

GENETIC VARIABILITY IN *Sechium* spp. (Cucurbitaceae) EVALUATED WITH AFLP MARKERS

VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Sechium* spp. (Cucurbitaceae) EVALUADA CON MARCADORES AFLP

María Isabel **Iñiguez-Luna**^{1,7}, Jorge **Cadena-Iñiguez**^{1,7*}, Moisés **Cortés-Cruz**^{1,2,7}, Francisco Javier **Morales-Flores**^{1,7}, Kazuo N. **Watanabe**³, Ryoko **Machida-Hirano**⁴, Ramón Marcos **Soto-Hernández**^{5,7}, Carlos H. **Avendaño-Arrazate**^{2,6}

¹Colegio de Posgraduados, Innovación en Manejo de Recursos Naturales, Campus San Luis Potosí, México. * Autor para correspondencia: (jocadena@gmail.com). ²Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, Tepatitlán de Morelos Jalisco, Mexico. ³Tsukuba Plant Innovation Research Center, University of Tsukuba, Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki Prefecture, 305-8571, Japan. ⁴Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan. ⁵Programa de Botánica Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. ⁶Campo Agrícola Experimental Rosario Izapa-INIFAP, Tuxtla Chico, Chiapas, México. ⁷Interdisciplinary Research Group at *Sechium edule* in México, A.C., Texcoco, México. †Fallecido / Deceased (2021).

ABSTRACT

There are few studies in Mexico aimed at evaluating the genetic variability of *Sechium* spp. Despite certain biological variants are reported with very high potential to develop antineoplastic supplements to treat public health conditions. Using the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique, the genetic variability of a sample of 95 accessions of three species of *Sechium* (*S. edule*, *S. chinantlense*, *S. compositum*) was evaluated, with leaf DNA from the Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* in Mexico. Four combinations of AFPL were applied (EcoRI + ACC/MseI + CAC, EcoRI + ACC/MseI + CAT, EcoRI + ACC/MseI + CGC, and EcoRI + ACC/MseI + CGG). DNA samples were classified into three groups based on the flavour of the fruit (sweet, neutral, bitter). An average of 47.91% polymorphism, 0.16 heterozygosity, 32.83 number of polymorphic bands, and a zero Wright fixation index (F_{st}) was obtained. The evidence showed that the domesticated accessions (sweet, neutral) were separated from the bitter-taste genotypes. A monophyletic tree was generated with the genetic distance matrix and the neighbour-joining methodology. Analyses showed *S. edule* as the root taxon, deriving *S. compositum* and *S. chinantlense* as subgroups, and suggesting that there is not enough differentiation to treat them as separate species. The evaluated

RESUMEN

En México existen pocos estudios dirigidos a la evaluación de la variabilidad genética de *Sechium* spp. A pesar de que existen reportes de ciertas variantes biológicas con potencial muy alto para desarrollar suplementos antineoplásicos para el tratamiento de enfermedades de salud pública. Por medio del análisis de polimorfismo de fragmentos con longitud amplificada (AFLP, Amplified fragment length polymorphism) se evaluó la variabilidad genética de una muestra de 95 accesiones de tres especies de *Sechium* (*S. edule*, *S. chinantlense*, *S. compositum*), a partir de ADN foliar del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* en México. Cuatro combinaciones de AFPL se aplicaron (EcoRI + ACC/MseI + CAC, EcoRI + ACC/MseI + CAT, EcoRI + ACC/MseI + CGC y EcoRI + ACC/MseI + CGG). Las muestras de ADN se clasificaron en tres grupos según el sabor del fruto (dulce, neutro, amargo). Para polimorfismo se obtuvo un promedio de 47.91%, 0.16 para heterocigosidad, y 32.83 como número de bandas polimórficas; además de un índice de fijación de Wright (F_{st}) de cero. La evidencia mostró que las accesiones domesticadas (dulce, neutra) se separaron de los genotipos de sabor amargo. El árbol monofilético se generó con la matriz de distancia genética y el método de unión de vecinos. El análisis mostró a *S. edule* como el taxón raíz y derivó a *S. compositum* y *S. chinantlense* como subgrupos, y sugirió que no hay diferenciación suficiente para tratarlos como especies separadas. La muestra evaluada probó que no existe una barrera reproductiva aparente para el cruzamiento genético. Los genotipos se comportaron como un complejo con dinamismo evolutivo; esa complejidad genética permitiría el diseño de nuevas variantes.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6427-0646>

Received: November, 2020. Approved: October, 2021.

Published in *Agrociencia* 55: 611-626. 2021.

sample showed that there is no apparent reproductive barrier for genetic cross breeding. Genotypes behaved as a complex with evolutive dynamism; that genetic complexity would allow the design of new variants.

Key words: chayote; *Sechium* spp., domestication; diversity; genotype

INTRODUCTION

In contrast to other cultivated species, there is no archaeological evidence nor relics that help to specify the origin of *Sechium* spp. (Cucurbitaceae) and their ancient management. The fleshy fruit and the soft head of the seed do not allow conservation (Lira-Saade *et al.*, 1999). The best evidence of their origin is the existence of wild *Sechium* spp. fruit-varieties in the central and southern region of Mexico and Central America. Older studies did not show evidence of the existence of an ancestor of the current wild relatives (Lira-Saade and Chiang, 1992). Nowadays, ten species are accepted in the *Sechium* genus: eight wild ones and two cultivated ones (*S. tacaco* and *S. edule*) with distribution from Mexico to Panama (Lira-Saade *et al.*, 1999).

In Mexico, a broad morphological variation in the genus has been reported in the states of Chiapas, Oaxaca and Veracruz, along with the presence of *S. hintonii*, *S. chinantlense*, *S. compositum* and *S. edule*. Only the last one is used as food (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2011). Lira-Saade *et al.* (1999) proposed a taxonomic classification of *S. edule*, suggesting *Sechium edule edule* and *Sechium edule silvestre* as subspecies. The considerations on which those authors based this separation were the morphological and chromosomal differences found through the identification of karyotypes. Later, Cadena-Íñiguez *et al.* (2011; 2013) described 12 varietal groups of *S. edule*, through morpho-structural, biochemical and genetic characterization allowing identification, conservation, and systematic research.

Some secondary traits were highlighted as stable and hereditary. Nevertheless, there are other traits that respond to environmental factors, generating epigenetic expressions, and modifying the phenotype without altering the genome (Cruz-Requena *et al.*, 2013). The same pattern can be explained by different population histories. Molecular tools should be used in order to trace the lines along which information

Palabras clave: chayote; *Sechium* spp., domesticación; diversidad; genotipo

INTRODUCCIÓN

A diferencia de otras especies cultivadas, no existen evidencias arqueológicas ni relictos que ayuden a precisar el origen de *Sechium* spp. (Cucurbitaceae) y su manejo ancestral. El fruto carnoso y la testa blanda de la semilla no permiten la conservación (Lira-Saade *et al.*, 1999). La mejor evidencia de su origen es la existencia de una variedad de frutos silvestres de *Sechium* spp. en la región central y sur de México y Centroamérica. Estudios antiguos no mostraron evidencia de la existencia de un antepasado de las líneas parentales silvestres actuales (Lira-Saade y Chiang, 1992). En la actualidad se aceptan diez especies del género *Sechium*: ocho silvestres y dos cultivadas (*S. tacaco* y *S. edule*) con distribución desde México hasta Panamá (Lira-Saade *et al.*, 1999).

En México se ha documentado una amplia variación morfológica del género en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz; así como la presencia de *S. hintonii*, *S. chinantlense*, *S. compositum* y *S. edule*. Solo el último se utiliza como alimento (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2008). Lira-Saade *et al.* (1999) propuso una clasificación taxonómica de *S. edule*, y sugirió a *Sechium edule edule* y *Sechium edule silvestre* como subspecies. Las consideraciones en las cuales esos autores basaron la separación fueron las diferencias morfológicas y cromosómicas encontradas a través de la identificación de cariotipos. Después, Cadena-Íñiguez *et al.* (2011; 2013) describieron 12 grupos varietales de *S. edule* por medio de una caracterización morfoestructural, bioquímica y genética que facilitó la investigación para identificación, conservación y sistemática.

Algunos rasgos secundarios se destacaron como estables y hereditarios. No obstante, existen otros que responden a factores ambientales y generan expresiones epigenéticas que modifican el fenotipo sin alterar el genoma (Cruz-Requena *et al.*, 2013). El mismo patrón puede explicarse por las diferentes historias de las poblaciones. Algunas herramientas moleculares se pueden utilizar para trazar las líneas a lo largo de las cuales se puede obtener información con un número ilimitado de marcadores. Esto permite identificar diferencias genéticas entre individuos o especies, al actuar como señales asociadas con los genes que

can be obtained with an unlimited number of markers. This allows to identify genetic differences between individuals or species, acting as signals associated with genes which control the characteristic of interest (Idrees and Irshad, 2014).

The development of techniques that use DNA has generated unique genetic profiles for each organism, determined by dominant or codominant aspects (Emanuelli *et al.*, 2013). It should be highlighted that these molecular tools are reliable and sensitive as they are not influenced by the environment. Additionally, these techniques do not depend on the physiological state of the individual, allowing phylogenetic evaluations of diversity and organization of the genome (Ben-Ayed *et al.*, 2013; Sabir *et al.*, 2014). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a reproducible technique which generates numerous polymorphic fragments in such a way that no prior sequence information is required to obtain the DNA sequence from the material of interest (Vekemans *et al.*, 2002).

