



TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Facultad de Ciencias Experimentales

Análisis genómico de la transición floral femenina en *Cucurbita pepo*

Genomic analysis of the female floral transition in *Cucurbita pepo*

Alumno/a: Laura Alonso López

Curso Académico: 2020/2021 – Convocatoria Septiembre

Director: Manuel Jamilena Quesada

Cotutor: Cecilia Martínez Martínez

ÍNDICE

RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Características de <i>Cucurbita pepo</i>	5
1.1.1. Caracterización taxonómica y origen	5
1.1.2. Importancia económica	5
1.1.3. Características morfológicas y de cultivo	7
1.2. Variabilidad natural	8
1.3. Caracteres de importancia agronómica en <i>C. pepo</i>	10
1.4. Control genético y hormonal de la determinación del sexo en calabacín	12
1.5. El genoma de <i>Cucurbita pepo</i> y otras cucurbitáceas.....	14
1.6. Estudios de asociación del genoma completo	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Material vegetal.....	20
3.2. Manejo del cultivo	20
3.3. Evaluación de la expresión sexual de <i>Cucurbita</i>	21
3.4. Análisis estadístico de los datos de expresión sexual	22
3.5. Análisis de asociación del genoma (GWAS)	22
3.6. Búsqueda de posibles genes candidatos	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Variación genética del panel de accesiones de <i>Cucurbita pepo</i> basada en genotipado por secuenciación GBS.....	24
4.3. Estudio de asociación del genoma completo (GWAS) para la transición floral femenina	26
4.5. Análisis de las regiones adyacentes a los SNPs significativamente asociados con la transición floral femenina	31

5. DISCUSIÓN	38
6. CONCLUSIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA.....	41
8. ANEXO	46

RESUMEN

Cucurbita pepo es uno de los cultivos más importantes económicamente en nuestro país. La transición floral femenina es un carácter de gran importancia agronómica, pues el adelanto de la floración femenina supone un aumento en el porcentaje de flores femeninas por planta y en la producción del cultivo. Aunque se sabe que la floración femenina en cucurbitáceas está regulada por etileno, hasta el momento no se han identificado los genes que regulan dicha transición. En este trabajo se han fenotipado más de 414 accesiones de *Cucurbita pepo* procedentes de distintas regiones mundiales y estos datos se han contrastado con los datos genómicos GBS obtenidos de la base de datos Cucurbit Genomics, para realizar un análisis de asociación del genoma completo (GWAS), con el objetivo de encontrar regiones genómicas asociadas a la floración femenina. El análisis GWAS ha permitido identificar 5 regiones genómicas en los cromosomas 2, 6, 7, 10 y 0 que presentan SNPs significativos altamente asociados al carácter. Junto a otros genes candidatos, en el cromosoma 7 se ha identificado un gen responsable de la ubiquitinación de los factores de transcripción *EIN3/EIL* que están implicados en la señalización de etileno; y en el cromosoma 10 se ha identificado un factor de transcripción tipo *AGAMOUS* que se sabe que en *Arabidopsis thaliana* está involucrado en la transición floral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de *Cucurbita pepo*

1.1.1. Caracterización taxonómica y origen

El género *Cucurbita* se encuentra dentro del orden *Cucurbitales*, familia *Cucurbitaceae* y subfamilia *Cucurbitoidae* (Tabla 1). La familia de las cucurbitáceas está formada por unas 1.000 especies reunidas en 96 géneros (Renner y Hanno, 2016), siendo *Cucumis*, *Cucurbita* y *Citrullus* los más importantes por su valor económico. *Cucurbita pepo* incluye ocho grupos de cultivos comestibles entre los que se encuentran el calabacín y la calabaza.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del calabacín, *Cucurbita pepo*.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Subfamilia	Cucurbitoidae
Tribu	Cucurbitae
Género	<i>Cucurbita</i>
Especie	<i>Cucurbita pepo</i>

México es considerado el centro de domesticación y diversificación del género *Cucurbita*, que consta de 20 taxones, donde *Cucurbita pepo subsp. pepo* es la mejor estudiada debido a su gran importancia económica y distribución mundial (Castellanos-Morales *et al.*, 2019).

1.1.2. Importancia económica

Cucurbita pepo es una de las especies más polimórficas y cultivadas de las cucurbitáceas, además de ser la que presenta una mayor importancia económica con respecto al resto de las especies de este género (París, 2001). La domesticación de *C. pepo* tuvo lugar en su lugar de origen y se cree que hubo al menos dos procesos de domesticación independientes, Sur de Norteamérica y Norte de México, apareciendo así las dos

subespecies más conocidas: *C. pepo subsp. pepo* y *C. pepo subsp. ovífera* (Carvajal Moreno, 2014).

A nivel mundial, los datos de la FAO indican que el continente más productivo de este cultivo es Asia, seguido de Europa y África, siendo Oceanía el menor (Figura 1).

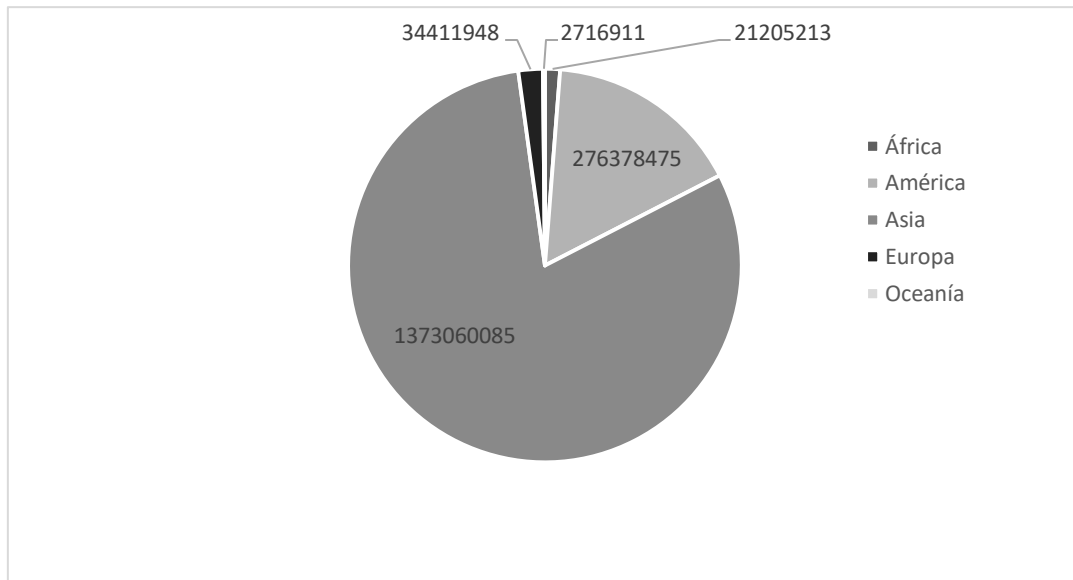
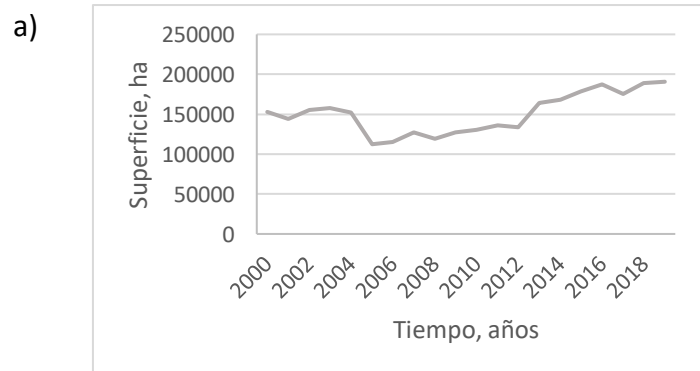


Figura 1. Producción mundial (t) desde 2000 hasta 2019. Fuente: FAOSFAT, Anuario de Estadísticas 2019).

España es uno de los principales países productores, con una superficie cultivada y una producción más o menos estables en los últimos 10 años (Figura 2).



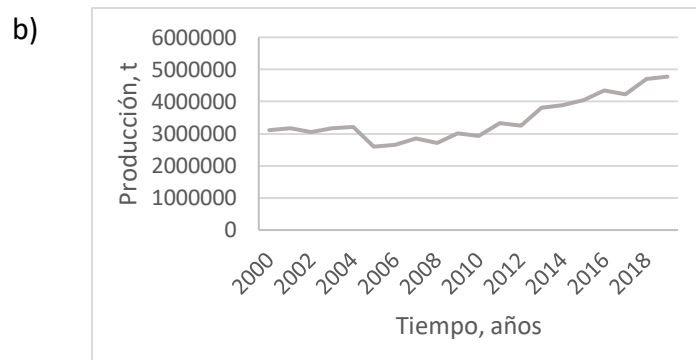


Figura 2 a) Superficie de *C. pepo* cultivada en España (ha). b) Producción de calabacín en España (t) en los últimos 9 años. Fuente: FAOSFAT, Anuario de Estadísticas 2019.

1.1.3. Características morfológicas y de cultivo

El calabacín, es una planta anual de crecimiento indeterminado, presenta un sistema radicular con una raíz principal axonomorfa de gran desarrollo en relación con las raíces secundarias (López Gázquez, 2018).

Presenta un tallo grueso y herbáceo cuyo tamaño y altura de entrenudos va a depender de las condiciones climáticas y de la variedad. Las hojas, palmeadas, tienen un gran limbo dentado cuyo envés está recubierto de pelos y su haz es glabro. Es una planta monoica, ya que coexisten flores femeninas y masculinas en un mismo pie de planta. Las flores poseen cáliz zigomorfo con una corola formada por cinco pétalos amarillos y cinco sépalos verdes. En el caso de las flores femeninas, el ovario es ínfero, alargado, tricarpelar y trilocular; y en el caso de las flores masculinas encontramos tres estambres soldados (Figura 3) (López Gázquez, 2018).

El fruto se recolecta cuando está a mitad de su desarrollo y se caracteriza por ser un pepónide carnoso, de color variable, unilocular, sin cavidad central, liso, reticulado y estriado (López Gázquez, 2018).



Figura 3. Diferencias morfológicas entre flor masculina y femenina de calabacín.

1.2. Variabilidad natural

C. pepo ha sido considerada durante mucho tiempo una de las especies más variables para las características del fruto en el reino vegetal. Una investigación, basada en la variación entre especies y dentro ellas, ha demostrado que *C. pepo* contiene la mayor variación genética de las especies del género *Cucurbita*. Los colores del fruto incluyen verde, amarillo y naranja que pueden variar desde casi negro hasta casi blanco, y en intensidad desde un color vivo a uno pálido, teniendo patrones que incluyen rayas longitudinales y moteado, así como un patrón bicolor, de manera que en un solo fruto pueden coexistir cuatro colores en la superficie (Renner y Hanno, 2016).

C. pepo presenta tres subespecies ampliamente reconocidas donde se han observado polimorfismos genéticos moleculares, dos de ellas son especies cultivadas: *C. pepo subsp. pepo* y *C. pepo subsp. texana*, y una tercera subespecie silvestre, *C. pepo subsp. fraterna*, procedente de México. *C. pepo subsp. pepo*, abarca la mayor parte del germoplasma cultivado; y *C. pepo subsp. texana*, también conocida como *subsp. ovifera* crece en el sureste y centro de Estados Unidos y abarca gran parte del germoplasma cultivado restante (Renner y Hanno, 2016).

Como consecuencia de esta gran variabilidad, Paris (2001) clasificó los tipos cultivados comestibles de *Cucurbita pepo* en 8 morfotipos, cuatro se incluyen dentro de la *subsp. pepo* y cuatro en la *subsp. texana* (Figura 4).

Cucurbita pepo subsp. pepo

- **Pumpkin.** Presenta frutos ovalados o esféricos y se consumen en estado maduro. Se han establecido subgrupos dentro de este morfotipo debido a su elevada variabilidad.
- **Vegetable Marrow.** Común en el norte de África y Oriente Medio, se consume en estado inmaduro. Sus frutos presentan una lignificada corteza con un ratio longitud/anchura superior a 3,5.
- **Zucchini.** Es el morfotipo que se corresponde con el calabacín habitual de consumo, presentando una elevada importancia económica y distribuido por todo el mundo.
- **Cocozelle.** El fruto inmaduro es consumido como hortaliza.

Cucurbita pepo subsp. texana

- **Scallop.** Presentan frutos discoidales, aplastados y con márgenes festoneados. Se consumen inmaduros, siendo los de color amarillo los más apreciados actualmente.
- **Acorn.** Sus frutos son cónicos u ovoides, presentando casi todos los cultivares modernos frutos de color verde con surcos pronunciados.
- **Croockneck.** Presentan un cuello largo, fino y curvado, siendo verrugosos y amarillos. Mayoritariamente presentan un crecimiento arbustivo.
- **Straighneck.** Sus frutos son amarillentos, con verrugas, cilíndricos y ensanchados en su extremo distal, presentando un cuello corto. Se consumen inmaduros.



Figura 4. Diferentes morfotipos para las subespecies *pepo* y *texana* comestibles.

1.3. Caracteres de importancia agronómica en *C. pepo*

El continuo desarrollo y crecimiento poblacional, junto con el aumento de la demanda de alimentos, ha hecho necesario incrementar la calidad y producción de hortalizas por unidad de superficie con el menor coste posible. Esto se consigue con la obtención de variedades que estabilizan su producción a través de la tolerancia o resistencia a estreses bióticos y abióticos.

Los estreses abióticos hacen referencia a los factores ambientales que alteran los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas, como son la salinidad, sequía, humedad, temperatura, etc. Una elevada concentración de sales en el suelo reduce la capacidad de las plantas para absorber agua, haciendo además que no pueda absorber elementos esenciales como el calcio y potasio, y se produzca una acumulación tóxica de sodio y cloro en la parte aérea de la misma. Esta acumulación de sales en las hojas hace que las células inhiban su expansión y se produzca una reducción de la actividad fotosintética. Esto ha hecho que las plantas hayan desarrollado tres mecanismos para tolerar dicho estrés: 1) Restauración de la homeostasis iónica 2) Restauración de la homeostasis osmótica 3) Prevención y reparación de daño celular (Cebrián *et al.*, 2021). Además, se ha visto que las algunas fitohormonas como ABA y etileno juegan un papel importante en la defensa de las plantas a este tipo de estreses. En *Cucurbita pepo*, se han desarrollado mutantes de los receptores de etileno *etr1b*, *etr1a* y *etr2b*, en los que

se ha visto que en presencia de sales, las plantas mutantes germinan más rápido que las plantas WT, indicando que estos mutantes son más tolerantes a dicho estrés (Cebrián *et al.*, 2021).

Otro de los caracteres agronómicos importantes son los que hacen referencia a la tolerancia a estreses bióticos como puede ser el desarrollo de variedades resistentes a hongos, bacterias, nemátodos, virus, etc. Este tipo de estreses también van a influir en el desarrollo de las plantas haciendo que estas presenten una reducción de su crecimiento y por tanto de su producción. Sáez *et al.*, 2016 llevaron a cabo un estudio de la resistencia al virus de Nueva Delhi (ToLCNDV) en *Cucurbita spp* donde se observó que había una elevada susceptibilidad de las especies de *C. pepo* a la infección mecánica y mediante mosca blanca. La alta susceptibilidad observada en todas estas especies puso en evidencia que es un virus de gran amenaza para el cultivo de calabacín. Sin embargo, a pesar de esta elevada susceptibilidad de *C. pepo*, el género *Cucurbita* es muy variable y esta variabilidad puede ser usada para identificar fuentes de resistencia a ToLCNDV en otras especies (Sáez *et al.*, 2016).

Entre los caracteres de desarrollo de importancia agronómica cabe destacar el cuajado y crecimiento de los frutos, y especialmente la partenocarpia. Estudios anteriores han demostrado que algunas fitohormonas están implicadas en este carácter. Martínez *et al.*, (2013) observaron un aumento en la inducción del cuajado y un desarrollo temprano del fruto cuando se reducía la producción de etileno o su señalización en la flor, poniendo de manifiesto que esta hormona participa activamente en estos caracteres. Además, el tratamiento con auxinas induce el desarrollo partenocárpico del fruto, siendo este aplicado para promover el cuajado y el crecimiento en la producción de invernadero de este cultivo (Martínez *et al.*, 2013). A pesar de que se han identificado genotipos partenocárpicos en calabacín, su asociación con la falta de abscisión floral o su dependencia ambiental ha hecho que todavía no se haya desarrollado una variedad partenocárpica que permita eliminar los tratamientos hormonales que se utilizan para el cuajado de esta hortaliza en las producciones de invernadero.

