

Análisis del potencial partenocárpico de un panel de accesiones de *Cucurbita pepo*

Lupiáñez García MM.

Palabras clave: calabacín, fenotipado, mejora genética, GWAS, tamaño ovario antesis.

Resumen

La partenocarpia es una característica importante para mejorar la calidad de los frutos hortícolas, particularmente de las especies que son cultivadas bajo invernadero, y son de polinización cruzada, como es el caso de *Cucurbita pepo*; por ello es importante identificar genotipos partenocárpico capaces de generar frutos sin fecundación y que mantengan todas sus características agronómicas. En este estudio se evaluaron 127 accesiones PI de distintos morfotipos de *C. pepo*, determinándose el tamaño medio del ovario de las flores en antesis de las distintas accesiones. Para determinar el tamaño medio del ovario, se cosecharon 6 ovarios de las flores en antesis de cada accesión y se les midió tanto la longitud como el ancho, estos dos caracteres fueron los que se utilizaron para la posterior búsqueda mediante GWAS de regiones genómicas o QTLs que pudieran estar implicadas en el control del potencial partenocárpico. El estudio del tamaño del ovario nos permitió encontrar una accesión con un alto potencial partenocárpico, PI 614961, la cual tuvo un tamaño medio del ovario de las flores en antesis comparable con los frutos comerciales de *C. pepo*. Esta accesión no se incluyó en GWAs por presentar una variación intravarietal muy alta para el carácter, indicando que los genes responsables del potencial partenocárpico de esta accesión no se encuentran fijados. Sería necesario obtener poblaciones biparentales segregantes en las que pudiéramos estudiar estos genes. Por otro lado, el análisis GWAs no mostró ningún valor significativo para ninguno de los dos caracteres estudiados, longitud y ancho del ovario. Es probable que para identificar las regiones genómicas que controlan el tamaño del ovario en antesis, debemos ampliar el panel de variedades a utilizar.

Abstract

Parthenocarpy is an important characteristic to improve the quality of horticultural fruits, particularly of species that are grown under greenhouse conditions and are cross-pollinated, as is the case of *Cucurbita pepo*; therefore, it is important to identify parthenocarpic genotypes capable of generating fruits without fertilization and that maintain all their agronomic characteristics. In this study, 127 PI accessions of different morphotypes of *C. pepo* were evaluated, determining the mean size of the ovary of flowers at anthesis of the different accessions. To determine the mean ovary size, 6 ovaries were harvested from flowers at anthesis of each accession and both length and width were measured. These two traits were used for the subsequent search by GWAS for genomic regions or QTLs that could be involved in the control of parthenocarpic potential. The study of ovary size allowed us to find an accession with

high parthenocarpic potential, PI 614961, which had a mean flower ovary size at anthesis comparable to commercial fruits of *C. pepo*. This accession was not included in GWAs because it had very high intravarietal variation for the trait, indicating that the genes responsible for the parthenocarpic potential of this accession are not fixed. It would be necessary to obtain segregating biparental populations in which we could study these genes. On the other hand, GWAs analysis did not show any significant value for either of the two characters studied, ovary length and ovary width. It is likely that in order to identify the genomic regions that control ovary size at anthesis, we should expand the panel of varieties to be used.

Introducción

El calabacín, *Cucurbita pepo*, es uno de los cultivos hortícolas más relevantes dentro de la agricultura intensiva almeriense. También es uno de los cultivos de hortalizas más importantes en España, pudiéndose observar un incremento del área cultivada en los últimos años de un 3% (FAOSTAT, 2022). La producción de calabacín a nivel mundial en el 2020 fue de unos 23 millones de toneladas, siendo la provincia de Almería una de las principales productoras a nivel europeo.

Los frutos de calabacín se producen como resultado del desarrollo del ovario. La recolección de los mismos se da en estado inmaduro, ya que se considera el momento óptimo de consumo de estos frutos, en este estado presentan sus mejores características organolépticas (Westwood, 1993). Cuando el fruto de calabacín alcanza la madurez fisiológica, las semillas están lo suficientemente desarrolladas para ser viables y germinar, pudiendo dar mal sabor y disminuir la calidad del fruto (Westwood, 1993).

Cucurbita pepo es una planta entomófila de polinización cruzada, por lo que para la polinización de sus ovarios y el posterior cuajado de sus frutos se produzca es necesario la presencia de polinizadores (Sanz, 1995). Estos polinizadores, abejas y otros insectos, se ven atraídos por el polen y el néctar de las flores masculinas (Reche, 1997). La actividad de los insectos polinizadores se ve afectada por las distintas condiciones climáticas (lluvia, temperatura, humedad, etc), pudiendo disminuir en condiciones de otoño/invierno en invernadero. Las condiciones climáticas también pueden afectar a la producción del polen, la cual debe ser óptima para que se produzca la polinización y posterior cuajado del fruto de forma correcta. En condiciones de invierno, algunos cultivares de calabacín, de hecho, apenas producen flores masculinas (Peñaranda et al., 2007). Además, debe existir una sincronización temporal en la apertura de flores masculinas y femeninas para que se produzca la polinización (Rylki et al., 1990).

De este modo, en condiciones ambientales desfavorables, o en ausencia de polinizadores, puede disminuir drásticamente la fertilización de los ovarios y consecuentemente el cuajado y el desarrollo del fruto. El desarrollo partenocárpico del fruto (el fruto cuaja y se desarrolla en ausencia de fecundación), es una alternativa para la producción de calabacín y otros frutos en estas condiciones adversas o en ausencia de polinizadores. La partenocarpia puede ser explotada para aumentar la producción en condiciones de cultivo intensivo bajo plástico fuera de temporada; esto significa la

posibilidad de consumir y encontrar productos hortícolas frescos en todas las épocas del año (Pandolfini, 2009). Así que la partenocarpia es un rasgo importante para mejorar el rendimiento, la calidad y el procesamiento de los frutos hortícolas, particularmente de las especies de polinización cruzada que son cultivadas en invernadero (Dhatt et al., 2016).

En cuajado y desarrollo del fruto están regulados por procesos hormonales endógenos (Ozga et al., 2003). Después de la fecundación, la semilla comienza a sintetizar hormonas, especialmente auxinas y giberelinas, que juegan un importante papel en el cuajado y desarrollo del fruto (García- Martínez et al., 1997). Las giberelinas aumentan el número de frutos y las auxinas aumentan el cuajado y tamaño de los mismos (Wien, 2020). Martínez et al. (2013) revelaron que el etileno también juega un papel importante durante el cuajado y desarrollo temprano del calabacín. Unos días después de la antesis, los frutos que no han sido polinizados, producen un pico de etileno que coincide con el aborto del desarrollo del fruto; por el contrario, los frutos polinizados o partenocárpicos no producen este pico de etileno. Los frutos partenocárpicos se pueden producir de forma natural como consecuencia de un aumento de auxinas en el ovario (Nitsch, 1970) y una reducción de etileno inmediatamente después de la antesis (Martínez et al. 2013).

La partenocarpia puede ser inducida artificialmente por hormonas (Gorguet et al., 2005). Actualmente el uso de auxinas de síntesis, ANA y ANA-amida, para conseguir el cuajado y crecimiento adecuado del fruto de calabacín está muy extendido en el cultivo intensivo bajo plástico (Gazquez et al., 2007). Sin embargo, cada vez existen más restricciones para el uso de estas hormonas. En este sentido, el desarrollo de variedades partenocárpicas constituye una de las mejores alternativas a la utilización de hormonas sintéticas para el cuajado del fruto de calabacín (Manzano et al., 2010). En los últimos años se han aumentado los esfuerzos en la búsqueda de variedades de calabacín de invernadero con una partenocarpia genéticamente determinada, que no requieran de polinización ni de los factores fisiológicos para que el fruto se desarrolle normalmente hasta la madurez (Martínez et al., 2013).

