
HORTICULTURA

Use of morphological, biochemical and molecular markers for early identification of an interspecific cucurbit hybrid (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*)

Uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares para la identificación de híbridos interespecíficos (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*) de zapallo

Tarnowski C. G.², Valdez J. G.², Lorello I. M.^{1,3}, Barboza K.^{1,4}, Cavagnaro P. F.^{1,4}, Della Gaspera, P.^{1*}

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estación Experimental Agropecuaria (EEA) La Consulta dellagaspera.pedro@inta.gob.ar Ex Ruta Nacional 40 - Km 96, CP: 5567, La Consulta, San Carlos, Mendoza.

² Laboratorio Análisis de Semillas, INTA La Consulta, Mendoza.

³ Cátedra de Botánica Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO).

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Mendoza.

Recibido: 04/08/2021

Aceptado: 07/12/2021

ABSTRACT

Tarnowski C. G., Valdez J. G., Lorello I. M., Barboza K., Cavagnaro P. F., Della Gaspera, P. 2022. Use of morphological, biochemical and molecular markers for early identification of an interspecific cucurbit hybrid (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). Horticultura Argentina 41 (104): 84-94. <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s18519342/ak2hqjmrbr>

Aconcagua INTA is an Argentine widespread cucurbit cultivar with high yield and suitability for the dehydration industry, developed from an interspecific cross (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). Its seed production involves the use of etephon in the maternal progenitor to castrate male flower organs, while the other line serves a pollen donor. Because this process is not totally effective, some hermaphrodite flowers remain in the maternal line, leading to self-pollination and –therefore- seeds of non-hybrid origin,

which are phenotypically different from the hybrid. Thus, the percentage of non-hybrid seeds needs to be estimated and labelled in commercial seed lots of this cultivar. To this end, the present study analyzed, comparatively, morphological, biochemical and molecular markers that may be used for the early identification of this hybrid and its parental lines. Thus, a morphological marker based on leaf characteristics, protein profiles by UTLIEF, and the microsatellite molecular marker CMBR22, were evaluated in hybrid and parental plants. All three marker systems were able to accurately identify the hybrid and the parental lines, with results revealing 100% correspondence among the three types of markers. The protein and molecular markers developed herein represent a valuable tool for the early identification of hybrids in seed lots of cv. Aconcagua INTA.



Additional Keywords: seed, early selection, UTLIEF, microsatellite marker.

RESUMEN

Tarnowski C. G., Valdez J. G., Lorello I. M., Barboza K., Cavagnaro P. F., Della Gaspera, P. 2022. Uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares para la identificación de híbridos interespecíficos (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*) de zapallo. Horticultura Argentina 41 (104): 84-94. <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s18519342/ak2hqjmrbr>

El cultivar de zapallo Aconcagua INTA es un híbrido interespecífico (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*) de amplia difusión en el país y que posee excelentes rindes, buen color y aptitud para el deshidratado. La producción de semilla implica el cruzamiento entre ambas especies parentales, previo asperjado con etephon del parental femenino, con el objetivo de “castrar” los órganos masculinos florales y obtener flores predominantemente femeninas. Debido a que siempre hay un porcentaje de flores que escapan a la castración química, los lotes de semilla incluyen un porcentaje de semillas

no híbridas, provenientes de la autofecundación del parental materno. Estos individuos poseen fenotipo diferente al del cultivar, por lo que debe cuantificarse su presencia en los lotes de semilla. Con ese fin, en este trabajo se analizaron comparativamente marcadores morfológicos (basado en caracteres de la hoja), bioquímicos (análisis proteico por UTLIEF) y moleculares (con el marcador microsatélite CMBR22) para la identificación temprana del híbrido Aconcagua INTA y sus parentales. Los tres métodos permitieron identificar inequívocamente al híbrido y sus parentales, presentando correspondencia absoluta (100%) entre ellos, en las plantas analizadas. Los marcadores proteicos y moleculares permitirán la identificación temprana de híbridos de zapallo cv. Aconcagua.

Palabras claves adicionales: semillas, selección temprana, UTLIEF, marcador microsatélite.

1. Introducción

La industria del deshidratado de hortalizas es una actividad relevante para la provincia de Mendoza, Argentina, la cual involucra una cadena productiva estimada, de 11,25 millones de dólares anuales. En particular, el deshidratado de zapallo moviliza 3.500 toneladas por año, de lo que se exporta el 48%, principalmente a Europa.

La problemática en la producción de zapallo deshidratado se centra en el bajo rendimiento en el campo, en el proceso de deshidratación y en la calidad del producto final. La obtención del híbrido interespecífico Aconcagua INTA (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*) aumentó el rendimiento en los cultivos, que pasaron de promedios de 20 t·ha⁻¹ (± 8 t) en materiales previos, a promedios de 45 t·ha⁻¹ (± 15 t) (Galmarini & Della Gaspera, 2016).

