

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Estructuración genética de una variedad criolla de *Cucurbita pepo*, en Baja Verapaz,  
Guatemala.”

INFORME DE TESIS

Presentado por

**Raquel Asunción Lima Córdón**

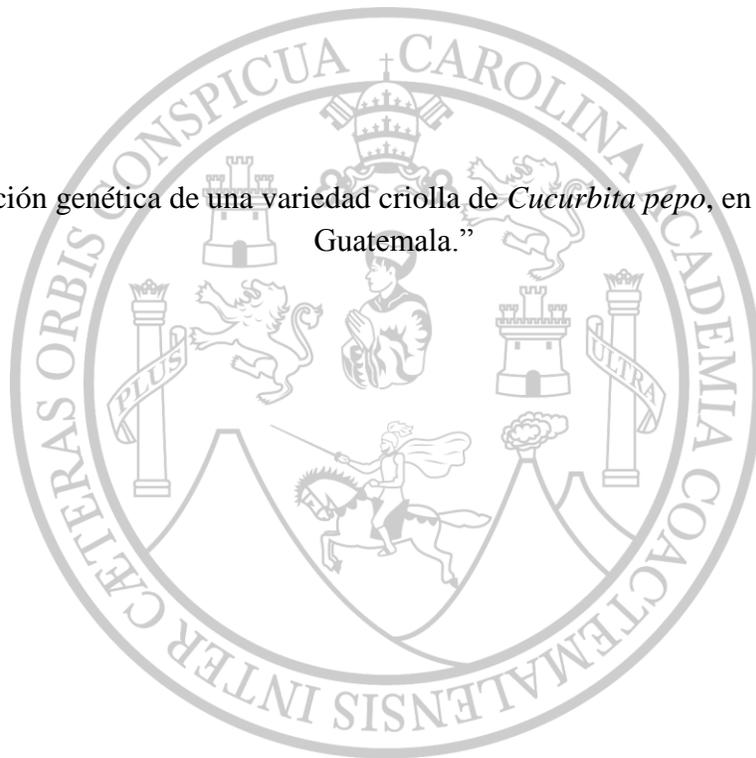
Para optar al título de

Bióloga

Guatemala, Enero del 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Estructuración genética de una variedad criolla de *Cucurbita pepo*, en Baja Verapaz,  
Guatemala.”



**Raquel Asunción Lima Cerdón**

Bióloga

Guatemala, Enero del 2015

## **JUNTA DIRECTIVA**

PhD. Óscar Manuel Cóbar Pinto	DECANO
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	SECRETARIO
Licda. Liliana Magaly Vides S. de Urizar	VOCAL I
PhD. Sergio Alejandro Melgar Valladares	VOCAL II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	VOCAL III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	VOCAL IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	VOCAL V

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer y dedicar a todas las personas e instituciones sin las cuales, la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A Dios y a la Virgen María por ser mi guía en todo momento.

A mi esposo Josué y a mi hijo Julián por todo su apoyo.

A mis papás, por sus enseñanzas, educación, y sabiduría.

A mis nueve hermanos Eva, Ada, Lis, Silvia, Ana, Pedro, Juanfra, José y Japi (Javier), Nana y demás familia por guiar mi educación y ayudarme incondicionalmente.

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología-LENAP- de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por permitir realizar toda la parte de laboratorio, en especial a la PhD. Carlota Monroy y Licda. Antonieta Rodas.

Al equipo de trabajo del LENAP, por su amistad y apoyo en todo momento, en especial a Marianela, Elizabeth y Gabriela Rodas.

A mi asesora PhD. Eunice Enríquez, por su amistad, paciencia y buenos consejos y a M.Sc. Patricia Landaverde por sus aportes durante los análisis y comentarios en la realización del informe.

A mi revisor PhD. Sergio Melgar por los valiosos aportes realizados a la investigación y paciencia.

Al laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo académico e insumos y análisis brindados para la realización de este trabajo, en especial a Rosalinda Tapia López, Marisol de la Mora y el PhD. Juan Nuñez Farfán.

## INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Generalidades del género Cucurbita	4
3.2. Distribución geográfica del género Cucurbita en Guatemala	5
3.3. Importancia de los cultivos del género Cucurbita	5
3.4. Cucurbita pepo	6
3.4.1. Generalidades	6
3.4.2. Clasificación	7
3.5. Amenazas a las variedades criollas	8
3.6. Estructuración genética	9
3.7. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	10
3.8. Técnicas moleculares más utilizadas para los estudios genéticos de poblaciones	10
3.8.1. Microsatélites (SSR's)	11
3.8.2. Aplicaciones de los microsatélites	12
3.9. Estudios moleculares en Cucurbita pepo	12
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. OBJETIVOS	14
5.1. General	14
5.2. Específicos	14
6. HIPOTESIS	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1. Universo	16
7.1.1. Población	16
7.1.2. Muestra	16
7.2. Materiales	18

7.2.1. Equipo	18
7.2.2. Reactivos	18
7.2.3. Instrumentos	19
7.2.4. Materiales	20
7.3. Métodos	20
7.3.1. Colecta de las muestras	20
7.3.2. Extracción, amplificación y Electroforesis	21
7.3.3. Análisis de los datos	23
8. RESULTADOS	25
8.1. Diversidad genética	25
7.2. Diferenciación Genética	28
8. DISCUSIÓN	32
8.1. Diversidad genética	32
8.2. Diferenciación genética y flujo génico	32
8.3. Endogamia	34
8.4. Introgresión	35
9. CONCLUSIONES	36
10. RECOMENDACIONES	37
11. BIBLIOGRAFÍA	38
12. ANEXOS	43

## 1. RESUMEN

El güicoy (*Cucurbita pepo*) es un cultivo que ha estado presente en América desde las primeras etapas de la agricultura. En Guatemala, es un cultivo tradicional de importancia económica que se ha mantenido de generación en generación. Debido a que es una planta domesticada, ha estado bajo selección artificial, lo que ha provocado pérdida en la diversidad genética de las variedades criollas. El presente estudio tuvo como objetivo determinar si existía estructuración genética entre las poblaciones de la variedad criolla de *C. pepo* y determinar si existe introgresión de la variedad comercial en la variedad criolla. Se utilizaron 8 Microsatelites (SSRs) con el fin de calcular la diversidad genética en 7 poblaciones de *C. pepo*. Los resultados muestran altos niveles de variación genética: un polimorfismo promedio de 0.91, diversidad alélica de 1.66 y la heterocigocidad esperada de 0.346. Así mismo se determinó la variación genética entre las poblaciones de la variedad criolla de *Cucurbita pepo* en el departamento de Baja Verapaz, la cual presenta dos grupos genéticamente diferentes, el primero conformado por los cultivos de las aldeas de El Repollal (criollo y comercial), Chilascó (criollo), Unión Barrios (criollo), Orejuelo (criollo) y El Jute (criollo); y el segundo grupo conformado por la variedad criolla de El Durazno. Se detectó que existe introgresión de la variedad comercial en la variedad criolla de *C. pepo* lo cual puede tener tanto efectos favorables como perjudiciales en la especie ya que al introducir plantas transgénicas, podría ocurrir introgresión.

## 2. INTRODUCCION

*Cucurbita pepo*, conocido como “güicoy”, es una planta que pertenece a la familia Cucurbitaceae, y al género *Cucurbita*. Esta especie ha estado presente en el registro arqueológico del nuevo mundo desde las primeras etapas de la agricultura, que datan en tiempos prehispánicos (Registros desde 8750 AC). *C. pepo* es de importancia económica y se usa para el consumo humano (Azurdia, 1999; Canul, *et al.* 2005; Decker, 1987; Nee, 2010; Gong, *et al.* 2008; Robinson & Decker-Walters, 1997; Smartt & Simmonds, 1995).

*C. pepo*, es considerada como un cultivo tradicional, es decir, el conocimiento que se tiene sobre dicho cultivo, se ha mantenido en las familias de generación en generación. De la misma forma, las semillas también han permanecido en las familias a lo largo de sus generaciones; lo que ha permitido conservar la variabilidad genética de la especie. Es por ello que existe un gran interés en estudiar las variedades criollas debido a su valor potencial como reservorios de variación genética. (Altieri, 1991; Azurdia, 1999)

Actividades como la selección por el hombre, y la ingeniería genética, han provocado cambios en la diversidad genética de las variedades criollas. Provocando el desplazamiento gradual de especies criollas, por especies comerciales; ya que estas últimas poseen rasgos distintivos, seleccionados y mejorados por el hombre. Esto podría estar alterando la estructura genética y modificando así la diversidad genética de la población criolla. Así mismo, estos procesos llevados a cabo por el hombre, podrían modificar el sistema natural de apareamiento y mecanismos de dispersión de estas variedades criollas, así como su morfología, fisiología e incluso la estructura genética. (Connor & Loomis, 2002).