There are few studies directed at the research of the genetic diversity of *Sechium* spp. (P. Browne) accessions in Mexico, and the number of studies done with the support of molecular markers is even smaller (Machida-Hirano *et al.*, 2015; Barrera-Guzmán *et al.*, 2021). Therefore, it is relevant to start identifying the genetic variability of a sample from the biological collection of *Sechium* spp., and to describe the dynamism of genetic differentiation which would lead to new approaches for use and conservation. On the basis of previous research regarding three *Sechium* species, morphological characters show some intra-species variation (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2013); one species with noticeable characteristics attributed to domestication and environmental adaptation, while the other two are wild. Thus, the objective was to study the genetic variability of three *Sechium* species through AFLP in order to identify genetic affinities which may ease the selection of genotypes for genetic improvement.

MATERIALS AND METHODS

The biological material was obtained from the Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* (BANGESe) at Huatusco, Veracruz, Mexico (19° 08' 48" N; 97° 57' 00" W). There, 95 accessions were collected and classified based on contrasting characteristics (Figure 1), such as colour of the

controlan la característica de interés (Idrees e Irshad, 2014).

El desarrollo de técnicas que utilizan al ADN ha generado perfiles genéticos únicos para cada organismo, determinados por aspectos dominantes o codominantes (Emanuelli *et al.*, 2013). Cabe destacar que estas herramientas moleculares son confiables y sensibles; ya que el ambiente no influye sobre ellas. Además, estas técnicas no dependen del estado fisiológico del individuo, lo cual permite evaluaciones filogenéticas de la diversidad y organización del genoma (Ben-Ayed *et al.*, 2013; Sabir *et al.*, 2014). El polimorfismo de fragmentos con longitud amplificada (AFLP) es una técnica repetible que genera fragmentos polimórficos numerosos de tal manera que no se requiere información de secuencia previa para obtener la secuencia de ADN del material de interés (Vekemans *et al.*, 2002).

Aún existen pocos estudios dirigidos a la investigación de la diversidad genética de accesiones de *Sechium* spp. (P. Browne) en México y el número de estudios realizados con el apoyo de marcadores moleculares es aún menor (Machida-Hirano *et al.*, 2015; Barrera-Guzmán *et al.*, 2021). Por tanto, es relevante identificar la variabilidad genética de una muestra de la colección biológica de *Sechium* spp., y describir el dinamismo de la diferenciación genética que conduzca a nuevos enfoques de uso y conservación. Sobre la base de investigaciones previas acerca de tres especies de *Sechium*, los caracteres morfológicos muestran alguna variación intra específica (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2013); una especie con características notables atribuidas a la domesticación y adaptación ambiental, mientras que las otras dos son silvestres. Así, el objetivo fue estudiar la variabilidad genética de tres especies de *Sechium* por medio de AFLP para identificar afinidades genéticas que faciliten la selección de genotipos para mejora genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico fue recuperado del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* (BANGESe) en Huatusco, Veracruz, México (19° 08' 48" N; 97° 57' 00" O). Allí, 95 accesiones se recolectaron y clasificaron con base en características contrastantes (Figura 1), como color de fruto (amarillo, verde claro y verde oscuro), sabor de fruto (dulce, neutro y amargo) y nivel de domesticación (silvestre, domesticado y semi domesticado) (Cuadro 1).

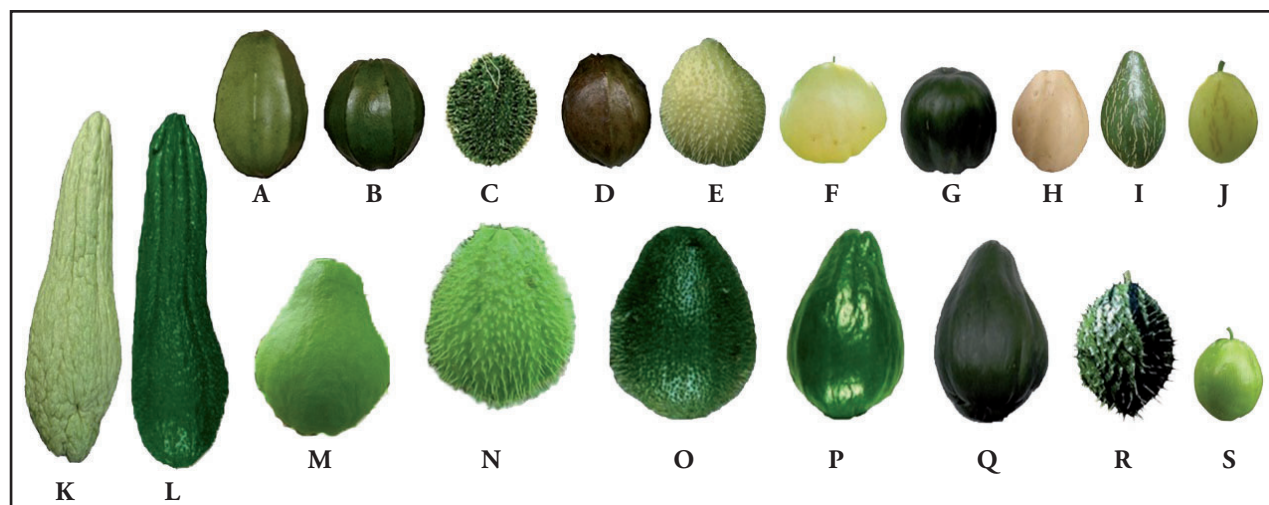


Figure 1. Representative phenotypes of the fruits of genotypes of *Sechium* spp., (A) *Sechium compositum* “Mal Paso” type; (B) *S. compositum* “Talismán” type; (C) *S. edule* wild type; (D) *S. chinantlense*; (E) *S. edule albus spinosum*; (F) *S. edule albus levis*; (G) *S. edule nigrum levis*; (H) *S. edule albus dulcis*; (I) *S. edule nigrum conus*; (J) *S. edule albus minor*; (K, L) *S. edule nigrum maxima*; (M) *S. edule virens levis*; (N, O) *S. edule nigrum spinosum*; (P, Q) *S. edule nigrum xalapensis*; (R) *S. edule amarus sylvestris*; and (S) *S. edule nigrum minor*.

Figura 1. Fenotipos representativos de frutos de los genotipos de *Sechium* spp., (A) *Sechium compositum* tipo “Mal Paso”; (B) *S. compositum* tipo “Talismán”; (C) *S. edule* de tipo silvestre; (D) *S. chinantlense*; (E) *S. edule albus spinosum*; (F) *S. edule albus levis*; (G) *S. edule nigrum levis*; (H) *S. edule albus dulcis*; (I) *S. edule nigrum conus*; (J) *S. edule albus minor*; (K, L) *S. edule nigrum maxima*; (M) *S. edule virens levis*; (N, O) *S. edule nigrum spinosum*; (P, Q) *S. edule nigrum xalapensis*; (R) *S. edule amarus sylvestris*; y (S) *S. edule nigrum minor*.

fruit (yellow, light green and dark green), flavour of the fruit (sweet, neutral, and bitter), and level of domestication (wild, domesticated, and semi-domesticated) (Table 1).

Extraction and evaluation of DNA with AFLP markers

The DNA was obtained from young and healthy leaves conserved at -80°C and freeze-dried in Labconco Freezone 12 (-82°C , 3.58 Pa; Kansas, USA) equipment, then ground in a pellet homogenizer Tissue Lyser II (QUIAGEN) for 90s at 30Hz. The DNA was extracted by the CTAB (Cetyl-Trimethylammonium Bromide) method, according to the protocol of Saghai-Marooof (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2005), using 50 mg of dry material ground per accession. The DNA concentration was determined by spectrophotometry with the Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) equipment. The quality and integrity of the DNA was evaluated through the electrophoresis of 100 ng of DNA in an agarose gel (1%) at 80 V for 45 min. The AFLP reactions were conformed to the method originally proposed by Vos (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2005). The DNA (500 ng) material was prepared by double digestion with the enzymes EcoRI, and MseI ($10\text{ U }\mu\text{g}^{-1}$, and $2.5\text{ U }\mu\text{g}^{-1}$) at 37°C for 4h.

Extracción y evaluación de ADN con marcadores AFLP

El ADN se obtuvo de hojas jóvenes y sanas conservadas a -80°C y liofilizadas en un equipo Labconco Freezone 12 (-82°C , 3.58 Pa; Kansas, EE. UU.). Luego trituradas en un homogeneizador de pellets Tissue Lyser II (QUIAGEN) durante 90s a 30Hz. El ADN se extrajo por el método CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio), según el protocolo de Saghai-Marooof (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2005), con 50 mg de material seco triturado por accesión. La concentración de ADN se determinó por medio de espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE. UU.). La calidad e integridad del ADN se evaluó a través de electroforesis de 100 ng de ADN en gel de agarosa (1%) a 80V durante 45 min. Las reacciones de AFLP se conformaron según el método original propuesto por Vos (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2005). El material de ADN (500 ng) se preparó por digestión doble con las enzimas EcoRI y MseI ($10\text{ U }\mu\text{g}^{-1}$ y $2.5\text{ U }\mu\text{g}^{-1}$) a 37°C durante 4h.