La producción de semilla de este híbrido es compleja porque existen barreras de incompatibilidad genética (Jiménez–Durán & Cruz–García, 2011). La semilla que se obtiene en estos cruzamientos por polinización manual asegura la obtención de un alto porcentaje (99 %) de semillas híbridas porque no existe la posibilidad de ingreso de otro polen que no sea el de la especie donante. Pero presenta un rendimiento cuatro veces inferior a la polinización entomófila (Galmarini & Della Gaspera, 2016). Por otro lado, existe la posibilidad del empleo

del regulador del crecimiento ácido 2-cloro etil fosfónico, conocido como “etephon”, para la generación de parentales de zapallo solamente con flores femeninas, por un determinado tiempo. Esta estrategia ha sido empleada desde hace más de cincuenta años con resultados positivos (Home & Lovell, 1981). Se ensayaron aplicaciones de diferentes dosis del etephon sobre el parental femenino del híbrido Aconcagua INTA y los resultados mostraron que dosis de $1875 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ reducen el nivel de flores masculinas casi totalmente por un período de tiempo de 20 a 30 días. Con la introducción de abejas, permite obtener lotes de semilla con un 50% a 80% hibridación y un rendimiento de 300 a $800 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Galmarini & Della Gaspera, 2016). Para determinar el porcentaje de semillas híbridas en el híbrido Aconcagua INTA se puede recurrir a la expresión fenotípicas del gen *M* (hojas moteadas o *mottled leaves*), que produce áreas de color gris-platinado en las hojas del progenitor masculino del híbrido. Se trata de un gen simple, con dominancia del alelo *M* (hojas moteadas) sobre *m* (ausencia de moteado). Las progenies F1 que se obtiene del cruzamiento entre el parental femenino (*mm*) y el masculino (*MM*), son heterocigotas (*Mm*) y, consecuentemente, expresan el fenotipo de “hojas moteadas”. Cuando hay autofecundación del progenitor femenino, la descendencia es homocigota recesiva (*mm*) y por lo tanto sus hojas no presentan el moteado gris-platinado. Este carácter permite identificar fenotípicamente los individuos híbridos (con hojas moteadas) y aquellos de origen materno (sin moteado), pudiendo así determinar el porcentaje de semillas híbridas con escaso error (Scott & Riner, 1946; Paris, 2005). Sin embargo, la determinación del porcentaje de hibridación con esta metodología dificulta la siembra del lote de semilla evaluado en la misma temporada, dado que transcurren cinco meses para romper la dormancia propia de las semillas de zapallo (de Marzo a Agosto), y otros dos meses (de Setiembre a Octubre) entre la siembra y el crecimiento de las plántulas. En este contexto, es importante el desarrollo de nuevos métodos para la identificación temprana del porcentaje de semillas híbridas.

Entre los métodos alternativos para la identificación de individuos híbridos, se encuentran las técnicas moleculares basadas en electroforesis de proteínas seminales o variantes alélicas en perfiles de ADN.

La separación de proteínas a través de electroforesis en geles se basa en diferentes propiedades químicas y físicas, tales como peso molecular, tamaño o carga eléctrica (Cooke, 1995). En las electroforesis de isoelectroenfoque (IEF) las proteínas son separadas por las diferencias en sus cargas eléctricas. Bajo un campo eléctrico, en el gel que contiene anfolitos se crea un gradiente de pH en el cual las proteínas migran hasta que se detienen en un punto donde la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, conocido como punto isoeléctrico (P_i). Todas las proteínas tienen diferentes valores de P_i por eso se puede observar un patrón de bandas en el gel. Cuando el gel IEF de poliacrilamida se realiza con un espesor de 0,15 mm se le llama electroforesis con enfoque isoeléctrico en capas ultrafinas (*Ultrathin-layer isoelectric focusing*, UTLIEF), la cual es una técnica rápida, segura y económica (Van den Berg, 1990). Esta técnica es aceptada por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas para la identificación varietal de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) (ISTA, 2021). Las principales proteínas de reserva en semillas de zapallo son las globulinas solubles en sales, le siguen las glutelinas y en menor cantidad albúminas y prolaminas (Marcone, 1997). Existen algunos antecedentes en el uso de esta técnica para la identificación de cultivares de *Cucurbita* en China (Tu *et al.*, 2012) y para la determinación de la pureza genética de un híbrido intraespecífico de zapallo (Yan, 2013). En Argentina, no se han reportado experiencias de este tipo, hasta la fecha.