La partenocarpia es un carácter heredable con modelos de control genéticos que varían desde un solo gen hasta múltiples loci de caracteres cuantitativos dependiendo de la especie. En el caso de *C. pepo*, Robinson y Reiners (1999) indican que la fuente genética de la capacidad de establecer frutos partenocárpicos en esta especie es incierta. Más tarde, Pomares-Viciano et al., (2019), mediante un estudio de ARN-seq, establecieron que este carácter es controlado por la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y la coordinación de fitohormonas durante la formación de los frutos, pero sin llegar a establecer marcadores moleculares asociados a este carácter en calabacín. De forma paralela, algunos estudios muestran, que las variedades que presentan un mayor tamaño de sus ovarios en antesis, resultan ser más partenocárpicas (Marcos-Espín, 2010). De este modo el tamaño del ovario durante la antesis sería un buen indicador del potencial partenocárpico de una variedad.

Los programas de mejora genética basados en la selección fenotípica, es decir la selección del carácter de interés en variedades genéticamente variables, así como la posterior hibridación y la selección en generaciones segregantes, presentan algunos inconvenientes (Prohens, 2014). Entre otros la expresión de estos caracteres puede estar sujeta a factores ambientales, no podemos controlar la trazabilidad de los genes responsables del carácter de interés, por lo que hay que centrarse en seleccionar las plantas que presenten estos caracteres que servirán como parentales y en que su descendencia mantenga los mismos, este proceso de evaluación y selección de plantas supone un retraso a la hora de conseguir variedades comerciales (Cubero, 1999).

El desarrollo y el uso de marcadores moleculares ha permitido solventar muchos de estos problemas. Los marcadores moleculares no se ven afectados por el medio ambiente y son selectivamente neutrales, permitiendo seleccionar variedades que presentan las características de interés de un modo rápido y eficaz (Rajwant et al., 2011). Así que los métodos de caracterización basados en el uso de marcadores moleculares han demostrado ser más eficientes y, en la mayoría de los casos, superan las limitaciones de los métodos tradicionales, ya que los marcadores moleculares proporcionan una herramienta valiosa para establecer un genotipado preciso de los cultivares (Azofeifa, 2006).

En este sentido, los avances en las tecnologías de secuenciación de última generación y los sistemas de genotipado de alto rendimiento han revolucionado el campo de la genómica de plantas (Lado, 2012). El desarrollo de estas técnicas ha supuesto que las bases de datos con miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) estén fácilmente disponibles para la mejora genética de especies cultivadas (Lado, 2012). En el caso de *C. pepo*, en el marco del *Cucurbit Coordinated Agricultural Project* (CucCAP) se ha secuenciado y genotipado mediante GBS (*Genotyping by Sequencing*) el genoma de 830 accesiones pertenecientes al banco de germoplasma del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), estando estos datos disponibles en CuGenDB (<http://cucurbitgenomics.org>). Estas accesiones están también disponibles en el banco de semillas tradicionales de la Universidad de Almería (BSUAL). Esta información genómica puede ser utilizada para estudiar las regiones genómicas relacionadas con diferentes caracteres de interés, como el potencial partenocárpico, y para el desarrollo de marcadores moleculares asociados a estos caracteres. Una forma de realizar estos estudios es mediante un análisis GWAS (Genome-wide association study), el cual es un análisis de asociación entre la variación fenotípica y los SNPs de todo el genoma en múltiples accesiones (Rafalski, 2010; Zhang et al., 2010). El propósito final del análisis GWAS es identificar los factores genéticos que determinan las variaciones fenotípicas de un panel de variedades, identificando múltiples regiones o QTLs, cada uno de los cuales se relaciona con los mecanismos moleculares implicados en las variaciones fenotípicas (Nakano, 2020).

El objetivo de este trabajo es el estudio del potencial partenocárpico de una colección de 127 accesiones PI de distintos morfotipos de *C. pepo*. Para ello se ha determinado el tamaño medio del ovario de las flores en antesis de las distintas

accesiones, y la posterior búsqueda de las regiones genómicas o QTLs que puedan estar implicadas en el control de este carácter mediante GWAS.

Materiales y métodos

Material vegetal

Los ensayos de campo realizados durante este trabajo de fin de máster se realizaron en el invernadero U14 de la finca de la Fundación experimental UAL-ANECOOP. Los experimentos se llevaron a cabo en la campaña de primavera, entre los meses de marzo y julio de 2022.

La siembra se realizó el 17 de febrero de 2022, sobre bandejas alveoladas, utilizando como sustrato turba recubierta por una fina capa de vermiculita. Las plántulas se trasplantaron al suelo del invernadero el 9 de marzo, con al menos los dos cotiledones y la primera hoja verdadera desarrollada. La densidad de la plantación fue de 2 plantas por metro cuadrado. Se plantaron 10 plantas de cada una de las 127 accesiones PI de *C. pepo* (Tabla 1S) utilizadas en el desarrollo de este TFM (1270 plantas en total). Estas accesiones fueron seleccionadas entre las 830 accesiones de variabilidad natural provenientes del USDA con datos de GBS y disponibles en el banco de semillas tradicionales de la Universidad de Almería (BSUAL).

Caracterización del ovario de flores en antesis

Para medir el potencial partenocárpico de cada accesión se recolectaron 6 flores en antesis, a las cuales se les midió la longitud y ancho del ovario. La longitud del ovario fue medida con una regla milimetrada de 30 cm y el ancho mediante un calibre digital de la marca PARKSIDE con un rango de medición 0-150 mm y con una precisión de $\pm 0,01$ mm. Para cada accesión se estableció la longitud y ancho de sus ovarios en antesis como la media aritmética de las seis flores analizadas más menos la desviación estándar de los datos obtenidos en las mismas. Para el posterior análisis GWAS, solo se utilizaron las accesiones cuya desviación estándar no superó el 20% de la media.

Análisis de asociación del genoma (GWAS)

En primer lugar, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) los datos obtenidos tanto para la longitud como para el ancho de los ovarios en antesis de las diferentes accesiones de *C. pepo* analizadas en el apartado anterior, para el cual se usó el software TASSEL (V 5.2.52) (Bradbury et al., 2007; Gur et al., 2017). Este análisis es una técnica utilizada para describir un conjunto de datos en términos de nuevas variables no correlacionadas. El resultado de la PCA para cada uno de los parámetros analizados, longitud y ancho del ovario, nos dirá si el conjunto de accesiones seleccionadas en este TFM es apto para el análisis GWAS en ese parámetro.

A continuación, se realizó un análisis de asociación de todo el genoma (GWAS), entre los datos fenotípicos obtenidos para cada parámetro analizado (caracteres medidos) y la secuencia del genoma de cada accesión. La secuencia del genoma de *Cucurbita pepo* y los SNPs obtenidos mediante GBS de cada una de las accesiones están disponibles en la base de datos de genómica de cucurbitáceas (<http://cucurbitgenomics.org>; Zheng et al., 2019). El GWAS es una prueba estadística múltiple en la que para cada SNP se realiza una prueba independiente de asociación. En este análisis sólo se utilizaron los SNPs bialélicos dentro de las accesiones de *C. pepo* (un total de 47544 SNPs). El análisis se realizó con el software TASSEL (V 5.2.52) (Bradbury et al., 2007; Gur et al., 2017), en el mismo, se testaron dos modelos de ajuste de los datos: un modelo lineal mixto (MLM), que considera tanto la estructura de la población (matriz Q) como el parentesco (matriz de parentesco), y un modelo lineal generalizado (GLM), que solo considera la estructura de la población en el análisis de asociación. Los umbrales de significación de los GWAS en todo el genoma se determinaron utilizando la corrección de Bonferroni en el valor $p=0,05$ y el valor $p=0,01$. El software TASSEL (V 5.2.52) también fue utilizado para la realización de los gráficos cuantil-cuantil (Q-Q), donde las distribuciones de los valores P esperaban la distribución de la hipótesis nula (Bradbury et al., 2007).