Una vez evaluados los fragmentos de restricción por medio de electroforesis en agarosa al 0.8% a 80V durante 70 min; la ligación se realizó con la adición de 10 μL de una mezcla de adaptadores a 5 mg kg^{-1} a la enzima ADN T4-ligasa en una concentración final de 1U para unir los extremos cohesivos. Para la

Table 1. Classification traits of the *Sechium* spp. accessions obtained from the Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* (BANGeSe), Huatusco, Veracruz; Mexico.**Cuadro 1. Rasgos de clasificación de las accesiones de *Sechium* spp. recuperadas del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* (BANGeSe), Huatusco, Veracruz; México.**

Genotype	Accession	Colour / flavour	Status	Genotype	Accession	Colour / flavour	Status
<i>albus levis</i>	761.49	Y/S	semi-domesticated	<i>albus levis</i>	764.44	Y/S	semi-domesticated
<i>albus spinosum</i>	805.1	Y/S	semi-domesticated	<i>virens levis</i>	911.7	G/N	domesticated
<i>virens levis</i>	804.34	G/N	domesticated	<i>albus dulcis</i>	912.11	Y/S	semi-domesticated
<i>albus levis</i>	369.35	Y/S	semi-domesticated	<i>nigrum xalapensis</i>	646.13	G/N	domesticated
<i>albus dulcis</i>	286.3	Y/S	semi-domesticated	<i>virens levis</i>	610.86	G/N	domesticated
<i>nigrum spinosum</i>	803.36	G/N	domesticated	<i>albus minor</i>	330.58	Y/S	semi-domesticated
<i>virens levis</i>	273.4	G/N	domesticated	<i>virens levis</i>	913.15	G/N	domesticated
<i>nigrum minor</i>	698.37	G/N	domesticated	<i>albus levis</i>	719.51	Y/S	semi-domesticated
<i>nigrum xalapensis</i>	530.5	G/N	domesticated	<i>albus levis</i>	719.52	Y/S	semi-domesticated
Hybrid (<i>albus minor/perla negra</i>)	709.67	DG/B	wild	<i>nigrum spinosum</i>	766.53	G/N	domesticated
<i>albus levis</i>	346.40	Y/S	semi-domesticated	<i>virens levis</i>	676.16	G/N	domesticated
<i>nigrum spinosum</i>	411.41	G/N	domesticated	<i>albus dulcis</i>	914.17	Y/S	semi-domesticated
<i>nigrum spinosum</i>	412.42	G/N	domesticated	<i>nigrum spinosum</i>	735.54	G/N	domesticated
<i>virens levis</i>	765.6	G/N	domesticated	<i>albus dulcis</i>	915.20	Y/S	semi-domesticated
<i>albus levis</i>	761.22	Y/S	semi-domesticated	HD Victor-1	644.55	DG/B	wild
<i>albus dulcis</i>	286.3	Y/S	semi-domesticated	<i>virens levis</i>	916.23	G/N	domesticated
<i>virens levis</i>	361.9	Y/N	domesticated	<i>albus levis</i>	719.56	Y/S	semi-domesticated
<i>S.chinantlense</i>	747.61	DG/B	wild	<i>nigrum xalapensis</i>	628.24	G/N	domesticated
<i>virens levis</i>	726.10	G/N	domesticated	<i>nigrum xalapensis</i>	628.25	G/N	domesticated
<i>albus minor</i>	709.45	Y/S	semi-domesticated	<i>nigrum levis</i>	700.27	G/N	domesticated
Hybrid (<i>chinantlense</i>)	387.66	DG/B	wild	<i>albus minor</i>	330.50	Y/S	semi-domesticated
<i>nigrum levis</i>	263.12	G/N	domesticated	<i>nigrum xalapensis</i>	530.28	G/N	domesticated
<i>nigrum maxima</i>	745.46	G/N	domesticated	<i>albus dulcis</i>	917.29	Y/S	semi-domesticated
<i>virens levis</i>	360.14	G/N	domesticated	<i>nigrum spinosum</i>	746.59	G/N	domesticated
<i>albus levis</i>	761.33	Y/S	semi-domesticated	<i>nigrum xalapensis</i>	747.71	G/N	domesticated
<i>albus levis</i>	761.43	Y/S	semi-domesticated	<i>albus dulcis</i>	918.31	Y/S	semi-domesticated
<i>virens levis</i>	504.18	G/N	domesticated	<i>nigrum xalapensis</i>	630.63	G/N	domesticated
<i>virens levis</i>	508.19	G/N	domesticated	<i>albus dulcis</i>	608.32	Y/S	semi-domesticated
<i>nigrum xalapensis</i>	750.21	G/N	domesticated	<i>nigrum spinosum</i>	651.64	G/N	domesticated
<i>albus levis</i>	761.48	Y/S	semi-domesticated	Hybrid (HDVictor)	643.65	DG/B	wild
<i>nigrum xalapensis</i>	529.26	G/N	domesticated	Hybrid (<i>S. chinantlense</i>)	387.88	DG/B	wild
<i>virens levis</i>	516.30	G/N	domesticated	<i>S. edule</i>	652.68	DG/B	wild
<i>virens levis</i>	612.2	G/N	domesticated	<i>S. chinantlense</i>	636	DG/B	wild
<i>albus dulcis</i>	768.38	Y/S	semi-domesticated	<i>S. edule</i>	652.70	DG/B	wild
<i>nigrum spinosum</i>	802.39	G/N	domesticated	<i>S. edule</i>	659-91	DG/B	wild
Hybrid	634.75	DG/B	wild	<i>S. edule</i>	661	DG/B	wild
<i>S. compositum</i>	20.76	DG/B	wild	<i>Nigrum spinosum</i>	658.57	G/N	domesticated
Hybrid (<i>S. chinantlense</i>)	387.72	DG/B	wild	<i>S. edule</i>	652.90	DG/B	wild
Hybrid (HDVictor 6)	649.78	DG/B	wild	<i>S. edule</i>	659-e	DG/B	wild
<i>S. edule wild type</i>	12.79	DG/B	wild	<i>nigrum spinosum</i>	657.60	G/N	domesticated
<i>S. edule wild type</i>	653.80	DG/B	wild	Hybrid (HDVictor 5)	648.92	DG/B	wild
<i>S. edule Wild</i>	659.73	DG/B	wild	<i>S. edule</i>	653.93	DG/B	wild
<i>S. compositum</i>	20.76	DG/B	wild	<i>nigrum spinosum</i>	658.62	G/N	domesticated
Hybrid (<i>n. spinosum</i> × <i>S. compositum</i>)	634.82	DG/B	wild	<i>S. compositum</i>	6.94	DG/B	wild
<i>S. edule wild type</i>	653.83	DG/B	wild	Perla negra	631	DG/B	wild
<i>S. edule wild type</i>	653.84	DG/B	wild	Hybrid (<i>S. chinantlense</i>)	387.77	DG/B	wild
<i>S. edule wild type</i>	659.85	DG/B	wild	<i>S. compositum</i>	921.89	G/B	wild
<i>virens levis</i>	610.47	G/N	domesticated	Hybrid (<i>n. spinosum</i> × <i>S. compositum</i>)	635.87	DG/B	wild

Y: yellow; G: green; DG: dark green; S: sweet; N: neutral; B: bitter. ♦ Y, amarillo; G, verde; DG, verde oscuro; S, dulce; N, neutro; B, amargo.

Once the restriction fragments were evaluated through electrophoresis in agarose at 0.8% at 80V for 70 min; the ligation was performed by adding 10 μ L of a mixture of adapters at 5 mg kg^{-1} to T4 DNA ligase enzyme at a final concentration of 1U for uniting the cohesive ends. For the pre-amplification, 4 μ L of the ligation product were mixed with 21 μ L of the primer mixture MseI+EcoRI with a final concentration of 5 μ M and 10.5 μ L of SIGMA REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, and the volume was adjusted to 25 μ L with type I water. The thermocycler was programmed at 94 °C for 30s, 56 °C for 60s, and 72 °C for 60s, during 25 cycles.

The result from this PCR was corroborated in agarose gel at 0.8% for 60 min at 80V, and later a dilution of the pre-amplification reaction was made with 80 μ L of type I water. For the selective amplification, 3.0 μ L of the pre-amplification dilution were taken; 3 μ M Eco RI + ACC marked with FAM, 5 μ M Mse I + CAC, and 1x SIGMA REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix were added for a final volume of 10 μ L. The combinations EcoRI+ACC/MseI+CAC; Eco RI+ACC/MseI+CAT; EcoRI+ACC/MseI+CGC; EcoRI+ACC/MseI+CGG were tested under the same conditions.

The thermocycler was programmed at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles (95 °C for 40s, 54 °C for 40s, and 72 °C for 90s), and then there was final elongation at 72 °C for 10 min. The product of the amplification was observed by polyacrylamide gel electrophoresis at 6%, at 200V for 3h; the gels were stained with silver nitrate, then a 1:10 dilution with formamide was made for the PCR-selective products, which were evaluated in a capillary sequencer, 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Scientific, USA), at the predetermined conditions for the fragment analysis (Instrument Protocol: FragmentAnalysis50_POP7xl_2; Size-calling Protocol: Fragment_Analysis_PA_Protocol).