El presente estudio buscó determinar la variación genética en los cultivos criollos de *Cucurbita pepo*, en Baja Verapaz, Guatemala, utilizando los marcadores moleculares

denominados microsatélites (SSR's), los cuales han sido ampliamente utilizados para estudios de genética de poblaciones. Con dichos marcadores, se determinó el porcentaje de loci porlimórficos, el número medio de alelos por locus, la heterocigocidad y los estadísticos de Wright. Se encontró que no existe correlación entre las distancias genéticas de las poblaciones de las variedades criollas de *Cucurbita pepo* colectados y la distancia geográfica entre los puntos de colecta. Estos datos, permitieron determinar el grado de conservación del acervo genético de la especie, así como el rescate de comunidades criollas que puedan estar perdiéndose como consecuencia de la introgresión entre las variedades comerciales y criollas.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Generalidades del género *Cucurbita*

El género *Cucurbita* pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, es un género del nuevo mundo muy bien conocido por sus especies cultivadas. Las especies de éste género forman el grupo conocido como calabazas, y se caracteriza por la gran variedad de formas que poseen sus frutos, ya que van desde globosos hasta formas en pera; sin embargo algunos son elongados. Así mismo, la variedad de colores van desde verdes, café, azul-grisáceo, amarillo, rojo-naranja, entre otros. (Azurdia, 1999; Decker-Walters, 1997; Nee, 2010).

Dentro del género *Cucurbita*, existen 22 especies silvestres, y 5 especies domesticadas (*Cucurbita máxima*, *C. pepo* L. *C. moschata* *C. fistifolia*, *C. argyrosperma*), las cuales están separadas por características morfológicas tales como hojas, tricomas, cálices, corolas, estambres, pedicelos y semillas. Son plantas monoicas, rastreras, trepadoras o subarborescentes; sus flores son muy vistosas de color amarillo pálido a amarillo-anaranjado brillante. Todas las especies contienen el número básico de cromosomas de  $2n = 2X = 40$ . Entre las especies cultivadas puede existir entrecruzamiento del cual se obtienen híbridos parcial o totalmente estériles. (Azurdia, 1999; Smartt & Simmonds, 1995)

Las especies del género *Cucurbita* pueden dividirse en 2 grupos basados en adaptaciones ecológicas. El primero, las mesofíticas anuales, a menudo llamadas perennes de corta duración si las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento, a ésta pertenece *Cucurbita pepo*. El segundo grupo, las xerofíticas, o a menudo llamadas perennes de larga duración, se caracterizan por la presencia de raíces carnosas para el almacenamiento de nutrientes (Smartt & Simmonds, 1995).

### 3.2. Distribución geográfica del género *Cucurbita* en Guatemala

En Guatemala, las especies de *Cucurbita* se encuentran ampliamente distribuidas en todo el país. Éstas han sido cultivadas en forma tradicional como parte del sistema frijol-maíz-cucurbita. *C. ficifolia* (chilacayote) y *C. pepo* (güicoy) se encuentran distribuidas en el altiplano central y occidental, localidades que abarcan desde los 1,400 msnm a 2,600 msnm. *C. moschata* (ayote) presenta una amplia distribución, con respecto a *C. ficifolia* y *C. pepo*, ya que es cultivada tanto en regiones cálidas secas y húmedas hasta altitudes que abarcan desde el nivel del mar hasta los 1,600 msnm; *C. argyrosperma* (pepitoria), es cultivada tanto en el norte como en el sur del país, en altitudes que abarcan desde el nivel del mar hasta los 1,500 msnm. (Azurdia, 1999)

### 3.3. Importancia de los cultivos del género *Cucurbita*

El género *Cucurbita*, ha estado presente en el registro arqueológico del nuevo mundo desde las primeras etapas de la agricultura, sin embargo dicho registro sugiere que las especies cultivadas fueron domesticadas a diferentes tiempos y en diferentes áreas. Este género ha sido ampliamente cultivado en todas las culturas indígenas del nuevo mundo, desde Canadá hasta Argentina y Chile; debido al alto valor nutricional de las semillas y valor medicinal, especialmente en la prevención y tratamiento de la hiperplasia de la próstata. (Decker, 1987; Nee, 2010; Gong *et al.* 2008)

Actualmente, tres de las cinco especies cultivadas, *Cucurbita pepo* L., *C. moschata* Duchesne y *C. maxima* Duchesne, son cultivos económicamente importantes, ya que los frutos son usados para el consumo humano, las semillas son utilizadas para hacer salsas, consumidas como “boquitas” o snacks, y son fuente de aceite con propiedades medicinales. (Azurdia, 1999; Cerón, 2010; Decker, 1987; Nee, 2010; Gong, *et al.* 2008; Robinson & Decker-Walters, 1997; Smartt & Simmonds, 1995)

### 3.4. *Cucurbita pepo*

#### 3.4.1. Generalidades

Es la cucurbitácea más conocida en los Estados Unidos, se caracteriza por presentar hojas lobuladas con pelos, pedicelos duros. (Nee, 2010). Es una planta herbácea, anual, monoica, sus flores se caracterizan por ser gamopétalas con corolas campanuladas, muy vistosas, cuya polinización es entomófila. (Figura 1)

Como ya se mencionó anteriormente, la antigüedad de los restos arqueológicos indican que *Cucurbita pepo*, según Lira (1993), fue una de las primeras especies en haber sido domesticadas, ya que los restos más antiguos de esta especie, han sido encontrados en México y datan desde 8750 AC; así mismo se cree que dicha especie era cultivada en los Estados Unidos y Canadá antes de la llegada de los españoles. Actualmente dichos países se dedican al cultivo de variedades comerciales, mientras que México y el norte de Centroamérica (Guatemala) se dedican al cultivo de variedades criollas. En Guatemala, se encuentra distribuida en el altiplano oriental, central y occidental, abarcando altitudes desde los 1,000 msnm hasta los 2,500 msnm. (Cerón, 2010; Figueroa, 1997)

Esta especie se ha cultivado de manera tradicional desde su domesticación; al decir “tradicional”, nos referimos a que el conocimiento que se tiene sobre su cultivo, ha sido transmitido de generación en generación por medios orales o experienciales, y que las semillas han permanecido en las familias a lo largo de sus generaciones; lo que ha permitido conservar la variabilidad genética de la especie. Es por ello que existe un gran interés en estudiar las variedades criollas debido a su valor potencial como reservorios de variación genética así mismo, Mesoamérica es considerada uno de los lugares más importantes de origen y diversidad de plantas cultivadas. (Altieri, 1991; Azurdia, 1999)



**Figura 1:** Flores de Cucurbita pepo. Izquierda: Flor masculina. Derecha: Flor femenina. (Fotografía, R. Lima)

### 3.4.2. Clasificación

Se conocen ocho variedades comestibles para la especie:

- *Cucurbita pepo* L. var. *pepo* L.H. Bayley (Φ “Pumpkin”): son plantas rastreras cuyos frutos son esféricos, ovales u oblados. Generalmente estos frutos son consumidos al madurar, aunque algunos son empleados como forraje.
- *C. pepo* L. var. *clypeapa* Alefeld (Φ “Scallop”): son plantas de hábito subarborescente, cuyos frutos son aplanados. Estos frutos generalmente son consumidos en estado inmaduro.
- *C. pepo* L. var. *turbinata* Paris (Φ “Acorn”): pueden ser plantas arbustivas o rastreras, cuyos frutos son obovoides o cónicos, agudos en el ápice; la cáscara es suave, por lo que sus frutos pueden ser consumidos en estado maduro.
- *C. pepo* L. var. *toticollia* Alefeld (Φ “Crookneck”): son plantas arbustivas, con frutos color amarillo, dorado o blanco, generalmente poseen cáscara verrugosa. Se consumen inmaduros, puesto que la cáscara y la pulpa se endurecen en la madurez.

- *C. pepo* L. var. *reticulata* Paris (Φ “Straightneck”): son plantas arbustivas con frutos amarillos o dorados, poseen cáscara verrugosa similares a la variedad anterior.
- *C. pepo* L. var. *fastigata* Paris (Φ “Vegetable Marrow”): son plantas de hábito rastrero, los frutos son cilíndricos, a menudo ensanchados en el ápice, con la cáscara lisa, endurecida y engrosada al madurar.
- *C. pepo* L. var. *longa* Paris (Φ “Cocozelle”): son frutos cilíndricos-alargados, delgados. Generalmente se consumen en estado inmaduro.
- *C. pepo* L. var. *cylindrica* Paris (Φ “Zucchini”): grupo de cultivares comerciales más común. Son plantas de hábito subarbuscivo y frutos cilíndricos. Se consumen en estado inmaduro.

### 3.5. Amenazas a las variedades criollas

Entre los procesos que han afectado los cultivos de especies criollas son las actividades de selección de semillas por el hombre, así como la ingeniería genética, ya que éstos han provocado que la diversidad genética de las variedades criollas de la mayoría de cultivos se segregue o bien se pierda, así mismo provocan cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento en los organismos. Esta pérdida de diversidad genética, está influenciada por la selección de los mejores granos llevada a cabo por los agricultores de sus propios campos para su empleo como material de siembra, y actualmente los cultivares indígenas han sido desplazados gradualmente por poblaciones que poseen rasgos distintivos, seleccionados y mejorados por el hombre (variedades comerciales). (Connor & Loomis, 2002)

Este reemplazo o bien el cultivo de especies tanto criollas como comerciales en una misma área ocasiona la introgresión, lo cual se define como el flujo de genes de una especie o subespecie a otra, seguida por cruces repetidos a uno de los parentales y posteriormente la selección de los retrocruces más adaptados. (Frankham, Ballou & Briscoe, 2004; León, 1968; Muñoz, 2004, Stewart, Halfhill, & Warwick, 2003)

Estos procesos, han modificado el sistema natural de apareamiento y mecanismos de dispersión de varias especies de plantas, así como su morfología, fisiología e incluso la estructura genética. Esta última, en poblaciones de plantas cultivadas puede ser moldeada por varios factores, por lo tanto, la importancia de mantener el material genético, es que éste pueda ser transmitido a la siguiente generación, y esto depende de cómo se propaga y del sistema de cruzamiento de la especie. (Connor & Loomis, 2002; Shi, Yang, Chen, Guo, 2008)

### **3.6. Estructuración genética**

La estructura genética poblacional de una especie, se considera como el resultado de procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones. Por ejemplo, cuando una población se subdivide, la conexión genética entre las partes de la población puede variar. Esta conexión genética depende principalmente de la cantidad de flujo de genes que tiene lugar entre las subpoblaciones o subgrupos. Cuando la cantidad de flujo de genes entre los grupos es alta, se homogeniza la variación genética en los grupos. Cuando el flujo de genes es baja, la deriva genética, selección, e incluso mutación en los grupos separados puede conducir a la diferenciación genética. Por lo tanto la estructuración genética se puede definir como la diferenciación genética espacial entre poblaciones. (Höglund, 2009; Hernández-Baños *et al.*, 2008, Pág. 467; Hedrick, 2011, Pág. 365).