Por último, la mejora de la expresión sexual es también un objetivo prioritario en los programas de mejora genética de calabacín. Conseguir una variedad de calabacín en la que se mejore la precocidad y la producción de flores femeninas es uno de los objetivos

de los programas actuales de mejora genética, todo ello con el fin de conseguir un aumento de la producción y la rentabilidad de los cultivos de esta hortaliza.

1.4. Control genético y hormonal de la determinación del sexo en calabacín

La separación de órganos masculinos y femeninos en diferentes individuos, llamada dioecia, es muy común en animales, pero en plantas solo se produce en un 5-6% de las especies con flores. En la familia de las cucurbitáceas, el 50% de las especies son dioicas (flores masculinas y femeninas en plantas separadas) y el 50% son monoicas (flores masculinas y femeninas en la misma planta). Análisis filogenéticos en cucurbitáceas han demostrado que la dioecia parece ser un estado ancestral de la familia (Martínez y Jamilena, 2021).

Las flores unisexuales han evolucionado a partir de flores hermafroditas mediante el establecimiento de mecanismos de determinación sexual, que regulan el arresto del desarrollo de estambres o carpelos en las flores femeninas o masculinas, respectivamente. En las cucurbitáceas, la ontogenia floral ha sido dividida en 12 etapas del desarrollo: las cinco primeras incluyen la iniciación de sépalos, pétalos, estambres y carpelos en el caso de las especies hermafroditas. Justamente después de la iniciación carpelar, el meristemo se determina para ser femenino mediante la prevención del desarrollo de los estambres, o masculino mediante la prevención del desarrollo de carpelos. En la etapa 6 y en las siguientes, los botones florales masculinos y femeninos son claramente distinguidos uno del otro mediante la presencia de estambres o carpelos, respectivamente (Martínez y Jamilena, 2021).

En cucurbitáceas monoicas, las flores unisexuales no se presentan unidas en inflorescencias masculinas o femeninas, como ocurre en otras especies como el maíz, si no que se desarrollan de forma individual en cada nudo a través de tres fases consecutivas: 1) Fase masculina 2) Fase mixta 3) Fase femenina. En estas plantas, el control genético del sexo no solo hace referencia a la determinación sexual, sino que también se refiere a la expresión sexual, que es el nivel general de “feminidad” o “masculinidad” de una planta. Ambos dependen de la duración de las fases sexuales y de la ratio de flores masculinas y femeninas por planta (Manzano *et al.*, 2014).

Estudios anteriores han demostrado que el etileno es el regulador principal de la determinación del sexo en cucurbitáceas. De manera que, si la producción de etileno y su señalización están activados, los meristemas se determinan como femeninos, pero si están desactivados el meristemo se determina como masculino. En el género *Cucurbita* y *Cucumis*, el etileno promueve la transición a floración femenina e incrementa la producción de flores femeninas, mientras que los agentes anti-etileno demoran esta transición y reducen el número de flores femeninas por planta (Martínez y Jamilena, 2021). Sin embargo, en sandía, el etileno tiene un efecto contrario ya que promueve el desarrollo de flores masculinas mientras que, los agentes anti-etileno promueven la feminidad (Manzano *et al.*, 2014).

Se ha visto que hay otras hormonas que participan en la expresión y determinación sexual de cucurbitáceas, pero estas han sido menos estudiadas. El efecto de algunas hormonas feminizantes como las auxinas o brasinosteroides parece estar mediado por etileno. Estudios relacionados han revelado que las auxinas promueven la feminidad induciendo la producción de etileno (Galun, 1959); sin embargo, la inhibición de la síntesis de estas no afecta a la expresión sexual, por lo que esto indica que las auxinas endógenas no tienen un papel determinante. La aplicación de epi-brasinólido en calabacín, melón y *zucchini* produce un aumento de los niveles de producción de flores femeninas, y el efecto parece estar relacionado con la producción y la sensibilidad a etileno (Manzano *et al.*, 2011).

Por el contrario, estudios relacionados con giberelinas han demostrado que presenta efecto masculinizante. Su aplicación exógena en cucurbitáceas aumenta el nivel de masculinidad de plantas monoicas, haciendo que se disminuya el desarrollo de flores femeninas y se aumente el de masculinas en calabacín, melón y sandía (Martínez y Jamilena, 2021).

1.5. El genoma de *Cucurbita pepo* y otras cucurbitáceas

Cucurbita pepo, a pesar de ser una especie con gran importancia agronómica, ha tenido una investigación genómica que ha progresado más lentamente que otras cucurbitáceas.

Lo primero que se hizo fue generar mapas genéticos construidos con marcadores de polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y microsatélites (SSR) (Gong *et al.*, 2008) que luego fueron mejorados con SNPs (Esteras *et al.*, 2012) y varios transcriptomas (Xanthopoulou *et al.*, 2016). Más recientemente, se desarrolló un mapa genético de alta densidad basado en SNPs utilizando una población RIL derivada del cruce entre dos subespecies de *C. pepo* (subespecie *pepo* Zucchini x subespecie *ovífera* Scallop) (Montero-Pau *et al.*, 2017), que fue de gran ayuda para el proceso de ensamblaje de novo del genoma realizado por Montero-Pau *et al.*, (2018).

Montero-Pau *et al.*, (2018) llevaron a cabo el ensamblaje de novo del genoma de *C. pepo*, un transcriptoma de alta cobertura y 40 transcriptomas de **12 especies** del género *Cucurbita*. El mapa genético desarrollado con la población RIL se utilizó para detectar scaffolds quiméricos y anclarlos y ordenarlos en pseudocromosomas. Se ubicaron en el mapa 7.718 SNP, con un promedio de 386 marcadores por grupo de ligamiento. Según la relación de las distancias físicas y genéticas y la presencia del mismo scaffold en más de un grupo de ligamiento, 22 de los 26.005 scaffolds se identificaron como quiméricos. Finalmente, tras la integración de este mapa genético con los mapas genéticos desarrollados por Estera *et al.* (2012) y el mapa genético de Holdsworth *et al.*, (2016), todos los scaffolds se agruparon en 20 pseudocromosomas (Tabla 2). De manera que este ensamblaje constituyó la versión 4.1. del genoma (Montero-Pau *et al.*, 2018).

Tabla 2. Resumen de los grupos de ligamientos y pseudocromosomas del genoma de *C. pepo*. Se muestra el número de scaffolds anclados a cada pseudocromosoma, su longitud total y el número de genes.

Grupos de ligamiento	Número de Scaffolds	Longitud (bp)	Número de genes
Cp4. 1LG01	19	21 320 769	3258
Cp4. 1LG02	16	14 376 414	1981
Cp4. 1LG03	12	13 772 414	2178
Cp4. 1LG04	5	12 709 140	1870
Cp4. 1LG05	8	10 865 678	1753
Cp4. 1LG06	11	10 677 745	1407
Cp4. 1LG07	14	10 147 556	1404

Cp4. 1LG08	4	10 059 303	1503
Cp4. 1LG09	10	9 920 322	1608
Cp4. 1LG10	8	9 835 092	1432
Cp4. 1LG11	11	9 833 969	1319
Cp4. 1LG12	5	9 824 194	1388
Cp4. 1LG13	8	9 354 089	1400
Cp4. 1LG14	5	8 955 933	1263
Cp4. 1LG15	4	8 816 444	1136
Cp4. 1LG16	10	8 691 934	1114
Cp4. 1LG17	9	8 680 504	1281
Cp4. 1LG18	7	8 333 454	1186
Cp4. 1LG19	8	8 246 682	1386
Cp4.1LG20	7	8 120 804	1000

EL 37,8% del genoma de *C. pepo* estaba formado por elementos repetidos. Posteriormente, haciendo genómica comparada observaron que en *C. pepo* el número de familias de genes con dos o más parálogos era mayor que en las demás especies de cucurbitáceas. La mayoría de las familias de genes en esta especie también estaban presentes en las otras cucurbitáceas; sin embargo, muchos tenían más de un gen en *C. pepo*. La mayoría de los genes parálogos de calabacín estaban organizados en grades regiones sinténicas que cubrían la mayor parte del genoma. La sintenia con las otras especies de cucurbitáceas, mostró que, a pesar de mostrar algunas regiones conservadas, se había producido un reordenamiento cromosómico extenso. De manera que el elevado número de genes parálogos detectados y su sintenia, sugirió que *C. pepo* podría haber sufrido una duplicación genómica completa que tuvo lugar en el origen del género *Cucurbita* (Montero-Pau *et al.*, 2018). El ensamblaje completo del genoma ha supuesto un recurso clave para el estudio y la mejora de una especie con gran importancia económica como es *C. pepo*.

Sun, H *et al.*, (2017) realizaron la secuenciación, el ensamblaje y la anotación de los genomas de *Cucurbita maxima* y *Cucurbita moschata*. En su estudio identificaron 7.773 pares de genes homólogos en *C. máxima* y 7.742 en *C. moschata*, de manera que estos resultados mostraron que ambos genomas habían experimentado un evento de duplicación del genoma completo (WGD) como el observado en *C. pepo*, pero que no ocurría en otras cucurbitáceas secuenciadas como pepino, melón y sandía.

Además del genoma de las especies de *Cucurbita*, en la familia *Cucurbitaceae* se conocen los genomas de otras especies cultivadas, incluyendo *Citrullus lanatus*, *Cucumis melo* y *Cucumis sativus* (<http://cucurbitgenomics.org/>).

El primer proyecto de genoma completo de la familia de las cucurbitáceas se realizó en pepino, *C. sativus var. sativus L.*, en la línea china 9930 (Huang *et al.*, 2009). Entre los 7 cromosomas de pepino y los 12 cromosomas de melón y 11 de sandía se dispusieron un total de 348 marcadores, concluyendo que se han producido algunos reordenamientos intracromosómicos y probablemente una reorganización antes de la separación del pepino y el melón. Observaron la ausencia de duplicaciones recientes del genoma completo (WGD) y la presencia de eventos antiguos de duplicación. Guo *et al.*, (2013) identificaron siete triplicaciones que se correspondían a 302 relaciones parálogas que cubrían el 29% del genoma, correspondiéndose con el evento de paleohexaploidización ocurrido hace 76-130 millones de años, mucho antes del evento de especiación del genoma de las cucurbitáceas, que ocurrió hace 15-23 millones de años. Mas recientemente, Qing Li *et al.*, (2019) han realizado otra secuenciación completa del genoma de la variedad “Chinese Long” de pepino donde identificaron 82 Mb de secuencias repetidas, representando el 36,43% del genoma. Entre estas secuencias repetidas, vieron que los retrotransposones terminales largos (LTRs) eran los más abundantes.

El genoma de melón fue el segundo en ser secuenciado (García-Mas *et al.*, 2012), utilizando la línea doble haploide DHL92 para la pirosecuenciación 454. El tamaño del genoma ensamblado fue de aproximadamente 375 Mb, lo que representa el 83,3% del genoma del melón. Se han predicho un total de 27.427 regiones codificantes de proteínas. También se examinaron las relaciones sinténicas entre el melón y el pepino, observando un gran nivel de sintenia a mayor resolución entre los genomas de melón y pepino, lo que facilita la detección de pequeñas regiones en los cromosomas.

El proyecto de secuenciación del genoma de sandía se completó en 2013 (Guo, S *et al.*, 2013). El cultivar chino de sandía de élite 97103 ($2n = 2 \times = 22$) y la tecnología Illumina se utilizaron para la secuenciación del genoma. El ensamblaje final de 353,5 Mb, representa el 83,2% del genoma de la sandía. En total, se detectaron 23.440 genes, un número similar al detectado en pepino y melón. Además del análisis de secuenciación

del genoma de la sandía, también se realizó la resecuenciación de 20 accesiones de sandía. Para comprender la estructura del genoma de las cucurbitáceas, se realizó un análisis de la relación sinténica entre sandía, pepino y melón, demostrando que los miembros de la familia de las cucurbitáceas tienen un alto grado de relaciones ortólogas a nivel genómico.

1.6. Estudios de asociación del genoma completo

La mejora genética de los cultivos es esencial para aumentar el rendimiento y alimentar a una población mundial en crecimiento. La identificación y caracterización de genes asociados con caracteres agronómicamente importantes es indispensable para comprender la base genética de la variación fenotípica y la eficiente mejora de los cultivos (Yano, K *et al.*, 2016).

La identificación de genes subyacentes a los loci de rasgos agronómicos cuantitativos (QTLs) se realiza normalmente, haciendo uso de poblaciones de mapeo biparental como líneas puras recombinantes (RILs) o F₂, pero esta metodología presenta limitaciones. Un estudio de asociación del genoma completo (GWAS), que analiza las asociaciones entre polimorfismos de nucleótidos y la variación fenotípica utilizando una población diversa, resulta ser una herramienta poderosa para la identificación de genes asociados con caracteres agronómicos en un solo estudio (Yano, K *et al.*, 2016). Por tanto, es una herramienta poderosa para diseccionar las bases genéticas de la variación de caracteres simples y complejos, permitiendo la identificación de marcadores moleculares que están estrechamente ligados a un carácter (Aguado *et al.*, 2020).

En la actualidad contamos con poderosas técnicas de secuenciación y análisis bioinformático para detectar polimorfismos entre un gran número de accesiones de germoplasma, y para asociar esos polimorfismos a caracteres agronómicos concretos utilizando estudios de asociación de genoma completo (GWAS). En algunos casos esos polimorfismos se detectan mediante resecuenciación de genoma completo (WGS), y en otros mediante la secuenciación parcial del genoma utilizando técnicas como el genotipado por secuenciación (GBS).

Guo, S *et al.*, (2013) hicieron uso de 20 accesiones de sandía para la resecuenciación del genoma (WGS). En este estudio identificaron 6.784.860 SNPs candidatos y 965.006 indels en las accesiones resecuenciadas, siendo la precisión de estos un 99,3% y 98%, respectivamente. Posteriormente, estos resultados fueron usados para llevar a cabo GWAS mediante estudios de diversidad genética y estructura de la población realizando neighbor-joining tree y análisis PCA. Estos dieron como resultado una estrecha relación entre la subespecie *vulgaris* y *mucosospermus*.

El genotipado por secuenciación (GBS) se ha desarrollado como un enfoque rápido y robusto para la secuenciación parcial de muestras, lo que permite la identificación de SNPs a lo largo de todo el genoma. La flexibilidad y el bajo coste de esta herramienta ha hecho que sea una excelente metodología para el mejoramiento genético de plantas (Poland y Rife, 2012).

Los dos componentes principales para el genotipado de un gran número de accesiones de germoplasma son encontrar polimorfismos en la secuencia de ADN y analizar todos los marcadores. Esto, clásicamente, se ha llevado a cabo en dos pasos que involucran el descubrimiento de marcadores seguido por el diseño del ensayo y el genotipado. Un punto fuerte de GBS es que el descubrimiento de los marcadores y el genotipado se realizan al mismo tiempo, facilitando la investigación de nuevo germoplasma o nuevas especies. Otro de los puntos clave de GBS es que los datos crudos de secuenciación son dinámicos, de manera que estos se pueden volver a analizar para descubrir más información a medida que mejoran las técnicas bioinformáticas, desarrollando así la información de genomas completos y aumentando la recopilación de datos de secuencias (Poland y Rife, 2012).

Por tanto, el objetivo de la técnica GBS no es solamente descubrir polimorfismos y transferirlos a un ensayo, sino que también su objetivo es descubrir estos polimorfismos y simultáneamente obtener la información genotípica de toda la población de interés. Esto hace que sea una técnica rápida y flexible adecuada para la selección genómica en programas de mejora genética (Poland y Rife, 2012).

Actualmente, el genotipado por secuenciación (GBS) se ha utilizado para estudiar toda la variación genética de *Cucurbita pepo*, incluyendo las tres subespecies (*pepo*, *ovifera* y

fraterna). De esta manera que se han identificado millones de SNPS y el genotipo de miles de accesiones para todos los marcadores identificados (<http://cucurbitgenomics.org/>).