Finalmente se utilizó el software R, con el paquete qqman, para representar los resultados del análisis GWAS de cada uno de los parámetros analizados, ancho y longitud de los ovarios en antesis, en un gráfico tipo QQ y otro gráfico tipo Manhattan, con los niveles de significación de cada análisis. Los gráficos tipo Manhattan nos muestran si existe alguna región genómica con una fuerte asociación con el carácter estudiado.

Resultados y Discusión

Caracterización de ovarios en flores en antesis

Los resultados obtenidos en las medidas realizadas a los ovarios, ancho y largo, en flores en antesis de las 127 accesiones se pueden observar en la Tabla 1 ($\bar{x} \pm SD$).

Accesión	Ancho (cm)	% Desviación	Largo (cm)	% Desviación
PI 136448	1,7 ± 0,2	11,2	5,0 ± 0,6	11,5
PI 155301	1,3 ± 0,2	17,4	5,4 ± 1,0	17,9
PI 164957	1,8 ± 0,3	14,5	6,7 ± 1,0	15,6
PI 165018	1,6 ± 0,3	17,6	7,1 ± 1,2	16,3
PI 165023	1,3 ± 0,3	18,8	4,1 ± 0,7	18,1

Tabla 1. Ancho y largo de los ovarios en el momento de la antesis de las diferentes PI accesiones de *C. pepo* utilizadas en este TFM, junto al % que supone la desviación estándar respecto a la media en cada una de las accesiones. *Valores con más de un 20% de desviación.

Accesión	Ancho (cm)	% Desviación	Largo (cm)	% Desviación
PI 165047	1,6 ± 0,1	6,2	5,4 ± 0,2	4,0
PI 166992	1,6 ± 0,2	12,6	5,7 ± 0,8	14,5
PI 167084	1,5 ± 0,2	12,6	5,9 ± 0,8	14,4
PI 167097	1,7 ± 0,1	7,0	6,8 ± 0,6	8,3
PI 167136	1,7 ± 0,3	17,8	5,3 ± 0,7	12,3
PI 167199	1,5 ± 0,1	9,3	5,4 ± 0,2	3,1
PI 167392	1,6 ± 0,1	5,2	5,4 ± 0,8	15,1
PI 169417	2,2 ± 0,2	7,0	7,9 ± 0,5	6,5
PI 169420	1,3 ± 0,1	9,1	6,3 ± 1,4	22,2*
PI 169422	1,8 ± 0,2	11,8	4,8 ± 1,1	24,0*
PI 169429	1,5 ± 0,3	16,2	5,4 ± 0,6	0,8
PI 169431	1,5 ± 0,2	11,9	8,3 ± 2,1	24,8*
PI 169432	1,6 ± 0,4	22,4*	7,3 ± 0,9	12,1
PI 169435	1,7 ± 0,1	7,9	6,6 ± 0,7	11,2
PI 169436	1,3 ± 0,4	31,3	7,0 ± 1,0	14,9
PI 169442	1,5 ± 0,1	9,3	4,8 ± 0,5	10,5
PI 169443	1,5 ± 0,3	19,8	6,0 ± 1,5	25,6*
PI 169446	1,4 ± 0,2	16,8	7,0 ± 1,1	15,4
PI 169447	1,3 ± 0,1	9,6	5,8 ± 0,5	8,6
PI 169454	1,8 ± 0,2	10,8	5,8 ± 0,8	14,4
PI 169458	1,6 ± 0,2	14,3	7,3 ± 1,3	18,1
PI 169461	1,2 ± 0,2	15,1	6,1 ± 1,0	17,2
PI 169462	1,7 ± 0,2	9,4	4,5 ± 0,8	18,5
PI 169465	1,8 ± 0,5	24,8*	5,9 ± 1,1	19,3
PI 171625	1,6 ± 0,2	9,2	6,1 ± 0,2	3,6
PI 171627	1,4 ± 0,2	13,7	5,4 ± 0,7	12,0
PI 171633	1,9 ± 0,1	6,9	6,1 ± 0,9	15,0
PI 172860	1,3 ± 0,2	12,2	4,6 ± 1,0	20,7*
PI 172861	1,2 ± 0,3	20,6*	4,5 ± 0,5	10,1
PI 172866	1,6 ± 0,3	20,2*	5,6 ± 0,8	13,9
PI 172870	2,1 ± 0,3	14,0	5,1 ± 0,3	5,7
PI 172873	1,8 ± 0,6	34,2*	4,9 ± 1,5	30,1*
PI 172874	1,7 ± 0,3	17,4	4,5 ± 1,1	23,5*
PI 173684	1,7 ± 0,2	12,5	3,9 ± 0,7	19,2
PI 174182	1,3 ± 0,1	8,9	4,8 ± 0,4	8,9
PI 174187	1,4 ± 0,3	20,7*	3,3 ± 1,0	30,2*
PI 174188	1,2 ± 0,3	24,1*	4,4 ± 0,9	19,8
PI 175707	1,5 ± 0,3	19,5	5,8 ± 0,6	10,4
PI 175708	1,7 ± 0,4	21,5*	5,8 ± 1,3	22,1*
PI 175710	1,6 ± 0,2	14,3	7,0 ± 1,2	16,7
PI 176534	1,4 ± 0,2	17,5	5,9 ± 1,0	17,2

Tabla 1. Continuación.

Accesión	Ancho (cm)	% Desviación	Largo (cm)	% Desviación
PI 176538	1,4 ± 0,3	18,6	6,1 ± 0,8	12,6
PI 179274	1,4 ± 0,1	7,2	5,7 ± 0,5	8,2
PI 181757	1,9 ± 0,9	46,8*	6,1 ± 2,9	47,6*
PI 181764	1,4 ± 0,3	18,8	4,4 ± 0,3	6,1
PI 181944	1,3 ± 0,2	13,1	4,3 ± 0,4	8,9
PI 182198	1,2 ± 0,3	22,8*	4,8 ± 0,5	10,7
PI 182199	1,4 ± 0,5	31,4*	4,9 ± 1,0	19,4
PI 182202	1,3 ± 0,2	11,3	4,7 ± 0,8	18
PI 182203	1,0 ± 0,2	21,0*	4,7 ± 0,3	6,4
PI 206956	1,6 ± 0,4	22,3*	6,2 ± 0,5	8,2
PI 206957	1,4 ± 0,3	18,6	6,0 ± 1,5	25,1*
PI 212006	1,6 ± 0,2	12,7	6,6 ± 0,9	13,6
PI 212008	1,6 ± 0,3	19,3	5,2 ± 0,8	14,6
PI 212012	1,2 ± 0,2	15,1	4,0 ± 0,6	14,4
PI 212013	1,4 ± 0,1	8,3	4,4 ± 0,5	10,3
PI 212060	2,0 ± 0,2	9,3	6,7 ± 0,7	10,1
PI 222786	1,6 ± 0,2	12,0	4,8 ± 0,3	6,5
PI 234252	1,6 ± 0,4	24,2*	6,7 ± 0,7	11,0
PI 234615	1,4 ± 0,3	21,5*	4,7 ± 1,0	21,1*
PI 234616	1,0 ± 0,1	11,0	3,9 ± 0,7	18,2
PI 234618	1,8 ± 0,2	13,2	5,7 ± 0,9	15,9
PI 251791	1,2 ± 0,2	16,6	7,3 ± 1,0	13,3
PI 261610	1,4 ± 0,3	20,2*	7,4 ± 0,9	11,6
PI 267755	1,9 ± 0,3	17,2	4,1 ± 1,0	24,2*
PI 267758	1,5 ± 0,1	7,4	5,7 ± 0,4	6,6
PI 267759	1,5 ± 0,2	13,2	6,5 ± 1,3	19,6
PI 288240	2,1 ± 0,4	16,7	8,8 ± 1,4	16,1
PI 292014	1,4 ± 0,2	14,1	5,6 ± 1,0	18,2
PI 306126	1,9 ± 0,2	11,6	7,2 ± 0,2	3,3
PI 344354	1,7 ± 0,1	7,9	5,0 ± 0,6	12,7
PI 344357	1,8 ± 0,2	11,8	5,5 ± 0,6	11,6
PI 355054	1,3 ± 0,1	7,8	5,0 ± 0,1	1,8
PI 357949	1,5 ± 0,2	12,3	6,3 ± 0,8	12,5
PI 357955	1,2 ± 0,2	12,9	7,5 ± 0,5	6,9
PI 357960	1,8 ± 0,4	21,6*	6,4 ± 0,4	6,9
PI 357968	1,2 ± 0,1	11,0	6,9 ± 0,7	10,2
PI 379307	1,2 ± 0,3	20,6*	7,5 ± 1,0	12,9
PI 379315	1,4 ± 0,2	12,0	6,0 ± 1,1	18,8
PI 379316	1,4 ± 0,2	13,0	7,4 ± 0,8	11,3
PI 379317	1,7 ± 0,2	10,1	8,2 ± 1,2	14,2

Tabla 1. Continuación.

