosos y/o costado-sulcados; pedúnculo generalmente menos de 10 cm de largo; mesocarpo o pulpa de color blanco, amarillo o anaranjado, fibroso, usualmente de sabor agradable o al menos no amargo; cavidad seminal proporcionalmente pequeña, excepto en algunos cultivares o razas locales seleccionadas para producción de semilla; semillas generalmente más de 1cm de largo.

2a. Semillas totalmente negras o pardo oscuras al madurar.....*C. ficifolia*

2b. Semillas blancas a pardas al madurar al menos en la porción central.

3a. Semillas con los márgenes de color azul- grisáceo-verdoso.....*C. argyrosperma ssp. argyrosperma*

3b. Semillas de todos los colores, pero nunca con los márgenes de color azul- grisáceo-verdoso.

4a. Semillas infladas con corte transversal, con la testa engrosada (1-2 mm); márgenes de la semilla no conspicuamente realzados o delimitados por un surco; pedúnculo del fruto cilíndrico, indistintamente anguloso, al madurar con estrías corchosas irregulares.....*C. maxima ssp. maxima*

4b. Semillas comprimidas a moderadamente infladas en corte transversal, generalmente con la testa delgada (menos de 1mm); márgenes de la semilla realzados o conspicuamente delimitados por un surco; pedúnculo del fruto uniformemente rígido, 5- anguloso-sulcado (al menos en el punto de unión) y leñoso a cilíndrico a globoso y entonces más o menos suave y notablemente ensanchado, nunca con estrías corchosas irregulares a madurar.

5a. Pedúnculo del fruto liso a sulcado o costado, ligera a notablemente ensanchado en toda su longitud, transformándose a cilíndrico, claviforme o subgloboso; peciolo y venas principales en la superficie abaxial de las hojas pubescentes a pilosas.....**C. argyrosperma ssp. argyrosperma**

5b. Pedúnculo del fruto sulcado o costado, ligera a notablemente ensanchado en el punto de unión, pero nunca transformándose en cilíndrico, claviforme o subgloboso; peciolo y venas principales en la superficie abaxial de las hojas largas y suavemente pubescentes a fuertemente áspero- espiculadas.

6a. Margen de las semillas de diferente color y /o textura que la parte central o sin uniforme, entonces las semillas de color blanco o pardo claro.....**C. moschata**

6b. Margen de la semilla siempre del mismo color que la parte central, semillas de color blanco opaco o pardo claro.

7a. Semillas elípticas a altamente elípticas con el margen simple, frutos globosos, elípticos u ovoides, grandes (15- 50 cm de largo), superficie densa o diminutamente ondulada, pulpa de color blanco; filamentos conspicuamente pubescentes.....**C. ficifolia**

7b. semillas angostamente a anchamente elípticas, margen simple o con un borde o surco doble; frutos de formas diversas, incluyendo las anteriores o lenticulares u oblados, piriformes o claviformes, pequeños a grandes, superficie lisa a sulcado- costada, con franjas y /o verrugas, pulpa comúnmente de color amarillo a anaranjado, raramente blanca; filamentos glabros..... **C. pepo ssp. pepo**

(Lira *et al.*, 1995)

Anexo 3. Descriptores morfológicos y taxonómicos de Calabaza (*Cucurbita* spp.)

Se caracterizaron los frutos correspondientes a las colectas de Oaxaca (1) y sonora (2). A un costado se encuentra el valor para cada colecta.

1. LUGAR Y FECHA DE CARACTERIZACIÓN:

1.1. Lugar de caracterización:

Fecha de caracterización

2. CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO MADURO

Úsense frutos completamente maduros y bien formados.

2.1. Días a fructificación

El 50 % de las plantas al menos con un fruto maduro.

2.2. Uniformidad de población

- | | |
|---------------|--------|
| 1. 80 – 100 % | (1): 2 |
| 2. 50 – 79 % | (2): 1 |
| 3. 25 – 49 % | |
| 4. 01 – 24 % | |

2.3. Forma del fruto

- | | | |
|--------------------------------|----------------------|--------|
| 1. globular o redonda | 8. dumbo | (1): 7 |
| 2. achatada o aplanada | 9. elongada | (2): 1 |
| 3. disco o empanada | 10. turbina superior | |
| 4. bloque oblongo (cilíndrica) | 11. turbina inferior | |
| 5. elíptica (oval) | 12. coronada | |
| 6. bellota o corazón | 13. curvada | |
| 7. piriforme | 14. cuello curvado | |



2.4. Longitud del fruto (cm)

Utilizar un fruto, de preferencia de los primeros.