Para Astorga y Ortiz (2006), la estructuración genética va a corresponder al menor nivel de diversidad biológica, lo cual considera como punto crítico para lograr que una especie se adapte y evolucione.

### **3.7. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)**

Actualmente los estudios genéticos de poblaciones utilizan técnicas moleculares para determinar la variación genética existente entre individuos de una misma especie o de diferentes especies. PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Esta técnica se basa en sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN. Cuando se lleva a cabo una reacción de PCR, lo que se está realizando es una simulación de lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, en donde en un tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo (la polimerasa, el ADN del organismo de interés, los oligonucleótidos, dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente. La replicación del ADN ocurre mediante la repetición de los ciclos que constan de tres fases: Desnaturalización del ADN por calentamiento del mismo a 95°C; enlace de los cebadores o fragmentos iniciadores al ADN, por el enfriamiento de la temperatura (Alineamiento); y síntesis del ADN, por medio de la enzima polimerasa (Extensión) Debido a que en cada ciclo de PCR se duplica todo el ADN, en pocas horas se pueden obtener más de mil millones de copias de un solo fragmento. (Eguiarte, 2007).

### **3.8. Técnicas moleculares más utilizadas para los estudios genéticos de poblaciones**

Entre las técnicas más utilizadas están:

Aloenzimas: son formas moleculares múltiples de las enzimas que pueden tener funciones idénticas o similares, las cuales se encuentran en el mismo individuo, son selectivamente neutras;

RFLP (polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción): expresan diferencias específicas del ADN. Se han utilizado para la construcción de mapas genéticos y taxonomía;

Microsatélites: son secuencias de ADN formadas de 1 a 6 pb, que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma;

AFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados): técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción con la unión de secuencias específicas a los extremos de los fragmentos de restricción.

RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar): son marcadores que amplifican segmentos de ADN aleatoriamente en una gran variedad de especies.

Secuenciación de ADN: este método es aplicado para el análisis de genética de poblaciones y problemas taxonómicos (Höglund, 2009).

En este estudio se utilizará la técnica de microsatélites.

### 3.8.1. Microsatélites (SSR's)

También llamados VNTRs (variable number of tándem repeats) o SSRs (simple sequence repeats). Son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de todos los procariontes y eucariontes. Se caracterizan por presentar un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, reproducibles, y son codominantes, es decir, se pueden diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos. Pueden encontrarse en las regiones codificantes y no codificantes dentro del genoma. Estas propiedades particulares, han hecho que los microsatélites tengan un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas. (Aranguren-Méndez, *et al.*, 2005)

### 3.8.2. Aplicaciones de los microsatélites

Los microsatélites pueden aplicarse a estudios de identificación individual y pruebas de paternidades (comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores), mapas genéticos y genómica comparativa, estudios de genética poblacional, o de asignamiento de raza. (Aranguren-Méndez, *et al.*, 2005, Zane, *et al.* 2002)

Dentro del campo de la genética de poblaciones, los microsatélites, permiten estimar los niveles de variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones, así mismo permiten analizar las relaciones genéticas existentes entre ellas. Con ello se pueden realizar estimaciones de diversidad genética, consanguinidad existente en poblaciones en peligro de extinción, distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (estructura de la población). (Aranguren-Méndez, *et al.*, 2005; Zane, *et al.* 2002)

### 3.9. Estudios moleculares en *Cucurbita pepo*

Decker (1985) realizó una diferenciación genética utilizando aloenzimas, las cuales mostraron patrones significativos de variación que coinciden con la variación en los caracteres estructurales de la fruta y el hábito de las plantas utilizados en el estudio.

Gong y colaboradores (2008) en su estudio del género *Cucurbita* desarrollaron 265 microsatélites para dicho género y con ellos, desarrollaron un mapa de ligamiento.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Mesoamérica es considerada uno de los lugares más importantes de origen y diversidad de plantas cultivadas (Azurdia, 1999). Así mismo existe un gran interés en estudiar las variedades criollas debido a su alto valor potencial como reservorios de variación genética. El güicoy (*Cucurbita pepo*) es un cultivo que ha estado presente en América desde las primeras etapas de la agricultura. En Guatemala, también es un cultivo tradicional, cuya forma de uso y cultivo ha sido transmitido de generación en generación, en las familias que lo cultivan, lo que ha permitido conservar la variabilidad genética de la especie; además es económicamente importante.

*C. pepo*, actualmente se encuentra distribuida en el altiplano oriental, central y occidental, abarcando altitudes desde los 1,000 msnm hasta los 2,500 msnm. Es un cultivo que forma parte del sistema de cultivo frijol-maíz-cucurbita. Sin embargo actividades como la selección por el hombre, y la ingeniería genética, han provocado pérdida en la diversidad genética de las variedades criollas de la mayoría de cultivos. Esto es debido a que los cultivares indígenas han sido desplazados gradualmente por poblaciones que poseen rasgos distintivos, seleccionados y mejorados por el hombre. Lo cual podría estar alterando la estructura genética, modificando la diversidad genética y provocando una pérdida de este cultivo criollo. Además, no hay suficientes estudios genéticos que aborden esta problemática a nivel del país, y por lo tanto, no existe estudio alguno en la región de Baja Verapaz, Guatemala.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

Estudiar la variación genética entre las poblaciones de la variedad criolla de *Cucurbita pepo*, en Baja Verapaz, Guatemala.

### 5.2. Específicos

- a) Determinar la diversidad genética de una variedad de *C. pepo* en Baja Verapaz, Guatemala.
- b) Determinar si existe estructuración genética en la variedad criolla de *C. pepo* en Baja Verapaz.
- c) Determinar si existe introgresión de la variedad comercial en la variedad criolla de *C. pepo* en cada una de las localidades de estudio.
- d) Aportar conocimiento para la conservación y rescate de la variedad criolla de *C. pepo* en el sitio de estudio.

## 6. HIPOTESIS

Existe estructuración genética en la variedad criolla de *Cucurbita pepo* L. dentro del rango de distribución en el departamento de Baja Verapaz, Guatemala.

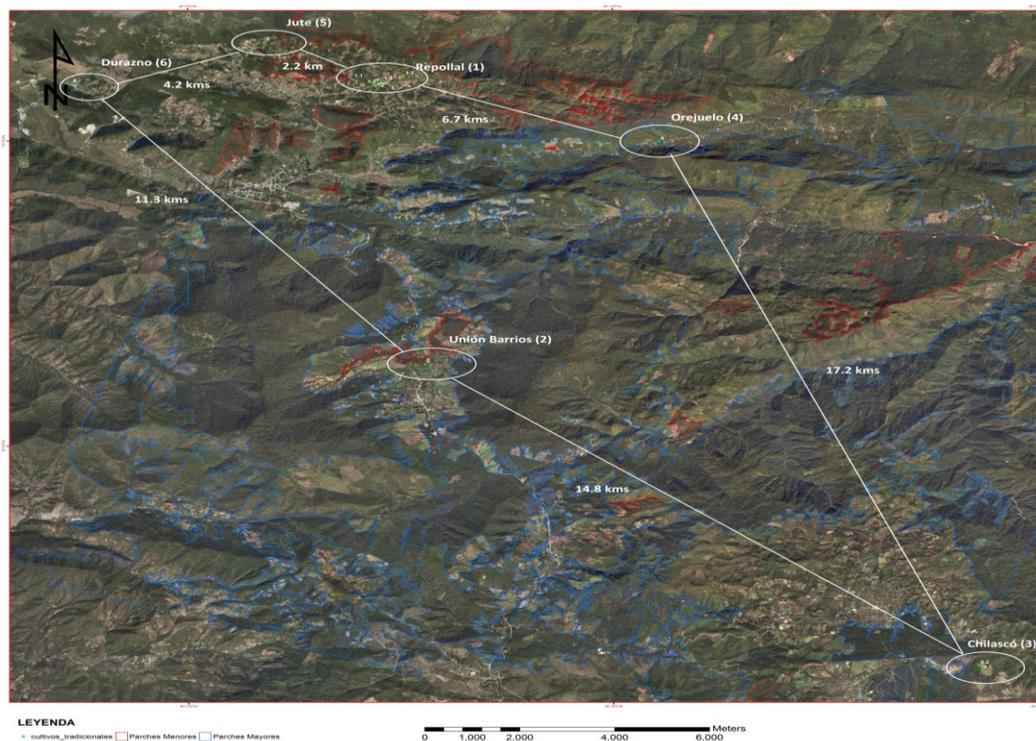
## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Universo

#### 7.1.1. Población

La población bajo estudio son las distintas poblaciones de *Cucurbita pepo* de Baja Verapaz. (Fig. 2) El estudio se llevó a cabo en el departamento de Baja Verapaz, Guatemala, en los municipios de Purulhá y Salamá (Corredor del Bosque nuboso). En dicho sitio de estudio se ubicaron familias que tienen cultivos tradicionales de la variedad criolla y comercial de *Cucurbita pepo*.