Accesión	Ancho (cm)	% Desviación	Largo (cm)	% Desviación
PI 418966	2,0 ± 0,5	23,4*	7,0 ± 1,2	17,3
PI 427095	1,8 ± 0,1	5,6	5,5 ± 0,4	6,4
PI 431582	1,9 ± 0,4	22,4*	6,3 ± 1,3	20,2*
PI 490274	1,5 ± 0,1	9,7	5,5 ± 0,4	8,0
PI 491201	1,7 ± 0,3	19,3	7,2 ± 1,4	19,4
PI 507886	2,9 ± 1,2	41,0*	6,1 ± 1,7	27,6*
PI 508467	1,5 ± 0,2	12,6	7,8 ± 0,4	4,7
PI 508468	1,5 ± 0,2	15,7	7,7 ± 0,9	12,1
PI 508469	1,8 ± 0,2	12,2	9,4 ± 1,2	11,5
PI 512710	1,5 ± 0,3	18,8	7,3 ± 1,2	16,8
PI 512739	1,5 ± 0,2	11,6	4,8 ± 0,5	9,9
PI 512757	1,5 ± 0,4	26,2*	5,9 ± 0,4	7,1
PI 512776	1,6 ± 0,2	13,2	4,9 ± 0,5	9,7
PI 512780	2,0 ± 0,4	18,8	6,3 ± 1,2	18,7
PI 512782	1,6 ± 0,2	11,3	7,3 ± 1,2	15,8
PI 512785	1,5 ± 0,2	15,5	6,9 ± 0,8	11,2
PI 512793	1,8 ± 0,3	14,9	7,8 ± 1,0	13,1
PI 512794	1,5 ± 0,4	26,0*	6,3 ± 1,0	16,2
PI 512804	1,8 ± 0,2	10,1	6,8 ± 1,1	16,4
PI 512810	2,2 ± 0,2	8,8	6,9 ± 0,6	8,0
PI 512817	1,2 ± 0,2	12,9	7,8 ± 0,9	11,4
PI 512822	1,4 ± 0,1	5,6	7,2 ± 0,7	10,1
PI 512834	1,5 ± 0,2	13,8	7,0 ± 0,5	6,8
PI 512837	1,4 ± 0,2	13,6	8,1 ± 1,0	12,6
PI 512870	1,2 ± 0,2	15,1	8,2 ± 1,9	23,4*
PI 512880	1,1 ± 0,1	8,9	5,4 ± 0,8	14,6
PI 525166	2,5 ± 0,3	12,9	6,5 ± 0,9	14,2
PI 525169	2,1 ± 0,4	19,2	7,1 ± 1,0	13,6
PI 525170	1,7 ± 0,1	5,7	7,3 ± 0,4	6,1
PI 525175	1,9 ± 0,2	9,0	7,2 ± 0,5	7,5
PI 525176	1,8 ± 0,2	9,4	8,9 ± 1,3	14,4
PI 525177	2,4 ± 0,2	10,2	6,6 ± 0,8	12,4
PI 525181	1,8 ± 0,3	14,8	7,2 ± 0,8	10,8
PI 597784	1,3 ± 0,2	14,6	6,7 ± 0,7	10,0
PI 599994	0,9 ± 0,2	15,6	5,1 ± 1,0	19,7
PI 614961	4,5 ± 2,1	46,7*	13,5 ± 7,0	51,9*
PI 615103	1,8 ± 0,2	10,7	7,6 ± 0,8	11,1
PI 615109	1,7 ± 0,2	10,7	6,5 ± 1,2	18,2
PI 615139	1,3 ± 0,2	13,2	7,5 ± 0,5	6,4
PI 615148	1,1 ± 0,2	13,5	6,5 ± 1,7	26,7*
PI 615154	1,1 ± 0,1	13,0	6,4 ± 1,3	19,6

Tabla 1. Continuación.

Los ovarios de *Cucurbita pepo* en el momento de la antesis muestran una gran variedad de tamaños, como podemos observar en la Figura 1.

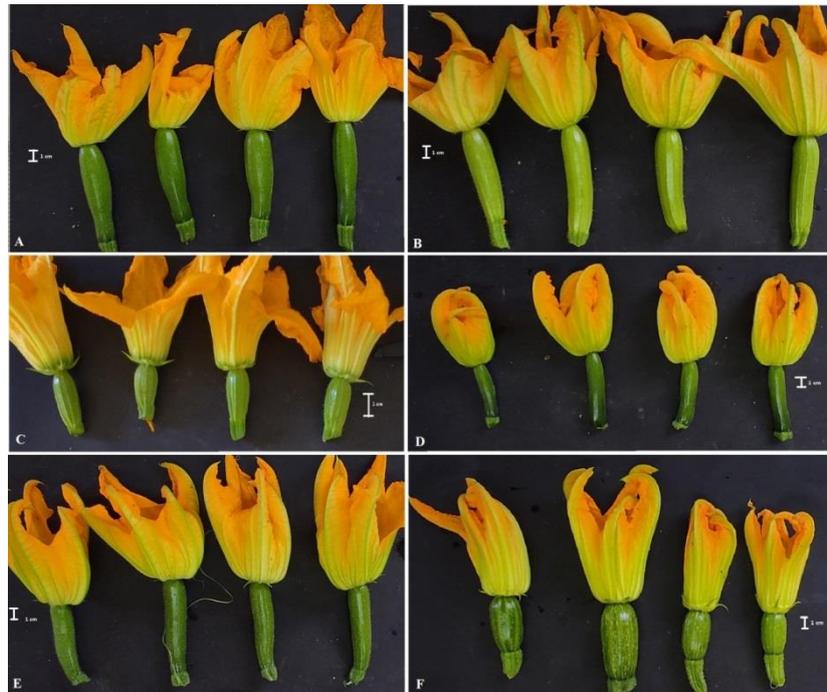


Figura 1. Ovarios en el momento de la antesis de diferentes accesiones de *C. pepo* PI 512782 (A), PI 512822 (B), PI 173684 (C), PI 599994 (D), PI 615139 (E) y PI 267755 (F).

La anchura media de los ovarios para cada accesión osciló entre $2,9 \pm 1,2$ cm (PI 507886) y $0,9 \pm 0,2$ cm (PI 599994) cm, mientras que la longitud media lo hizo entre $9,4 \pm 1,2$ cm (PI 508469) y $3,9 \pm 0,7$ cm (PI 173684 y PI 234616) (Tabla 1). El análisis conjunto de todas las accesiones indicó que el ancho medio de todas las accesiones analizadas fue de $1,6 \pm 0,2$ cm y la longitud media fue $6,1 \pm 0,9$ cm. En la Figura 3, podemos observar la distribución y la tendencia central de las distintas accesiones, para los dos caracteres analizados, longitud y ancho del fruto.