Entre los marcadores moleculares disponibles para detectar variaciones a nivel de ADN e identificar individuos, variedades, géneros o especies, se encuentran los microsátélites o ‘secuencias simples repetitivas’ (*Simple Sequence Repeats*, SSR). Estos aparecen con alta frecuencia y presentan una distribución uniforme en el genoma, pueden ser altamente polimórficos, y generalmente se heredan de manera mendeliana y codominante (Kalia *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2019; Mafakheri *et al.*, 2020). En los últimos años se han

desarrollado un gran número de marcadores SSR en especies hortícolas de *Cucurbitaceae*, incluidas pepinillo (*Cucumis sativus* L.) (Cavagnaro *et al.*, 2010; Jingjing *et al.*, 2019; Pandey *et al.*, 2021), melón (*Cucumis melo*) (Bhawna *et al.*, 2015; Ritschel *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2016), calabaza amarga (*Momordica charantia*) (Cui *et al.*, 2017) y varios tipos de zapallo del género *Cucurbita* (Stift *et al.*, 2004). Lorello (2012) utilizó marcadores SSR desarrollados a partir de secuencias de melón (Ritschel *et al.*, 2004) para evaluar la diversidad genética en germoplasma de zapallo criollo (*Cucurbita maxima*), proveniente de los valles andinos de Argentina. En ese trabajo, se identificó un marcador denominado CMBR22, que permitió diferenciar entre poblaciones de *C. maxima* y *C. moschata* (Lorello *et al.*, 2010), sugiriendo que dicho SSR podría servir para el genotipado de híbridos interespecíficos entre ambas especies.

Con el fin de contar con métodos alternativos a la identificación morfológica de híbridos del cultivar Aconcagua INTA, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos: 1) poner a punto la técnica UTLIEF y desarrollar marcadores de proteínas seminales que permitan identificar los parentales y el híbrido interespecífico; 2) evaluar el marcador molecular SSR CMBR22 como herramienta para el genotipado de híbridos y parentales; y 3) evaluar la eficiencia de las tres metodologías para la identificación del híbrido interespecífico Aconcagua INTA.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal y muestreos:

Se tomaron 50 semillas, 47 del híbrido Aconcagua INTA extraídas al azar de un lote de producción comercial, una semilla obtenida por cruzamiento manual *C. maxima* x *C. moschata* (control positivo), y una semilla de cada parental.

El trabajo se realizó en la provincia de Mendoza, Argentina, en 2018. Las semillas se enumeraron como 1 (*C. maxima*); 2 (*C. moschata*); 3 (F1 control manual) y 4 al 50 (F1 lote comercial). Luego se cortaron en sentido transversal y las mitades del lado opuesto al embrión se conservaron a -20 °C. Las mitades conteniendo el embrión fueron tratadas con fungicida Captan 80 WG y se pusieron a germinar en macetas individuales con sustrato, enumeradas del mismo modo y colocadas dentro de un invernáculo. Al cabo de un mes, todas las plantas que crecieron fueron transplantadas a campo para la posterior evaluación de los caracteres morfológicos de las hojas. De cada una de estas plantas se extrajo una porción de hoja para realizar la extracción de ADN y su posterior análisis con el marcador molecular SSR.

Finalmente, se realizó el análisis proteico de las porciones de cotiledón reservadas a -20 °C correspondientes a las plantas sobrevivientes en campo.

2.2. Análisis morfológico:

Cuando las plantas en el campo desarrollaron 10 a 15 hojas verdaderas se realizó el análisis visual, pues este estado de desarrollo es el óptimo para una identificación morfológica inequívoca de individuos híbridos y de origen materno. Para la evaluación, se asumió que las plantas que provenían de autofecundación del progenitor femenino poseían hojas sin motas (*mm*), mientras que las plantas híbridas (*Mm*) poseían hojas moteadas. Se registró esta característica identificando la numeración que le correspondió a cada planta.

2.3. Extracción de proteínas:

Se tomaron 0,025 g de cotiledón de cada una de las medias semillas almacenadas a -20 °C correspondientes con las plantas que fueron evaluadas morfológicamente y se colocaron en un tubo de 1,5 ml. Posteriormente se agregó a cada tubo 250 µl de solución de extracción 2-

cloroetanol 35% y se dejó a temperatura ambiente por una hora. Los tubos fueron sonicados por 1 min y luego centrifugados por 10 min a 5000 rpm. De cada muestra se dispensaron 20 µl del sobrenadante en cada pozo del gel de poli(acrilamida) para la electroforesis y separación de proteínas.

2.4. Electroforesis con enfoque isoeléctrico en capas ultrafinas:

El UTLIEF se desarrolló de acuerdo a las Reglas Internacionales para Análisis de Semilla (International Seed Testing Association, 2021). La solución del gel contenía 0,65 ml de stock acrilamida 40%; 4,35 ml de agua; 0,44 ml de anfolitos pH 2-9 (Sinus, Alemania); 1,6 g de urea; 0,16 g de taurina; 30 µl de amonio persulfato (APS) 20% y 4 µl tetrametiletildiamina (TEMED).

El gel, armado sobre un vidrio, se colocó encima de una placa de cerámica en una cuba de electroforesis horizontal Desaphor HF (Desaga GmbH, Alemania) el cual fue conectado a un equipo de enfriamiento para mantener la superficie del gel a una temperatura constante de 10 °C. Dos tiras absorbentes fueron embebidas cada una en una solución cátodo y en una solución ánodo, y colocadas en ambos extremos del gel. La solución ánodo contenía 0,332% (p/v) de ácido aspártico y 0,368% (p/v) de ácido glutámico, y la solución cátodo contenía 0,472% (p/v) de arginina, 0,364% (p/v) de lisina y 12% (v/v) de etilendiamina. La tira de aplicación fue colocada a 0,5 cm por debajo del buffer ánodo. La fuente de poder fue configurada a 2000 V y se ajustó el amperaje para que el voltaje inicial de la electroforesis sea aproximadamente 170 V.