Los marcadores SNPs identificados mediante GBS se han utilizado para hacer estudios de asociación de genoma completo (GWAS) en Cucurbitáceas y en otras especies vegetales. Por ejemplo, Aguado et al. (2020) llevaron a cabo un estudio GWAS para el índice de andromonoecia haciendo uso de un panel de 122 accesiones de sandía. La densidad de SNPs por cromosoma osciló ente 1425,54 y 39,55 SNPs por Mb, con un promedio de un SNP cada 25,3 Kb. Además, realizaron un análisis de componentes principales (PCA) para garantizar que cualquier asociación entre los SNPs y el rasgo no se podía atribuir a la estructura de la población, es decir que no existía ningún tipo de relación entre los genotipos muestreados. Se identificaron así dos SNPs en la posición 30.740.460 y 30.740.501 del cromosoma 3 significativamente asociados con el carácter monoecia/andromonoecia, a 80kb aguas arriba del locus *M/m* del gen *CitACS4*, principal gen causante de la monoecia/andromonoecia en sandía (Manzano *et al.*, 2016). La combinación de este estudio con un estudio BSA-seq (Bulk Segregant Analysis Sequencing) permitió identificar una región genómica en el cromosoma 1 de sandía responsable de la andromonoecia parcial en esta especie (Aguado *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este Trabajo Fin de Máster (TFM) es localizar regiones candidatas en el genoma de *Cucurbita pepo* que puedan estar asociadas con la transición floral femenina.

Para poder abordar dicho objetivo se han establecido objetivos específicos:

1. Fenotipar 414 accesiones de *Cucurbita pepo* del banco de germoplasma del USDA para la transición floral femenina.
2. Llevar a cabo un estudio de asociación del genoma completo con los datos fenotípicos obtenidos y los datos de genotipado por GBS disponibles en Cucurbit Genomics Database (CuGenDB): <http://cucurbitgenomics.org/>.
3. Identificar regiones genómicas y genes candidatos responsables de la transición floral femenina en *C. pepo*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Se han evaluado fenotípicamente un total de 414 accesiones procedentes de distintas regiones del mundo (Tabla suplementaria 1) y cedidas por el banco de germoplasma del Departamento de Agricultura de EEUU (National Plant Germoplasm System, NGPS). Geográficamente, se han establecido 8 regiones mundiales según la procedencia de las accesiones:

- 21 procedentes de África
- 8 procedentes de América Centro y Sur
- 81 procedentes de América Norte
- 120 procedentes de Europa y Rusia
- 10 procedentes de India y Sudasia
- 1 procedente de Oceanía
- 7 procedentes de Oriente Lejano
- 166 procedentes de Oriente Medio

Estas accesiones se han seleccionado porque habían sido genotipadas por GBS (*Genotyping by Sequencing*) dentro del proyecto CucCAP (Cucurbit Coordinated Agricultural Project), y los datos de secuenciación han sido utilizados en este TFM para estudiar variantes y genes asociados con el carácter de interés. Todos estos datos genómicos obtenidos por GBS se encuentran disponibles en CuGenDB (<http://cucurbitgenomics.org/>), y su utilización ha sido autorizada al grupo de investigación Genética de hortícolas de la UAL para este y otros proyectos.

3.2. Manejo del cultivo

Para el fenotipado, las 414 accesiones de *Cucurbita pepo* se crecieron en un invernadero con una superficie de 4.500m² y en un marco de plantación de 0,8 plantas/m² (Figura 5).

Se sembraron 64 semillas por cada accesión en las instalaciones de la empresa Enza Zaden, localizada en Santa María del Águila, en el Término Municipal de El Ejido, Almería.

Las plantas se crecieron en las mismas condiciones ambientales y de manejo durante todo el periodo de cultivo.



Figura 5. Invernadero en el que se llevó a cabo la toma de datos durante el periodo de cultivo situado en Santa María del Águila.

3.3. Evaluación de la expresión sexual de *Cucurbita*

Junto con otros caracteres de interés agronómico, las diferentes accesiones de *C. pepo* se fenotiparon para la expresión sexual, y en para este proyecto fin de máster nos hemos centrado en la evaluación de la precocidad de la floración femenina o transición floral femenina, un carácter relacionado con la precocidad de la producción. Para ello, en un mínimo de plantas por accesión se ha evaluado el nudo en el que aparece la primera flor femenina. Dependiendo del nudo medio en que aparece la primera flor femenina, las accesiones se han clasificado en tres clases fenotípicas: temprana, intermedia y tardía (Figura 6).

- Floración femenina temprana. Presencia de la primera flor femenina en los **cuatro** primeros nudos.
- Floración femenina intermedia. Presencia de la primera flor femenina entre el **quinto** y décimo nudo.

- Floración femenina tardía. Presencia de la primera flor femenina a partir del **décimo** nudo.

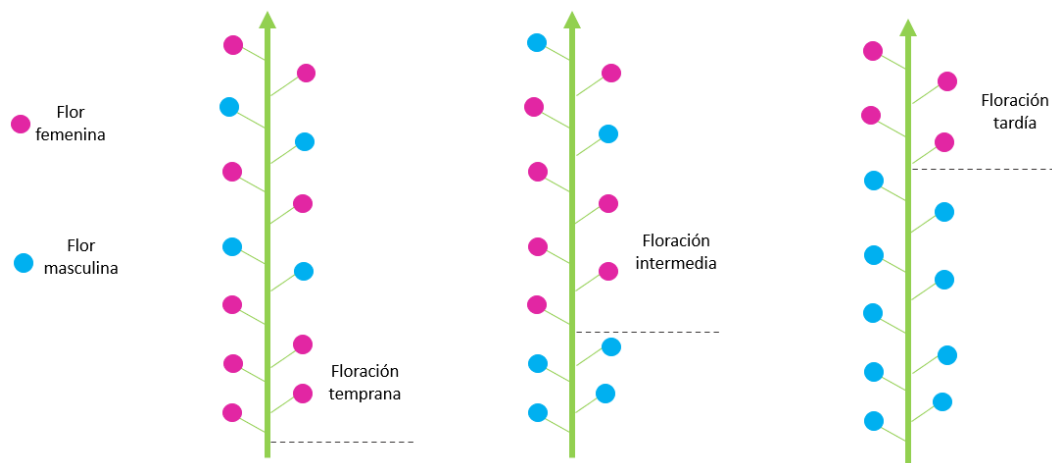


Figura 6. Representación gráfica de plantas con floración femenina temprana, intermedia y tardía.

3.4. Análisis estadístico de los datos de expresión sexual

Para determinar si había diferencias significativas entre accesiones con diferentes alelos para los SNPs significativos identificados por GWAS, se hizo un análisis de varianza ANOVA (p -valor $<0,05$). En caso de existir diferencias entre las medias, se procedió a una comparación de grupos mediante un test de mínimas diferencias de Fisher (LSD). En ausencia de normalidad se empleó un método no paramétrico para estudiar las diferencias, la prueba de Kruskal-Wallis. El programa estadístico empleado fue StatGraphics Centurium XVI.

3.5. Análisis de asociación del genoma (GWAS)

El genotipado masivo de las accesiones de *Cucurbita pepo* se recuperó de Cucurbit Genomics Database (<http://cucurbitgenomics.org>). Se utilizaron los datos de genotipado de las 414 accesiones fenotipadas, y para llevar a cabo GWAS usando solo los SNPs bialélicos. Para llevar a cabo el análisis se utilizó el software estadístico TASSEL 5, que permite realizar dicho análisis mediante un modelo lineal general (GLM) y mediante un modelo lineal mixto (MLM). Los modelos GLM, que considera la estructura de la población (matriz Q) y, MLM, que considera tanto la estructura de la población (matriz Q) como el parentesco (matriz K), se utilizaron para el estudio de asociación de genoma completo. Ambos modelos estiman el p -valor de cada SNP individual en el análisis y lo compara con el p -valor esperado. De manera que la elección del modelo a

utilizar dependió de los p- valores observados y esperados que se representa en un gráfico Q-Q (cuanti-cuantil). En el modelo GLM con matriz Q, se realizaron 1.000 permutaciones para encontrar los SNPs significativos asociados con la transición floral femenina. Los umbrales de significación del análisis GWA se determinaron aplicando la corrección de Bonferroni (α/N), siendo α el nivel de significación y N el número de test independientes que se corresponde con el número de SNPs que se analizan.

En este TFM, teniendo en cuenta el ajuste de los gráficos Q-Q se han seleccionado el p-valor sin ajustar del modelo GLM y MLM. Posteriormente, los datos proporcionados en TASSEL 5 se exportaron en formato de tabla tabulada al software R para representar los límites de significación. Este software cuenta con paquetes de análisis para GWAS. En este trabajo se ha utilizado el paquete “qqman” ya que permite la representación del resultado del análisis en un gráfico Manhattan, con los límites de significación calculados de acuerdo con la corrección de bonferroni. Este gráfico representan en el eje X la posición de cada SNP en cada uno de los cromosomas y en el eje Y el nivel de asociación que tiene cada SNP al carácter.

3.6. Búsqueda de posibles genes candidatos

Una vez identificados los SNPs significativamente asociados con el carácter, se hizo un estudio de las regiones adyacentes a dichos SNPs para encontrar genes candidatos del carácter de interés. En primer lugar, haciendo uso del archivo vcf se buscó la posición de los diferentes SNPs. Posteriormente, en CuGenDB, mediante su herramienta “Genome Browser” se localizó la posición y se mapearon 150.000 pb aguas arriba y abajo de la posición de los SNP. Por último, con la anotación proporcionada en CuGenDB y su posterior exportación a UniProt, se obtuvo la posible función biológica de cada uno de los genes.

4. RESULTADOS

4.1. Variación genética del panel de accesiones de *Cucurbita pepo* basada en genotipado por secuenciación GBS

Los datos genómicos utilizados en este TFM fueron obtenidos por GBS, y se han extraído de la base de datos Cucurbit Genomics Database (<http://cucurbitgenomics.org/>). Inicialmente se realizó un fenotipado de más de 800 accesiones de *Cucurbita pepo*, pero finalmente se filtraron y seleccionaron aquellas que presentaban más de cuatro o más plantas por accesión, resultando ser 414 accesiones. Entre estas accesiones se han identificado un total de 47.544 SNPs bialélicos que son los que se han utilizado finalmente para los análisis bioinformáticos posteriores. El genoma de *C. pepo* está formado por 20 cromosomas de manera que estimamos una distribución de aproximadamente 2.000 SNPs por cromosoma, excepto los cromosomas 0 y 1 que mostraron 5.656 y 4.155 SNPs, respectivamente. Estos SNP bialélicos nos han permitido realizar los análisis de componentes principales (PCA) y de Asociación de Genoma Completo (GWAS) que describimos a continuación.

Dado que el objetivo principal del trabajo era estudiar la asociación entre la transición floral femenina y las variantes genéticas a lo largo de todo el genoma de la especie, inicialmente analizamos si la variabilidad genética del panel podía estar relacionada con el origen geográfico de las accesiones bajo estudio. Para ello hemos realizado un análisis de componentes principales (PCA) usando todos los datos de marcadores moleculares tipo SNP en el genoma de las distintas accesiones, y un gráfico de dos dimensiones usando el componente principal 1 y el componente principal 2 (Figura 7) donde se muestra la variabilidad que aporta cada una de las muestras a un conjunto de datos.

Según su distribución geográfica (país de origen) las accesiones estudiadas se clasificaron en 8 grupos: 21 de África, 8 de América Centro y Sur, 81 de América Norte, 120 de Europa y Rusia, 10 de India y Sudeste, 1 de Oceanía, 7 de Oriente Lejano y 166 de Oriente Medio. El análisis reveló que en general las accesiones de América del Norte, Europa y Rusia, y Oriente Medio mostraban mucha variabilidad genética, ya que las accesiones evaluadas están muy separadas en ambos ejes. Por el contrario, entre las muestras analizadas procedentes de África se observó una menor variabilidad o un

mayor parecido genético entre las accesiones utilizadas. Observándose la misma dispersión en los ejes de las regiones restantes. Estos resultados demuestran que la variabilidad genética del panel no separa las accesiones por su origen geográfico, es decir, la variabilidad genética observada entre las accesiones del panel de *C. pepo* no puede atribuirse a el origen geográfico de las accesiones (Figura 7).

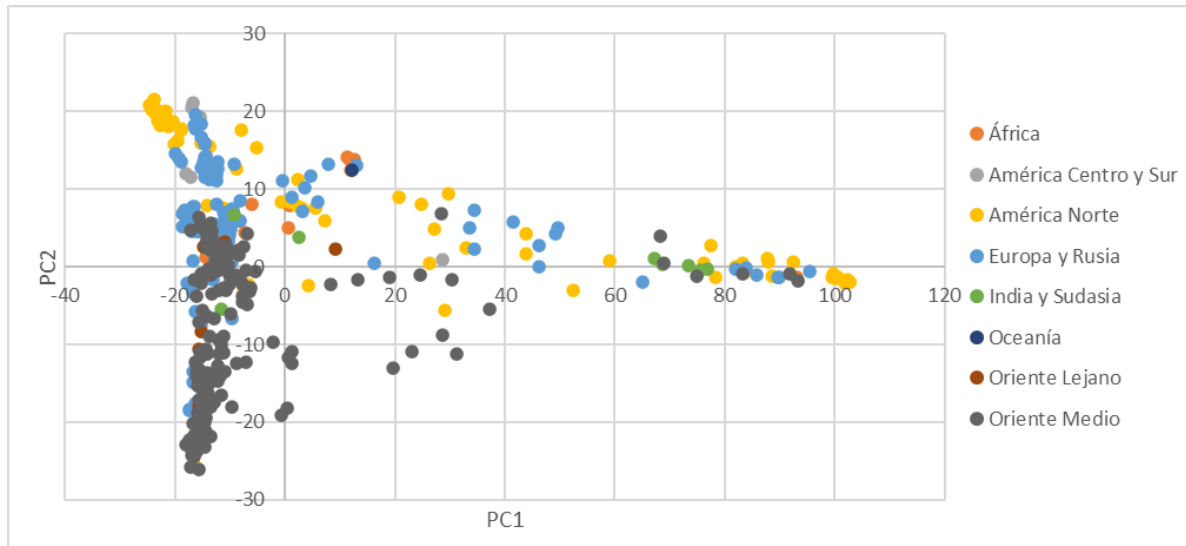


Figura 7. Análisis de componentes principales (PCA) de 414 accesiones de *C. pepo* realizado utilizando los SNPs obtenidos mediante GBS. En el eje horizontal se representa el componente principal 1 (PC1) y en el eje vertical el componente principal 2 (PC2). El gráfico PCA se han coloreado atendiendo al origen geográfico de las diferentes accesiones.

El análisis PCA entre las accesiones también se utilizó para mostrar la relación entre la variabilidad genética y la transición floral femenina de las diferentes variedades. Para ello se establecieron tres niveles de precocidad de la floración femenina: temprana, intermedia y tardía (véase Material y Métodos).

La distribución de los fenotipos de floración femenina en la gráfica PCA se muestra en la Figura 8. Las accesiones con una precocidad intermedia y tardía presentaban una mayor variabilidad, ya que las accesiones evaluadas estaban muy esparcidas a lo largo de la variación genética del gráfico PCA (Figura 8). El número de accesiones con una transición floral temprana fue mucho menor, y por tanto mostraron menor variabilidad genética, aunque algunas de ellas se separan bastante entre sí y se agrupan con diferentes accesiones intermedias y tardías (Figura 8). Estos resultados demuestran que, las clases fenotípicas definidas como temprana, intermedia o tardía no se separan en grupos

genéticos diferentes, sino que cada clase fenotípica se distribuye uniformemente a través de la variación genética, y por tanto independiente de la estructura de la población. Este dato es importante para que el estudio de asociación que pretendemos realizar sea lo más eficaz posible.