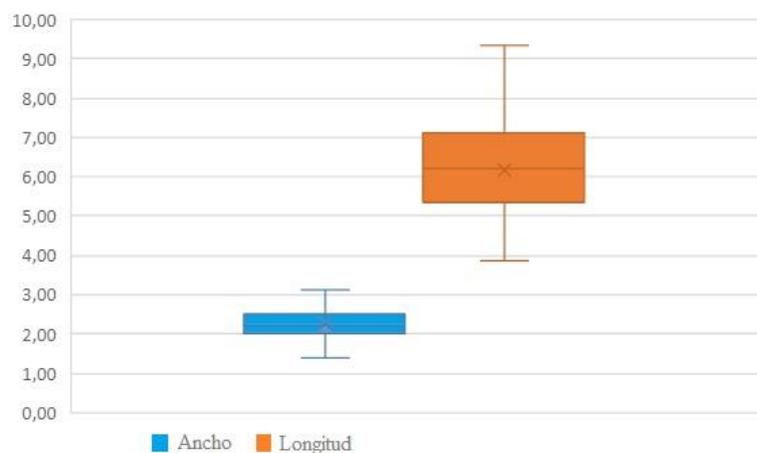


Figura 2. Ancho y longitud del ovario en 127 accesiones de *C. pepo*. Cada caja de bigotes representa la mediana y los cuartiles del ancho (azul) y la longitud (naranja) de

los ovarios en el momento de antesis de las diferentes accesiones PI de *C. pepo* analizadas.

Entre las accesiones analizadas destaco la accesión PI 614961. En algunas plantas de esta accesión los ovarios alcanzaban una longitud media de $19,3\pm 1,7$ cm y un ancho medio de $6,7\pm 0,3$ cm (Figura 3). Este tamaño de ovario, mucho mayor que en el resto de accesiones analizadas, indica el altísimo potencial partenocárpico de esta accesión. En el momento de la antesis los ovarios de estas plantas ya han alcanzado el tamaño comercial habitual para los frutos de calabacín, entre 18 y 20 cm de longitud, por lo que no necesitan ser polinizados ni tratados con hormonas exógenas para la correcta fructificación de los frutos. Lamentablemente en esta accesión se observaron dos tamaños de ovarios en antesis muy diferentes, habiendo plantas que presentaban un tamaño similar al del resto de accesiones analizadas. De este modo, la accesión PI 169416 presenta una alta variabilidad en los datos obtenidos tanto para la longitud como para el ancho (51,9 % y 46,7 % de desviación estándar respecto a la media respectivamente) por lo que dicha accesión no será incluida en el posterior análisis WGAS. Además, esta alta variabilidad indica que los genes responsables del alto potencial partenocárpico de esta accesión no están fijados en la misma.



Figura 3. Ovarios en el momento de la antesis de la accesión PI 614961 de *C. pepo*.

Los resultados obtenidos para la accesión PI 614961 confirman que el estudio del tamaño del ovario en antesis es un buen modo de analizar el potencial partenocárpico de una variedad, tal como indicaba Marcos-Espin (2010). Sin embargo, este mismo autor (Marcos-Espin, 2010) indicó que la partenocarpia en calabacín puede manifestarse con diferentes patrones de crecimiento del fruto no polinizado, es decir que los ovarios del resto de accesiones pueden seguir creciendo tras la antesis de forma partenocárpica hasta alcanzar el tamaño comercial. Aunque siempre se mantiene que las variedades con un mayor tamaño del ovario en antesis son las más partenocárpicas. Como ya dijimos en la introducción de este TFM, en el caso de *C. pepo* la partenocarpia es un carácter controlado por la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y la coordinación de fitohormonas durante la formación de los frutos (Pomares-Viciana et al., 2019). Por otro lado, trabajos realizados en *C. pepo*, con

poblaciones biparentales, indican la existencia de dos QTLs mayores que controlan la longitud de los frutos maduros e inmaduros en *C. pepo*, ambos situados en el LG6 (v3.2 del genoma de *C. pepo*) (Esteras et al., 2012). Años después, Kaźmińska et al. (2020) localizaron seis QTLs que controlaban la longitud de los frutos, dos regiones en el LG1, y cuatro en el LG14, mientras que el ancho estaría controlado por cuatro regiones, dos de ellas en el LG2 y otras dos en el LG4. Sin embargo, este trabajo (Kaźmińska et al. (2020) fue realizado en *C. máxima* por lo que no tienen que coincidir con los QTLs responsables en *C. pepo*. Una buena manera de comprobar si el tamaño del ovario en antesis de la accesión PI 169416 y su potencial partenocárpico está controlado por estos QTLs es mediante GWAS. Lamentablemente esta accesión no se pudo incluir en este análisis al no estar los genes de interés fijados en la misma, ya que el ovario en antesis presenta una gran variabilidad de tamaño. Así que para establecer las regiones genómicas o QTLs responsables de la partenocarpia de la accesión PI 614961 tendremos que recurrir a la obtención de poblaciones biparentales dentro de esta accesión en las que este carácter segregue y el posterior mapeado del carácter mediante secuenciación o mediante marcadores moleculares tipo SNPs.

Junto a la accesión PI 614961, se descartaron 18 accesiones para el carácter largo y 24 accesiones para el carácter ancho por presentar una alta variabilidad para cada uno de estos parámetros (más de un 20% de desviación estándar frente a la media), de este modo nos quedamos con 109 accesiones para analizar la longitud y 103 accesiones para el ancho.

Análisis de asociación del genoma (GWAS)

El análisis GWAS permite la identificación de regiones del genoma (QTLs que regulan caracteres) empleando la variabilidad natural completa de una especie o un género (Zargar et al., 2015). En este caso se han realizado dos análisis GWAS independientes para cada carácter (longitud y ancho) con las accesiones seleccionadas de *C. pepo* (Tabla 1).

Para hacer el análisis GWAs se necesita una alta variabilidad genética y por ello antes se realizó un análisis PCA para comprobar si nuestro panel de accesiones es adecuado para el estudio. El estudio mostró (Figura 4), que las accesiones que se utilizaron para ambos parámetros, longitud y ancho de los ovarios en antesis, se distribuían a lo largo de PC1 y PC2 independientemente del tamaño del ovario. Por tanto, estas accesiones son adecuadas para realizar el estudio GWAs.

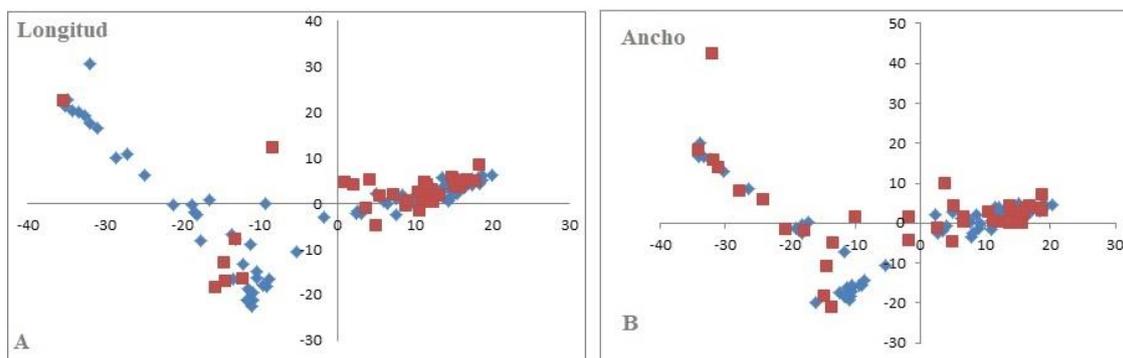


Figura 4. PCA de las diferentes accesiones PI de *C. pepo* utilizadas en el análisis WGAS. PC1 eje X y PC2 eje Y. Longitud (A), accesiones con $\leq 5,5$ cm (rojo) y $> 5,5$ cm (azul). Ancho (B), accesiones $\leq 1,5$ cm (rojo) y $> 1,5$ cm (azul). Nótese que la separación de las distintas accesiones por su genotipo es independiente del tamaño del ovario.

A pesar de que las accesiones se separaban genéticamente con independencia del carácter estudiado, para realizar el estudio WGAS se seleccionó el modelo MLM (modelo lineal mixto). Este modelo hace correcciones para evitar que tanto la estructura de la población (matriz Q) como el parentesco (matriz de parentesco o kinship) influyan en el análisis.