For the principal coordinates analysis (PCoA), percentage of polymorphism per band, and percentage of variation explained, an analysis was performed with the software AFLP-SURV v.1.0 (Vekemans *et al.*, 2002). To generate the tree, it was analysed with MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016) by means of the neighbour-joining analysis and the absence-presence matrix of distances calculated with the Nei-Lynch formula. With the Structure v.2.3.4 software (Pritchard *et al.*, 2000) a Bayesian analysis was performed based on the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm, in order to assign individuals to populations based on their genotypes. Simultaneously estimating the frequency of alleles of the populations studied and identifying the structure of the populations by explaining the presence of Hardy-Weinberg or linkage disequilibrium (Hausdorf and Hennig, 2010). The

pre amplificación se mezclaron 4 μ L del producto de ligación con 21 μ L de la mezcla de iniciadores MseI + EcoRI con una concentración final de 5 μ M y 10.5 μ L de la mezcla para reacción de PCR SIGMA REDTaq® ReadyMix™, y el volumen se ajustó a 25 μ L con agua tipo I. El termociclador se programó a 94 °C durante 30s, 56 °C durante 60s y 72 °C durante 60s, durante 25 ciclos.

El resultado de esta PCR se corroboró en gel de agarosa al 0.8% durante 60 min a 80V, y después se realizó una dilución de la reacción de pre amplificación con 80 μ L de agua tipo I. Para la amplificación selectiva se tomaron 3.0 μ L de la dilución de pre amplificación; y se añadieron 3 μ M de EcoRI + ACC marcado con FAM, 5 μ M de MseI + CAC y 1x SIGMA REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix para un volumen final de 10 μ L. Las combinaciones EcoRI+ACC/MseI+CAC; EcoRI+ACC/MseI+CAT; EcoRI+ACC/MseI+CGC; EcoRI+ACC/MseI+CGG se probaron en las mismas condiciones.

El termociclador se programó a 95 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos (95 °C durante 40s, 54 °C durante 40s y 72 °C durante 90s), y luego hubo un alargamiento final a 72 °C durante 10 min. El producto de la amplificación se observó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, a 200V durante 3h; los geles se tiñeron con nitrato de plata, luego se realizó una dilución 1:10 con formamida para los productos selectivos de PCR, los cuales se evaluaron en un secuenciador capilar, 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Scientific, USA), en las condiciones predeterminadas para el análisis de fragmentos (Protocolo del instrumento: FragmentAnalysis50_POP7xl_2; Protocolo de recuperación por tamaño de fragmento: Fragment_Analysis_PA_Protocol).

Para el análisis de coordenadas principales (PCoA), porcentaje de polimorfismo por banda y porcentaje de variación explicada se realizó un análisis con el software AFLP-SURV v.1.0 (Vekemans *et al.*, 2002). Para generar el árbol se analizó con MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016) por el método de unión de vecinos y la matriz de distancias por ausencia-presencia calculada con la fórmula de Nei-Lynch. Con el programa Structure v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) se realizó un análisis Bayesiano basado en el algoritmo Monte Carlo por cadenas de Markov (MCMC), con el fin de asignar individuos a poblaciones en función de sus genotipos. Además de estimar de manera simultánea la frecuencia de alelos de las poblaciones estudiadas e identificar la estructura de las poblaciones al explicar la presencia de equilibrio Hardy-Weinberg o desequilibrio por ligamiento (Hausdorf and Hennig, 2010). La evaluación se realizó con 277 loci de alelos con un pre análisis de 10 000 repeticiones y con 100 000 repeticiones de MCMC como análisis final.

evaluation was done with 277 allele loci with a pre-analysis of 10 000 repetitions, and with 100 000 MCMC repetitions as final analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The four combinations selected showed good informative quality when amplified between 48-108 bands. The EcoRI+ACC/MseI+CGA combination showed the lowest number of polymorphic bands for the three groups, while EcoRI + ACC/MseI + CGG was the combination with the highest number of bands, generating a total of 277 polymorphic bands for 95 amplified samples. Percentage of polymorphism expected heterozygosity (He), and number of polymorphic bands obtained with AFLP-SURV v.1.0 per group and combination of AFLP markers were recorded (Table 2). Out of the three groups evaluated, the third which included the wild types of *S. edule*, *S. chinantlense* and *S. compositum* of bitter taste, presented the highest indexes for the three traits, indicating that they are the populations with the greatest genetic variation, although not expressed morphologically.

Group 1, including those fruits (*chayotes*) of sweet flavour, yellow colour and without spines, was the most differentiated morphologically. However, they showed the lowest levels of heterozygosity (0.1502), suggesting that phenotypical differences are products of environmental adaptation (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2011). Similar values of heterozygosity were obtained for group 2 (0.1542), including *chayotes* of green colour, neutral flavour, with and without spines, where the genotypes of highest preference

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cuatro combinaciones seleccionadas mostraron una calidad informativa buena cuando se amplificaron entre 48-108 bandas. La combinación EcoRI+ACC/MseI+CGA mostró el número menor de bandas polimórficas para los tres grupos, mientras que EcoRI+ACC/MseI+CGG fue la combinación con mayor número de bandas que generó un total de 277 bandas polimórficas para 95 muestras amplificadas. El porcentaje de polimorfismo, heterocigosidad esperada (He) y número de bandas polimórficas obtenidas con AFLP-SURV v.1.0, se registraron por grupo y combinación de marcadores AFLP (Cuadro 2). De los tres grupos evaluados, el tercero que incluyó los tipos silvestres de *S. edule*, *S. chinantlense* y *S. compositum* de sabor amargo, presentó los índices más altos en los tres rasgos, lo cual indicó que se trata de las poblaciones con variación genética mayor, aunque no se exprese morfológicamente.

El grupo 1, compuesto por chayotes de sabor dulce, color amarillo y sin espinas, fue el más diferenciado morfológicamente. Sin embargo, mostraron los niveles más bajos de heterocigosidad (0.1502), lo cual sugiere que las diferencias fenotípicas son producto de adaptación ambiental (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2011). Valores similares de heterocigosidad se obtuvieron para el grupo 2 (0.1542), conformado por chayotes de color verde, sabor neutro, con y sin espinas, en el cual se ubicaron los genotipos con preferencia mayor por parte de los consumidores. Algunos estudios señalaron que las variedades domesticadas pueden mostrar una diferenciación genética mayor respecto al ancestro silvestre debido a la domestica-

Table 2. Values of traits of *Sechium* spp. determined in AFLP-SURV v.1.0.
Cuadro 2. Valores de rasgos de *Sechium* spp. determinados en AFLP-SURV v.1.0.

EcoRI+(AFLP) combination Population [†]	Polymorphism (%)			Expected heterozygosity (He)			Polymorphic bands (Number)		
	1	2	3	1	2	3	1*	2*	3*
MseI + CAC	43.10	47.80	56.20	0.154	0.160	0.180	25	28	32
MseI + CAT	52.10	54.20	66.70	0.193	0.175	0.213	25	26	32
MseI + CGA	25.40	36.50	47.60	0.080	0.104	0.124	16	23	30
MseI + CGG	43.50	46.30	55.60	0.174	0.178	0.197	47	50	60
Average	41.03	46.20	56.53	0.150	0.154	0.179	28.25	31.75	38.5

[†]Each population number corresponds to a classified group of chayote: 1= sweet flavour; 2= neutral flavour; 3= bitter flavour. ♦ [†]Cada población corresponde a un grupo de chayote clasificado: 1 = sabor dulce; 2 = sabor neutro; 3 = sabor amargo.

from consumers were located. Some studies pointed out that the domesticated varieties can show a higher genetic differentiation in regard to the wild ancestor because of domestication, although on the whole they appear less diverse (Gaut *et al.*, 2015; Moyers *et al.*, 2018).

The average of the polymorphic bands was 32.83, out of a total of 68.5 amplified bands, from which 47.92% were informative. This is considered as a good approach to describe the genetic variation of the sample and the trend of the genotypes to differentiate (Moyers *et al.*, 2018). The EcoRI+ACC/MseI+CGG combination presented the highest polymorphism per locus and the highest number of bands. Whilst the EcoRI + ACC/MseI + CAT combination recorded the highest values of heterozygosity for the three groups.

The statistical values of F_{st} or Wright fixation index, which estimate the genetic difference between populations, ranged between 0 and 0.1123, suggesting low genetic differentiation between accessions based on the island model (Vekemans *et al.*, 2002). According to that model, populations present a continuous or discrete distribution, and the isolation because of distance negatively influences the genetic flow. For this study, a balance between genetic drift and genetic flow was suggested, given that the F_{st} values were close to zero (Van Strien *et al.*, 2015). The total genetic diversity (Ht) was 0.1725 for the EcoRI + ACC/MseI + CAC combination, 0.1947 for EcoRI + ACC/MseI + CAT, 0.1029 for EcoRI + ACC/MseI + CGA, and 0.1897 for the EcoRI + ACC/MseI + CGG combination. The distribution of principal coordinates and the rotation of the axes depicting the accessions within each cluster show associations and disassociations among them (Figure 2).