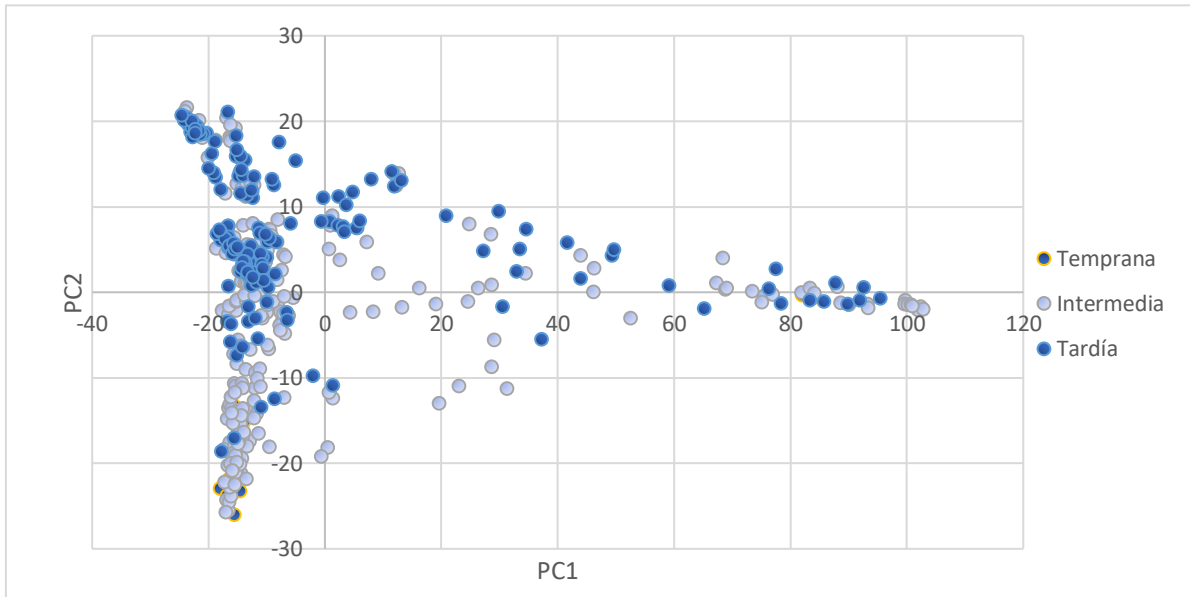


Figura 8. Análisis de componentes principales (PCA) de 414 accesiones de *C. pepo* realizado utilizando los SNPs obtenidos mediante GBS. El gráfico PCA se ha coloreado atendiendo al nivel de precocidad de la floración femenina en las diferentes variedades: temprana, intermedia y tardía.

4.3. Estudio de asociación del genoma completo (GWAS) para la transición floral femenina

Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) han demostrado ser una herramienta poderosa para diseccionar la base genética de la variación tanto para rasgos simples como complejos. El estudio resulta en la identificación de variantes genéticas que están asociadas con una determinada característica fenotípica en las plantas bajo estudio. Usando los datos de secuenciación de *Cucurbita pepo* disponibles tras el genotipado por secuenciación (GBS), así como los datos de fenotipado obtenidos en este trabajo, se llevó a cabo un análisis GWAS para el carácter “tiempo de floración femenina”. Aunque inicialmente fenotipamos más de 800 accesiones de *C. pepo* para el carácter, se filtraron aquellas accesiones que mostraron una alta variación intravarietal para el rasgo en cuestión, así como aquellas en las que el fenotipado del carácter se

realizó en un número menor de cuatro plantas por accesión. Finalmente seleccionamos un panel de 414 accesiones (Tabla suplementaria 1).

El análisis de componentes principales (PCA) indicado anteriormente garantizaba que cualquier posible asociación entre los SNPs y el carácter bajo estudio no se podía atribuir a la estructura de la población utilizada. Para el mapeo de asociación se usó el Modelo Lineal General (GLM) y el Modelo Lineal Mixto (MLM). El primero de ellos incluye una corrección para la estructura de la población como variable (GLM + Q), mientras que el segundo incorpora también una corrección para el parentesco (MLM + Q + K). Usando el panel de 414 accesiones y ambos modelos estadísticos, se identificaron varias regiones genómicas significativamente asociadas con la transición floral femenina (Figura 9). En el modelo estadístico GLM se identificaron varias regiones genómicas representadas por un SNP en el cromosoma 2 (pos: 1.495.089), uno en el cromosoma 6 (pos: 4.880.074), uno en el cromosoma 7 (pos: 9.778.200) y 8 SNPs cercanos en el cromosoma 10 (pos: 666.768; 666.810; 753.000; 755.704; 758.600; 768.265; 775.529; 843.138) que se asociaron significativamente con el carácter con ($p < 0,01$). En esas mismas regiones genómicas otros SNPs cercanos mostraron una menor significación estadística ($p < 0,05$), pero también indicaban la implicación de esa región en el control del carácter bajo estudio. Sin embargo, en el análisis estadístico MLM solo se identificó un SNP significativo en la posición 2.268.954 del cromosoma 0 ($p < 0,05$) (Figura 9).

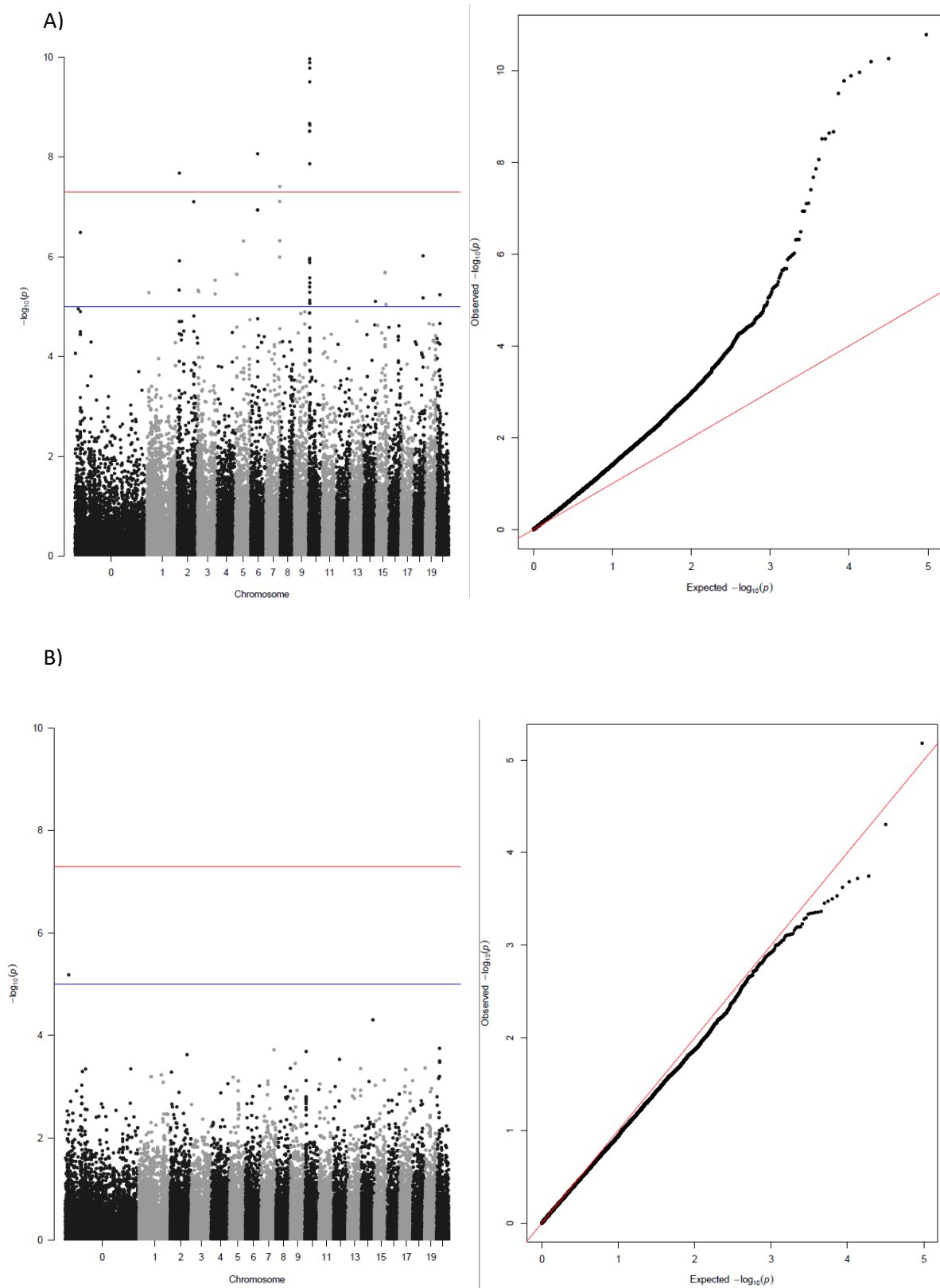


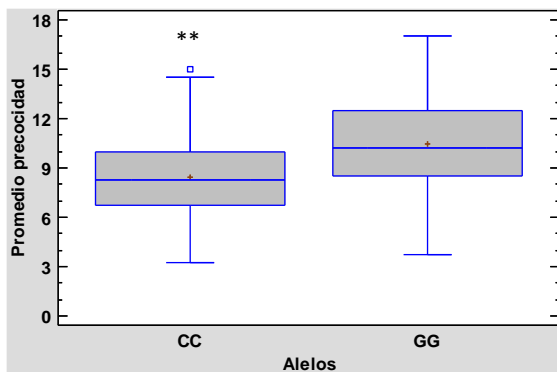
Figura 9. Mapeado de la transición floral femenina en *C. pepo* mediante un análisis de asociación de genoma completo (GWAS). Gráficos Manhattan y QQ plots de GWAS para la precocidad en la transición floral femenina. A) Modelo Lineal General (GLM + Q). B) Modelo Lineal Mixto (MLM + K + Q). La línea roja y azul horizontales indican umbrales de significación de $p=0,05$ y $p=0,01$, respectivamente usando la corrección de Bonferroni.

Para ver el efecto de los alelos de cada SNP significativo se realizó un análisis de varianza ANOVA (p-valor <0,05) para ver si había diferencias significativas en el nivel de precocidad dependiendo del alelo que portara cada accesión en la posición concreta del SNP. En la tabla 3 se muestra la posición de cada uno de los SNPs junto con los posibles alelos y en la figura 10 están representados los gráficos de cajas y bigotes para cada uno de los cromosomas en los que había un SNP significativo.

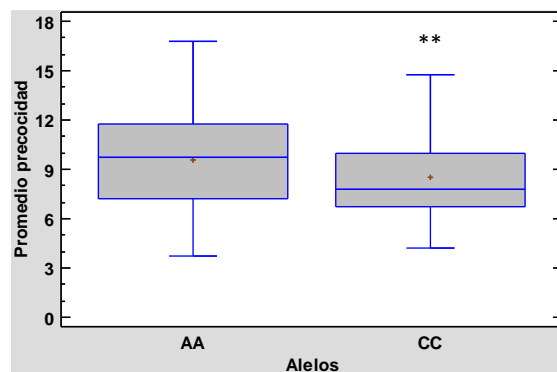
Tabla 3. Alelos para cada uno de los SNPs significativos detectados en las regiones genómicas de *C.pepo* mediante GWAS.

CROMOSOMA	POSICIÓN	REFERENCIA	ALTERNATIVO
Cromosoma 2	1.495.089	G	C
Cromosoma 6	4.880.074	A	C
Cromosoma 7	9.778.200	T	C
Cromosoma 10	753.000	T	C
Cromosoma 0	2.268.954	G	C

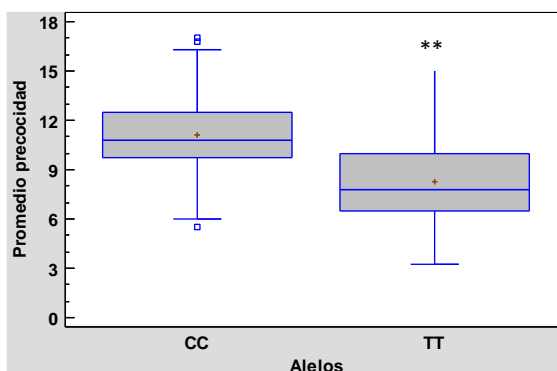
Cromosoma 2 (p-valor = 0)



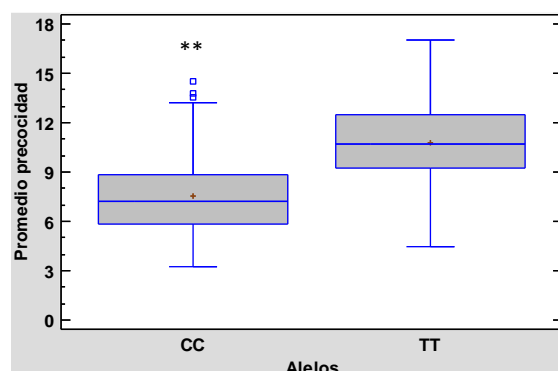
Cromosoma 6 (p-valor = 0,0015)



Cromosoma 7 (p-valor = 0)



Cromosoma 10 (p-valor = 0)



Cromosoma 0 (p-valor = 0,004)

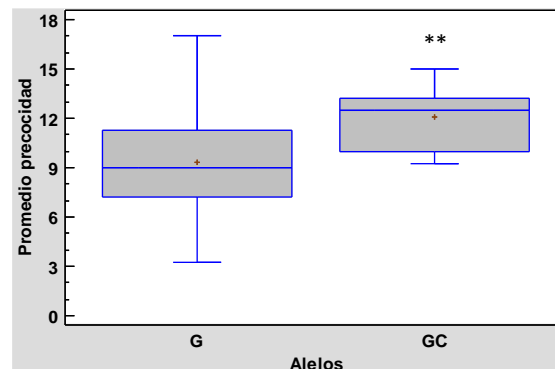
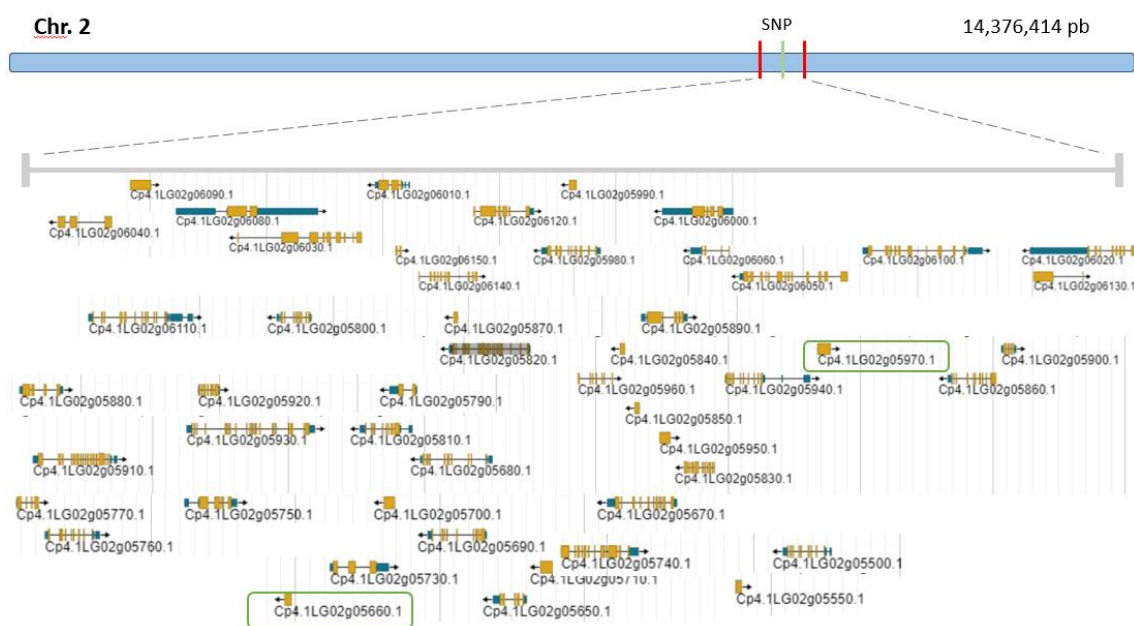