Además, para ambos caracteres se utilizó el método gráfico Q-Q (Figura 5) para el diagnóstico de diferencias entre la distribución de probabilidades. Estos gráficos se utilizan, además del análisis PCA, para seleccionar el mejor método de ajuste (GLM o MLM), que se determina por la precisión del mejor ajuste de la distribución de los p-valores esperados y observados. En ambos casos se ha elegido el modelo lineal mixto (MLM) que presenta un mejor ajuste y evitan la sobreestimación o subestimación de las variantes (SNPs). Los límites calculados con el método de Bonferroni identifican SNPs con asociación estadística ($\alpha=0,05$ y $\alpha=0,01$).

Una vez seleccionado el modelo de análisis y realizados los análisis WGAS, los resultados de estos se visualizaron en un gráfico tipo Manhattan para cada uno de los caracteres de interés, longitud y ancho de los ovarios. Como podemos observar en estos gráficos (Figura 5), el análisis no identificó valores significativos, tanto para $\alpha=0,05$ (5,97) como para $\alpha=0,01$ (6,67), para ninguno de los 47544 SNPs analizados, en ninguno de los dos parámetros estudiados. Por lo que no se pudo establecer ninguna región cromosómica o QTL responsable de las diferencias de longitud o ancho del ovario en anthesis observadas entre las diferentes accesiones del panel de *Cucurbita pepo* utilizados en este TFM, y por tanto tampoco de su potencial partenocárpico.

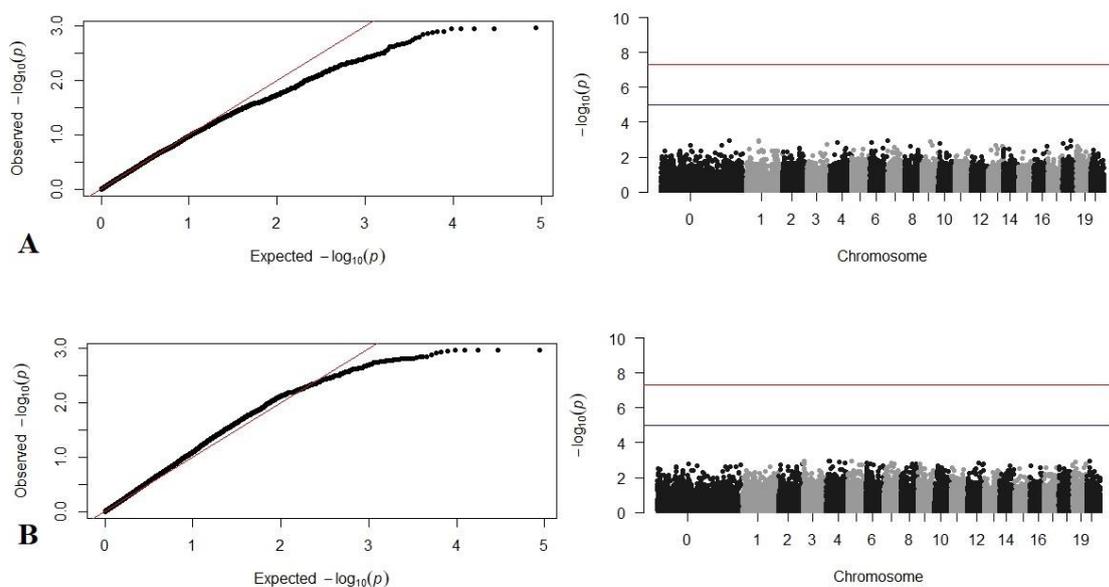


Figura 5. Resultados de los GWAS realizados con un modelo MLM para la longitud (A) y ancho (B) del ovario en antesis del panel de accesiones de *C. pepo* usado en este TFM. Gráfico QQ-Plot (izquierda) y Grafico Manhattan (derecha), las líneas azul y rojo indican los umbrales de significación $\alpha=0,05$ (azul) y $\alpha=0,01$ (rojo).

La falta de resultados en los GWAs puede deberse a que el panel de accesiones estudiado no presente suficientes variedades con valores contrastantes a nivel de fenotipo como para encontrar una asociación entre los caracteres estudiados, longitud y ancho del ovario en antesis, y el genotipado de las diferentes accesiones. Sin embargo, también hay que considerar que como se indica en la sección de material y métodos para el GWAS realizado en este TFM se han utilizado los datos GBS de cada una de las accesiones disponibles en la base de datos de genómica de cucurbitáceas (<http://cucurbitgenomics.org>; Zheng et al., 2019). El genotipado por secuenciación (GBS, *Genotyping by Sequencing*) no cubre el 100% del genoma. Este genotipado se basa en la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) de datos genómicos obtenidos a partir de los lugares de corte de enzimas de restricción (RE). En un primer paso se crean las bibliotecas de secuenciación, para ello el ADN genómico se somete al corte por enzimas de restricción. Se emplean una o dos enzimas con el propósito de reducir la complejidad del genoma y eliminar regiones repetidas o poco informativas, obteniendo así información suficiente a la vez que se reducen costes (Elshire et al., 2011). Este proceso puede conllevar la pérdida de regiones del genoma, lo que podría incluir las regiones cromosómicas responsables de controlar las variaciones en el tamaño de los ovarios en antesis en el panel de *C. pepo* estudiado en este TFM y por tanto ser uno de los motivos por el que no obtengamos resultados en nuestros análisis GWAs.

Otra cuestión que puede explicar la falta de resultados en los análisis GWAS es el momento de desarrollo elegido para la toma de datos. En este trabajo se tomaron los

datos del tamaño de los ovarios en la antesis de las flores. Sin embargo, en otros trabajos en el que se estudió el potencial partenocárpico de diferentes variedades de calabacín la caracterización fue realizada en momentos posteriores del desarrollo del fruto. Puertas-Martín (2008) caracterizó los frutos entre los 6-9 DPA (días post-antesis), tiempo suficiente para distinguir el mayor o menor grado de partenocarpia de las variedades estudiadas. Del mismo modo, Marcos-Espín (2010), realizó otro estudio en el que cuantificó el nivel de partenocarpia de varios genotipos de calabacín, y observó que, a los 6 DPA las diferencias entre frutos considerados partenocarpicos y no partenocarpicos se hacían más evidentes. Así que, una caracterización posterior (6 DPA) de los frutos de las diferentes accesiones estudiadas en este TFM podría haber ayudado a tener resultados en los análisis GWAS realizados.

Conclusión

El estudio del tamaño del ovario en antesis de un panel de variedades de *C. pepo* nos ha permitido encontrar una accesión con un alto potencial partenocárpico, PI 614961. En esta accesión se pudieron observar ovarios en antesis con un tamaño equivalente al de los frutos comerciales de calabacín, lo que indica su alto potencial partenocárpico. Lamentablemente, los genes responsables de la partenocarpia de esta accesión no se encuentran fijados, ya que no estaba presente en todas las plantas de la accesión, por lo que será necesario obtener poblaciones biparentales en las que dicho carácter segregue para estudiar los genes responsables de la misma.

Los análisis GWAs realizados no encontraron asociación entre ninguna región cromosómica y los caracteres estudiados, longitud y ancho del ovario en antesis. Esto se puede deber a una falta de variabilidad dentro del panel de accesiones estudiadas o que las regiones cromosómicas de interés hayan quedado fuera del genotipado mediante GBS. Finalmente, una caracterización más tardía de los frutos de cada accesión, 6DPA, podía haber contribuido a establecer una relación entre el potencial partenocárpico de las diferentes accesiones y las regiones cromosómicas responsables del mismo.

Referencias

- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomy Mesoamerican*, 221-242.
- Bradbury, J., Zhang, Z., Kroon, E., Casstevens, M., Ramdoss, Y., Buckler, S. (2007). TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), 2633-2635.
- Cubero, J. I. (1999). Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 365 pp.
- Dhatt, A. S., y Kaur, G. (2016). Parthenocarpy: a potential trait to exploit in vegetable crops. *Agricultural Reviews*, 37(4).