**Figura 2:** Ubicación de las 6 localidades en el sitio de estudio y las distancias geográficas entre cada una. La línea continua color azul muestra el bosque continuo y la línea roja muestra los parches de bosque fragmentado.



Fuente: Mapa obtenido a partir de Ortofotos del sitio de estudio y modificadas utilizando ArcGis.

## 7.1.2. Muestra

De las muestras de hojas de 30 individuos colectados en cada población, se analizaron de 13 a 26 individuos en 6 poblaciones de la variedad criolla de *Cucurbita pepo* (en las aldeas Repollal, Unión Barrios, Chilascó, Orejuelo, El Jute y el Durazno); así como 12 individuos de una población de la variedad comercial (ubicada en la aldea Repollal) en todo el sitio de estudio (Cuadro 1), esta diferencia en el número de individuos se debe a limitaciones técnicas.

**Cuadro 1.** Poblaciones de *C. pepo* utilizadas en el presente estudio, se detalla el tipo de cultivo utilizado por cada localidad y el número de individuos analizados por cada cultivo, así mismo se indican las coordenadas y elevación (msnm) a la cual se encuentra cada cultivo.

No.	Localidad	Tipo de Cultivo	No. De individuos Analizados	Coordenadas	Elevación (msnm)
1	Repollal (RPCR)	Criollo	23	15.26678611 -90.21763889	2118
2	Unión Barrios (UB)	Criollo	25	15.18888611 -90.20353611	1619
3	Chilascó (CH)	Criollo	17	15.10522778 -90.09450000	1880
4	Orejuelo (OR)	Criollo	26	15.24971667 -90.15755833	1396
5	Jute (JU)	Criollo	13	15.27681667 -90.23488333	2226
6	Durazno (DU)	Criollo	17	15.26547778 -90.27281667	1601
7	Repollal (RPCO)	Comercial	12	15.26544444 -90.21333333	2021

Fuente: Datos obtenidos en el campo

## 7.2. Materiales

### 7.2.1. Equipo

- Incubadora de baño maría para el proceso de Extracción de ADN
- Autoclave
- Deshidratadora
- Microcentrífuga
- Congelador de -20 °C
- Campana de Flujo Laminar
- Termociclador modelo PTC-100
- Estufa para preparación de geles de agarosa
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador de luz UV
- Genotipificador
- Impresora
- Computadora

### 7.2.2. Reactivos

- Extracción de ADN
  - CTAB 2X, formado por Tris-HCl 1M y Tris
  - Agua bidestilada
  - HCl
  - NaCl 5M

- EDTA pH 8 0.5M
- EDTA sal sódica
- Agua destilada
- NaOH como ajustador de pH
- CTAB 2%
- 2-mercapto-etanol
- Cloroformo:Octanol 24:1
- Isopropanol
- Etanol al 70%
- Amplificación
  - Agua destilada
  - Buffer 10X
  - MgCl<sub>2</sub> 20X
  - dNTPs
  - Cebadores
  - Taq Polimerasa
- Electroforesis
  - Agarosa
  - TBE
  - TE
  - Bromuro de etidio

### 7.2.3. Instrumentos

- Micropipetas de 1.5, 10, 20, 100, y 1000 µl
- Prensa de Herbario

- Gradillas para tubos de microcentrífuga 1.5 ml
- Gradillas para tubos PCR de 0.2 ml
- Pinzas entomológicas

#### 7.2.4. Materiales

- Sobres de hojas papel bond
- Tijeras de podar
- Tejido foliar de *Cucurbita pepo*
- Lápiz
- Libreta de campo
- Hojas Bond en blanco tamaño carta
- Calculadora
- Folders
- Fásteners
- Papel mayordomo
- Guantes de Látex
- Guantes de Nitrilo
- Puntas de 10, 100, 1000  $\mu$ l
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Tubos de microcentrífuga PCR de 0.5 ml

### 7.3. Métodos

#### 7.3.1. Colecta de las muestras

Se colectaron 30 muestras de hojas de diferentes individuos en cada cultivo de *C. pepo* (población) en cada una de las localidades de estudio. Para esto se utilizó tijeras de podar. El tejido foliar fue desinfectado en el campo, utilizando etanol al 100% para matar hongos o algunos insectos que pudieran interferir con los análisis de ADN. Luego, las muestras fueron transportadas al laboratorio en sobres de hojas papel bond. Cada sobre fue etiquetado con la siguiente información: fecha, localidad, nombre del dueño del cultivo y tipo de cultivo. Estos sobres fueron colocados en una deshidratadora de alimentos a 35°C, para su secado.

### 7.3.2. Extracción, amplificación y Electroforesis

El ADN total genómico fue aislado del tejido foliar previamente secado siguiendo el protocolo establecido por Doyle y Doyle (1987), el cual se describe a continuación:

En un tubo eppendorff se muele alrededor de 1g de tejido previamente congelado a -20°C, con ayuda de un pistilo, hasta obtener un polvo fino. Luego se agrega 1 ml de buffer CTAB 2X (Tris-HCl 100mM pH 8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2% y b-ME 0.3%) y se continúa macerando hasta obtener una mezcla homogénea. Centrifugar a 10 000 rpm durante 8 min. a 4°C

Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 µl de CTAB 2X. incubar en un baño maría a 60° C durante 10 minutos.

Agregar 600 µl de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogenizar. Centrifugar a 7000 rpm durante 12 minutos a 4°C.

Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo. Evitar recuperar el material de la difase que se forma.

Precipitar el ADN con 2/3 del volumen final, aproximadamente 400 µl de isopropanol frío. Dejar reposar por 2 horas a -20°C.

Centrifugar a 9000 rpm durante 5 minutos a 4°C. eliminar el sobrenadante.

Limpia el pellet con 1 ml de etanol al 70% frío y centrifugarlo a 7000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 200 µl de agua.

El ADN extraído fue amplificado de acuerdo al protocolo establecido por Gong y colaboradores (2008) en una mezcla de 12 µL compuesta por 6.5 µL de H<sub>2</sub>O libre de ADNasas y ARNasas de grado molecular, 0.4 µL de dNTPs, 0.25 µL de Taq DNA polimerasa, 1 µL de buffer (10X), 0.75 µL de MgCl<sub>2</sub> (5X), 0.3 µL de cada cebador (10 µM, *forward* y *reverse*) y 0.5 µL de ADN genómico.

Posteriormente, la mezcla fue incubada en un termociclador PTC-100 (MJ Research®, California, CA, USA). El PCR tuvo las siguientes condiciones: la desnaturalización 95°C por 2 minutos, seguido de 7 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 68°C (en cada ciclo la temperatura de alineamiento decrece 2°C), y 60 segundos a 72°C. Seguidamente, este producto fue amplificado por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos y 72°C por 60 segundos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, se realizó la electroforesis del ADN amplificado, la cual consistió en la separación de los productos de PCR en geles de 1% de agarosa que contenían 10 µg/mL de bromuro de etidio inmerso en una solución amortiguadora de TBE (90 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador con luz UV. Así mismo, parte del producto de PCR fue enviado a la Universidad Autónoma de México (UNAM) para llevar a cabo la genotipificación en el laboratorio del Instituto de Biología de la UNAM.

Para el presente estudio, se seleccionaron 9 microsatélites, desarrollados por Gong y colaboradores (2008), los cuales se detallan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Loci de microsatélites de *Cucurbita moschata* utilizados durante el estudio en *C. pepo*

Nombre <sup>1</sup>	No. Alelos	Motivo	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tamaño esperado (bp)
CMTm7	5	(CT) <sub>30</sub>	<i>F</i> :AACCAAACCTCCGGCAAGA <i>R</i> : GTTCTCTCCGTTTCAGGATGG	152
CMTm39	5	(TTTC) <sub>6</sub>	<i>F</i> :ATCTTTGTGCTTCTAACCTTTTTC <i>R</i> : TAAAGCTCGAAAAAGCAACC	153
CMTm65	6	(CT) <sub>10</sub>	<i>F</i> :GAACTTCGTGTGTGCGTGTC <i>R</i> : TTGCTGGAACTTCCTCTCGT	97
CMTm83	5	(AG) <sub>19</sub>	<i>F</i> :GGCATTCTGAGAACAGCTT <i>R</i> :ACGTTAGTTATGCTATTTTGTAGGC	111
CMTm132	7	(Ct) <sub>9</sub>	<i>F</i> :TTCGAGTTTAATTCCCTCTTCG <i>R</i> : CCATTCTTTTTGCCTCTCG	107
CMTm188	6	(AG) <sub>8</sub>	<i>F</i> :ACTGAGAGGCCCTGAATTGT <i>R</i> :CCCCCTCTTAGTCTTAATATTCTCA	158
CMTm252	7	(CT) <sub>5+8</sub>	<i>F</i> : CCCATTCCCCATTCTTTCT <i>R</i> : CAAATTTCGATCGGCTTTACAC	101
CMTmC60	7	(GAA) <sub>5+8</sub>	<i>F</i> :ATCAGGCTAAGGCCCAAACCT <i>R</i> : GCCAATGTAATCTCCCCACA	142
CMTmC64	6	(TC) <sub>14</sub>	<i>F</i> :AAACGTTCTGCAATCAAGGA <i>R</i> :CAAGCTTGTGTACAATAGGATAAGG	94