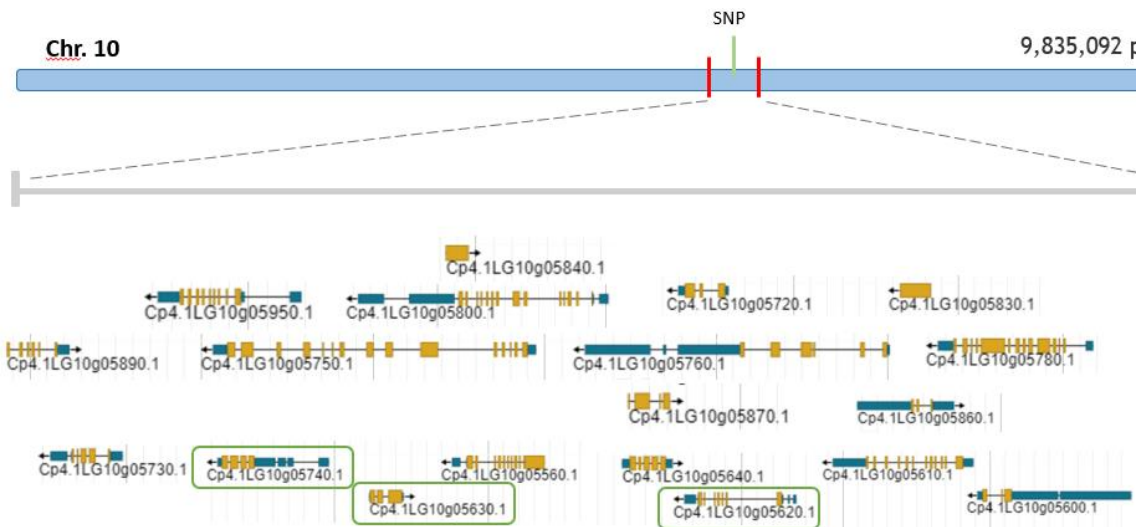
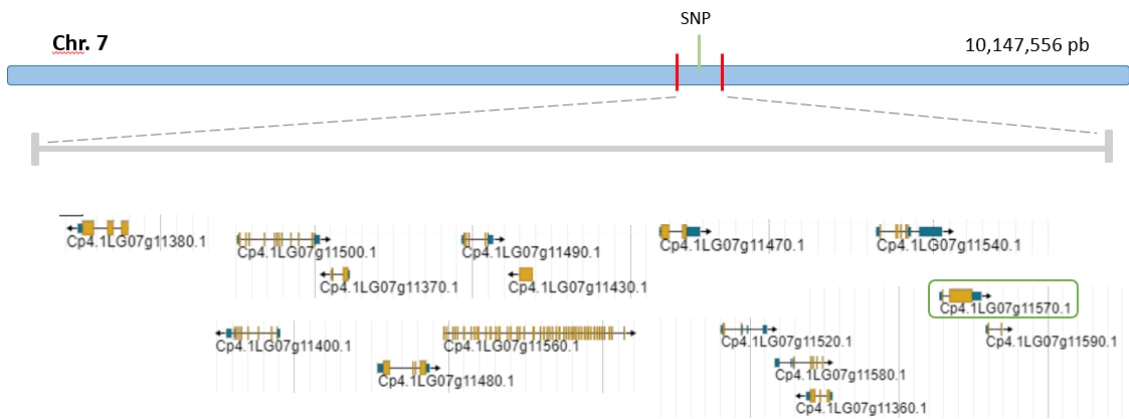
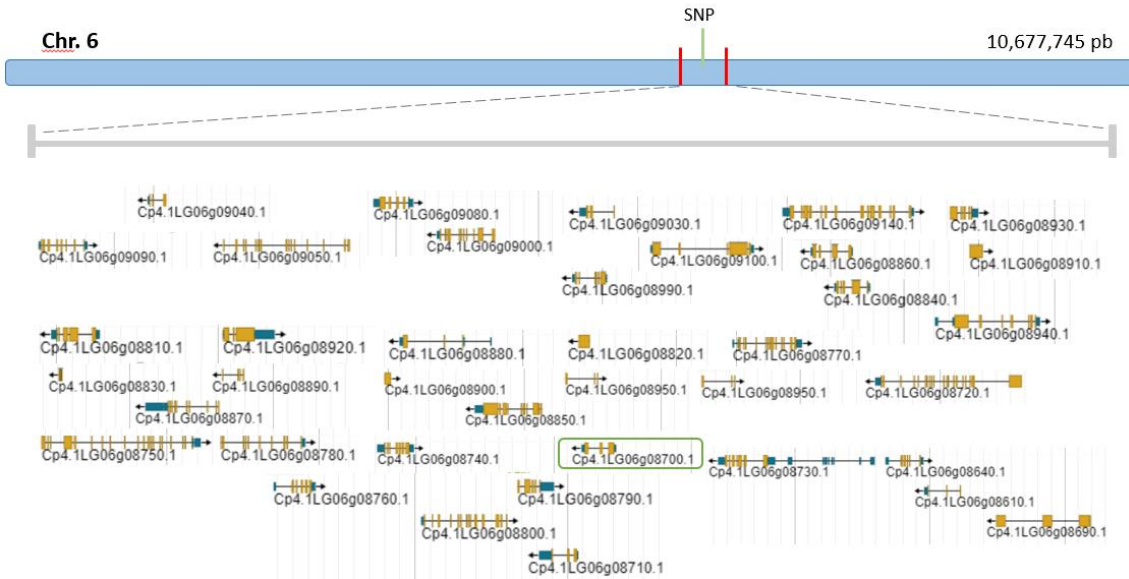
Figura 10. Gráficos de cajas y bigotes para el efecto de los alelos de los 5 SNPs significativos sobre la transición floral femenina de las diferentes accesiones bajo estudio. ** indica diferencias significativas entre los genotipos con distintos alelos a un p-valor < 0,01.

Por ejemplo, en el cromosoma 2 se observa que las accesiones con genotipo GG tienen una transición floral femenina significativamente más tardía, ya que la primera flor femenina aparece en un nudo superior que si las accesiones son de genotipo CC (Figura 14). De la misma manera, en el SNP del cromosoma 6, se encontró que la presencia del alelo A en homocigosis (accesiones AA) retrasaba significativamente la transición floral femenina, mientras que el alelo C aceleraba la aparición de la primera flor femenina (Figura 10). En el cromosoma 0 solo identificamos accesiones homocigotas para uno de los alelos o accesiones polimórficas. En este caso, el alelo G (accesiones GG) acelera la transición floral femenina mientras que en las accesiones con los dos alelos (accesiones GC) se retrasa significativamente la transición floral respecto de las primeras (Figura 10).

4.5. Análisis de las regiones adyacentes a los SNPs significativamente asociados con la transición floral femenina

Las regiones adyacentes a los SNPs significativos identificados mediante GWAS se han rastreado en busca de posibles genes candidatos responsables del carácter. Para ello se estudió la región de 150.000 pb aguas arriba y aguas debajo de la posición del SNP significativamente asociado con el carácter de interés. En la Figura 11 se muestran los cromosomas (Chr) en los que se han obtenido SNPs significativos junto con los genes que rodean dicha región.





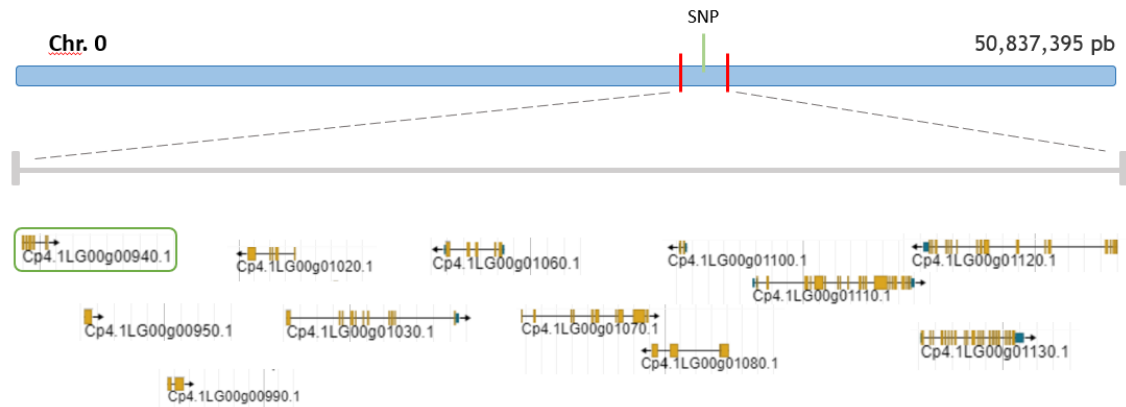


Figura 11. Genes en las 5 regiones genómicas significativamente asociadas con el control de la transición floral femenina en *C. pepo*. En ellas aparece el tamaño de dicho cromosoma junto con los genes adyacentes al SNP. Rodeados en verde se encuentran los genes identificados como posibles candidatos del control de la transición floral femenina.

Una vez identificados los genes que rodean a los SNPs, se realizó un estudio en la base de datos de Cucurbit Genomics y en UniProt para conocer la función biológica de cada uno de ellos (Tabla 4).

Tabla 4. Genes en las posiciones adyacentes a los SNPs significativos. Aparece el nombre del gen, posición, anotación y función.

	GEN	ANOTACIÓN	FUNCIÓN BIOLÓGICA
Cromosoma 2	Cp4.1LG02g06090.1	AT5g56980/MHM17_10	Desconocida
	Cp4.1LG02g06080.1	NAD-dependent epimerase/dehydratase	Biosíntesis de xilosa, una aldosa que forma parte de la hemicelulosa de la pared celular
	Cp4.1LG02g06030.1	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH protein	Implicación en diversos procesos catabólicos y de desarrollo.
	Cp4.1LG02g06010.1	Zinc finger protein MAGPIE	Factor de transcripción implicado en la señalización de giberelinas y en la división celular asimétrica
	Cp4.1LG02g06120.1	Beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1	Metabolismo de carbohidratos
	Cp4.1LG02g05990.1	Glutaredoxin-like protein, putative	Posible función en la señalización de ácido jasmónico y ácido salicílico
	Cp4.1LG02g06000.1	Protein IQ-DOMAIN 1	Posible implicación en la unión a calmodulina o proteínas similares
	Cp4.1LG02g06150.1	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase	Biosíntesis de citoquininas y regulación del desarrollo del meristemo
	Cp4.1LG02g06140.1	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase	
	Cp4.1LG02g05980.1	Protein of unknown function (DUF803)	Transportador de Magnesio
	Cp4.1LG02g06060.1	Unknown protein	Desconocida
	Cp4.1LG02g06050.1	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8	Crecimiento del tubo polínico
	Cp4.1LG02g06100.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Regulación de la división, adhesión y elongación celular a lo largo del desarrollo y embriogénesis

Cp4.1LG02g06020.1	Plant/M4122-120 protein, putative	Desconocida
Cp4.1LG02g06130.1	Harbinger transposase-derived nuclease	Desconocida
Cp4.1LG02g06110.1	Protein kinase	Actividad quinasa
Cp4.1LG02g05820.1	Aminopeptidase	Actividad aminopeptidasa
Cp4.1LG02g05800.1	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	Desconocida
Cp4.1LG02g05840.1	17.6 kDa class II heat shock protein	Chaperona
Cp4.1LG02g05960.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Desconocida
Cp4.1LG02g05850.1	17.6 kDa class II heat shock protein	Chaperona
Cp4.1LG02g05950.1	Mitochondrial carrier protein	Cotransporte de ATP con cationes divalentes metálicos a través de la membrana interna mitocondrial
Cp4.1LG02g05830.1	RWP-RK domain protein	Regulación de la división celular
Cp4.1LG02g05870.1	Unknown protein	Desconocida
Cp4.1LG02g05940.1	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase family protein	Metabolismo de malato
Cp4.1LG02g05970.1	Protein BIG GRAIN 1-like B	Transporte de auxinas. Señalización auxinas. Implicado en el gravitropismo, crecimiento vegetal y desarrollo de la semilla.
Cp4.1LG02g05890.1	Mechanosensitive ion channel family protein	Desconocida
Cp4.1LG02g05860.1	Peroxisome biogenesis factor 10	Implicado en la formación de peroxisomas y cuerpos lipídicos
Cp4.1LG02g05900.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	Facilita el plegado de proteínas sintetizadas <i>de novo</i>
Cp4.1LG02g05880.1	Cytokinin oxidase/dehydrogenase-like protein	Actividad oxidorreductasa
Cp4.1LG02g05910.1	F-box/LRR-repeat protein 15	Ubiquitinación de proteínas.
Cp4.1LG02g05920.1	Protein of Unknown Function (DUF239)	Desconocida
Cp4.1LG02g05930.1	Receptor-like kinase ERECTA	Regula la arquitectura aérea de la planta, incluida la arquitectura de la inflorescencia, así como el patrón estomático. Tolerancia a patógenos
Cp4.1LG02g05790.1	Damaged dna-binding 2, putative isoform 2	Ubiquitinación de proteínas
Cp4.1LG02g05810.1	Chalcone-flavanone isomerase family protein isoform 1	Biosíntesis de flavonoides
Cp4.1LG02g05680.1	Guanine nucleotide-binding protein alpha-1 subunit	Señal de transducción requerida para el crecimiento y desarrollo de nudos, hojas y semillas
Cp4.1LG02g05770.1	Kinase family protein	Actividad quinasa
Cp4.1LG02g05760.1	G-protein-coupled receptor 1	Desconocida
Cp4.1LG02g05750.1	Smr (Small MutS-related) domain protein	Desconocida
Cp4.1LG02g05730.1	3-ketoacyl-CoA synthase	Síntesis de ácidos grasos de cadena larga (22-26 carbonos)
Cp4.1LG02g05660.1	Ethylene-responsive transcription factor ERF017	Señalización de etileno
Cp4.1LG02g05700.1	Unknown protein	Desconocida
Cp4.1LG02g05690.1	DUF1350 family protein	Desconocida
Cp4.1LG02g05710.1	F-box only protein 13	Ubiquitinación de proteínas. Componente del complejo E3-ubiquitina ligasa

Cromosoma 6	Cp4.1LG02g05650.1	E3 ubiquitin-protein ligase AIP2	Ubiquitinación de proteínas. Regulador negativo de la señalización de ácido abscísico
	Cp4.1LG02g05740.1	Histidine kinase 5	Transmisión de una señal de estrés a través de la cascada MAPK. Señalización de ABA, etileno, peróxido de hidrogeno o citoquininas
	Cp4.1LG02g05550.1	Glutamine dumper, putative	Exportación de aminoácidos
	Cp4.1LG02g05500.1	Phosphatase 2C family protein	Transducción de señales. Señalización de ABA
	Cp4.1LG06g09090.1	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	Transferencia de electrones a la cadena respiratoria
	Cp4.1LG06g09040.1	Unknown protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g09050.1	AP-5 complex subunit zeta-like protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g09080.1	Glucose-6-phosphate/phosphate-translocator family protein	Transportador de fosfato inorgánico
	Cp4.1LG06g09000.1	Smad nuclear-interacting protein 1	Desconocida
	Cp4.1LG06g08990.1	Septum-promoting GTP-binding 1	Desconocida
	Cp4.1LG06g09030.1	Unknown protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g09140.1	Inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 4 isoform 1	Desconocida
	Cp4.1LG06g09100.1	Microtubule-associated TORTIFOLIA1-like protein	Regula la orientación de los microtúbulos y la dirección del crecimiento de los órganos
	Cp4.1LG06g08930.1	CRS2-associated factor 1	Splicing de intrones
	Cp4.1LG06g08860.1	Cytochrome P450	Desconocida
	Cp4.1LG06g08910.1	DTW domain protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g08840.1	Purple acid phosphatase	Actividad fosfatasa
	Cp4.1LG06g08940.1	Heat shock 70 kDa protein	Plegamiento de proteínas sintetizadas de novo
	Cp4.1LG06g08810.1	Rho GTPase-activating 32	Desconocida
	Cp4.1LG06g08920.1	F11F12.2 protein, putative	Desconocida
	Cp4.1LG06g08830.1	DUF4228 domain protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g08890.1	RING/U-box superfamily protein, putative isoform 1	Sumoilación de proteínas. Regulación del desarrollo del meristemo, división celular, reparación del ADN
	Cp4.1LG06g08870.1	Ubiquitin thioesterase OTU1-like protein	Desubiquitinación de proteínas
	Cp4.1LG06g08880.1	Translation factor SUI1	Homeostasis iónica
	Cp4.1LG06g08820.1	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	Biosíntesis de isoprenoides: carotenoides, giberelinas, etc.
	Cp4.1LG06g08900.1	Protein of unknown function, DUF584	Desconocida
	Cp4.1LG06g08950.1	Unknown protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g08850.1	Bromodomain-containing protein, putative	Reconocimiento de regiones de cromatina con histonas acetiladas. Regulan muchos procesos de desarrollo.
	Cp4.1LG06g08770.1	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	Catabolismo de la L-lisina
	Cp4.1LG06g08950.1	Unknown protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g08720.1	Imidazole glycerol phosphate synthase	Biosíntesis de L-histidina
	Cp4.1LG06g08750.1	1,4-alpha-glucan branching enzyme, putative	Metabolismo de carbohidratos
	Cp4.1LG06g08780.1	Cell differentiation, Rcd1-like protein	Regulación negativa de la traducción
	Cp4.1LG06g08740.1	GDP-L-galactose phosphorylase	Biosíntesis de ácido ascórbico. Respuesta a estreses bióticos y abióticos