Luego de 3 h el gel fue removido y fijado en 12% (p/v) de ácido tricloroacético por 20 min, luego teñido en agitación en una solución colorante que contenía 0,015% (p/v) Coomassie R250 y 0,045% (p/v) Coomassie G250, 11% (v/v) de ácido acético, 18% (v/v) de etanol y 71% (v/v) de agua, por 45 min. Finalmente, el gel fue desteñido en una solución de 30% (v/v) etanol, 5% (v/v) ácido acético y 65% (v/v) de agua por 20 min. Después de enjuagar con agua, el gel se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente fue fotografiado para su análisis.

2.5. Extracción de ADN:

Las muestras de hojas se extrajeron cuando las plantas presentaron 10 hojas verdaderas. El material fue identificado con el número asignado y liofilizado. Luego se pesó 15 mg de tejido vegetal seco y fueron macerados en un tubo de 1,5 ml hasta obtener un polvo fino, al cual se agregó 700 µl de buffer de extracción (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2% polivinilpirrolidona) previamente calentado a 65 °C más 2 µl de β-mercaptoetanol. Las muestras fueron homogeneizadas mediante agitación en vórtex por 10 seg y luego los tubos se incubaron en baño termostático a 65 °C durante 45 min, invirtiéndolos cada 5 o 10 min. Luego de enfriados los tubos, se agregaron 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), y se mezcló mediante inversiones suaves durante 10 min, seguido de centrifugación a 14.000 rpm por 10 min. La fase superior resultante se transfirió a un nuevo microtubo, al que se le adicionaron 600 µl de isopropanol frío, mezclando suavemente, seguido de su incubación a -20 °C durante 30 min. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se lavó con 500 µl de etanol al 70% (v/v) y luego otro lavado con 500 µl de etanol 96%. El precipitado resultante se dejó secar en estufa a 35 °C durante 30 a 40 min, luego se resuspendió el ADN en 50 µl de agua miliQ estéril y finalmente se colocó en heladera a 5 °C por 24 h hasta la total disolución del precipitado. La calidad y concentración del ADN extraído se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% a 90 V por 60 min usando como patrón de concentración conocido ADN lambda. Por último, se realizaron los cálculos para diluir el ADN genómico a una concentración de 15 ng/µl.

2.6. Marcador molecular SSR:

Se utilizó el marcador molecular SSR CMBR22, desarrollado previamente por Ritschel *et al.* (2004) a partir de secuencias genómicas de melón. Para ello se utilizaron los cebadores forward (5'-TCATGGAAACCCATCACT-3') y reverse (5'-TGGAGATATAATTTGCTGACACC-3') originales. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 13 µl que contenía 5,45 µl de agua, 1,3 µl de Taq buffer 10X, 0,5 µl MgCl₂ (50 mM), 1,3 µl de mezcla de dNTPs (2,5 mM de cada uno), 0,65 µl (5 µM) de cada cebador, 0,15 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl) y 3 µl de ADNg de zapallo (15 ng/µl). El termociclador (Bioneer MyGenie® 96 Gradient Thermal Block) fue programado de la siguiente manera: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min; con un paso de extensión final a 72 °C por 4 min. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 3% en buffer TBE, durante 120 min a 100 V. Posteriormente, los geles fueron teñidos con GelGreen, visualizado en un transiluminador Dark Reader® DR46B (Clare Chemical Research, USA) y fotodocumentados. Los amplicones generados a partir del locus CMBR22 fueron purificados y secuenciados para conocer el tamaño de los alelos generados siguiendo métodos descritos previamente por Lorello *et al.* (2012).

3. Resultados

Del total de 50 semillas utilizadas, 14 no germinaron y las restantes 36 plantas fueron analizadas mediante los tres métodos para determinar su perfil fenotípico, proteico y molecular.

3.1. Análisis morfológico:

En el campo se registraron 19 plantas (52,8%) con el fenotipo de hojas moteadas (*Mm*), correspondientes al híbrido Aconcagua INTA, mientras que 17 plantas (47,2%) presentaron hojas sin motas (*mm*), provenientes de autofecundación del parental materno (Figura 1).



Figure 1: Typical phenotypes of a hybrid individual of Aconcagua INTA with mottled leaves (left image), and an individual derived from self-pollination of the maternal progenitor (right image). Mendoza, Argentina, 2018.

Figura 1: A la izquierda se observa una planta híbrida Aconcagua INTA con las típicas motas en las hojas, y a la derecha una planta con hojas sin motas cuya semilla proviene de una autofecundación. Mendoza, Argentina, 2018.