The molecular and variance analyses showed that the variation identified among accessions by dominant markers explained 45.12% in the first axis, 21.47% in the second, and 11.69% in the third, that accounts for a total variance of 78.28%. Jain *et al.* (2017) reported 66.6% of genetic polymorphism in 36 accessions of *S. edule* in India. Although the biological variants evaluated were not specified, important traits in the fruit were highlighted, such as colour, size, and spines. The differences in this sample enrich the premise of genetic dynamism of *S. edule*, considering the reproductive isolation and different life history within the sample used for this study.

ción, aunque en general aparenten ser menos diversas (Gaut *et al.*, 2015; Moyers *et al.*, 2018).

El promedio de las bandas polimórficas fue 32.83, de un total de 68.5 bandas amplificadas, de las cuales 47.92% fueron informativas. Esto se considera como un enfoque bueno para describir la variación genética de la muestra y la tendencia de los genotipos a diferenciarse (Moyers *et al.*, 2018). La combinación EcoRI+ACC/MseI+CGG presentó el polimorfismo por locus mayor y el número de bandas mayor. En tanto que la combinación EcoRI+ACC/MseI+CAT registró los valores más altos de heterocigosidad para los tres grupos.

Los valores estadísticos de F_{st} o índice de fijación de Wright que estiman la diferencia genética entre poblaciones variaron entre 0 y 0.1123, lo cual sugiere una diferenciación genética baja entre accesiones con base en el modelo de isla (Vekemans *et al.*, 2002). De acuerdo con ese modelo, las poblaciones presentan una distribución continua o discreta, y el aislamiento debido a distancia influye en el flujo genético de manera negativa. En el caso de este estudio, lo sugerido por el índice fue un equilibrio entre la deriva genética y el flujo genético, debido a que los valores de F_{st} fueron cercanos a cero (Van Strien *et al.*, 2015). La diversidad genética total (Ht) fue 0.1725 para la combinación EcoRI+ACC/MseI+CAC, 0.1947 para EcoRI+ACC/MseI+CAT, 0.1029 para EcoRI+ACC/MseI+CGA y 0.1897 para la combinación EcoRI+ACC/MseI+CGG. La distribución de coordenadas principales y la rotación de los ejes que representan a las accesiones presentes en cada clúster muestran las asociaciones y disociaciones entre ellas (Figura 2).

El análisis molecular y de varianza mostró que la variación identificada entre accesiones por marcadores dominantes explicó 45.12% en el primer eje, 21.47% en el segundo y 11.69% en el tercero, lo cual significa una varianza total de 78.28%. El estudio de Jain *et al.* (2017) informó 66.6% de polimorfismo genético en 36 accesiones de *S. edule* en la India. Aunque no se especificaron las variantes biológicas evaluadas, se destacaron rasgos importantes en el fruto, como color, tamaño y espinas. Las diferencias en esta muestra enriquecen la premisa de dinamismo genético de *S. edule*, si se considera el aislamiento reproductivo y la diferencia en historias de vida de las muestras utilizadas en este estudio.

Las diferencias entre los estudios citados y este estudio pueden deberse al mayor número y diversidad de

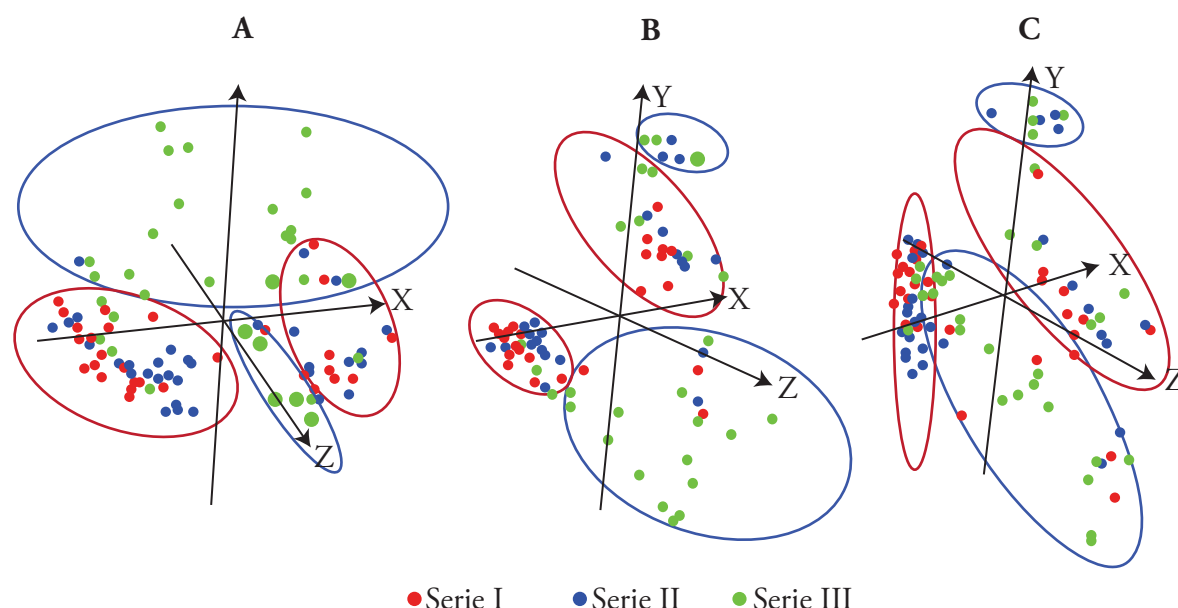


Figure 2. Distribution of principal coordinates of 95 accessions of *Sechium* spp., with four combinations of AFLP markers. PCoA analysis showed the contrasts made between the axes of the abscissa (X), ordinate (Y) and coordinate (Z). Series I (red) correspond to the accessions of sweet fruits; series II (blue) corresponds to accessions with fruits of neutral flavour; finally, series III (light green) groups the accessions with a bitter taste with thorns and without thorns. A) Contrast of rotation of axes 1 and 3 (X, Z). B) Contrast of rotation of axes 1 and 2 (X, Y). C) Contrast of rotation of axes 2 and 3 (Y, Z) (CurlyWhirly® 1017.08.31, 2009-2017).

Figura 2. Distribución de coordenadas principales de 95 accesiones de *Sechium* spp., a partir de cuatro combinaciones de marcadores AFLP. El análisis de PCoA mostró los contrastes realizados entre los ejes de la abscisa (X), ordenada (Y) y coordenada (Z). La serie I (roja) corresponde con las accesiones de frutos dulces; la serie II (azul) corresponde con accesiones con frutos de sabor neutro; por último, la serie III (verde claro) agrupa las accesiones con sabor amargo, con espinas y sin espinas. A) Contraste de rotación de los ejes 1 y 3 (X, Z). B) Contraste de rotación de los ejes 1 y 2 (X, Y). C) Contraste de rotación de los ejes 2 y 3 (Y, Z) (CurlyWhirly® 1017.08.31, 2009-2017).

Those differences between the studies cited and this study may be due to the higher number and diversity of accessions included (infra-species and inter-species). Since Mexico as the centre of origin and domestication has the widest range of biological types of *S. edule*, *S. chinantlense* and *S. compositum* (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011). The dispersion of accessions in this study formed primarily the categories of domesticated and wild genotypes (Figure 2). These were interspersed between the axes, generating then four groups. The materials limited with red colour are mostly genotypes of sweet and neutral fruits, identifying two other groups with wild materials. However, none of the four groups showed exclusivity of group or type; that is, none of them were solely sweet, neutral, or bitter.

The neighbour-joining tree was elaborated with MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016), compared with

accesiones incluidas (intraespecíficas e interespecíficas). Debido a que México como centro de origen y domesticación tiene la gama más amplia de tipos biológicos de *S. edule*, *S. chinantlense* y *S. compositum* (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011). La dispersión de las accesiones estudiadas formó como categoría principal genotipos domesticados y silvestres (Figura 2). Los cuales, intercalados entre los ejes, generaron cuatro grupos a su vez. Los materiales delimitados con color rojo son en su mayoría genotipos de frutos dulces y neutros, e identifican a los otros dos grupos con materiales silvestres. Sin embargo, ninguno de los cuatro grupos mostró exclusividad de grupo o tipo; es decir, ninguno fue únicamente dulce, de sabor neutro o amargo.

El árbol generado por el método de unión de vecinos se elaboró con MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016) y se comparó con el árbol Phylip 3.695 con la fórmula

the Phylip 3.695 tree using the Nei-Lyn formula to generate a matrix of genetic distances. In the first association group, an evolutionary dynamism can be observed which produces a genetic pool between *S. edule*, *S. chinantlense* and *S. compositum*. Six groups were formed, out of which the last one was subdivided into seven (Figure 3).

Group 1 included five yellow genotypes, four green with neutral flavour and one wild *S. edule*; group 2 included two hybrids (387.88, 635.87), two accessions of wild *S. edule* and one *S. compositum*; the remaining in this group were three *virens levis*, one *nigrum spinosum*, and one *nigrum minor*, derived from *S. edule*. The parents of hybrid 635.87 are *S. compositum* and *S. edule nigrum spinosum*, and those of hybrid 387 are *amarus sylvestris* and *virens levis*, both derived from *S. edule*. In group 3, the hybrid 387.72 stood out, one from *n. levis*, *n. spinosum*, *n. xalapensis* (dark green color), two *virens levis* and one *albus dulcis*. In group 4, a hybrid 387.77 was identified and one wild *S. edule* (661.74). It is relevant to emphasize that the four initial groups derived from a wild *S. edule* (653.83), according to the depicted genotypic tree; despite one *S. compositum* was also found there.