Fuente: <sup>1</sup>Gong *et al* (2008)

### 7.3.3. Análisis de los datos

Las frecuencias alélicas para cada localidad fueron estimadas a partir de los genotipos obtenidos por medio de los marcadores moleculares tipo microsatélite. Para esto, los cromatogramas producto de la genotipificación se analizaron utilizando el programa GeneMarker versión 2.4.0 (SoftGenetics LLC®, 2011, PA), con la cual se generó una

matriz de alelos para cada microsatélite evaluado. Con estos datos se determinó la variación en la frecuencia alélica entre y dentro de las localidades por medio de los siguientes estadísticos: Porcentaje de loci polimórfico ( $p\%$ ), número efectivo de alelos promedio por locus ( $A$ ), heterocigocidad observada promedio ( $H_o$ ), Heterocigocidad esperada según Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) y el índice de fijación ( $F$ ). Dichos estadísticos fueron calculados con el programa GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Para determinar la variación genética dentro y entre localidades se calcularon los estadísticos  $F$  de Wright (1965),  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ . Así mismo, para determinar la estructuración genética se realizó un AMOVA (Análisis de varianza molecular) según los criterios de Excoffier, et al. (1992) utilizando ARLEQUIN (Excoffier, 2009).

Se aplicó el test de Mantel para determinar si existía una correlación entre las distancias genéticas ( $F_{st}$ ) y las distancias geográficas, utilizando el programa IBDWS Ver. 3.23 (Jensen *et al.* 2005).

Para determinar la divergencia entre poblaciones se construyó un dendograma utilizando el criterio UPGMA (por sus siglas en inglés *unweighted pair group method using arithmetic means*) utilizando los  $F_{st}$  de Wright como distancias genéticas. La confiabilidad de cada nodo fue probado con el método de bootstrap. Este análisis fue realizado en el programa TFPGA versión 1.3 (Miller, 1997).

Finalmente se utilizó el programa STRUCTURE para determinar el número de grupos de individuos genéticamente similares, sin información *a priori*.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Diversidad genética

Se trabajó con 9 loci de microsatélites en total, de los cuales 8 locus fueron polimórficos (CMTm7, CMTm39, CMTm65, CMTm83, CMTm132, CMTm188, CMTm252 y CMTmC60) y uno fue monomórfico (CMTm C64). Únicamente 2 de los 36 alelos encontrados están presentes en todas las localidades bajo estudio (Cuadro 3). En total se detectaron 16 alelos privados, presentes en 4 de las 7 localidades bajo estudio. El Durazno fue el que presentó mayor cantidad de alelos privados (11) con respecto a las demás poblaciones. Así mismo, el Repollal y Unión Barrios presentaron 2 alelos privados cada uno y finalmente Orejuelo presentó 1 alelo privado (Cuadro 3).

**Cuadro 3:** Frecuencia alélica de los 8 microsatélites polimórficos para las 7 localidades bajo estudio.

Locus	Alelo	RPCR	RPCO	CH	UB	OR	DU	JU
Cmtm83	1						0.765	
	2					0.019		
	3	0.913	0.864	0.969	0.840	0.942		0.958
	4				0.100	0.019		
	5	0.087	0.136	0.031	0.060	0.019	0.088	0.042
	6						0.147	
Cmtm188	1						0.438	
	2						0.563	
	3	0.325	0.500	0.455	0.464	0.481		0.462
	4	0.550	0.500	0.545	0.536	0.519		0.538
	5	0.125						
Cmtm7	1						1.000	
	2	0.033	0.042		0.045	0.900		0.429

	3	0.433	0.583	0.600	0.841			
	4	0.133						
	5	0.133	0.083	0.200		0.100		
	6	0.267	0.250	0.200	0.068			0.571
	7		0.042		0.045			
Cmtmc60	1						0.036	
	2		0.300	0.042	0.077	0.500		
	3						0.893	
	4	0.929	0.700	0.958	0.846	0.500		0.583
	5	0.071			0.077		0.071	0.417
Cmtm132	1						0.294	
	2	0.738	0.375	0.833	0.460	0.500		1.000
	3						0.706	
	4	0.262	0.625	0.167	0.540	0.500		
Cmtm252	1	0.587	0.545	0.559	0.460	0.500		0.538
	2						0.500	
	3	0.022	0.045	0.088	0.140	0.500	0.500	
	4	0.391	0.409	0.353	0.400			0.462
Cmtm65	1					0.065		0.050
	2	1.000	1.000	0.950	0.733	0.870		0.900
	3			0.050		0.065	1.000	0.050
	4				0.133			
	5				0.133			
Cmtm39	1	0.217	0.125	0.281	0.229	0.587	0.700	0.875
	2						0.300	
	3	0.783	0.875	0.719	0.771	0.413		0.125

En el cuadro 4 se puede observar que el promedio del número efectivo de alelos por locus es de 1.663. Además, el porcentaje promedio de loci polimórficos ( $p^{\wedge}$ ) varió entre 75% a 100%, donde Chilascó, Unión Barrios y Orejuelo presentaron el valor más alto y El Durazno el valor más bajo. En promedio, el 91.07% de los loci fueron polimórficos para cada localidad y el promedio de heterocigocidad esperada fue de 0.346. Unión Barrios presentó el valor más alto de heterocigocidad promedio esperada (0.413) y El Durazno el menor valor (0.311). Los valores del índice de fijación negativos nos indican un exceso de heterocigotos como se observa en Orejuelo, El Jute y El Durazno, mientras que los valores cercanos a cero son esperados cuando hay apareamiento al azar, como el caso de Chilascó; Repollal comercial y Repollal criollo; así mismo, los valores sustancialmente positivos, indican endogamia o alelos nulos no detectados.

**Cuadro 4:** Niveles de variación intrapoblacional en las siete localidades. N= número promedio de individuos por localidad.  $p^{\wedge}$ = porcentaje promedio de loci polimórficos.

Localidad	N	$p^{\wedge}$	A	$H_e$	F	Desviación H-W		
						No. Total		
						-	+	
RPCR	19.625	0.875	1.780	0.36 (0.241)	0.057	7	4	3
RPCO	9.125	0.875	1.720	0.392 (0.200)	0.015	7	4	3
CH	12.37	1	1.603	0.33 (0.217)	0.01	8	3	5
UB	20.375	1	1.748	0.413 (0.125)	0.183	8	4	4
OR	21.875	1	1.699	0.386 (0.169)	-0.432	8	3	5
JU	10.25	0.875	1.560	0.325 (0.209)	-0.213	7	5	2
DU	15.125	0.75	1.535	0.311 (0.208)	-0.056	6	4	2

**Nota:** Los valores han sido dados en promedio para los 8 loci: Número de alelos efectivos promedio por locus (A), porcentaje de loci polimórficos ( $p^{\wedge}$ , un locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede 0.95), heterocigocidad esperada promedio ( $H_e$ , entre paréntesis su desviación estándar), índice de fijación promedio (F). Para el equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) se determinó que el no. Total de loci = al número de loci fuera de los 8 para los cuales las frecuencias genotípicas difieren significativamente de equilibrio H-W, (-) = el número de loci con significativo exceso de heterocigotos, y (+) = número de loci con significativo déficit de heterocigotos.

## 7.2. Diferenciación Genética

En el cuadro 5 se puede observar que el  $F_{is}$  es negativo, lo cual nos indica la existencia de un exceso de heterocigotos en todas las poblaciones de *C. pepo*. Aunque se observó un exceso de heterocigotos, el  $F_{st}$  de 0.399, según Wright (1978) nos indica que existe una alta diferenciación genética entre las poblaciones de *C. pepo* en el sitio de estudio que no corresponde a los grupos definidos *a priori*. Es decir, existe variabilidad dentro de las poblaciones y entre poblaciones, lo cual lo explica de mejor manera el AMOVA.

**Cuadro 5:** Estadísticos F de Wright y número de migrantes para todas las poblaciones de *C. pepo*.

	Fis	Fit	Fst	Nm
Promedio	-0.006	0.349	0.399	0.474 (0.320)
S.D	0.496	0.470	0.146	
IC (95%)	(-0.350, 0.338)	(0.023, 0.675)	(0.298, 0.500)	

Niveles de flujo génico (Desviación estándar entre paréntesis) entre poblaciones. Los intervalos de confianza fueron del 95% (IC).