3.2. Análisis proteico:

Las 36 semillas que fueron analizadas con la técnica UTLIEF revelaron en total 14 bandas y seis fueron polimórficas, de las cuales tres bandas eran maternas exclusivas (denominadas BM1, BM2 y BM3 relacionadas con el alelo *m*) y tres bandas paternas exclusivas (denominadas

BP1, BP2 y BP3 relacionadas con el alelo *M*) (Figura 2). En base al análisis de estas bandas, se pudo determinar el perfil proteico del híbrido 'control' (F1), que comparte las bandas de ambos parentales; por el contrario, las semillas producto de autofecundación, poseen solamente bandas maternas (muestras 5, 6, 7, 8, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 30, 32, 35, 37, 38, 40 y 42 en Figura 2).

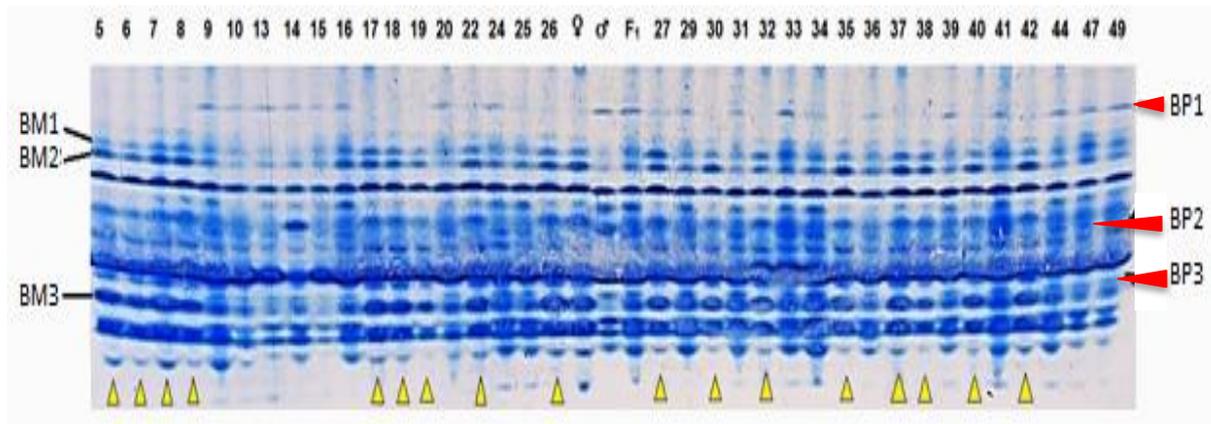


Figure 2: UTLIEF seed protein profiles (pH 2-9) of 36 cucurbit individuals. BM: maternal band; BP: paternal band. Yellow triangles indicate self-pollinated individuals. Mendoza, Argentina, 2018.

Figura 2: Perfil de proteínas del UTLIEF (pH 2-9) de las semillas correspondientes a las 36 plantas germinadas. BM: banda materna. BP: banda paterna. Triángulos amarillos: autofecundadas. Mendoza, Argentina, 2018.

3.3. Análisis genético-molecular:

Los geles obtenidos aplicando el marcador CMBR22 mostraron un perfil alélico polimórfico y codominante en las muestras de los progenitores con tamaño de alelo de 187 pb en el progenitor femenino de la especie *C. maxima*, un alelo de 170 pb en el progenitor masculino de la especie *C. moschata* y en el híbrido interespecífico Aconcagua INTA se observó la presencia de ambos alelos. La diferencia de tamaños entre los alelos permitió su separación y clara visualización mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% (Figura 3).

En las 36 muestras analizadas mediante los tres métodos se observó una correspondencia absoluta (100%) respecto a la identificación de las semillas híbridas, de las autofecundadas y de los respectivos parentales.

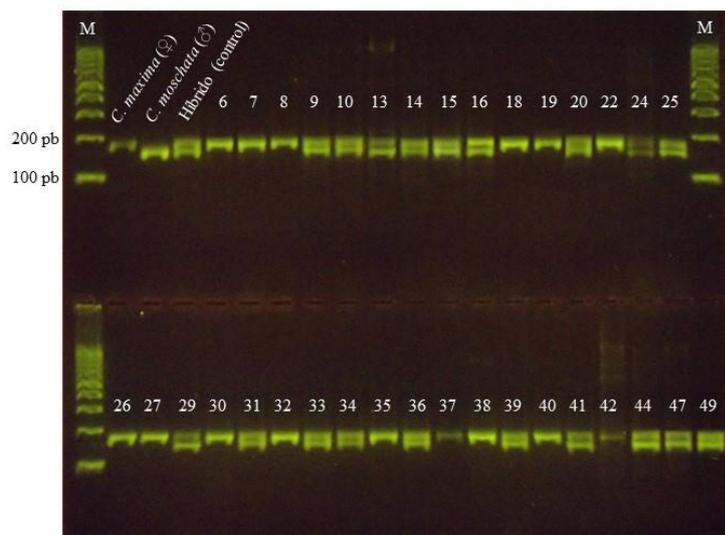


Figure 3: Molecular marker analysis of the microsatellite locus ‘CMBR22’ in interspecific hybrids of Aconcagua INTA, and its maternal (*C. maxima*) and paternal (*C. moschata*) progenitors. Individuals that are homozygote for the maternal allele derive from self-pollination of *C. maxima*, while heterozygous plants (with both alleles) are true hybrids. A molecular size marker (Fermentas, 100-bp ladder) was included to estimate amplicons sizes. Mendoza, Argentina, 2018.