	Cp4.1LG06g08700.1	Indole-3-acetate O-methyltransferase 1	Cataliza la metilación de Ácido Indolacético. Homeostasis de auxinas
	Cp4.1LG06g08760.1	prohibitin 2	Estabilización proteínas mitocondriales
	Cp4.1LG06g08790.1	GrpE protein homolog	Intercambio de ATP
	Cp4.1LG06g08800.1	Transcriptional adapter ADA2	Señalización de auxinas y citoquininas en el control de la proliferación celular
	Cp4.1LG06g08710.1	BnaA03g45290D protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g08730.1	Lipid-binding serum glycoprotein family protein	Desconocida
	Cp4.1LG06g08640.1	Syntaxin-51	Transporte intracelular de proteínas
	Cp4.1LG06g08610.1	ATPase, V0 complex, subunit E	Defensa contra bacterias
	Cp4.1LG06g08690.1	MBOAT (Membrane bound O-acyl transferase) family protein, putative	Biosíntesis y modificación de lípidos membrana
Cromosoma 7	Cp4.1LG07g11380.1	Kinase family protein	Actividad quinasa
	Cp4.1LG07g11500.1	NADH-cytochrome b5 reductase	Cadena de transporte de electrones
	Cp4.1LG07g11490.1	NHP2-like protein 1	Procesamiento del ARNm
	Cp4.1LG07g11370.1	Dynein light chain-like protein	Procesos relacionados con los microtúbulos
	Cp4.1LG07g11430.1	Nucleotide-sugar transporter family protein	Transporte de azúcares
	Cp4.1LG07g11400.1	Signal peptidase I	Maduración de plastidios
	Cp4.1LG07g11560.1	Nuclear pore complex Nup205-like protein	Señalización ácido salicílico
	Cp4.1LG07g11480.1	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	Actividad glucosaminil transferasa
	Cp4.1LG07g11470.1	FkbM family methyltransferase	Actividad metil-transferasa
	Cp4.1LG07g11540.1	DUF4050 family protein	Desconocida
	Cp4.1LG07g11570.1	EIN3-binding F-box 1-like protein	Ubiquitinación de EIN3 y EIN3-LIKE (EIL), los principales factores de transcripción que regulan positivamente la respuesta a etileno
	Cp4.1LG07g11520.1	Unknown protein	Desconocida
	Cp4.1LG07g11590.1	Unknown protein	Desconocida
	Cp4.1LG07g11580.1	Unknown protein	Desconocida
Cp4.1LG07g11360.1	SPX domain-containing family protein	Respuesta a hipoxia	
Cromosoma 10	Cp4.1LG10g05950.1	IMP dehydrogenase/GMP reductase	Biosíntesis de GMP y purinas
	Cp4.1LG10g05800.1	O-acetyltransferase family protein	Actividad acetil-transferasa
	Cp4.1LG10g05840.1	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	Respuesta a la luz. Fotosíntesis
	Cp4.1LG10g05720.1	WRKY protein	Factor de transcripción implicado en multitud de procesos
	Cp4.1LG10g05830.1	Outward rectifying potassium channel protein	Homeostasis celular de potasio
	Cp4.1LG10g05890.1	4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehydratase	Señalización de ABA y estrés salino
	Cp4.1LG10g05750.1	Kinase-related protein of unknown function (DUF1296)	Desconocida
	Cp4.1LG10g05760.1	CTD small phosphatase-like protein 2	Actividad fosfatasa
	Cp4.1LG10g05870.1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	Degradación de calosa en el plasmodesmo. Comunicación celular y organización de la pared celular
	Cp4.1LG10g05780.1	Protein MEI2-like 2	Proteína de unión al ADN con posible función en la división meiótica y el desarrollo vegetativo
	Cp4.1LG10g05860.1	AWPM-19-like membrane family protein	Desconocida
	Cp4.1LG10g05730.1	At1g29530	Desconocida

	Cp4.1LG10g05740.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Catabolismo de auxinas
	Cp4.1LG10g05630.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
	Cp4.1LG10g05560.1	Bromodomain-containing protein, putative	Posible regulación de la respuesta a estreses abióticos
	Cp4.1LG10g05640.1	GDSL-lipase protein	Lipasa actividad. Posible implicación en la organización del retículo endoplasmático, resistencia a patógenos, respuesta a etileno y ácido salicílico
	Cp4.1LG10g05620.1	Agamous MADS-box transcription factor	Los genes AGAMOUS regulan muchos procesos de desarrollo, incluyendo la regulación de la transición floral, mantenimiento de la identidad del meristemo floral, la identidad de los órganos florales sexuales, y el desarrollo del fruto
	Cp4.1LG10g05610.1	Protein kinase, putative	Actividad quinasa
	Cp4.1LG10g05600.1	RNA ligase/cyclic nucleotide phosphodiesterase family protein	Metabolismo de nucleótidos cíclicos como AMPc y GMPc
Cromosoma 0	Cp4.1LG00g00940.1	WAT1-related protein	Transporte de auxinas
	Cp4.1LG00g00950.1	RING-H2 finger protein ATL79, putative	Ubiquitinación de proteínas
	Cp4.1LG00g00990.1	Receptor protein kinase, putative	Desarrollo embrionario a final de la dormición de semillas
	Cp4.1LG00g01020.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: proline-rich family protein	Desconocida
	Cp4.1LG00g01030.1	8-amino-7-oxononanoate synthase	Formación de 8-amino-7-oxononanoato
	Cp4.1LG00g01060.1	Quinone oxidoreductase	Transporte de electrones
	Cp4.1LG00g01070.1	Kinase family protein	Actividad quinasa
	Cp4.1LG00g01080.1	Protein kinase family protein	Actividad quinasa
	Cp4.1LG00g01100.1	Peptidylprolyl isomerase	Aceleración plegamiento proteínas
	Cp4.1LG00g01110.1	Cell division cycle and apoptosis regulator 1	Desconocido
	Cp4.1LG00g01120.1	Anaphase-promoting complex subunit 2	Ciclo celular
	Cp4.1LG00g01130.1	5'-3' exoribonuclease 3	Procesamiento ARNm

La anotación y función de los genes adyacentes a los SNPs significativos identificados por GWAS nos ha permitido señalar a varios genes como posibles candidatos del control de la transición floral femenina en *C. pepo*. Estos genes están implicados en la señalización de etileno, en la homeostasis y transporte de auxinas o codifican para factores de transcripción directamente relacionados con la transición floral en otras especies (Tabla 5).

Tabla 5. Posibles genes candidatos regulando la transición floral femenina en *C. pepo*.

Cromosoma	Gen	Función biológica
2	Cp4.1LG02g05660.1	Factor de transcripción de respuesta a etileno
2	Cp4.1LG02g05970.1	Transporte de auxinas
6	Cp4.1LG06g08700.1	Metilación de AIA y en la homeostasis de auxinas
7	Cp4.1LG07g11570.1	Ubiquitinación de los factores de transcripción <i>EIN3/EIL</i> , componentes principales de la señalización de etileno.
10	Cp4.1LG10g05740 y Cp4.1LG10g05630.1	Catabolismo de auxinas
10	Cp4.1LG10g05620.1	Factor de transcripción tipo AGAMOUS, involucrados en muchos procesos de desarrollo, incluyendo la transición floral de <i>Arabidopsis</i> .
0	Cp4.1LG00g00940.1	Transporte de auxinas

5. DISCUSIÓN

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se han convertido en una herramienta alternativa muy útil y poderosa para detectar marcadores asociados, alelos favorables y genes candidatos responsables de la variación de rasgos cuantitativos (Chong, X *et al.*, 2019). En el estudio GWAS que hemos realizado en este trabajo se han identificado varias regiones genómicas candidatas a regular la transición floral femenina en los cromosomas 2, 6, 7, 10 y 0 de *Cucurbita pepo*.

El factor más importante que regula la expresión sexual en las cucurbitáceas es el etileno, pues esta hormona controla la transición a la floración femenina y la proporción de flores femeninas y masculinas por planta (Martínez y Jamilena, 2021). En pepino, melón y calabacín, los tratamientos con etileno promueven la transición floral femenina y aumentan el número de flores femeninas por planta, mientras que los tratamientos con inhibidores de su biosíntesis retrasan la transición floral femenina y reducen el número de flores femeninas por planta (Boualem *et al.*, 2009; Manzano *et al.*, 2011). En los últimos años se han descubierto algunos de los genes implicados en la determinación del sexo de la cucurbitáceas (Martínez y Jamilena, 2021), pero todavía no se ha detectado ningún gen implicado en la transición floral femenina de estas especies. Comparando variedades con floración femenina temprana y tardía Manzano (2013) demostró que la transición floral femenina en *C. pepo* requiere de la inducción de genes implicados de biosíntesis de etileno en el meristemo apical, pero también de la

inhibición de reguladores negativos de la respuesta a etileno tales como los receptores de etileno (ETR) y los genes *CTR* (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE*).

En este estudio hemos identificados dos genes implicados en la señalización de etileno y que podrían explicar la variación en la transición floral femenina en las accesiones de *C. pepo* analizadas. Por un lado, se ha identificado un gen en el cromosoma 7 que codifica para una proteína EIN3-binding F-box 1 (*EBF1*). En *Arabidopsis thaliana* *EBF1* es responsable de la ubiquitinación de *EIN3/EIL1*, factores de transcripción responsables de la respuesta al etileno (Stepanova y Alonso, 2009; An *et al.*, 2010). *EIN3* y *EIL1* son factores de transcripción con vida corta, y se someten a ubiquitinación y degradación proteosomal para inhibir la respuesta al etileno (An *et al.*, 2010). Los factores EIN3/EIL activan transcripcionalmente genes diana de respuesta a etileno, pero también a otros factores de transcripción entre los que se incluyen los factores ERFs (ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS) que finalmente activan los genes diana de respuesta a etileno. Entre los genes candidatos identificados en la región genómica del cromosoma 2 también hemos detectado al gen de señalización de etileno *ERF017*. Desconocemos si este gen puede estar implicado en la transición floral femenina de *C. pepo*, pero se han descubierto otros genes *ERFs* que también parecen estar involucrados en la determinación del sexo de pepino, incluyendo los genes *CsERF110* y *CsERF31* (Tao *et al.*, 2018; Martínez y Jamilena, 2021). Varios genes *EIN3/EIL* también se han encontrado subyacentes a QTLs ligados al tiempo de floración en *C. pepo* (Esteras *et al.*, 2012; Montero-Pau *et al.*, 2017; Xanthopoulou *et al.*, 2019).

Además del etileno, se sabe que hay otras hormonas implicadas en la expresión sexual de *C. pepo*. En este estudio se han identificado 3 genes relacionados con el catabolismo y transporte de auxinas en los cromosomas 2,10 y 0. Se sabe que las auxinas tienen un efecto feminizante en distintas cucurbitáceas al promover la expresión de genes *ACS* y la producción de etileno (Trebitch *et al.*, 1987). No obstante, la inhibición de su síntesis no afecta a la expresión sexual, por lo que esto indica que las auxinas endógenas no tiene un papel muy determinante (Martínez y Jamilena, 2021).

En este trabajo también se ha identificado un gen en el cromosoma 10 perteneciente a la familia *AGAMOUS MADS-box*. Los factores de transcripción que contienen el dominio *MADS* comprenden una gran familia de reguladores que tienen diversas funciones en el

desarrollo de las plantas, incluida la regulación del tiempo de floración y el desarrollo floral. En concreto el gen *AGL24* juega un papel muy importante en la regulación del tiempo de floración. En *Arabidopsis*, Michaels, S.D *et al.*, (2003) observaron que los mutantes de pérdida de función *agl24-1* y *agl24-2* mostraban una floración tardía. Para comprobar que el gen *AGL24* es realmente el responsable de la floración, estos mismos autores transformaron dichos mutantes con una construcción que poseía el gen *AGL24* y observaron que efectivamente, la reintroducción de la actividad de *AGL24* restauraba el fenotipo de floración WT. Además, la sobreexpresión del gen *AGL24* con el promotor 35S en plantas WT, producía un fenotipo de floración temprana, demostrando que el gen *AGL24* es realmente responsable de la transición floral de *Arabidopsis*. Experimentos similares podrían indicar si el gen *Cp4.1LG10g05620.1* de *C. pepo* puede ser el responsable de la transición floral femenina en esta especie monoica

6. CONCLUSIONES

PRIMERA. - El análisis de componentes principales (PCA) reveló que la variabilidad genética observada entre las accesiones de *C. pepo* no se puede atribuir a el origen geográfico de las mismas.

SEGUNDA. -El análisis de componentes principales (PCA) demostró que las clases fenotípicas de floración femenina temprana, tardía e intermedia no se separan en grupos genéticos diferentes sino que se distribuyen de forma uniforme a través de la variación genética, independientemente de la estructura de la población.

TERCERA. - El análisis de estudio de asociación de genoma completo (GWAS) ha permitido identificar 5 regiones genómicas candidatas para el control de la transición floral femenina en los cromosomas 2, 6, 7, 10 y 0 de *C. pepo*.