Group 5 included the Perla negra variety (922.95, bitter flavour), two accessions of the inter-species hybrid H-Víctor (648.92, 649.78) product of *S. compositum* × *S. edule nigrum xalapensis*. Wild *S. edule* (659.91), two *nigrum spinosum* (651.64, 658.62), one *virens levis* (804.34), and 761.33 corresponding to *albus levis* were also found. Group 6 (the one subdivided into seven subgroups) appeared as it follows, group 6a showed accession 747.71 corresponding to *S. chinantlense*, 746.59 (*nigrum spinosum* from *S. edule*), the hybrid 709.45, a product from bitter Perla negra × *albus minor*, *n. xalapensis* (530.28), *albus dulcis* (768.38), and 658.62 *nigrum spinosum*. Subgroups 6b, 6c and 6d showed domesticated genotypes of *S. edule*, except genotype 644.55 whose hybrid lineage is from *S. compositum* × *S. edule nigrum xalapensis* and the 653.80 corresponding to wild *S. edule*; indicating a higher genetic distance (longitude) regarding their genetic derivatives.

Subgroup 6e showed two branches, one comprising bitter genotypes with very close relation to the species *S. compositum* (6.94, 921.89, 20.76) and *S. chinantlense* (919.69), as well as two interspecies

de Nei-Lyn para generar una matriz de distancias genéticas. En el primer agrupamiento se observó un dinamismo evolutivo que produce un acervo genético entre *S. edule*, *S. chinantlense* y *S. compositum*. Seis grupos se formaron, de los cuales el último se subdividió en siete (Figura 3).

El grupo 1 mostró cinco genotipos amarillos, cuatro verdes con sabor neutro y un *S. edule* silvestre; el grupo 2 incluyó dos híbridos (387.88, 635.87), dos accesiones de *S. edule* silvestre y una *S. compositum*; el resto de este grupo fueron tres *virens levis*, uno *nigrum spinosum*, y una *nigrum minor*, derivadas de *S. edule*. Los padres del híbrido 635.87 son *S. compositum* y *S. edule nigrum spinosum*, y los del híbrido 387 son *amarus sylvestris* y *virens levis*, ambos derivados de *S. edule*. En el grupo 3, se destacó el híbrido 387.72, uno de *n. levis*, *n. spinosum*, *n. xalapensis* (color verde oscuro), dos *virens levis* y un *albus dulcis*; en el grupo 4, se localizó un híbrido 387.77 y un *S. edule* silvestre (661.74). De esos cuatro grupos iniciales conviene resaltar que derivaron de un *S. edule* silvestre (653.83), de acuerdo con el árbol genético generado, a pesar de que también se encontró allí un *S. compositum*.

El grupo 5 incluyó la variedad Perla negra (922.95, sabor amargo), dos accesiones del híbrido interespecífico H-Víctor (648.92, 649.78) producto de *S. compositum* × *S. edule nigrum xalapensis*. Un *S. edule* silvestre (659.91), dos *nigrum spinosum* (651.64, 658.62), un *virens levis* (804.34), y la accesión 761.33 correspondiente a *albus levis* también se encontraron allí. El grupo 6 (dividido en siete subgrupos) mostró lo siguiente, un subgrupo 6a, el cual mostró la accesión 747.71 que corresponde con *S. chinantlense*, 746.59 (*nigrum spinosum* derivado de *S. edule*), el híbrido 709.45, producto de la variedad amarga Perla negra × *albus minor*, *n. xalapensis* (530.28), *albus dulcis* (768.38) y 658.62 *nigrum spinosum*. Los subgrupos 6b, 6c y 6d mostraron solo genotipos domesticados de *S. edule*, excepto el genotipo 644.55, cuyo linaje híbrido proviene de *S. compositum* × *S. edule nigrum xalapensis*, y el 653.80 el cual corresponde con *S. edule* silvestre, e indica una distancia genética mayor (longitud) respecto a sus derivados genéticos.

El subgrupo 6e mostró dos ramas, una que se conformó con genotipos amargos con relación muy cercana a las especies *S. compositum* (6.94, 921.89, 20.76) y *S. chinantlense* (919.69), así como dos híbridos interespecíficos (643.65, 634.75) de *S.*

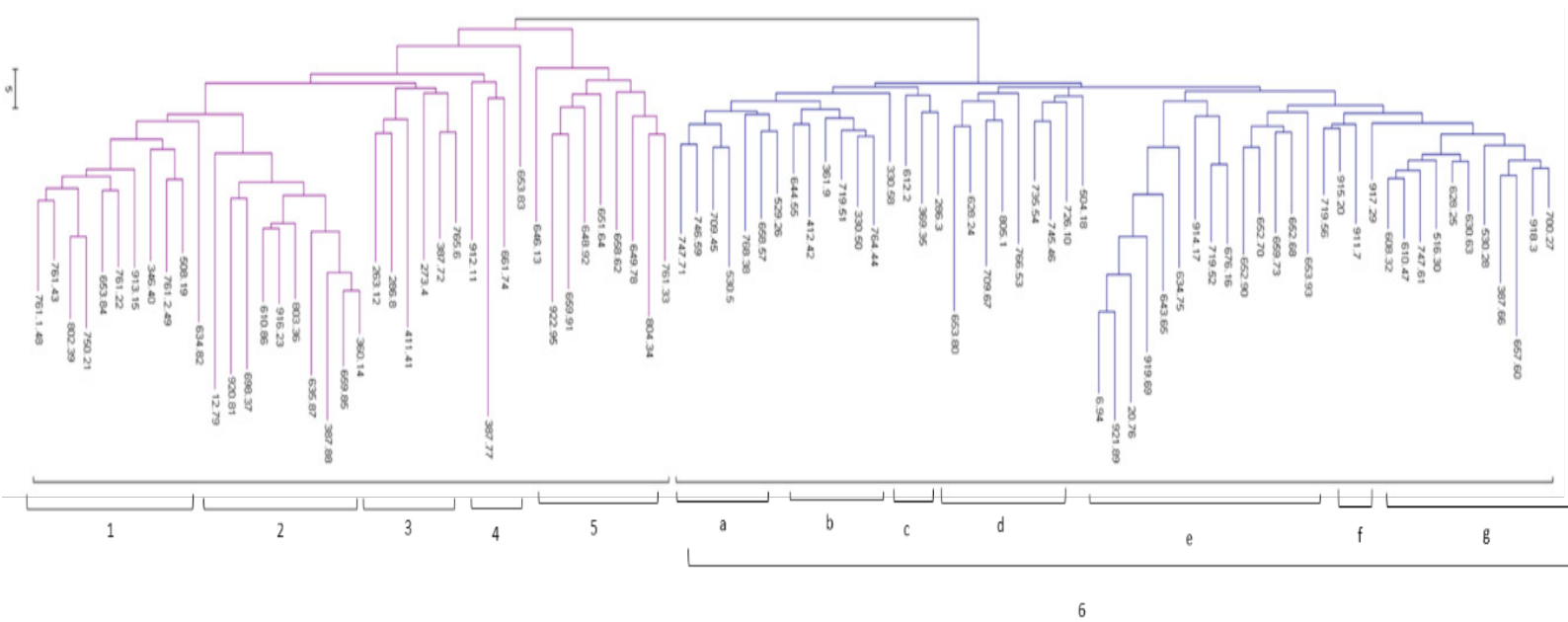


Figure 3. Neighbour-joining tree of domesticated and wild *Sechium* spp. genotypes, elaborated with MEGA v.7.

Figura 3. Árbol generado por el método de unión de vecinos de genotipos domesticados y silvestres de *Sechium* spp., elaborado con MEGA v.7.

(*S. compositum* × *S. edule*) hybrids (643.65, 634.75); the other arm of group 6e comprised domesticated *chayotes* of yellow fruits, such as *a. dulcis* (914.17), *a. levis* (719.52), and light green *virens levis* (676.16). In the subgroup 6f, an arm with five bitter genotypes (652.90, 652.70, 659.73, 652.68, 653.93) can be noticed, corresponding to a wild *S. edule*, considered as the closest wild ancestor; the next arm in (6f) was formed by two *a. dulcis* (719.56, 915.20, 917.29), and one *virens levis* (911.7). Finally, in subgroup 6g, it should be noticed the alignment of nine domesticated genotypes (608.32, 610.47, 516.30, 628.25, 630.63, 530.28, 657.60, 918.3, 700.27), in addition to *S. chinantlense* (747.61) and the hybrid 387.66, both of bitter flavour.

The results obtained (Structure v. 2.3.4) showed a degree of alpha mix of 0.22, organized in three populations, where 52.63% of the accessions showed a higher probability of being part of the main population made up of bitter and wild genotypes. The rest of the alpha mix (47.37%) was distributed as two populations made up of domesticated (neutral flavour) and semi-domesticated genotypes (sweet flavour). This strengthens the premise that genotypes from the three evaluated species behave as a single genetic pool. Within it, a constant evolutionary dynamism, determined by the migration of edible *chayotes* (domesticated and semi-domesticated) to new geographic localities, would be a main force, as the local, edible, and wild genotypes enter into contact attaining hybridization.