Figura 3: Análisis del marcador molecular SSR CMBR22 en los progenitores materno (*C. maxima*) y paterno (*C. moschata*) y el híbrido interespecífico Aconcagua INTA (*C. maxima* x *C. moschata*) obtenido mediante fecundación manual (control). Individuos homocigotos para el alelo materno provienen de autofecundaciones, e individuos heterocigotos que presentan ambos alelos son considerados híbridos. Como indicador de peso molecular (M) se usó un marcador Ladder de 100 pb (Fermentas). Mendoza, Argentina, 2018.

4. Discusión

En este trabajo se comprobó que cualquiera de los tres métodos analizados: morfológico, proteico o genético, puede ser utilizados indistintamente y con la misma eficacia para identificar al híbrido Aconcagua INTA, pues hubo una coincidencia absoluta en la identificación de los respectivos genotipos.

Si bien existen notables diferencias morfológicas entre las plantas de semillas híbridas respecto de las autofecundadas hay que esperar aproximadamente siete meses para poder evaluarlas. El largo periodo que se requiere para alcanzar las condiciones para una identificación morfológica confiable impide obtener dicha información antes de la fecha de siembra. Las técnicas moleculares ensayadas en este trabajo permitirán la determinación temprana del porcentaje de hibridación, posibilitando realizar siembras planificadas en función del porcentaje de híbridos en el lote de semillas a usar (por ejemplo, dimensionando con mayor precisión la superficie a implantar para obtener la producción deseada, teniendo en cuenta el porcentaje de híbridos en el lote de semillas).

En este trabajo se demostró la utilidad del marcador molecular SSR CMBR22 para la identificación temprana de híbridos en lotes de semilla de Aconcagua INTA. Igualmente se tuvo que esperar a que las semillas terminaran su período de dormancia, pero se ganaba tiempo

extrayendo el ADN de las primeras hojas verdaderas de las plántulas. Otra opción que se tuvo en cuenta fue la extracción de ADN a partir de los cotiledones pero surgieron algunos inconvenientes en la purificación, atribuibles al elevado contenido de aceites y polisacáridos presente en las semillas (Gohari Ardabili *et al.*, 2011).

Lorello *et al* (2010) verificaron la especificidad de la reacción de PCR respecto a la amplificación del locus CMBR22 para constatar la naturaleza del polimorfismo de bandas observado en los geles. Para ello, cortaron y purificaron ambos amplicones (bandas) del SSR a partir del gel, luego fueron clonados (en vector de clonación) y secuenciados. El análisis de dichas secuencias demostró que los amplicones correspondían al SSR CMBR22 y que el polimorfismo de tamaño observado en los geles estaba dado por variaciones en el número de repeticiones del motivo AG. La diferencia de tamaño final entre los amplicones fue de 17 nucleótidos, lo cual se verificó mediante separación de los fragmentos por electroforesis capilar en un secuenciador (Genetic Analyzer ABI 3130), usando como referencia un marcador de peso molecular que variaba, incrementalmente, de a un nucleótido.

Este marcador ha sido utilizado localmente para el genotipado de poblaciones “criollas” de zapallo (*Cucurbita maxima*) en Argentina (Lorello, 2012; Lorello *et al.*, 2020).

Por último, se puso a punto la técnica electroforética UTLIEF para la identificación del cultivar Aconcagua INTA (Della Gaspera *et al.*, 2019 y 2020). No obstante, Valdez (2007, datos sin publicar) fue quién utilizó esta técnica por primera vez y observó un patrón de bandas únicas en proteínas de semillas de varios cultivares locales de zapallo. Este método tiene la ventaja que se puede realizar inmediatamente luego de extraídas las semillas y el procedimiento total en laboratorio demora tres días hasta la obtención de los resultados.

Comparada con otras técnicas de electroforesis de proteínas de semillas (PAGE y SDS-PAGE) usadas previamente en especies del género *Cucurbita* (Stoilova *et al.*, 2006), la técnica UTLIEF permitió detectar un mayor número de bandas totales y bandas polimórficas. El polimorfismo observado en el presente trabajo puede deberse a una mayor distancia genética existente entre los parentales del híbrido interespecífico analizado. Dudwadkar *et al.* (2015) analizaron proteínas seminales de especies cucurbitáceas y observaron una mayor diversidad genética en cultivares interespecíficos.

La técnica UTLIEF ha sido utilizada también con éxito para la identificación de cultivares de maíz (Milivojević *et al.*, 2017), arroz (Jiamtaea *et al.*, 2017), pepino (Onwimol *et al.*, 2014), ají picante (Akrawong *et al.*, 2019) y en el género *Cucurbita* (Yan, 2013).