2.4. Diámetro del fruto (cm)

De la parte más ancha.

2.5. Peso del fruto (g)

2.6. Características de la epidermis (Epicarpio)

2.6.1. Color primario o color predominante del fruto maduro.

El color predominante es el que cubre la superficie más grande del área del fruto. En caso de que dos colores tengan la misma superficie,

el área de color más claro será considerada como la predominante.

- | | | |
|--------------------------|---------------|-------|
| 1. no hay color primario | 7. anaranjado | (1):5 |
| 2. blanco | 8. rojo | (2):7 |
| 3. verde | 9. rosa | |
| 4. azul | 10. café | |
| 5. crema | 11. gris | |
| 6. amarillo | 12. negro | |



2.6.2. Color secundario del fruto maduro.

El color secundario es el que cubre la segunda área más grande del fruto. En caso de que dos colores tengan la misma superficie, el área de color más claro será considerada como la predominante.

- | | | | |
|----------------------------|---------------|-----------|--|
| 1. no hay color secundario | 3. verde | 8. rojo | |
| 4. azul | 9. rosa | (1): 3 | |
| 5. crema | 10. café | (2):5 | |
| 6. amarillo | 11. gris | | |
| 2. blanco | 7. anaranjado | 12. negro | |

2.6.3. Color terciario del fruto maduro

- | | | |
|---------------------------|-----------|---------|
| 1. no hay color terciario | (1):0 | |
| 2. blanco | | 8. rojo |
| 3. verde | (2):0 | |
| 4. azul | 9. rosa | |
| 5. crema | 10. café | |
| 6. amarillo | 11. gris | |
| 7. anaranjado | 12. negro | |

2.6.4. Distribución del color primario

Distribución de los colores la epidermis del fruto maduro.

Pecas. Motas menores de 5 mm.

Manchas. Motas mayores de 5 mm.

Franjas. Bandas que recorren el fruto desde su unión con el pedúnculo hasta el ápice, la anchura de las franjas es menor en su central y disminuye hacia extremos.

Rayas. Motas alargadas cuya longitud es menor de 4 cm y cuya anchura menor de 1 cm.

1. total de la epidermis (1): 1
2. franjas (2): 2
3. manchas
4. franjas y manchas
5. franjas y pecas
6. manchas y pecas



2.6.5. Distribución del color secundario

- | | | |
|--------------------------|---------------------|--------|
| 0. ausente | 5. rayas | (1): 6 |
| 1. resto de la epidermis | 6. franjas y machas | (2): 3 |
| 2. franjas | 7. franjas y pecas | |
| 3. manchas | 8. manchas y pecas | |
| 4. pecas | 9. pecas y rayas | |

2.6.6. Distribución del color terciario

- | | | |
|----------------------|-------------------|-------|
| 0. ausente | 5. pecas | (1):0 |
| En color primario: | 6. rayas | (2):0 |
| 1. manchas | En ambos colores: | |
| 2. pecas | 7. manchas | |
| 3. rayas | 8. pecas | |
| En color secundario: | 9. rayas | |
| 4. manchas | | |

2.6.7. Dureza de la epidermis.

Presionar con la uña del dedo pulgar la epidermis del fruto.

1. **suave**, con facilidad se estampa la huella de la uña.
 2. **intermedia**, difícilmente se estampa la huella de la uña.
 3. **dura**, no es posible estampar la huella de la uña.
- (1):3 (2):2

2.7. Pronunciación de lomos

2.7.3. Presencia de la pronunciación de lomos en la parte basal (proximal) del fruto. Considerar la pronunciación del tercio proximal del fruto.