El análisis molecular de varianza (AMOVA) muestra que la mayor parte de la varianza está explicada dentro de las poblaciones (68.66%), lo que se explica por un exceso de heterocigotos presentes. Sin embargo, la varianza explicada entre poblaciones es importante (31.44%). (Cuadro 6)

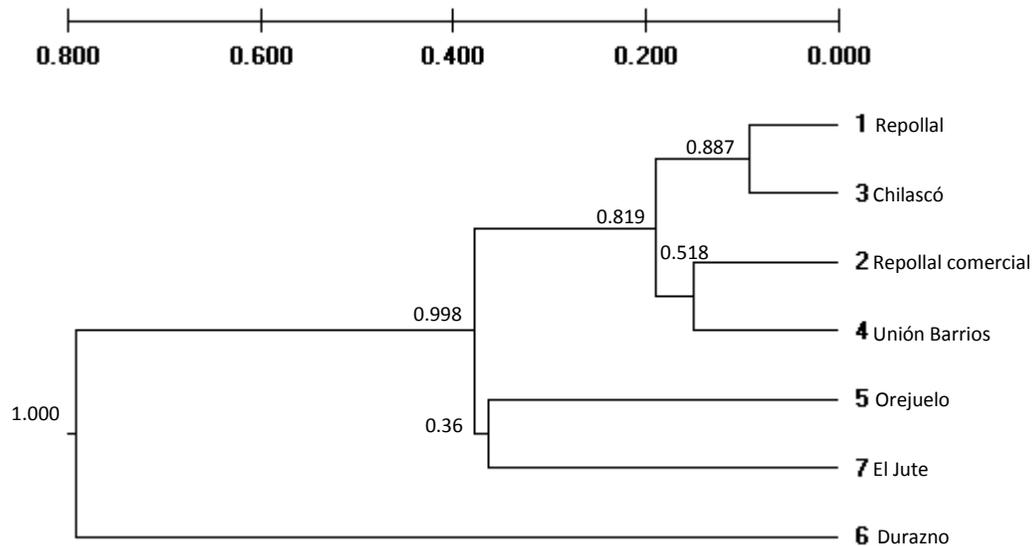
**Cuadro 6:** Análisis molecular de varianza (AMOVA) de 7 localidades.

Fuente de variación	Gl	Suma de cuadrado	Componentes de la varianza	% de variación explicada
Entre Poblaciones	6	39.386	0.16533	31.34%
Dentro de Poblaciones	259	93.828	0.36227	68.66%
Total	265	133.214	0.5276	100%

$\alpha=0.05$ ,  $p<0.05$

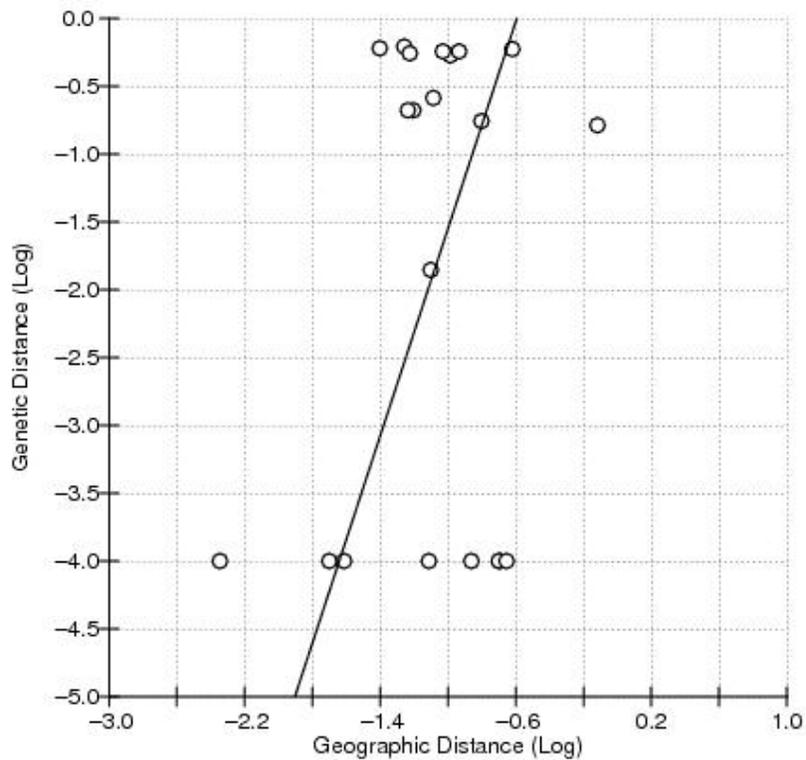
El análisis cluster de las localidades, utilizando el estadístico  $F_{ST}$  de Wright como distancia genética, muestra claramente dos grupos (Fig.3). Haciendo un corte en el 80% de

disimilitud entre los grupos formados, el primer grupo quedaría conformado por las variedades criollas de Repollal, Chilascó, Unión Barrios, Orejuelo, El Jute y la variedad comercial de Repollal; y el segundo grupo lo conformaría únicamente El Durazno.



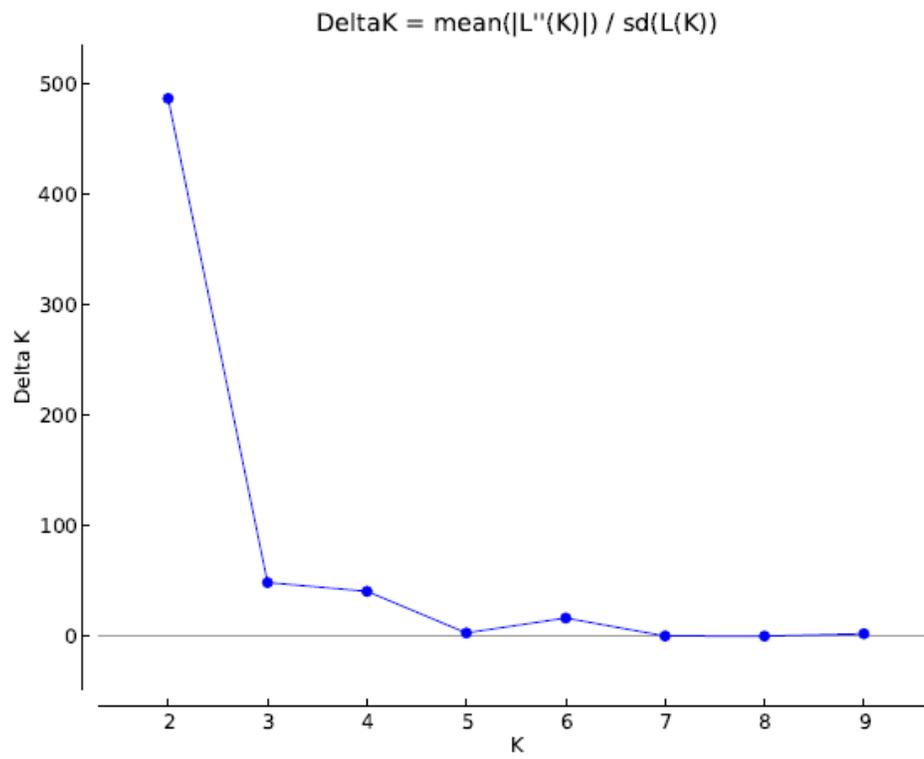
**Figura 3:** Dendrograma basado en UPGMA de datos microsatélites en *Cucurbita pepo*. Los valores en los nodos indican en porcentaje de ocurrencia de la topología en las réplicas de 1000 bootstraps.

El test de Mantel muestra que no existe una correlación entre las distancias genéticas ( $F_{st}$ ) y las distancias geográficas ( $Z=45.52$ ,  $r = 0.2090$ ,  $p=0.2570$ ), lo que sugiere que la distancia geográfica no tiene influencia sobre la variación genética (Fig.4)



**Figura 4:** Correlación entre las distancias geográficas y distancias genéticas de las poblaciones de *C. pepo* en el sitio de estudio (Test de Mantel,  $Z=45.52$ ,  $r = 0.2090$ ,  $p=0.2570$ ).

Por medio del análisis de tipo bayesiano, sin información *a priori* de la localidad de origen de cada uno de los individuos de *C. pepo* evaluados, realizado con el software Structure, se detectó que existen dos grupos de individuos genéticamente diferentes ( $\Delta K=2$ ) (Fig. 5A) En Anexo 1A, se muestran las dos poblaciones o grupos que están genéticamente diferenciados. En el Anexo 1B, se representan los individuos por separado, donde la localidad del Durazno (Variedad Criolla) es la que se diferencia genéticamente de las otras 6 localidades (5 localidades con variedad criolla y 1 con variedad comercial). No existe diferencia evidente entre la variedad criolla y la variedad comercial, lo que podría indicarnos que está ocurriendo introgresión.



**Figura 5:** Grupos de individuos genéticamente diferentes determinadas por el programa STRUCTURE para el sitio de estudio.  $\Delta K = 2$

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Diversidad genética

El principal objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad genética entre poblaciones de la variedad criolla de *Cucurbita pepo* utilizando el marcador molecular microsatélite. Los resultados muestran que el polimorfismo promedio ( $p\hat{=} 0.9107$ ), diversidad alélica ( $A = 1.66$ ) y la Heterocigocidad esperada ( $H_e = 0.346$ ) son similares al estudio realizado por Montes-Hernández y Eguiarte (2002) para el género *Cucurbita* ( $p\hat{=} 0.99$ ,  $A = 2.5$ ,  $H_e = 0.409$ ). A pesar de que se usaron microsatélites de *Cucurbita moschata* y no de *Cucurbita pepo*, los loci utilizados son polimórficos e informativos. La importancia de la diversidad genética radica en que nos provee de información sobre el efecto que tiene la selección humana sobre los rasgos morfológicos en plantas cultivadas de importancia económica (Bacilieri *et al.*, 2013).