- Elshire, J., Glaubitz, C., Sun, Q., Poland, A., Kawamoto, K., Buckler, S., y Mitchell, E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6(5), e19379.
- Esteras, C., Gómez, P., Monforte, A.J., Blanca, J., Vicente-Dólera, N., Roig, C., y Picó, B. (2012). High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC Genomics* 13(1), 1-21.
- FAOSTAT 2022. Datos sobre alimentación y agricultura. <https://www.fao.org/faostat/es>
- García-Martínez J.L., Hedden, P. (1997). Gibberellins and fruit development. In: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Tomás-Barberán F.A., and Robins R.J, (eds). *Clarendon Press: Oxford*, 263–286pp.
- Gázquez, J.C., Meca, D., Soler, A., Fernández, F.J., Martínez, E.M. y Segura, M^a.D. (2007). Polinizadores naturales (*Bombus terrestris*) vs bioestimulantes para un cultivo de calabacín en invernadero. XI Congreso SECH. Albacete 2007. Estación Experimental de la Fundación Cajamar, Almería.
- Gorguet, B., Van Heusden, A. W., y Lindhout, P. (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant biology*, 7(02), 131-139.
- Gur, A., Tzuri, G., Meir, A., Sa'ar, U., Portnoy, V., Katzir, N. y Tadmor, Y. (2017). Genome-wide linkage-disequilibrium mapping to the candidate gene level in melon (*Cucumis melo*). *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Każmińska, K., Hallmann, E., Korzeniewska, A., Niemirowicz-Szczytt, K. y Bartoszewski, G. (2020). Identification of fruit-associated QTLs in Winter Squash (*Cucurbita maxima* Duchesne) using recombinant inbred lines. *Genes (Basel)*, 11(4), 419.
- Lado, L.B. (2012). Identificación de SNPs mediante genotipado por secuenciación para el mejoramiento genético de trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Magister. Universidad de la Republica, Uruguay.
- Manzano, S., Marcos, S., Martínez, C., Megías, Z., Mazet, J. y Jamilena, M. (2010). Producción de etileno y partenocarpia en calabacín. *Actas de horticultura* 55, 203-204.
- Marcos-Espín, S. (2010). Implicaciones del etileno en la partenocarpia del calabacín. Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia. Trabajo Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Madrid.
- Martínez, C., Manzano, S., Megías, Z., Garrido, D., Picó, B. y Jamilena, M. (2013). Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in fruit set and early fruit development in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *BMC Plant Biol.*, 13(1), 1-14.

- Nakano, Y. y Kobayashi, Y. (2020). Genome-wide association studies of agronomic traits consisting of field-and molecular-based phenotypes. *Reviews Agric. Sci.* 8, 28-45.
- Nitsch JP. (1970). Hormonal factors in growth and development. En: Hulme AC. (ed.) , *Thebiochemistry of fruits and their products*. Volume II. London, Academic Press, London, 427-472.
- Ozga, J. y Reinecke, D. (2003). Hormonal Interactions in fruit development. *J. Plant Growth Regul.* 22(1), 73-81.
- Pandolfini, T. (2009). Seedless Fruit Production by Hormonal Regulation of Fruit Set. (2009). *Nutrients* , 1(2), 168-177.
- Peñaranda, A., Payán, M.C., Garrido, D., Gómez, P. and Jamilena, M. (2007). The production of fruits with attached flowers in zucchini squash is correlated with the arrest of female flower maturation. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 82(4), 579-584.
- Pomares-Viciano, T., Río-Celestino, D., Román, B., Die, J., Pico, B., & Gómez, P. (2019). First RNA-seq approach to study fruit set and parthenocarpy in zucchini (Cucurbita pepo L.). *BMC plant biology*, 19(1), 1-20.
- Prohens, J. (2014). Mejora genética de la calidad nutracéutica en hortalizas. *Instituto de Conservación y Mejora de la Agro diversidad Valenciana*, 62.
- Puertas-Martín, B. (2008). Partenocarpia en calabacín: comparación del desarrollo temprano del fruto en diferentes variedades comerciales y locales. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Almería.
- Rafalski, J.A. (2010). Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2), 174-180.
- Rajwant, K. K., Manoj, K. R., Sanjay, K., Rohtas, S. y Dhawan K. A. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica.*, 177(3), 309-334.
- Reche Mármol, J. (1997). Cultivo del calabacín en invernadero / José Reche Mármol. Almería: Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos y Peritos Agrícolas de Almería.
- Robinson, R.W. y Reiners, S. (1999). Parthenocarpy in summer squash. *Hortscience.*, 34(4), 715-717.
- Rylki, I. and Aloni, B. (1990). Parthenocarpic fruit set and development in Cucurbitaceae and Solanaceae under protected cultivation in a mild winter climate. *Acta Hort.*, 287, 117-126.
- Sanz, M. (1995). Fitorreguladores para el calabacín. *Hortofruticultura.*, 33, 46-48.
- Westwood, M.N. (1993). Temperate-zone pomology. *Timper Press, Oregon*, 3, 461 pp.

- Wien, H. C. y Stützel, H. (2020). *The physiology of vegetable crops*. CABI.
- Zargar, S. M., Raatz, B., Sonah, H., Bhat, J. A., Dar, Z. A., Agrawal, G. K., y Rakwal, R. (2015). Recent advances in molecular marker techniques: insight into QTL mapping, GWAS and genomic selection in plants. *Journal of crop science and biotechnology*, 18(5), 293-308.
- Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C. Q., Todhunter, R. J., Tiwari, H. K., Gore, M. A. y Buckler, E. S. (2010). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature genetics*, 42(4), 355-360.
- Zheng, Y., Wu, S., Bai, Y., Sun, H., Jiao, C., Guo, S. y Fei, Z. (2019). Cucurbit Genomics Database (CuGenDB): a central portal for comparative and functional genomics of cucurbit crops. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1128-D1136.

Anexo I

Accesión	Nombre planta	País	Descripción	Color
PI 136448	Summer Squash	China	Summer squash.	4
PI 155301		Yemen	NA	3
PI 164957	Sakiz Kabak	Turkey	White, narrow type. Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 165018	Dolma Kabagi	Turkey	Pumpkin.	3
PI 165023	Sakiz Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 165047	Dolma kabagi	Turkey	Pumpkin.	3
PI 166992	Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 167084	Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 167097	Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 167136	Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	4
PI 167199	Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 167392	Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	4
PI 169416	Sakiz Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash. From agricultural school, Bornova, Izmir.	3
PI 169417	1461	Turkey	Seed store, Manisa, Manisa.	3
PI 169420	1508	Turkey	NA	4
PI 169422	Ak Kabak	Turkey	Long white type. Market, Korkuteli. Kabak = pumpkin/squash.	2
PI 169429	1841	Turkey	Mixed types. Market, Mugla.	3
PI 169431	Sakiz Kabagi	Turkey	Sweet type. Sakiz Kabagi =vegetable marrow pumpkin.	4
PI 169432	Dolmalik	Turkey	NA	3
PI 169435	Bal Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash. Market, Akhisar, Manisa.	4
PI 169436	Sakiz Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash. Market, Akhisar, Manisa.	4
PI 169442	Sakiz Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash. Seed stores and markets, Soma, Manisa Province.	4
PI 169443	Tezce	Turkey	Early type. From garden of Ali Kucuk Kirca, Bergama.	4
PI 169446	2359	Turkey	Seed store, Istanbul.	3
PI 169447	Kolsus Sakiz	Turkey	NA	3
PI 169454	Sakiz Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 169458	Sakiz Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 169461	2948	Turkey	NA	3
PI 169462	Sakiz Kabak	Turkey	Kabak = pumpkin/squash.	3
PI 169465	Dolmalik	Turkey	Originally from Calova.	3
PI 171625	6789	Turkey	Sweet type. Seedsman, Amasya, Amasya.	4
PI 171627	Erken	Turkey	NA	4
PI 171633	Dolmalik	Turkey	NA	4
PI 172860	7519	Turkey	Sweet type.	4
PI 172861	Dolmalik	Turkey	NA	4
PI 172866	7792	Turkey	Sweet type. From seed dealer, Van, Van.	4
PI 172870	8232	Turkey	Seed dealer, Urfa, Urfa.	3
PI 172873	Dolma	Turkey	Seedsman, Maras, Maras.	2
PI 172874	Dolmalik	Turkey	Gardener, Elbistan Maras.	3
PI 173684	Dolmalik	Turkey	Seedsman, Malatya, Malatya.	3

Tabla 1S. Accesiones PI de C.pepo utilizados en este TFM, junto con su nombre, el país de procedencia, una descripción del fruto y el color interno del fruto (1 (blanco), 2 (naranja), 3 (crema) y 4 (amarillo)).