From the genetic point of view, there is the founding effect, which explains that the immigrant genotype contributes a small proportion of alleles to the local genetic base (Van Strien *et al.*, 2015). This active genetic enrichment may be directed to obtain new diverse biological variants (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2013). For example, nutraceutical, antiproliferative, immune-stimulating, antineoplastic, and dietary varieties (Aguíñiga-Sánchez *et al.*, 2015). According to Cardoso *et al.* (2000), the genetic differentiation between populations is correlated with the geographic distance, and the dominant AFLP markers allow detecting species or subspecies.

Wild *S. edule* was observed (653.83) as the root genotype, at least for groups 1 to 5 (Figure 3); within their derived groups *S. chinantlense* was found (747.61), in addition to accessions 6.94, 921.89, 12.79 and 20.76, which correspond to *S.*

compositum × *S. edule*; el otro brazo del subgrupo 6e incluyó chayotes domesticados de frutos amarillos, como *a. dulcis* (914.17), *a. levis* (719.52) y *virens levis* (676.16). En el subgrupo 6f, se destacó un brazo con cinco genotipos amargos (652.90, 652.70, 659.73, 652.68, 653.93), correspondientes con un *S. edule* silvestre, considerado como el ancestro silvestre más cercano. El siguiente brazo (del 6f) estaba formado por *a. dulcis* (719.56, 915.20, 917.29) y un *virens levis* (911.7). Por último, en el grupo 6g se destacó la alineación de nueve genotipos domesticados (608.32, 610.47, 516.30, 628.25, 630.63, 530.28, 657.60, 918.3, 700.27), además de *S. chinantlense* (747.61) y el híbrido 387.66, ambos de sabor amargo.

Los resultados obtenidos (con Structure v. 2.3.4) mostraron un grado de mezcla alfa de 0.22, organizado en tres poblaciones, donde el 52.63% de las accesiones mostró una probabilidad mayor de formar parte de la población principal conformada por genotipos amargos y silvestres. El resto de la mezcla alfa (47.37%) se distribuyó en dos poblaciones compuestas por genotipos domesticados (sabor neutro) y semi domesticados (sabor dulce). Esto refuerza la premisa de que los genotipos de las tres especies evaluadas se comportan como un acervo genético único, resaltando un dinamismo evolutivo constante, determinado por la migración de chayotes comestibles (domesticados y semi domesticados) a nuevas localidades geográficas, sería la fuerza principal; ya que los genotipos silvestres locales, comestibles y los genotipos silvestres entran en contacto y llegan a producir híbridos.

Desde el punto de vista genético existe el efecto fundador, el cual explica que el genotipo inmigrante aporta una proporción de alelos pequeña a la base genética local (Van Strien *et al.*, 2015). Este enriquecimiento genético activo se puede dirigir a la obtención de variantes biológicas nuevas y diversas (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2013). Por ejemplo, variedades nutraceuticas, antiproliferativas, inmunoestimulantes, antineoplásicas y dietéticas (Aguíñiga-Sánchez *et al.*, 2015). Según Cardoso *et al.* (2000), la diferenciación genética entre poblaciones se correlaciona con la distancia geográfica y los marcadores AFLP dominantes permiten detectar especies o subspecies.

S. edule silvestre (653.83) se observó como el genotipo raíz de al menos los grupos 1 a 5 (Figura 3); dentro de sus grupos derivados se encontró a *S. chinantlense* (747.61), además de las accesiones 6.94, 921.89, 12.79 y 20.76, las cuales corresponden a *S.*

compositum. They were found as well, 634.75 and 643.65 (H-DV́ctor), which are interspecies hybrids obtained from *nigrum spinosum* y *nigrum xalapensis* with *S. compositum* (bitter, dark green colour, presence of spines). What suggests that there are no reproductive barriers between the genotypes, and that the differentiation in reproductive isolation of *S. chinantlense* and *S. compositum* is not sufficient for them to be considered true species, but rather subspecies of *S. edule*. The morphogenetic differences in populations are attributed to environmental conditions and the reproductive isolation due to geographic distances from each other, indicating recent periods of divergence during the Pleistocene (Barrera-Guzmán *et al.*, 2021).

S. chinantlense, *S. edule*, and *S. compositum* record the most recent evolutionary divergence with a distance of between 1.9 to 4.9 million years compared to *S. hintonii*; the latter is considered as the possible ancestor of the former. A greater number of genetic sequencing analyses of the species of the Mexican clade (*S. edule*, *S. compositum*, *S. chinantlense* and *S. hintonii*) would help to confirm the evolutionary path of the three species depending on the time of disruption which generated separation. Results in this study show that there are no reproductive barriers between the three species, since their interbreeding generates new genotypes with fertile offspring. This sets the precedent for a possible adjustment from ten species to eight, considering *S. hintonii* as a starting point for the Mexican chayotes as it was suggested by Barrera-Guzmán *et al.* (2021).

According to the indexes of genetic diversity (expected heterozygosity, number of polymorphic bands, percentage of polymorphism), the genotypes did not form strict conglomerates by uniformity. From the distribution of the neighbour-joining tree, we considered that there is a high genetic flow between the three evaluated species of *Sechium*, possibly due to different evolutionary routes and environmental adaptation, since the biological sample evaluated derived from the nucleus collection of the germplasm bank, whose origins are diverse (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2011).

Species are made up of a series of populations connected through genetic flow, and the group of all the populations between which there is such a flow constitutes a species. This does not support the proposal of classification of subspecies suggested

compositum. Así como 634.75 y 643.65 (H-DV́ctor) que son híbridos interespecíficos obtenidos de *nigrum spinosum* y *nigrum xalapensis* con *S. compositum* (amargo, color verde oscuro, con presencia de espinas). Esto sugiere que no existen barreras reproductivas entre los genotipos, y que la diferenciación en aislamiento reproductivo de *S. chinantlense* y *S. compositum* no es suficiente para que se consideren especies verdaderas, sino subespecies de *S. edule*. Las diferencias morfogenéticas entre las poblaciones se atribuyeron a condiciones ambientales y aislamiento reproductivo debido a las distancias geográficas entre ellas; estas distancias sugieren periodos de divergencia recientes, durante el Pleistoceno (Barrera-Guzmán *et al.*, 2021).

S. chinantlense, *S. edule* y *S. compositum* registran la divergencia evolutiva más reciente con una distancia de entre 1.9 a 4.9 millones de años respecto a *S. hintonii*; con ésta última considerada como un posible ancestro de la primera. Un número mayor de análisis de secuencias genéticas de las especies del clado mexicano (*S. edule*, *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. hintonii*) ayudarían a confirmar la trayectoria evolutiva de las tres especies con dependencia del momento disruptivo que produjo la separación. Los resultados en este estudio muestran que no existen barreras reproductivas entre las tres especies, debido a que su entrecruzamiento genera nuevos genotipos con descendencia fértil. Lo anterior sienta el precedente para un posible ajuste de diez especies a ocho, lo cual consideraría a *S. hintonii* como el punto de partida del cual se derivan los chayotes mexicanos, como lo sugerido por Barrera-Guzmán *et al.* (2021).

De acuerdo con los índices de diversidad genética (heterocigosidad esperada, número de bandas polimórficas, porcentaje de polimorfismo), los genotipos no formaron conglomerados estrictos por uniformidad. A partir de la distribución en el árbol de unión de vecinos, se considera que existe un flujo genético importante entre las tres especies evaluadas de *Sechium*; cuyo origen posible son las rutas evolutivas diferentes y la adaptación ambiental, ya que la muestra biológica evaluada provino de la colección núcleo del banco de germoplasma, cuyas colectas de origen son diversas (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2011).

Las especies se conforman por una serie de poblaciones conectadas a través de flujo genético, y el grupo de todas las poblaciones entre las cuales existe dicho flujo constituye una especie. Este hecho no

for *Sechium* (Lira-Saade *et al.*, 1999), since the distribution observed (Figure 3) is very narrow in a monophyletic tree, indicating that there were no biological barriers preventing the exchange of genes (Van Strien *et al.*, 2015). That is, no subspecies were appreciated, despite the morpho-structural differences previously cited (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2011), even when the results from AFLP could be ambiguous in regard to the directionality of the genetic movement (Eguiarte *et al.*, 2013).

Mercado and Lira (1994) reported a chromosome number $n=13$ for *S. edule*, $n=14$ for *S. compositum*, $n=14$ for *S. hintonni* and *S. venosum*, and $n=12$ for *S. vellosum*. Those authors argued that this difference is due to aneuploidy, although they suggested treating those values with caution due to the reduced number of samples evaluated. However, the hybridization between *S. edule* (wild) and *S. chinantlense* generated genotypes which in turn (F1) formed the segregates P1 and P2 (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2017). In this study, the results indicated that the genotypes can be grouped as a complex, with dynamism and genetic flow that are potential for forming new biological variants with diverse uses. The same pattern can be explained by different population histories, and molecular tools implemented showed that there would be no reproductive barriers between the three species towards generating new genotypes with fertile offspring.

CONCLUSIONS

The biological sample of *Sechium* spp. showed low indexes of heterozygosity, average number of polymorphic bands, and high percentage of polymorphism, which exceeded the values reported by other authors. A differentiation of most domesticated accessions was achieved, separated from the wild types of bitter flavour. There are no apparent reproductive barriers to genetic cross-breeding.