### 8.2. Diferenciación genética y flujo génico

En cuanto a la diferenciación genética, se obtuvo que los estadísticos F de Wright, nos indican un exceso de heterocigotos ( $F_{is}$  negativo) lo cual puede estar relacionado con recientes cruzamientos debido al intercambio de material genético entre las poblaciones por medio de los agricultores (intercambio de semillas entre ellos). Así mismo el  $F_{st} = 0.399$  nos indica que existe una alta diferenciación genética entre las poblaciones basándonos en los parámetros reportados por Wright (1978). Diferenciación que podría ser causada por El Durazno. Montes-Hernández y Eguiarte (2002) reportaron  $F_{st}$  promedio de 0.111, lo que es considerado bajo para plantas con polinización cruzada. El AMOVA ( $p < 0.05$ ) nos indica que la mayor parte de la variación está explicada dentro de las poblaciones (68.66%) que entre poblaciones (31.44%). El Durazno fue la localidad con mayor proporción de alelos privados detectados y mayor diferenciación genética con respecto a las otras localidades. Y

debido a que los alelos privados son alelos exclusivos de una población, la diferenciación entre el Durazno y las demás localidades puede estar marcada por la presencia de éstos. Szpiech y Rosenberg (2011) encontraron que los alelos privados están correlacionados con la diferenciación genética entre pares de poblaciones por lo tanto, el 31.44% de variación entre poblaciones determinada por el AMOVA, podría estar explicada por el Durazno. Dicha variación puede deberse al bajo número de migrantes que hay entre el Durazno y las demás poblaciones, probablemente por la falta de movimiento de las semillas por parte de los agricultores de esta población hacia las otras. La Licda. Eunice Enríquez (comunicación personal) menciona que para la variedad comercial, los agricultores compran la semilla en agropecuarias, mientras que las semillas de la variedad criolla, son intercambiadas a nivel local por los agricultores, ya que su demanda es a nivel local, debido a que su cultivo está relacionado con sus costumbres y porque su cultivo no requiere de mayor cuidado.

Nuestro análisis UPGMA muestra la presencia de dos grupos bien diferenciados, uno compuesto por la variedad criolla proveniente del Durazno y el otro grupo compuesto por las demás localidades de cultivos criollos, incluyendo la variedad comercial. Es importante mencionar que algunos valores de bootstrap en los nodos son bajos, posiblemente porque se tienen valores faltantes entre cada loci. Así mismo, el análisis de STRUCTURE, nos muestra los mismos resultados descritos anteriormente por el UPGMA, ya que detecta dos grupos de individuos genéticamente emparentados. Sin embargo la prueba de Mantel nos indica que dicha diferenciación no es explicada por la distancia geográfica, ya que no existe correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. Por lo tanto, la diferenciación genética entre el Durazno y las demás poblaciones, se debe al manejo de semillas entre los agricultores, como ya se mencionó anteriormente.

Sabemos que el flujo génico es una fuerza evolutiva muy importante. Una pequeña cantidad de flujo génico, podría contrarrestar otras fuerzas como mutación, deriva y selección

(Eguiarte *et al.* 2013). El número de migrantes promedio ( $N_m$ ) estimado fue de 0.474 (Cuadro 5) lo que significa que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, principalmente entre el Durazno y el resto de localidades (Repollal, Repollal comercial, Unión Barrios, El Jute, Orejuelo y Chilascó). Sin embargo estas últimas localidades, se ven afectados por el tipo de selección artificial, llevada a cabo por los agricultores. Por lo tanto, si nos enfocamos en el grupo que excluye al Durazno, posiblemente sí esté ocurriendo algún intercambio de información genética, lo que explica los altos niveles de heterocigotos así como su agrupación ya que algunas especies cultivadas aumentan su variación genética debido a las prácticas inherentes de su cultivo.

### **8.3. Endogamia**

Los valores del índice de fijación negativos presentes en Orejuelo, Jute y El Durazno (Cuadro 4) nos indican un exceso de heterocigotos. Los valores cercanos a cero son esperados cuando hay apareamiento al azar como el caso de Chilascó, Repollal, Repollal comercial y Unión Barrios, mientras que valores sustancialmente positivos, indican endogamia y no se tuvo evidencia de ello en este estudio. En poblaciones de especies cultivadas, donde existe selección artificial; los niveles de endogamia tienden a aumentar, provocando depresión por endogamia o cuellos de botella que pueden provocar una pérdida en heterocigotos (Bisognin, 2002, Montes *et al.* 2005). Montes y colaboradores (2005) proponen que este efecto puede ser invertido intercambiando semillas o utilizando métodos de cultivo que promuevan el intercambio genético entre cultivos. Así mismo, recomienda que los agricultores seleccionen diversos fenotipos de frutos descartando la idea de tamaño y forma de fruto ideal. En la localidad bajo estudio, el intercambio de semillas en la variedad criolla ocurre entre los agricultores de manera local y tradicional.

#### 8.4. Introgresión

Debido a que los grupos genéticamente emparentados detectados tanto por STRUCTURE como por el UPGMA, ubican el cultivo comercial dentro del grupo de cultivos criollos, sugiere que ha ocurrido un flujo génico entre la variedad comercial y la criolla, lo cual ha sido observado en estudios entre cultivos criollos y comerciales (Kuroda *et al.*, 2006). Debido a que Mesoamérica es centro de diversidad para el género Cucurbita, se debe tener mucha cautela en el uso de variedades comerciales ya que el flujo génico entre plantas domesticadas y sus parientes criollos, puede tener consecuencias perjudiciales. Estudios como el de Stewart *et al.* (2003) menciona que la introgresión es un proceso muy importante en la evolución en plantas debido a que naturalmente tiene implicaciones como el aumento de la diversidad genética, como es el caso del presente estudio, así como la transferencia de adaptaciones, origen de adaptaciones, origen de variedades o especies, el refuerzo o ruptura de barreras que promueven la colonización o dispersión (Rieseberg y Wendel, 1993). Estudios en *C. pepo* muestran que la introgresión puede ser un proceso viable y puede favorecer a la variedad debido a que le confiere resistencia a virus. (Oliveira *et al.* 2003). Entrevistas realizadas a los agricultores de la localidad bajo estudio (Comunicación personal Licda. Eunice Enríquez) indican que el 30% de los agricultores siembran la variedad criolla y comercial al mismo tiempo, y en algunos casos, la separación entre cada cultivo es menor a 2 o 3 metros. Incluso algunos de los agricultores reconocieron que sí existe hibridación entre ambas variedades ya que la progenie presenta características de ambos padres, por lo que se debe tener mucha cautela al manejar variedades comerciales para no perder la diversidad genética de las variedades criollas.

## 9. CONCLUSIONES

- 9.1. Se determinó que sí existe estructuración genética entre las poblaciones de la variedad criolla de *Cucurbita pepo*, en Baja Verapaz, Guatemala.
- 9.2. Se identificaron dos grupos genéticamente diferentes, el primero conformado por los cultivos de las aldeas de El Repollal (criollo y comercial), Chilascó (criollo), Unión Barrios (criollo), Orejuelo (criollo) y El Jute (criollo); y el segundo grupo conformado por la variedad criolla de El Durazno.
- 9.3. La diferenciación genética entre ambos grupos se debe al bajo número de migrantes detectados, así como la presencia de alelos privados principalmente en El Durazno
- 9.4. Se determinó que existe alta diversidad genética, así como el exceso de heterocigotos en la variedad de *C. pepo* analizada, que puede ser a causa de las prácticas ancestrales relacionadas con su cultivo.
- 9.5. La evidencia sugiere que existe introgresión de la variedad comercial en la variedad criolla de *C. pepo* lo cual puede tener tanto efectos favorables como perjudiciales en la especie.

## 10. RECOMENDACIONES

- 10.1. Aumentar el número de microsatélites polimórficos utilizado para los análisis genéticos con el fin de darle mayor robustez a los datos generados.
- 10.2. Aumentar el tamaño de muestra utilizado en cada población al menos de 30 individuos por cultivo.
- 10.3. Ampliar el área de estudio a nivel regional utilizando otras poblaciones de *C. pepo*, para establecer un mejor plan de manejo de los cultivos de importancia económica, haciendo uso de un grupo externo que valide los futuros análisis.
- 10.4. Que los agricultores manejen una distancia prudente entre sus cultivos de variedades comerciales y criollas para evitar que exista introgresión.
- 10.5. La presencia de introgresión debe manejarse con mucha cautela en los cultivos criollos, ya que al manejar variedades comerciales puede perderse la diversidad genética de las variedades criollas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- 11.1. Altieri, M. (1991). ¿Por qué estudiar la agricultura tradicional? *CLADES*, 1, 1-14.
- 11.2. Aranguren-Méndez, J., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *ALPA*, 13(1), 1-13.
- 11.3. Astorga, M., & Ortiz, J. (2006). Variabilidad genética y estructura poblacional de tunicado *Pyura chilensis* Molina, 1782, en la costa de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74(4), 423-434.
- 11.4. Azurdia, C. (1999). Las Cucurbitas de Guatemala. *TIKALIA*, 17(1), 41-58.
- 11.5. Bacilieri, R. Lacombe, T. Cunff, L. Vecchi-Staraz, M. Laucou, V. Genna, B. Péros, JP. This, P. y Boursiquot, JM. (2013) Genetic Structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC Plant Biology*, 13, 25.
- 11.6. Bisognin, DA. (2002) Origin and Evolution of cultivated cucurbits. *Ciencia Rural, Santa Maria*, 32 (5), 715-723.
- 11.7. Canul, J., Ramírez, P., Castillo, F., & Chávez, J. (2005). Diversidad Morfológica de Calabaza cultivada en el Centro-Oriente de Yucatán, México. *Fitotecnia Mexicana*, 339-349.
- 11.8. Cerón, G. (2010). *Caracterización de Calabazas (Cucurbita spp.) mexicanas como fuente de resistencia al Cucumber mosaic virus (CMV)*. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- 11.9. Connor, D., & Loomis, R. (2002). *Ecología de cultivos: productividad y manejo en sistemas agrarios*. España: Mundi Prensa Libros.