CUARTA. - En las regiones adyacentes a los SNPs significativos se han detectado varios genes candidatos del control de la floración femenina en *C. pepo*. Estos genes codifican para un factor de transcripción tipo AGAMOUS, que es responsable de la transición floral en *Arabidopsis thaliana*, así como elementos que intervienen en señalización de etileno o auxinas, dos hormonas que se sabe están implicadas en la expresión sexual de cucurbitáceas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguado, E., García, A., Iglesias-Moya, J., Romero, J., Wehner, T. C., Gómez-Guillamón, M. L., Jamilena, M. (2020). Mapping a Partial Andromonoecy Locus in *Citrullus lanatus* Using BSA-Seq and GWAS Approaches. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.01243
2. An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J. R., Guo, H. (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *The Plant cell*, 22(7), 2384–2401. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076588>
3. Boualem, A., Troadec, C., Kovalski, I., Sari, M. A., Perl-Treves, R., Bendahmane, A. (2009). A conserved ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in two cucumis species. *PloS one*, 4(7), e6144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006144>
4. Carvajal Moreno, F. (2014). Mejora de la vida comercial, calidad y conservación de calabacín (*Cucurbita pepo* L.): estudio comparativo en variedades comerciales (tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.
5. Castellanos-Morales, G., Ruiz-Mondragón, KY., Hernández-Rosales, HS., Sánchez-de la Vega, G., Gámez, N., Aguirre-Planter, E., Montes-Hernández, S., Lira-Saade, R., Eguiarte, LE. (2019). Tracing back the origin of pumpkins (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo* L.) in Mexico. *Proc. R. Soc. B* 286: 20191440. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.1440>
6. Cebrián, G., Iglesias-Moya, J., García, A., Martínez, J., Romero, J., Regalado JJ., Martínez, C., Valenzuela, JL., Jamilena, M. Involvement of ethylene receptors in the salt tolerance response of *Cucurbita pepo*. *Hortic Res* 8, 73 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00508-z>
7. Chong, X., Su, J., Wang, F., Wang, H., Song, A., Guan, Z., Fang, W., Jiang, J., Chen, S., Chen, F., Zhang, F. (2019). Identification of favorable SNP alleles and candidate genes responsible for inflorescence-related traits via GWAS in chrysanthemum. *Plant molecular biology*, 99(4-5), 407–420. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00826-w>

8. Esteras C, Nuez F, Pico B: Genetic diversity studies in cucurbits using molecular tools. In Sex Expression in Cucurbits Genetics, Genomics, and Breeding of Cucurbits. Edited by Wang YH, Behera TK, C. K. CRC Press; 2012:140-198. DOI: 10.1201/b11436-6
9. Esteras, Cristina; Gómez, Pedro; Monforte, Antonio J; Blanca, José; Vicente-Dólera, Nelly; Roig, Cristina; Nuez, Fernando; Pico, Belén (2012) High-throughput SNP genotyping in Cucurbita pepo for map construction and quantitative trait loci mapping. BMC Genomics. 13, 80.
10. Galun E (1959). The role of auxins in the sex expression of the cucumber. *Physiol Plant* 1959, 12:48-61. doi:10.1111/j.1399-3054.1959.tb07884.x
11. García A, Aguado E, Parra G, Manzano S, Martínez C, Megías Z, Cebrián G, Romero J, Beltrán S, Garrido D and Jamilena M. (2018). Phenomic and Genomic Characterization of a Mutant Platform in Cucurbita pepo. *Front. Plant Sci.* 9:1049. DOI: 10.3389/fpls.2018.01049
12. García-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., Hénaff, E., Câmara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., Alioto, T., Capella-Gutiérrez, S., Blanca, J., Cañizares, J., Ziarsolo, P., Gonzalez-Ibeas, D., Rodríguez-Moreno, L., Droege, M., Du, L., Alvarez-Tejado, M., ... Puigdomènech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), 11872–11877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>
13. Gong, L., Stift, G., Kofler, R., Pachner, M. and Lelley, T. (2008) Microsatellites for the genus Cucurbita and an SSR-based genetic linkage map of Cucurbita pepo L.. *Theoret. Appl. Genet.* 117, 37–48.
14. Guo, S., Zhang, J., Sun, H. et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat Genet* 45, 51–58 (2013). <https://doi.org/10.1038/ng.2470>
15. Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W. J., Wang, X., Xie, B., Ni, P., Ren, Y., Zhu, H., Li, J., Lin, K., Jin, W., Fei, Z., Li, G., Staub, J., Kilian, A., van der Vossen, E. A., ... Li, S. (2009). The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature genetics*, 41(12), 1275–1281. <https://doi.org/10.1038/ng.475>

16. J. Rudich, A. H. Halevy, Involvement of abscisic acid in the regulation of sex expression in the cucumber, *Plant and Cell Physiology*, Volume 15, Issue 4, August 1974, Pages 635–642, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075048>
17. Khryanin, V.N. Role of Phytohormones in Sex Differentiation in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 49, 545–551 (2002). <https://doi.org/10.1023/A:1016328513153>
18. López Gázquez, A. M. (2018). Evaluación fenotípica y molecular de mutantes de insensibilidad a etileno en calabacín. Universidad de Almería. Almería.
19. Manzano S, Martínez C, García JM, Megías Z, Jamilena M: Involvement of ethylene in sex expression and female flower development in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Physiol Biochem* (2014), 85:96-104. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.004>
20. Manzano S, Martínez C, Megías Z, Gómez P, Garrido D, Jamilena M. (2011). The role of ethylene and brassinosteroids in the control of sex expression and flower development in *Cucurbita pepo*. *Plant Growth Regul* 65:213-221. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9589-7>
21. Manzano, S., Aguado, E., Martínez, C., Megías, Z., García, A., Jamilena, M. (2016). The Ethylene Biosynthesis Gene CitACS4 Regulates Monoecy/Andromonoecy in Watermelon (*Citrullus lanatus*). *PloS One* 11, e0154362. doi: 10.1371/journal.pone.0154362
22. Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Garrido, D., & Jamilena, M. (2013). Involvement of Ethylene Biosynthesis and Signalling in the Transition from Male to Female Flowering in the Monoecious *Cucurbita pepo*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 789-798. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-139>
23. Martínez C, Jamilena M. To be a male or a female flower, a question of ethylene in cucurbits. *Current Opinion in Plant Biology*. 2021 Feb;59:101981. DOI: 10.1016/j.pbi.2020.101981.
24. Martínez, C., Manzano, S., Megías, Z. et al. Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in fruit set and early fruit development in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) *BMC Plant Biol* 13, 139 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-139>

25. Michaels, S. D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Pelaz, S., Yanofsky, M., & Amasino, R. M. (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 33(5), 867–874. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01671.x>
26. Montero-Pau, J., Blanca, J., Esteras, C., Martínez-Pérez, E. M., Gómez, P., Monforte, A. J., Cañizares, J., & Picó, B. (2017). An SNP-based saturated genetic map and QTL analysis of fruit-related traits in Zucchini using Genotyping-by-sequencing. *BMC genomics*, 18(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3439-y>
27. Montero-Pau, J., Blanca, J., Bombarely, A., Ziarsolo, P., Esteras, C., Martí-Gómez, C., Ferriol, M., Gómez, P., Jamilena, M., Mueller, L., Picó, B. y Cañizares, J. (2018). El ensamblaje de novo del genoma del calabacín revela una duplicación del genoma completo asociada con el origen del género Cucurbita. *Revista de biotecnología vegetal*, 16 (6), 1161-1171. <https://doi.org/10.1111/pbi.12860>
28. Paris H.S. (2001). History of the cultivar-groups of Cucurbita pepo. *Horticultural Reviews* 25: 71-170 <https://doi.org/10.1002/9780470650783.ch2>
29. Poland, J. A., & Rife, T. W. (2012). Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics. *The Plant Genome Journal*, 5(3), 92. doi:10.3835/plantgenome2012.05.0005
30. Qing Li, Hongbo Li, Wu Huang, Yuanhao Xu, Qian Zhou, Shenhao Wang, Jue Ruan, Sanwen Huang, Zhonghua Zhang, A chromosome-scale genome assembly of cucumber (*Cucumis sativus* L.), *GigaScience*, Volume 8, Issue 6, June 2019, giz072, <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz072>
31. Renner SS. and Schaefer H. (2016). Phylogeny and Evolution of the Cucurbitaceae. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. doi: 10.1007/7397_2016_14
32. Sáez, C., Martínez, C., Ferriol, M., Manzano, S., Velasco, L., Jamilena, M., ... Picó, B. (2016). Resistance to Tomato leaf curl New Delhi virus in Cucurbita spp. *Annals of Applied Biology*, 169(1), 91–105. doi:10.1111/aab.12283
33. Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current opinion in plant biology*, 12(5), 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.009>

34. Sun H., Wu S., Zhang G., Jiao C., Guo S., Ren Y., Zhang J., Zhang H., Gong G., Jia Z., Zhang F., Tian J., Lucas W.J., Doyle J.J., Li H., Fei Z., and Xu Y. (2017). Karyotype stability and unbiased fractionation in the paleo-allotetraploid *Cucurbita* genomes. *Mol. Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2017.09.003.
35. Tao Q, Niu H, Wang Z, Zhang W, Wang H, Wang S, Zhang X, Li Z: Ethylene responsive factor ERF110 mediates ethyleneregulated transcription of a sex determination-related orthologous gene in two *Cucumis* species. *J Exp Bot* 2018, 69:2953-2965. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery128>
36. Trebitsh T, Rudich J, Riov J: Auxin, biosynthesis of ethylene and sex expression in cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Growth Regul* 1987, 5:105-113. <https://doi.org/10.1007/BF00024738>
37. Xanthopoulou, A., Psomopoulos, F., Ganopoulos, I., Manioudaki, M., Tsaftaris, A., Nianiou-Obeidat, I. and Madesis, P. (2016) De novo transcriptome assembly of two contrasting pumpkin cultivars. *Genom. Data*, 7, 200–201.
38. Xanthopoulou, A., Montero-Pau, J., Mellidou, I. et al. Whole-genome resequencing of *Cucurbita pepo* morphotypes to discover genomic variants associated with morphology and horticulturally valuable traits. *Hortic Res* 6, 94 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0176-9>
39. Yano, K., Yamamoto, E., Aya, K., Takeuchi, H., Lo, P., Hu, L., Matsuoka, M. (2016). Genome-wide association study using whole-genome sequencing rapidly identifies new genes influencing agronomic traits in rice. *Nature Genetics*, 48(8), 927–934. doi:10.1038/ng.3596

8. ANEXO

Tabla suplementaria 1. Acciones *Cucurbita pepo* utilizadas en este trabajo y secuenciadas por GBS.

ACCESIÓN	TAXONOMÍA	PAÍS DE PROCEDENCIA	PROMEDIO PRECOCIDAD DE LA FLORACIÓN FEMENINA
PI_109486	Cucurbita pepo	Turkey	6,5
PI_135394	Cucurbita pepo	Afghanistan	7,25
PI_135398	Cucurbita pepo	Afghanistan	7
PI_136448	Cucurbita pepo	China	5,5
PI_137896	Cucurbita pepo	Iran	10
PI_141660	Cucurbita pepo	Iran	9
PI_143306	Cucurbita pepo	Iran	10,75
PI_143329	Cucurbita pepo	Iran	8,25
PI_155301	Cucurbita pepo	Yemen	3,25
PI_158990	Cucurbita pepo	South Africa	7,75
PI_163232	Cucurbita pepo	India	11,5
PI_164957	Cucurbita pepo	Turkey	4,5
PI_164997	Cucurbita pepo	Turkey	7
PI_165018	Cucurbita pepo	Turkey	4,75
PI_165023	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_165047	Cucurbita pepo	Turkey	5,5
PI_165992	Cucurbita pepo	India	10,25
PI_166992	Cucurbita pepo	Turkey	6,5
PI_167084	Cucurbita pepo	Turkey	4,5
PI_167097	Cucurbita pepo	Turkey	5
PI_167136	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_167199	Cucurbita pepo	Turkey	3,75
PI_167392	Cucurbita pepo	Turkey	4,25
PI_169416	Cucurbita pepo	Turkey	6
PI_169420	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_169423	Cucurbita pepo	Turkey	7
PI_169425	Cucurbita pepo	Turkey	8,5
PI_169428	Cucurbita pepo	Turkey	8,25
PI_169429	Cucurbita pepo	Turkey	6,25
PI_169431	Cucurbita pepo	Turkey	5,5
PI_169432	Cucurbita pepo	Turkey	7,25
PI_169434	Cucurbita pepo	Turkey	8,75
PI_169436	Cucurbita pepo	Turkey	7,5
PI_169442	Cucurbita pepo	Turkey	6,5
PI_169443	Cucurbita pepo	Turkey	5,5
PI_169445	Cucurbita pepo	Turkey	4,25
PI_169446	Cucurbita pepo	Turkey	5,5
PI_169447	Cucurbita pepo	Turkey	4,4
PI_169452	Cucurbita pepo	Turkey	10,6
PI_169454	Cucurbita pepo	Turkey	4,75
PI_169456	Cucurbita pepo	Turkey	9

PI_169458	Cucurbita pepo	Turkey	5,2
PI_169461	Cucurbita pepo	Turkey	5,5
PI_169462	Cucurbita pepo	Turkey	5,5
PI_169465	Cucurbita pepo	Turkey	6
PI_169467	Cucurbita pepo	Turkey	8
PI_169468	Cucurbita pepo	Turkey	9,75
PI_169473	Cucurbita pepo	Turkey	9,75
PI_169475	Cucurbita pepo	Turkey	5,25
PI_169476	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_169478	Cucurbita pepo	Turkey	8
PI_171622	Cucurbita pepo	Turkey	8,5
PI_171625	Cucurbita pepo	Turkey	5,5
PI_171628	Cucurbita pepo	Turkey	11,25
PI_171631	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_172858	Cucurbita pepo	Turkey	13
PI_172860	Cucurbita pepo	Turkey	5,75
PI_172861	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_172866	Cucurbita pepo	Turkey	6,25
PI_172870	Cucurbita pepo	Turkey	7,5
PI_172872	Cucurbita pepo	Turkey	10,5
PI_172875	Cucurbita pepo	Turkey	12,5
PI_173680	Cucurbita pepo	Turkey	9,5
PI_173681	Cucurbita pepo	Turkey	9,75
PI_173683	Cucurbita pepo	Turkey	9,75
PI_173684	Cucurbita pepo	Turkey	7,25
PI_173685	Cucurbita pepo	Turkey	10,75
PI_173686	Cucurbita pepo	Turkey	10,25
PI_174183	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_174185	Cucurbita pepo	Turkey	8,75
PI_174188	Cucurbita pepo	Turkey	8
PI_174190	Cucurbita pepo	Turkey	10
PI_174192	Cucurbita pepo	Turkey	8
PI_175130	Cucurbita pepo	Turkey	12,25
PI_175706	Cucurbita pepo	Turkey	9
PI_175707	Cucurbita pepo	Turkey	8
PI_175708	Cucurbita pepo	Turkey	11,75
PI_175710	Cucurbita pepo	Turkey	6
PI_175712	Cucurbita pepo	Turkey	10,25
PI_176532	Cucurbita pepo	Turkey	10
PI_176533	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_176534	Cucurbita pepo	Turkey	5
PI_176536	Cucurbita pepo	Turkey	9,25
PI_176538	Cucurbita pepo	Turkey	5,25
PI_176543	Cucurbita pepo	Turkey	6,5
PI_176545	Cucurbita pepo	Turkey	6,25
PI_176546	Cucurbita pepo	Turkey	5,25
PI_176547	Cucurbita pepo	Turkey	9,75
PI_176548	Cucurbita pepo	Turkey	7,25

PI_176550	Cucurbita pepo	Turkey	10,25
PI_176962	Cucurbita pepo	Turkey	11
PI_176965	Cucurbita pepo	Turkey	11
PI_177369	Cucurbita pepo	Turkey	3,75
PI_177372	Cucurbita pepo	Turkey	6
PI_177374	Cucurbita pepo	Turkey	9,75
PI_177375	Cucurbita pepo	Turkey	9,25
PI_177376	Cucurbita pepo	Turkey	13,25
PI_178896	Cucurbita pepo	Turkey	9,5
PI_178897	Cucurbita pepo	Turkey	8,5
PI_179267	Cucurbita pepo	Turkey	10,5
PI_179268	Cucurbita pepo	Turkey	7,25
PI_179270	Cucurbita pepo	Turkey	11,75
PI_181757	Cucurbita pepo	Syria	11,2
PI_181758	Cucurbita pepo	Lebanon	10,25
PI_181763	Cucurbita pepo	Lebanon	10
PI_181764	Cucurbita pepo	Lebanon	8,25
PI_181912	Cucurbita pepo	Syria	7,5
PI_181944	Cucurbita pepo	Syria	9
PI_182199	Cucurbita pepo	Turkey	8,5
PI_182201	Cucurbita pepo	Turkey	10
PI_182202	Cucurbita pepo	Turkey	7
PI_182203	Cucurbita pepo	Turkey	11
PI_185032	Cucurbita pepo	Turkey	6,75
PI_185033	Cucurbita pepo	Turkey	12,5
PI_192941	Cucurbita pepo	China	10
PI_199015	Cucurbita pepo	Turkey	13,25
PI_204693	Cucurbita pepo	Turkey	6,25
PI_204697	Cucurbita pepo	Turkey	6,25
PI_204698	Cucurbita pepo	Turkey	6,5
PI_206956	Cucurbita pepo	Turkey	5,25
PI_206957	Cucurbita pepo	Turkey	5
PI_207479	Cucurbita pepo	Afghanistan	10,25
PI_209783	Cucurbita pepo	Germany	10,75
PI_212002	Cucurbita pepo	Iran	6,5
PI_212003	Cucurbita pepo	Iran	9,5
PI_212004	Cucurbita pepo	Iran	9
PI_212006	Cucurbita pepo	Iran	6,4
PI_212012	Cucurbita pepo	Iran	7,25
PI_212013	Cucurbita pepo	Iran	7,25
PI_212014	Cucurbita pepo	Iran	6,5
PI_212060	Cucurbita pepo	Greece	5
PI_214122	Cucurbita pepo	Bolivia	6,25
PI_216032	Cucurbita pepo	India	6,5
PI_222100	Cucurbita pepo	Afghanistan	8,25
PI_222247	Cucurbita pepo	Iran	7,75
PI_223352	Cucurbita pepo	Iran	9,75
PI_223354	Cucurbita pepo	Iran	7,75