S. edule was found to be the possible root taxon, deriving *S. compositum* and *S. chinantlense* as subgroups, which suggests that the differentiation among the three is not sufficient to treat them as separate species. This was evidenced by their bitter hybrids and those domesticated accessions of *S. edule*. The genotypes behaved as a single group, with strong evolutionary dynamism generating a genetic pool. Thus, it is possible to design new genotypes from that genetic heritage.

apoya la propuesta de clasificación de subespecies sugerida para *Sechium* (Lira-Saade *et al.*, 1999), ya que la distribución observada (Figura 3) es muy estrecha dentro de un árbol monofilético que indica que no existen barreras biológicas que impidan el intercambio de genes (Van Strien *et al.*, 2015). Esto es, no se apreció ninguna subespecie, a pesar de las diferencias morfoestructurales citadas con anterioridad (Cadena-Íñiguez *et al.*, 2011). Incluso cuando los resultados del AFLP pudieran ser ambiguos respecto a la direccionalidad del movimiento genético (Eguiarte *et al.*, 2013).

Mercado y Lira (1994) reportaron un número cromosómico $n = 13$ para *S. edule*, $n = 14$ para *S. compositum*, $n = 14$ para *S. hintonni* y *S. venosum*, y $n = 12$ para *S. vellosum*. Estos autores argumentaron que esta diferencia se debe a la aneuploidía, aunque sugirieron tratar dichos valores con precaución debido al número de muestras reducido que se evaluó. Sin embargo, la hibridación entre *S. edule* (silvestre) y *S. chinantlense* generó genotipos que a su vez se segregaron en (F1) como P1 y P2 (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2017). En este estudio, los resultados indican que los genotipos pueden agruparse como un complejo, con dinamismo y flujo genético que tienen potencial para formar variantes biológicas nuevas con usos diversos. El mismo patrón puede explicarse por diferentes historias de vida de las poblaciones, y las herramientas moleculares implementadas mostraron que no habría barreras reproductivas entre las tres especies para generar genotipos nuevos con descendencia fértil.

CONCLUSIONES

La muestra biológica de *Sechium* spp. presentó índices de heterocigosidad bajos, número promedio de bandas polimórficas y valores altos de porcentaje de polimorfismo, los cuales excedieron a los valores reportados por otros autores. La diferenciación de la mayoría de las accesiones domesticadas se logró, separadas de los tipos silvestres de sabor amargo. En apariencia no existen barreras reproductivas para el entrecruzamiento.

En este estudio se observó a *S. edule* como el posible taxón raíz, con *S. compositum* y *S. chinantlense* como subgrupos, lo cual sugiere que la diferenciación entre los tres no es suficiente para tratarlos como especies separadas. La evidencia de esto fueron sus híbridos de sabor amargo y las accesiones domesticadas de *S. edule*. Los genotipos se comportaron como

REFERENCES

- Aguñiga-Sánchez I., R. M. Soto-Hernández, J. Cadena-Íñiguez, L. M. Ruiz-Posadas, J. D. Cadena-Zamudio, A. González, E. Santiago. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nut. and Cancer* 67: 250-257 <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.989370>
- Avendaño-Arrazate C.H., J. Cadena-Íñiguez, V. M. Cisneros-Solano, Y. C. Ramírez-Rodas, G.B. Mejía-Montoya. 2017. Morphological variation at inter and infraspecific level in *Sechium* spp. *Agroproductividad*, 10: 58-63. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183200079>
- Barrera-Guzmán Legaría-Solano Á J., J. C. Cadena-Íñiguez, J. Sahagún-Castellanos. 2021. Phylogenetic relationships among Mexican species of the genus *Sechium* (Cucurbitaceae). *Turkish J. Bot.* 45: 302-314. <https://doi.org/10.3906/bot-2007-18>
- Cadena-Íñiguez J., R. M. Soto-Hernández, M. L. Arévalo-Galarza, C. H. Avendaño-Arrazate, J. F. Aguirre, L. M. Ruiz-Posadas. 2011. Biochemical characterization of domesticated varieties of chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Compared to wild relatives. *Rev. Chapingo. Ser. Hort.* 17: 45-55.
- Cadena-Íñiguez J., R. M. Soto-Hernández, A. Torres, I. Aguiñiga-Sánchez, L. M. Ruiz-Posadas, A. Rivera, E. Santiago-Osorio. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *J. Med. Plant Res.* 7: 455-460. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.866>
- Cardoso S. R. S., N. B. Eloy, J. Provan, M. A. Cardoso, and P. C. G. Ferreira. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Mol. Ecol.* 9: 1753-1760. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01056>
- Cruz-Requena M., C. N. Aguilar-González, J. Espinoza-Velázquez, M. H. Reyes-Valdés, and R. Rodríguez-Herrera. 2013. AFLPs loci associated with polyembryonic maize using selective genotyping analysis. *Israel J. Plant Sci.* 61: 46-50. DOI: <https://doi.org/10.1080/07929978.2014.950045>
- Eguarte L. E., J. A. Aguirre-Liguori, L. Jardón-Barbolla, E. Aguirre-Planter, and V. Souza. 2013. Population genomics: nothing in evolution will make sense if not in light of genomics, and nothing in genomics will make sense if not in light of evolution. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 16: 42-56.
- Emanuelli, F., S. Lorenzi, L. Grzeskowiak, V. Catalano, M. Stefanini, M. Troggio, M. S. Grando. 2013. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grapes. *BMC Plant Biol.* 13: 1-17.
- Gaut B. S., C. M. Díez, and P. L. Morrell. 2015. Genomics and the contrasting dynamics of annual and perennial domestication. *Trends Genet.* 31: 709-719. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-39>
- Hausdorf B., and C. Hennig. 2010. Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Syst. Biol.* 59: 491-503. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq039>
- Hebert J. B., S. J. Scheffer, and D. J. Hawthorne. 2016. Evidence for ecological speciation via a host shift in the holly leaf miner, *Phytomyza glabricola* (Diptera: Agromyzidae). *Ecol. Evol.* 6: 6565-6577. <https://doi.org/10.1002/ece3.2358>
- un solo grupo, con un dinamismo evolutivo fuerte que generó un solo acervo genético. De modo que es posible diseñar genotipos nuevos a partir de esa herencia genética.
- Fin de la versión en Español—
- *
- Idrees M., and M. Irshad. 2014. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *Eur. Acad. Res.* 2: 1513-1540.
- Jain J.R., B. Timsina, K. B. Satyan, S. H. A. Manohar. 2017. Comparative assessment of morphological and molecular diversity among *Sechium edule* (Jacq.) Sw. accessions in India. 3 *Biotech* 7: 106. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0726-5>
- Kumar S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA v.7. Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lira-Saade R., and F. Chiang. 1992. Two new combinations in *Sechium* (Cucurbitaceae) from Central America, and a new species from Oaxaca, Mexico. *Novon* 2: 227-231. <https://doi.org/10.2307/3391556>
- Lira-Saade R., J. Castrejón, S. Zamudio, y C. Rojas-Zenteno. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silverstres (*Sechium edule*, *Cucurbitaceae*) de México. *Acta Bot. Mex.* 49:47-61. [http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.49.1999/acta49\(47-61\).pdf](http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.49.1999/acta49(47-61).pdf) (Retrieved: November 2019).
- Machida-Hirano R., M. Cortés-Cruz, B. A. González A., J. Cadena-Íñiguez, K. Shirata, K. N. Watanabe. 2015. Isolation and characterization of novel microsatellite markers in chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw.]. *Am. J. Plant Sci.* 6: 2033-2041. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.613203>
- Meléndez-Ackerman E.J., P. Speranza, W. J. Kress, L. Rohena, E. Toledo, C. Cortés, D. Soltis. 2005. Microevolutionary processes inferred from AFLP and morphological variation in *Heliconia bihai* (Heliconiaceae). *Int. J. Plant Sci.* 166: 781-794. <https://doi.org/10.1086/431231>
- Mercado P., and R. Lira. 1994. Contribution to the Knowledge of the chromosomal numbers of the genera of *Sechium* P. Br. and *Sicana naudin* (Cucurbitaceae). *Acta Bot. Mex.* 27:7-13.
- Moyers B.T., P.L. Morrell, and J. K. McKay. 2018. Genetic costs of domestication and improvement. *J. Heredity.* 109: 103-116. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx069>
- Pritchard, J. K.; M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-959 <https://www.genetics.org/content/155/2/945> (Retrieved: February 2020).
- Sabir J., M. Mutwakil, A. El-Hanafy, A. Al-Hejin, M. A. Sadek, M. Abou-Alsoud, and M. Ahmed. 2014. Applying

- molecular tools for improving livestock performance: from DNA markers to next generation sequencing technologies. *J. Food Agric. Environ.* 12: 541-553.
- Van Strien M. J., R. Holderegger, and H. J. Van Heck. 2015. Isolation-by-distance in landscapes: considerations for landscape genetics. *Heredity*, 114: 27-37. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.62>
- Vekemans X., T. Beauwens, M. Lemaire, and I. Roldán-Ruiz. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol. Ecol.* 11: 139-151. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01415.x>