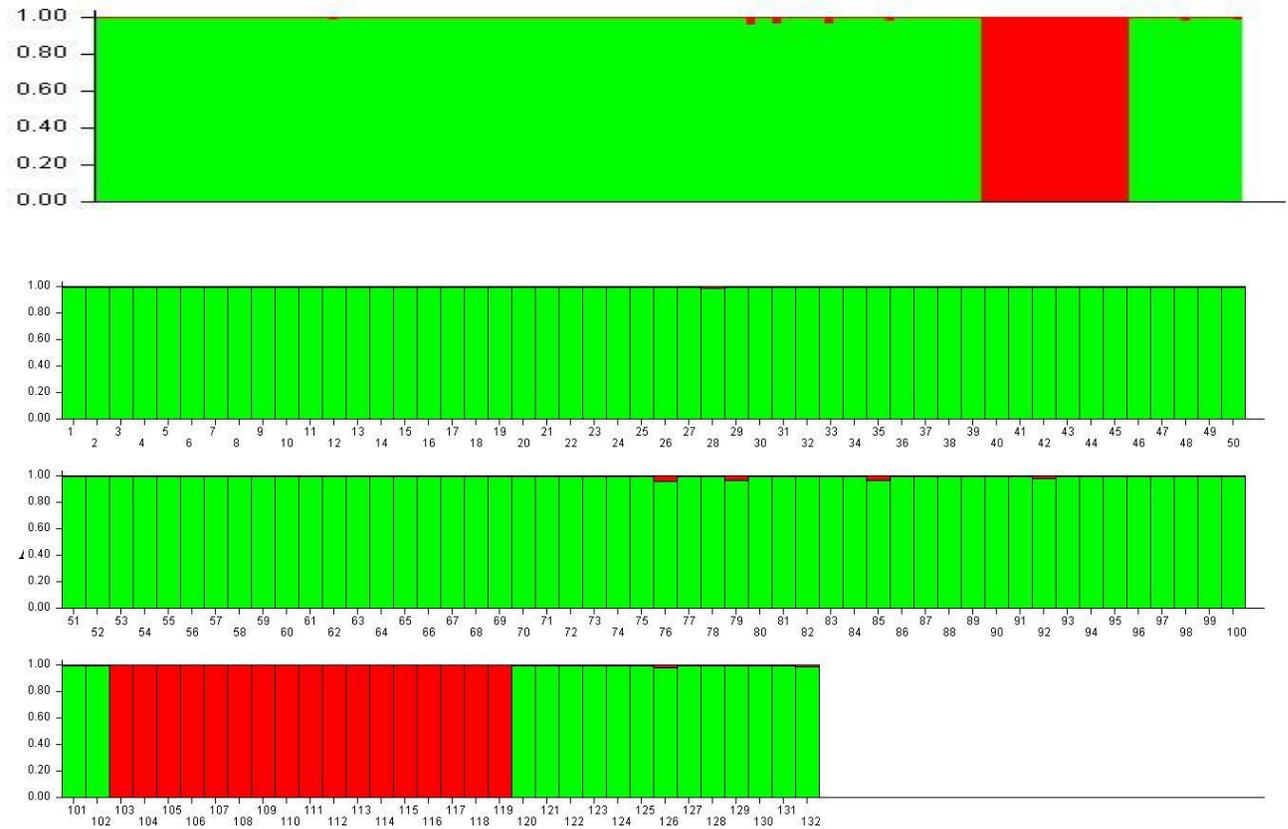
- 11.10. Decker, D. (1985). Numerical Analysis of Allozyme Variation in *Cucurbita pepo*. *New York Botanical Garden*, 3(39), 300-309.
- 11.11. Decker, D. (1987). Origin(s), Evolution, and Systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botanic*, 1(42), 4-15.
- 11.12. Eguiarte, L., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
- 11.13. Eguiarte, L. Aguirre-Liguori, J. Jardón-Barbolla, L. Aguirre-Planter, E. Souza, V. (2013) Genómica de Poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en la genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución. *Revista especializada en Ciencias Químicas y Biológicas*, 16, 42-56.
- 11.14. Excoffier L. (2009) ARLEQUIN Ver 3.5, An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Suiza
- 11.15. Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- 11.16. Figueroa, J. (1997). *Caracterización agromorfológica y nutricional de 20 cultivos de Güicoy (Cucurbita pepo) nativos de Guatemala, en el valle de Chimaltenango, Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 11.17. Frankham, R., Ballou, J., & Briscoe, D. (2004). *A primer of conservation genetics*. London: Cambridge University Press.
- 11.18. Gong, L., Stif, G., Kofler, R., Pachner, M., & Lelley, T. (2008). Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theor Appl Genet* (117), 37-48.
- 11.19. Hedrick, P. (2011). *Genetics of Populations*. 4th Edition. Jones and Bartlett Publisher, LLC. Estados Unidos. 675.

- 11.20. Hernández Baños, B., Honey Escandón, M., Cortés Rodríguez, M., & García, D. (2007). Filogeografía de aves mexicanas. En L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología Molecular* (págs. 467-490). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- 11.21. Höglund, J. (2009). *Evolutionary Conservation Genetics*. United States: OXFORD University Press.
- 11.22. Jensen, JL. Bohonak, AJ. and Kelley, ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6, 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- 11.23. Kuroda, Y. Kaga, A. Tomooka, N. Vaughan, DA (2006). Population genetic structure of Japanese wild soybean (*Glycine soja*) base on microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 15: 959-974
- 11.24. León, J. (1968). *Fundamentos Botánicos de los Cultivos tropicales*. IICA.
- 11.25. Lira. (1993). *Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica*. México DF: Herbario Nacional de México, Instituto de Biología UNAM.
- 11.26. Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villareal, D., Gepts, P., Delgado-Valerio, P., & Colunga-García, P. (2006). Structure and Genetic Diversity of Wild Populations of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatán Península, México. *Crop Science*, 3(46), 1071-1080.
- 11.27. Miller, M. (1997). *Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA)*. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA.
- 11.28. Montes-Hernández, S y Eguiarte, LE. (2002). Genetic Structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) in western México. *American Journal of Botany*, 89 (7): 1156-1163.

- 11.29. Montes-Hernández, S., Merrick, L.C. y Eguiarte, L.E. (2005). Maintenance of squash (*Cucurbita* spp.) landrace diversity by farmers' activities in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 697-707.
- 11.30. Muñoz, R. (2004). Alimentos transgénicos: Ciencia, ambiente y mercado, un debate abierto. *Siglo XII Editores S.A.*, 298.
- 11.31. Nee, M. (2010). The Domestication of Cucurbita (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 3(44), 56-68.
- 11.32. Oliveira A. Maluf, W y Pinto, J. (2003) Resistance to papaya ringspot virus in summer squash *Cucurbita pepo* L introgressed from an interspecific *C. pepo* x *C. moschata* cross. *Euphytica*, 132: 211-215
- 11.33. Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539. Freely available as an open access article from: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>
- 11.34. Rieseberg, LH y Wendel, JF. (1993) Introgression and its consequences in plants. Harrison, R. Hybrid Zones and the evolutionary Process. *Oxford University Press*. 364
- 11.35. Robinson, R., & Decker-Walters, D. (1997). Cucurbits. *CAB International*, 226.
- 11.36. Shi, W., Yang, J., Chen, M., & Guo, Y. (2008). Genetic variation among wild and cultivated populations of the Chinese medicinal plant *Coptis Chinensis* (Ranunculaceae). *Plant Biology*, 10, 485-491.
- 11.37. Smartt, J., & Simmonds, N. (1995). *Evolution of crop plants* (2 ed.). Longman Scientific & Technical UK.
- 11.38. Stewart, C., Halfhill, M., & Warwick, S. (2003). Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature*, 4, 806-817.

- 11.39. Szpiech, Z. Rosenberg, N. (2011) On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theoretical population biology*, 80, 100-113.
- 11.40. Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 395-420
- 11.41. Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Blackwell Science Ltd.*, 11, 1-16.

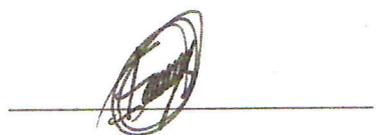
## 12. ANEXOS



**Anexo 1:** Grupos de individuos genéticamente diferentes determinadas por el programa STRUCTURE para el sitio de estudio A = grupos de individuos de manera general y B = desglosado por individuo.



Raquel Asunción Lima Córdon  
Autora



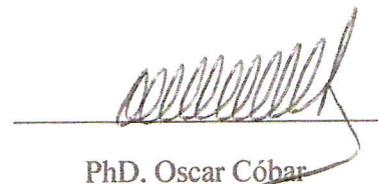
Licda. María Eunice Enríquez Cottón  
Asesor



PhD. Sergio Alejandro Melgar  
Revisor



PhD. Sergio Alejandro Melgar  
Director de Escuela



PhD. Oscar Cobar  
Decano