Accesión	Nombre planta	País	Descripción	Color
PI 174182	8057	Turkey	Seed dealer, Diyarbakir.	4
PI 174187	Dolma	Turkey	Market, Birecik, Urfa.	4
PI 174188	Dolmalik	Turkey	Seed dealer, Nizip, Gaziantep.	4
PI 175707	6048	Turkey	NA	4
PI 175708	6066	Turkey	Sweet type.	2
PI 175710	Dolma	Turkey	Market, Yozgat, Yozgat.	3
PI 176534	Amasya	Turkey	Seed dealer, Amasya. Originally from Amasya, Amasya.	4
PI 176538	Dolma	Turkey	Seed dealer, Sivas, Sivas.	3
PI 179274	10105	Turkey	Common type.	4
PI 181757	Beledi	Syria	Market, Damascus.	4
PI 181764	Course	Lebanon	NA	3
PI 181944	Homs No. 10	Syria	NA	4
PI 182198	Kundur	Turkey	NA	4
PI 182199	Dolmalik	Turkey	NA	3
PI 182202	10575	Turkey	NA	4
PI 182203	10653	Turkey	NA	4
PI 206956	741	Turkey	Bazaar, Giresun.	3
PI 206957	945	Turkey	Harasi Farm, Eskisehir.	3
PI 212006	7	Iran	NA	4
PI 212008	9	Iran	NA	4
PI 212012	13	Iran	NA	4
PI 212013	14	Iran	NA	4
PI 212060		Greece	NA	4
PI 222786	Kadoo	Iran	(Kadoo, Kadu, Kaddu = pumpkin/squash.)	4
PI 234252	G56-31B	Argentina South	NA	3
PI 234615	Long White Bush	Africa South	NA	3
PI 234616	Long Green Bush	Africa	NA	3
PI 234618	Long White Bush	Australia	NA	4
PI 251791		Unknown	Source unknown.	3
PI 261610	Calabacin	Spain	Eight inches long.	4
PI 267755	Vegetable Marrow	United Kingdom	Table variety. Plants runners, vigorous, early maturing; fruit dark green, striped orange, smooth, oblong, 11 by 5 inches, four per plant. Susceptible to mosaic and powdery mildew.	3
PI 267758	Saki Kabagi	Turkey	Plants vigorous, early maturing; half-runner; leaves 15-pointed; fruit cream colored, 12 ridged, 14 by 4 inches; flesh deep. Some resistance to powdery mildew.	4
PI 267759	Murdurlugu	Turkey	Plants vigorous, bush type, early maturing; fruit cream orange, oblong, 10-ridged, 18 by 4 inches; flesh deep; seed cavity small. Susceptible to powdery mildew.	4
PI 288240	Eskandarany	Egypt	Bush type; runner length variable; fruits similar to 'Cocozelle'; color variable.	4
PI 292014	White Bush Squash	Israel	NA	4
PI 306126	Jantra	Bulgaria	NA	4
PI 344354	Sakiz	Turkey	NA	4
PI 344357	Kolsus	Turkey	NA	4

Tabla 1S. Continuación.

Accesión	Nombre planta	País	Descripción	Color
PI 355054	Mosamai	Iran	Reported to carry mosaic resistance. Received as C. maxima.	4
PI 357949	Bolta	Macedonia	NA	4
PI 357955	Bela sakaska	Macedonia	NA	3
PI 357960	Resenska	Macedonia	NA	4
PI 357968	Gotvarska	Macedonia	NA	4
PI 379307	Tikvica	Serbia	NA	3
PI 379315	Tikvica	Macedonia	NA	4
PI 379316	Tikvica	Macedonia	NA	3
PI 379317	Tikvica	Macedonia	Tikvica = squash, gourd.	4
PI 418966	Hua Yeh	China	Calabash. Bush small, short internodes. Fruit green, flat, round. Early maturity, high yield. Leaves pubescent. Fruit oblong, dark green. Growth period 50 to 60 days.	2
PI 427095		China		2
PI 431582	Pusa Alankar	India	NA	4
PI 490274	Courgette	United Kingdom	Plants bushy. Fruit oblong, smooth, mottled.	4
PI 491201	Combocolokitho	Greece	Semi-bush, zucchini type. Skin light. Yield high.	3
PI 507886	2701060	Hungary	NA	4
			Donor description: Bush zucchini type. Maturity 50-55 days. Fruit cylindrical, yellow, 20-25cm long, 4-4.5cm diam., 250-300g, tasty. Flesh light yellow. Curator comment: Fruit oblong 35 to 37 cm x 10 cm wide; smooth; green speckled with yellow. Flesh cream, 1.6 cm thick; 64 hand-sib pollinations made between 7/13 and 8/2/1988; approximately 2 males:1 female; 24 fruit harvested.	
PI 508468	Golden Zucchini	"Korea	Sown March, transplanted May. Harvested in July-August. Used for self-consumption.	4
PI 512710	AN-CU-1	Spain	Sown May-June, harvested September-October. Used cooked and for stew.	3
PI 512739	AN-CU-36	Spain	Sown March, harvested July. Self-consumption and markets.	4
PI 512757	C-CU-2	Spain	Sown May, harvested August-September. Self-consumption.	4
PI 512776	C-CU-22	Spain	Sown March, harvested July-August. Self-consumption.	2
PI 512780	C-CU-26	Spain	Sown beginning May, harvested July-August.	4
PI 512782	CM-CU-4	Spain	Sown May, harvested August.	4
PI 512785	CM-CU-7	Spain	Sown May, harvested August.	4
PI 512793	E-CU-9	Spain	Sown April, harvested August. Used for stew.	4
PI 512794	E-CU-10	Spain	Sown April, harvested August. Used for stew.	3
PI 512804	V-CU-2	Spain	Sown March-April, harvested June.	4
			Sown March-April, harvested June-September. Self-consumption	
PI 512810	V-CU-10	Spain	Sown April, harvested June. Self-consumption.	4
PI 512817	V-CU-18	Spain	Sown May, harvested July-August. Self-consumption.	4
PI 512834	V-CU-50	Spain	Sown March, harvested September. Used for stew.	3
PI 512837	V-CU-54	Spain	Sown May, harvested October. Used for hay.	3
PI 512880	V-CU-116	Spain	Sown February, harvested April. Powdery mildew and viruses observed	2
PI 525166	9	Egypt	Local type	2
PI 525169	54	Egypt	Local type. Sown February, harvested April. Powdery mildew, red spider, virus, and aphids observed.	2
PI 525170	65	Egypt		2

Tabla S1. Continuación

Accesión	Nombre planta	País	Descripción	Color
PI 525175	141	Egypt	Local type.	2
PI 525176	157	Egypt	Local type. Sown November, harvested January	3
PI 525177	165	Egypt	Sown March, harvested April. Not grown in Delta in	4
PI 525181	Eskanderani	Egypt	Nov., Dec., Jan.	2
PI 597784	Allie	United States	NA	1
PI 599994	Black Magic	United States	NA	4
PI 615103	Oland	Sweden	NA	4
PI 615109	Trailing Green Marrow	United Kingdom	NA	2
PI 615139	Calabacín largo	Spain	Sown February, harvested September-November. Used as food.	4
PI 615148	Sote 38	Moldova	NA	4
PI 615154	7000	Nepal	NA	4

Tabla S1. Continuación.