PI_223773	Cucurbita pepo	Afghanistan	10,25
PI_227237	Cucurbita pepo	Iran	7
PI_227298	Cucurbita pepo	Iran	7,5
PI_230181	Cucurbita pepo	Turkey	11,5
PI_232072	Cucurbita pepo	South Africa	10,8
PI_234252	Cucurbita pepo	Argentina	7,25
PI_234614	Cucurbita pepo	South Africa	9,5
PI_234615	Cucurbita pepo	South Africa	7
PI_234617	Cucurbita pepo	South Africa	9,25
PI_256064	Cucurbita pepo	Afghanistan	14,75
PI_260653	Cucurbita pepo	Ukraine	11,5
PI_261610	Cucurbita pepo	Spain	12,75
PI_261780	Cucurbita pepo	France	9,75
PI_265560	Cucurbita pepo	Afghanistan	8,5
PI_266925	Cucurbita pepo	Germany	11,5
PI_267660	Cucurbita pepo	United States	12,75
PI_267661	Cucurbita pepo	United States	13,75
PI_267663	Cucurbita pepo	United States	13,25
PI_267664	Cucurbita pepo	United States	12,75
PI_267755	Cucurbita pepo	United Kingdom	13,75
PI_267757	Cucurbita pepo	United States	9,5
PI_267758	Cucurbita pepo	Turkey	6,5
PI_267759	Cucurbita pepo	Turkey	6,5
PI_268381	Cucurbita pepo	Afghanistan	9,5
PI_269483	Cucurbita pepo	Pakistan	7,25
PI_274336	Cucurbita pepo	Guatemala	15,75
PI_274787	Cucurbita pepo	India	9,5
PI_282486	Cucurbita pepo	United States	6,25
PI_282487	Cucurbita pepo	United States	8,25
PI_285213	Cucurbita pepo var. texana	United States	8,75
PI_288240	Cucurbita pepo	Egypt	10
PI_291254	Cucurbita pepo	China	6,75
PI_292014	Cucurbita pepo	Israel	6,5
PI_293433	Cucurbita pepo	Lebanon	7,75
PI_299574	Cucurbita pepo	South Africa	7
PI_299575	Cucurbita pepo	South Africa	7,5
PI_302418	Cucurbita pepo	United States	10,25
PI_304061	Cucurbita pepo	Pakistan	11,25
PI_306126	Cucurbita pepo	Bulgaria	4,75
PI_311103	Cucurbita pepo	Guatemala	10,25
PI_314806	Cucurbita pepo	Netherlands	8,25
PI_318826	Cucurbita pepo	Mexico	7
PI_344357	Cucurbita pepo	Turkey	4,5
PI_344358	Cucurbita pepo	Turkey	7,25
PI_344359	Cucurbita pepo	Turkey	7,4
PI_355054	Cucurbita pepo	Iran	9
PI_357892	Cucurbita pepo	Macedonia	10,83
PI_357926	Cucurbita pepo	Macedonia	14,5

PI_357930	Cucurbita pepo	Macedonia	11,75
PI_357931	Cucurbita pepo	Macedonia	13
PI_357933	Cucurbita pepo	Macedonia	13,5
PI_357936	Cucurbita pepo	Macedonia	14,25
PI_357937	Cucurbita pepo	Macedonia	12,25
PI_357940	Cucurbita pepo	Macedonia	12,4
PI_357948	Cucurbita pepo	Macedonia	11,75
PI_357949	Cucurbita pepo	Macedonia	13,6
PI_357952	Cucurbita pepo	Macedonia	12
PI_357953	Cucurbita pepo	Macedonia	13,5
PI_357957	Cucurbita pepo	Macedonia	15
PI_357960	Cucurbita pepo	Macedonia	8,75
PI_357963	Cucurbita pepo	Macedonia	8
PI_357966	Cucurbita pepo	Macedonia	6
PI_357968	Cucurbita pepo	Macedonia	8
PI_357970	Cucurbita pepo	Macedonia	9,75
PI_357973	Cucurbita pepo	Macedonia	8,75
PI_357974	Cucurbita pepo	Macedonia	6,5
PI_368588	Cucurbita pepo	Macedonia	9,5
PI_368595	Cucurbita pepo	Macedonia	11
PI_368596	Cucurbita pepo	Macedonia	8,75
PI_368597	Cucurbita pepo	Macedonia	8
PI_368599	Cucurbita pepo	Macedonia	10,25
PI_368600	Cucurbita pepo	Macedonia	12,25
PI_368601	Cucurbita pepo	Macedonia	10
PI_368604	Cucurbita pepo	Macedonia	9,5
PI_368605	Cucurbita pepo	Macedonia	11,25
PI_368606	Cucurbita pepo	Macedonia	11
PI_368607	Cucurbita pepo	Macedonia	12,25
PI_368609	Cucurbita pepo	Macedonia	14,5
PI_368611	Cucurbita pepo	Macedonia	16,25
PI_368615	Cucurbita pepo	Macedonia	15,25
PI_370462	Cucurbita pepo	Macedonia	16,75
PI_370463	Cucurbita pepo	Macedonia	8,5
PI_370466	Cucurbita pepo	Macedonia	12,25
PI_370467	Cucurbita pepo	Macedonia	10
PI_379302	Cucurbita pepo	Macedonia	13,25
PI_379307	Cucurbita pepo	Serbia	9,25
PI_379309	Cucurbita pepo	Macedonia	12,25
PI_379310	Cucurbita pepo	Macedonia	13
PI_379314	Cucurbita pepo	Macedonia	12,75
PI_379315	Cucurbita pepo	Macedonia	9
PI_379316	Cucurbita pepo	Macedonia	8,5
PI_379317	Cucurbita pepo	Macedonia	7,25
PI_379319	Cucurbita pepo	Macedonia	11,75
PI_379323	Cucurbita pepo	Macedonia	12,25
PI_379324	Cucurbita pepo	Macedonia	11,5
PI_381323	Cucurbita pepo	Japan	9

PI_418966	Cucurbita pepo	China	11,2
PI_420328	Cucurbita pepo	Turkey	7,75
PI_420330	Cucurbita pepo	Turkey	8,75
PI_420332	Cucurbita pepo	Turkey	9
PI_427095	Cucurbita pepo	China	8,25
PI_431582	Cucurbita pepo	India	7,5
PI_438700	Cucurbita pepo	Mexico	10,8
PI_438711	Cucurbita pepo	Mexico	10,2
PI_442260	Cucurbita pepo	Mexico	11,75
PI_442293	Cucurbita pepo	Mexico	11
PI_442294	Cucurbita pepo	Mexico	9,75
PI_442295	Cucurbita pepo	Mexico	10,5
PI_442298	Cucurbita pepo	Mexico	15
PI_442305	Cucurbita pepo	Mexico	11,75
PI_442307	Cucurbita pepo	Mexico	14,25
PI_442309	Cucurbita pepo	Mexico	12
PI_442310	Cucurbita pepo	Mexico	9,25
PI_442311	Cucurbita pepo	Mexico	14
PI_442313	Cucurbita pepo	Mexico	10,75
PI_442314	Cucurbita pepo	Mexico	10,5
PI_442315	Cucurbita pepo	Mexico	9
PI_442317	Cucurbita pepo	Mexico	11
PI_442318	Cucurbita pepo	Mexico	10,75
PI_442319	Cucurbita pepo	Mexico	12,75
PI_442320	Cucurbita pepo	Mexico	12,75
PI_442321	Cucurbita pepo	Mexico	8,5
PI_442791	Cucurbita pepo	South Africa	11,25
PI_449350	Cucurbita pepo	Guatemala	11,5
PI_451849	Cucurbita pepo	Guatemala	8
PI_451853	Cucurbita pepo	Guatemala	10
PI_482592	Cucurbita pepo	Zimbabwe	10,67
PI_490274	Cucurbita pepo	United Kingdom	10
PI_490275	Cucurbita pepo	United Kingdom	11
PI_490278	Cucurbita pepo	United States	7,5
PI_491201	Cucurbita pepo	Greece	4,6
PI_508465	Cucurbita pepo	Korea	7,75
PI_511969	Cucurbita pepo	Korea	14,75
PI_511977	Cucurbita pepo	Mexico	13,25
PI_511983	Cucurbita pepo	Mexico	9,5
PI_512189	Cucurbita pepo	Mexico	9
PI_512190	Cucurbita pepo	Mexico	11,25
PI_512662	Cucurbita pepo	Spain	10,25
PI_512665	Cucurbita pepo	Spain	10
PI_512701	Cucurbita pepo	Spain	8,25
PI_512709	Cucurbita pepo	Spain	12,25
PI_512710	Cucurbita pepo	Spain	8,75
PI_512729	Cucurbita pepo	Spain	11
PI_512739	Cucurbita pepo	Spain	10,25

PI_512741	Cucurbita pepo	Spain	10,5
PI_512744	Cucurbita pepo	Spain	14,5
PI_512751	Cucurbita pepo	Spain	8,5
PI_512754	Cucurbita pepo	Spain	12,75
PI_512755	Cucurbita pepo	Spain	10
PI_512757	Cucurbita pepo	Spain	6,25
PI_512776	Cucurbita pepo	Spain	8,25
PI_512780	Cucurbita pepo	Spain	7,75
PI_512782	Cucurbita pepo	Spain	10
PI_512785	Cucurbita pepo	Spain	8,25
PI_512789	Cucurbita pepo	Spain	9
PI_512800	Cucurbita pepo	Spain	10,25
PI_512801	Cucurbita pepo	Spain	9,75
PI_512802	Cucurbita pepo	Spain	7
PI_512803	Cucurbita pepo	Spain	10
PI_512804	Cucurbita pepo	Spain	12,25
PI_512806	Cucurbita pepo	Spain	13
PI_512807	Cucurbita pepo	Spain	13,5
PI_512812	Cucurbita pepo	Spain	13,5
PI_512813	Cucurbita pepo	Spain	10,5
PI_512820	Cucurbita pepo	Spain	10,25
PI_512823	Cucurbita pepo	Spain	11,75
PI_512826	Cucurbita pepo	Spain	9,75
PI_512834	Cucurbita pepo	Spain	8,5
PI_512837	Cucurbita pepo	Spain	11,5
PI_512840	Cucurbita pepo	Spain	12,75
PI_512857	Cucurbita pepo	Spain	13,5
PI_512859	Cucurbita pepo	Spain	15
PI_512860	Cucurbita pepo	Spain	14,75
PI_512861	Cucurbita pepo	Spain	15,25
PI_512862	Cucurbita pepo	Spain	14,5
PI_512863	Cucurbita pepo	Spain	8,75
PI_512874	Cucurbita pepo	Spain	7,5
PI_512880	Cucurbita pepo	Spain	11,75
PI_518687	Cucurbita pepo	United States	11,75
PI_518688	Cucurbita pepo	United States	9,5
PI_518689	Cucurbita pepo	Bolivia	7,5
PI_525166	Cucurbita pepo	Egypt	6
PI_525169	Cucurbita pepo	Egypt	7
PI_525170	Cucurbita pepo	Egypt	7
PI_525172	Cucurbita pepo	Egypt	8
PI_525175	Cucurbita pepo	Egypt	6,5
PI_525176	Cucurbita pepo	Egypt	7,25
PI_525177	Cucurbita pepo	Egypt	5,25
PI_525178	Cucurbita pepo	Egypt	8
PI_525179	Cucurbita pepo	Egypt	8,5
PI_525181	Cucurbita pepo	Egypt	9,5
PI_525182	Cucurbita pepo	Egypt	7,75

PI_531315	Cucurbita pepo	Hungary	8,75
PI_531316	Cucurbita pepo	Hungary	5
PI_531320	Cucurbita pepo	Hungary	4,75
PI_532355	Cucurbita pepo subsp. pepo	Mexico	12
PI_532389	Cucurbita pepo	Mexico	9,25
PI_534558	Cucurbita pepo	Syria	7,5
PI_534559	Cucurbita pepo	Syria	6,75
PI_534560	Cucurbita pepo	Syria	6,75
PI_534562	Cucurbita pepo	Syria	5,75
PI_534564	Cucurbita pepo	Syria	9,5
PI_534565	Cucurbita pepo	Syria	7,25
PI_534569	Cucurbita pepo	Syria	5,5
PI_534621	Cucurbita pepo	Syria	8
PI_534622	Cucurbita pepo	Syria	5,75
PI_534623	Cucurbita pepo	Syria	5
PI_534624	Cucurbita pepo	Syria	7,75
PI_534630	Cucurbita pepo	Syria	5,5
PI_534632	Cucurbita pepo	Syria	6
PI_534634	Cucurbita pepo	Syria	8,6
PI_534639	Cucurbita pepo	Syria	9
PI_534641	Cucurbita pepo	Syria	8,25
PI_537504	Cucurbita pepo	Spain	12,5
PI_537505	Cucurbita pepo	Spain	12,5
PI_537508	Cucurbita pepo	Spain	10,5
PI_537532	Cucurbita pepo	Spain	8,5
PI_537555	Cucurbita pepo	Spain	9,25
PI_537560	Cucurbita pepo	Spain	12,5
PI_537562	Cucurbita pepo	Spain	11,25
PI_595364	Cucurbita pepo	United States	13,5
PI_595838	Cucurbita pepo	United States	11,25
PI_597784	Cucurbita pepo	United States	10,25
PI_599994	Cucurbita pepo	United States	12,25
PI_600771	Cucurbita pepo	United States	11,25
PI_600995	Cucurbita pepo	United States	12,25
PI_601144	Cucurbita pepo	United States	10
PI_601193	Cucurbita pepo	United States	13
PI_608048	Cucurbita pepo	Pakistan	14,5
PI_612862	Cucurbita pepo	Mexico	12,5
PI_614684	Cucurbita pepo var. texana	United States	6,5
PI_614686	Cucurbita pepo var. texana	United States	5,25
PI_614687	Cucurbita pepo var. texana	United States	8,75
PI_614688	Cucurbita pepo var. texana	United States	6,75
PI_614689	Cucurbita pepo var. texana	United States	7,25
PI_614690	Cucurbita pepo var. texana	United States	7,75
PI_614699	Cucurbita pepo var. ozarkana	United States	10
PI_615086	Cucurbita pepo	United States	8,25
PI_615087	Cucurbita pepo	United States	4,25
PI_615089	Cucurbita pepo	United States	5,5

PI_615091	Cucurbita pepo	United States	11
PI_615092	Cucurbita pepo	United States	7,25
PI_615095	Cucurbita pepo	Australia	7,25
PI_615096	Cucurbita pepo	United States	10,75
PI_615097	Cucurbita pepo	United States	13,75
PI_615098	Cucurbita pepo	United States	15
PI_615099	Cucurbita pepo	United States	13,5
PI_615100	Cucurbita pepo	United States	10,5
PI_615104	Cucurbita pepo	United States	11,75
PI_615105	Cucurbita pepo	United States	5,75
PI_615106	Cucurbita pepo	United States	13,25
PI_615107	Cucurbita pepo	United States	9,75
PI_615108	Cucurbita pepo	United States	7,75
PI_615109	Cucurbita pepo	United Kingdom	9,75
PI_615110	Cucurbita pepo	United States	12,5
PI_615111	Cucurbita pepo	United States	13,5
PI_615112	Cucurbita pepo	United States	9,75
PI_615116	Cucurbita pepo	United States	10,5
PI_615119	Cucurbita pepo	United States	16
PI_615122	Cucurbita pepo	Mexico	15
PI_615126	Cucurbita pepo	Mexico	12,75
PI_615127	Cucurbita pepo	Mexico	17
PI_615131	Cucurbita pepo	Mexico	14,75
PI_615133	Cucurbita pepo	Austria	12,5
PI_615139	Cucurbita pepo	Spain	9,5
PI_615142	Cucurbita pepo	Kazakhstan	13
PI_615143	Cucurbita pepo	Kazakhstan	12,5
PI_615145	Cucurbita pepo	Ukraine	10,25
PI_615146	Cucurbita pepo	Ukraine	13,75
PI_615147	Cucurbita pepo	Russian Federation	9,5
PI_615148	Cucurbita pepo	Moldova	7,75
PI_615149	Cucurbita pepo	India	8,75
PI_615150	Cucurbita pepo	India	7,5
PI_615151	Cucurbita pepo	India	7
PI_615152	Cucurbita pepo	United States	9
PI_615153	Cucurbita pepo	United States	10
PI_615154	Cucurbita pepo	Nepal	8