5. Conclusiones

La técnica UTLIEF permitió una inequívoca identificación de híbridos y parentales del cultivar Aconcagua INTA (validado mediante análisis morfológico de las plantas analizadas).

El marcador SSR CMBR22 reveló polimorfismo codominante, con dos alelos claramente distinguibles en geles de agarosa que permiten identificar el híbrido y sus parentales, de forma inequívoca (validado por métodos morfológicos).

Los tres métodos tuvieron correspondencia absoluta respecto a la identificación de híbridos y parentales en las muestras analizadas pero la técnica UTLIEF tiene mayores ventajas con respecto al ahorro de tiempo del análisis. Esto es debido a que UTLIEF permite directamente su análisis a partir de tejidos de semilla. Por el contrario, la extracción de ADN a partir de semillas –para su posterior análisis del marcador molecular CMBR22– produce ADN de baja calidad, debido a un excesivo contenido de macromoléculas de reserva presentes en dicho órgano, lo que dificulta los análisis posteriores mediante amplificación por PCR.

Los marcadores proteicos y moleculares caracterizados en este estudio permitirán la identificación temprana de híbridos de zapallo cv. Aconcagua INTA. Su utilización contribuirá a una mejor y más rápida identificación genética en los lotes de semilla comercializados.

6. Bibliografía

- Akrawong, F.; Chanpreme, S.; Knoblauch, R.; Demharter, M. & Thongket, T. (2019). Varietal identification of Thai hot chilli using seed protein analysis by ultrathin layer isoelectric focusing technique. *Seed Science and Technology*, 47, 2, 187-209.
- Cavagnaro, P. F.; Senalik, D.; Yang, L.; Simon, P.W.; Harkins, T.; Kodira, C.D.; Huang, S. & Weng, Y. (2010). Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *BMC Genomics* 11: 569.
- Castro, H. A.; Gálvez, M. J.; González, S. R. & Villamil, C. B. (2006). Protein composition of *Cucurbita maxima* and *C. moschata* seeds. *Biologia Plantarum*, 50, 251-256.
- Bhawna Chaduvula, P. K.; Bonthala, V. S.; Manjusha, V.; Siddiq, E. A.; Polumetla, A. K. & Prasad, G. M. (2015). CmMDB: a versatile database for *Cucumis melo* microsatellite markers and other horticulture crop research. *PloS one*, 10(4), e0118630.
- Cui, J.; Cheng, J.; Nong, D.; Peng, J.; Hu, Y., He, W. & Hu, K. (2017). Genome-wide analysis of simple sequence repeats in bitter melon (*Momordica charantia*). *Frontiers in plant science*, 8, 1103.
- Della Gaspera, P. G.; Tarnowski, C. G.; Valdez, J. G.; Lorello, I. M.; Barboza, K. & Cavagnaro, P. F. (2019). Determinación de pureza genética en semillas híbridas interespecíficas de zapallo por medio de marcadores moleculares, bioquímicos y fenotípicos. XVII Congreso Latinoamericano de Genética. Mendoza, Argentina, 6 al 9 de octubre de 2019.
- Della Gaspera, P. G.; Tarnowski, C. G.; Valdez, J. G.; Lorello, I. M.; Barboza, K. & Cavagnaro, P. F. (2020). Determinación de pureza genética en Aconcagua INTA, un híbrido interespecífico de zapallo. 1° Congreso Argentino de Semillas. Córdoba, 3 y 4 de noviembre de 2020.
- Dudwadkar, S.; Parab, M. & Singh, S. (2015). Diversity analysis among few *Cucurbitaceae* using seed protein profile. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 5(1), 146:151.
- Galmarini, C. R. & Della Gaspera, P. G. (2016). Informes anuales período 2002-2016 del Convenio de Vinculación Tecnológica INTA – UNILEVER “Obtención de cultivares de especies hortícolas para la industria del deshidratado. INTA-Sistema Integrado de Gestión de Convenios (SYGeC).
- Gohari Ardabili, A.; Farhoosh, R. & Haddad Khodaparast, M. H. (2011). Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. pepo Var. Styriaca) Grown in Iran. *Journal of Agriculture, Science and Technology* 13: 1053-1063
- International Seed Testing Association. (2021). Reglas Internacionales para Análisis de Semillas. Bassersdorf, Suiza, Cap. 8, p. 14-16.
- Jiamtaea, P.; Onwimola, D.; Chanpraserta, W.; Thongketb, T. & Prasertsakc, A. (2017). Varietal verification of Thai rice using ultrathin layer isoelectric focusing of seed proteins. *ScienceAsia* 43: 145-154.
- Jiménez Durán, K. & Cruz García, F. (2011). Incompatibilidad sexual, un

- mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. *Revista Fitotecnia Mexicana* vol.34 no.1 Chapingo ene./mar. 2011. ISSN 0187-7380
- Jingjing, Y.; Jian, Z.; Ruixi, H.; Feng, Z.; Aijun, M.; Jiang, L.; Bobo, D. & Changlong, W. (2019). Target SSR-Seq: A novel SSR genotyping technology associate with perfect SSRs in genetic analysis of cucumber varieties. *Frontiers in Plant Science* 10, 531.
- Kalia, R.K.; Rai, M.K.; Kalia, S.; Singh, R. & Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177, 309-334.
- Lorello, I. M. (2010). Desarrollo y Utilización de Técnicas Moleculares en Estudios Genéticos de Vegetales: Identificación del híbrido interespecífico Aconcagua (*Cucurbita maxima* cv. Zapuco INTA x *Cucurbita moschata* cv. Paquito INTA). Análisis de Semillas Tomo 4. Vol 2. N° 14. ISSN 1851-1678. p 46-49.
- Lorello, I. M.; García Lampasona, S. C. & Della Gaspera, P. G. (2010). Identificación molecular del híbrido interespecífico Aconcagua INTA, obtenido del cruzamiento entre las líneas LC 1 (*Cucurbita maxima*) y LC 2 (*Cucurbita moschata*). XIV Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG), Viña del Mar, Chile, 01-05 octubre, 2010. Libro de resúmenes p. 237.
- Lorello, I. M. (2012). Recolección, conservación y caracterización morfológica y molecular de poblaciones “criollas” de zapallo (*Cucurbita maxima*) colectadas en los valles andinos de la Argentina. Phd Dissertation Abstracts 98, PROBIOL, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
- Lorello, I. M.; García Lampasona S.C. & Peralta, I.E. (2020). Diversidad genética de poblaciones de zapallo (*Cucurbita maxima*) colectadas en los valles andinos de la Argentina. *Revista Facultad de Ciencias Agrarias - UNCUIYO*. ISSN impreso 0370-4661. ISSN (en línea) 1853-8665. <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCA/article/view/3033>
- Mafakheri, M.; Kordrostami, M.; Rahimi, M. & Matthews, P. D. (2020). Evaluating genetic diversity and structure of a wild hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm using morphological and molecular characteristics. *Euphytica* 216, 58.
- Milivojević, M.; Nikolić, A.; Marković, K.; Filipović, M.; Vančetović, J.; Petrović, T. & Srdić, J. (2017). Relationship between genetic diversity and cold-tolerance of maize inbred lines. *Genetika*, vol 49, no2, 635 - 646.
- Pandey, S.; Yadav, P.S.; Ansari, W.A.; Pandey, M.; Yang, L.; Singh, B.; Singh, P.M. & Singh, J. (2021). Development of high conserved cross-species microsatellite markers from cucumber genome and their applicability in genetic diversity and comparative mapping. *Scientia Horticulturae* 288, 110408.
- Paris, H. S. (2005). The Genes of Pumpkin and Squash. *HortScience* 40 (6):1620-1630
- Ritschel, P. S.; de Lima Lins, T. C.; Tristan, R. L.; Buso, G. S.; Buso, J. A. & Ferreira, M. E. (2004). Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, 4(1), 9.
- Rezig, L.; Chouaibia, M.; Msaadab, K. & Hamdia, S. (2012). Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products* 37: 82– 87.
- Scott, D. H. & Riner, M. E. (1946). A mottled-leaf character in winter squash; inherited as a dominant Mendelian character. *Journal of Heredity* 37: 27. doi:

- 10.1093/oxfordjournals.jhered.a105529. PMID: 21015950.
- Stift, G.; Zraidi, A. & Lelley, T. (2004). Development and characterization of microsatellite markers (SSR) in *Cucurbita* species. *REPORT-CUCURBIT GENETICS COOPERATIVE*, 27, 61.
- Stoilova, T.; Cholakova, N. & Markova, M. (2006). Variation in seed protein and isoenzyme patterns in *Cucurbita* cultivars. *Biologia Plantarum*, 50, 450-452.
- Wang, X. F.; Knoblauch, R. & Leist, N. (2000). Varietal discrimination of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. *Seed Science Technology* 28, 521-6.
- Yang, S.; Zhong, Q.; Tian, J.; Wang, L.; Zhao, M.; Li, L. & Sun, X. (2018). Characterization and development of EST-SSR markers to study the genetic diversity and populations analysis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Genes Genom* 40, 1023-1032.
- Zheng, X.; Cheng, T.; Yang, L.; Xu, J.; Tang, J.; Xie, K.; Huang, X.; Bao, Z.; Zheng, Z.; Diao, Y.; You, Y. & Hu, Z. (2019). Genetic diversity and DNA fingerprints of three important aquatic vegetables by EST-SSR markers. *Sci Rep* 9, 14074.
- Zhu, H.; Guo, L.; Song, P.; Luan, F.; Hu, X. & Lang, L. (2016). Development of genome-wide SSR markers in melon with their cross-species transferability analysis and utilization in genetic diversity study. *Molecular Breeding* 36, 153.

Horticultura Argentina es licenciado bajo Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 2.5 Argentina.