1. ausente (1):5
3. poca (2):1
5. intermedia
7. marcada

2.7.4. Forma de la pronunciación de lomos en la parte basal (proximal) del fruto

1. lisa sin costilla (1): 3

- 3. ranurada (2): 1
- 5. intermedia
- 7. forma de v (estrella)



1. Lisa sin costillas

3. ranurada

5. intermedia

7. forma de v (estrella)

2.7.5. Presencia de la pronunciación de lomos en la parte apical (distal) del fruto. Considerar la pronunciación del tercio distal del fruto.

- 1. ausente (1):5
- 3. poca (2):1
- 5. intermedia
- 7. marcada

2.7.6. Forma de la pronunciación de lomos en la parte apical (distal) del fruto

- 1. lisa sin costilla (1):3
- 3. ranurada (2):3
- 5. intermedia
- 7. forma de v (estrella)

2.8. Características de la pulpa del fruto maduro

2.8.3. Color de la pulpa del fruto maduro

- | | | |
|----------------------|----------------------|-------|
| 1. blanco | 8. anaranjado rojizo | |
| 2. crema | 9. amarillo verdoso | (1):5 |
| 3. amarillo pálido | 10. verde | (2):7 |
| 4. amarillo | 11. verde intenso | |
| 5. amarillo naranja | 12. café | |
| 6. anaranjado pálido | | |
| 7. anaranjado | | |



2.8.4. Grosor de la pulpa del fruto maduro (mm)

3. CARACTERÍSTICAS DEL PEDÚNCULO COMPLETAMENTE DESARROLLADO

3.6. Forma del corte transversal del pedúnculo. Cortar el pedúnculo por su parte de unión con el fruto

1. redondeada (1):2
2. angulosa (2):1
3. estrellada

3.7. Forma de la inserción del pedúnculo al fruto

1. **recta**, el diámetro permanece casi constante a lo largo del pedúnculo.
2. **aplanada**, solo la parte del pedúnculo próxima al fruto se ve incrementada en su diámetro.
3. **abultada**, diámetro del pedúnculo incrementado en casi toda su longitud, debido a la acumulación de corcho rugoso.



4. CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA

4.1. Longitud de la semilla (mm). Incluyendo el margen. Anotar un promedio de 10 semillas

4.2. Ancho de la semilla (mm). Incluyendo el margen. Anotar un promedio de 10 semillas

4.3. Rendimiento (Peso) de semillas por fruto

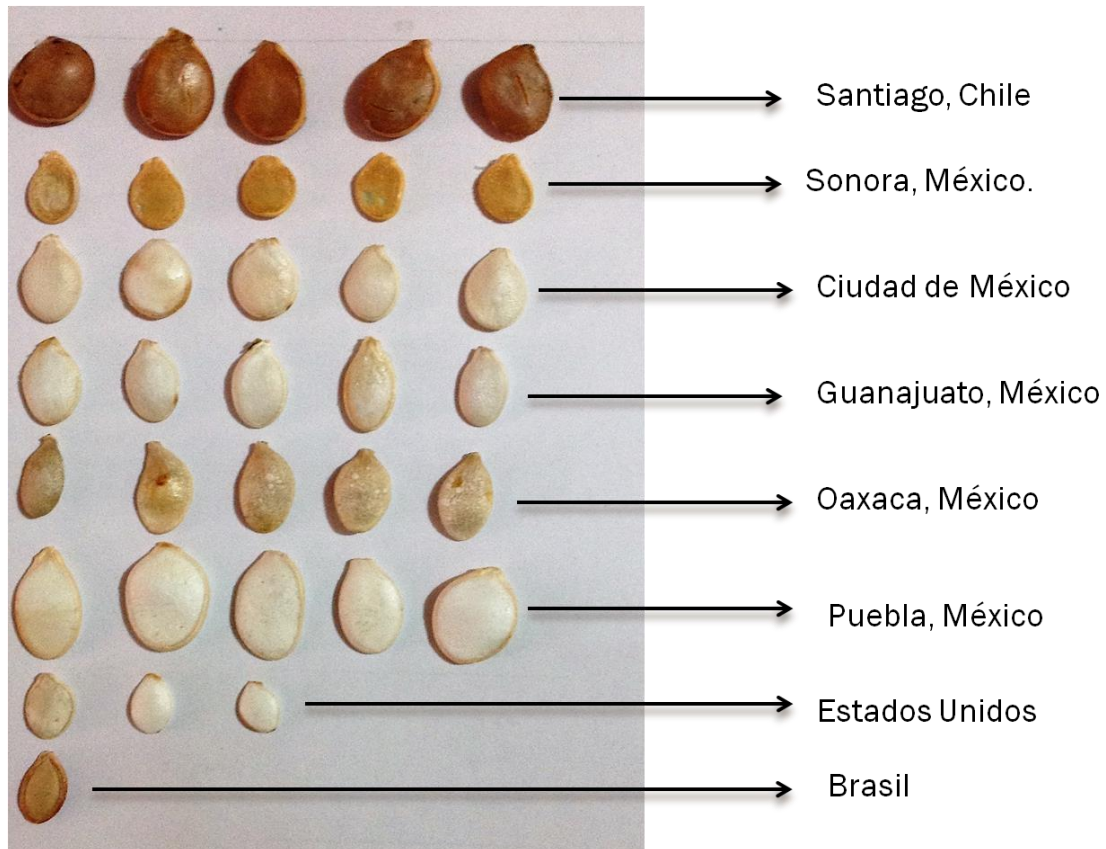
4.4. Peso de 100 semillas (g) con testa

4.5. Peso de 100 semillas (g) sin testa

4.6. Características del margen de la semilla

4.6.1. Tipo de margen de la semilla

1. ausente (1):1
3. delgado y uniforme (2):7
5. delgado e irregular
7. grueso y uniforme
9. grueso e irregular



4.6.2. Color del margen de la semilla

- | | | |
|-------------------|-----------------------|-------|
| 1. margen ausente | 6. café | (1):1 |
| 2. blanco | 7. gris | (2):4 |
| 3. crema | 8. negro | |
| 4. amarillo | 9. mismo que la testa | |
| 5. anaranjado | | |

4.7. Características de la testa de la semilla

4.7.1. Color de la testa de la semilla

- | | | |
|------------------|---------------|-------|
| 1. testa ausente | 5. anaranjado | (1):4 |
| 2. blanco | 6. café | (2):4 |
| 3. crema | 7. gris | |
| 4. amarillo | 8. negro | |

Anexo 4. Método de extracción Mini-Prep para plantas.

Este método fue modificado de acuerdo a las necesidades de las plantas, en este caso para el género *Cucurbita*

- 1.- Moler el tejido fresco con nitrógeno líquido en un mortero limpio hasta pulverizar.
- 2.- Preparar un stock de CTAB + Mercaptoetanol con la siguiente relación:
Por cada 100 ml de CTAB, agregar 300 µl de mercaptoetanol
- 3.- Seguir moliendo el tejido con 700 µl de CTAB + Mercaptoetanol al 2x hasta homogenizar.
- 4.- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos con 8 µl de RNAsa
- 5.- Incubar a 60 °C durante 20 minutos con agitación
- 6.- Agregar 500 µl de Cloroformo: Octanol 24:1 a temperatura ambiente y agitar hasta homogenizar.
- 7.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- 8.- Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml recuperando 300 µl.
- 9.- Agregar 2/3 partes del volumen final de isopropanol frio (aproximadamente 250 µl)
- 10.- Dejar reposar a – 24°C entre 2 a 24 horas.
- 11.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
- 12.- Lavar la pastilla con 500 µl de etanol y centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos.
Repetir este proceso de dos a tres veces según el color de la pastilla.
- 13.- Dejar secar la pastilla en una campana de flujo durante 20 minutos aproximadamente.
- 14.- Resuspender la pastilla con 300 µl de Agua irradiada.
- 15.- Poner en agitación dos horas antes para que la pastilla se diluya rápidamente antes de realizar un gel de agarosa para revelar la presencia de ADN.

Anexo 5. Fotografías de *C. maxima* ssp. *maxima*

Colecta de Miquel Alemán. Sonora



Colecta Los Nanches, Oaxaca



Colecta de Santiago, Chile



Colecta de Acatzingo, Puebla





Colecta Banco de Germoplasma Celaya, Guanajuato



Colectas viaje 1

