

Proyecto monográfico
Grado en Ingeniería Agrícola

Universidad de Almería
Escuela Superior de Ingeniería



**Implicación del gen *CitACS4* en el desarrollo
de flores y frutos de sandía
(*Citrullus lanatus*)**

Directores:

Dr. Manuel Jamilena Quesada

Dña. Encarnación Aguado Donaire

Alumno:

José Antonio Ibáñez Barón

Almería, Junio 2017

ÍNDICE



ÍNDICE

1. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	1
1.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LA SANDÍA A NIVEL MUNDIAL.....	2
1.2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LA SANDÍA EN ESPAÑA Y ALMERÍA	3
1.3. INTERÉS DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE LA SANDÍA.....	7
2.1.1. Origen y utilización.....	7
2.1.2. Taxonomía y descripción botánica	7
2.1.3. Requerimientos edafoclimáticos	9
2.1.3.1. Temperatura	9
2.1.3.2. Humedad	10
2.1.3.3. Luminosidad	10
2.1.3.4. Suelo	10
2.2. DESARROLLO FLORAL	11
2.3. DETERMINACIÓN DEL SEXO EN LAS PLANTAS.....	12
2.3.1. Determinación del sexo en la familia de las Cucurbitáceas.....	13
2.3.2. Regulación de la síntesis de etileno	14
2.3.3. Determinación del sexo y genes ACS de biosíntesis de etileno	16
2.4. FISIOLÓGÍA DEL CUAJADO Y DESARROLLO DEL FRUTO	18
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
3.1. EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO E INSTALACIONES.....	21
3.2. CONDICIONES AMBIENTALES DEL INVERNADERO, MATERIAL VEGETAL Y MANEJO DEL CULTIVO.....	22
3.2.1. Condiciones ambientales	22
3.2.2. Material vegetal	23
3.2.3. Manejo del cultivo	24
3.3. TOMA DE DATOS.....	24
3.3.1. Toma de muestras foliares y extracción de ADN genómico	25
3.3.2. Genotipado de las plantas	26
3.3.3. Fenotipado del sexo	28
3.3.4. Relación entre la monoecia/andromonoecia y el cuajado de frutos.....	29

3.3.5. Relación entre la monoecia/andromonoecia, la forma del fruto y el cierre pistilar	29
3.3.6. Relación entre la monoecia/andromonoecia y el desarrollo inicial del fruto.....	30
3.3.7. Comparación del crecimiento de ovario y pétalos en flores pistiladas y masculinas de distintas líneas	30
3.3.8. Comparación del crecimiento de estambres, ovario y pétalos en flores pistiladas de distintas líneas.....	30
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. COSEGREGACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL GEN <i>CitACS4</i>	32
4.2. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL CUAJADO DE FRUTOS.....	34
4.3. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL CIERRE PISTILAR.....	36
4.4. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL DESARROLLO TEMPRANO DEL FRUTO	37
4.5. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y LA FORMA DEL FRUTO	39
4.6. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE OVARIO Y PÉTALOS EN FLORES PISTILADAS Y MASCULINAS DE DISTINTAS LÍNEAS	41
4.7. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ESTAMBRES, OVARIO Y PÉTALOS EN FLORES PISTILADAS DE DISTINTAS LÍNEAS.....	45
5. CONCLUSIONES.....	48
6. BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de sandía a nivel mundial (elaboración propia a partir de F.A.O 2014).	2
Figura 2. Principales países productores de sandía dentro de la Unión Europea (elaboración propia a partir de F.A.O 2014).	3
Figura 3. Producción de los principales cultivos hortícolas de la provincia de Almería (elaboración propia a partir del Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería de Cajamar, campaña 2014/2015).	4
Figura 4. Principales países importadores de sandía de la provincia de Almería en el año 2015 (elaboración propia a partir del servicio estadístico ESTACOM del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, 2015).	4
Figura 5. Morfología de la planta de sandía. 1: Flor femenina, 2: Flor masculina, 3: Hoja, 4: Fruto.	9
Figura 6. Modelo ABC de control genético de la identidad de los órganos florales. A: Tipos de genes homeóticos que controlan la identidad de los órganos florales. B: Ejemplos de fenotipos mutantes para cada uno de los grupos de genes homeóticos (Azón-Bieto y Talón, 2000).	12
Figura 7. Ruta de la biosíntesis del etileno. Las reacciones mediadas por las enzimas ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO) son los pasos limitantes en la síntesis (elaboración propia a partir de Kierber y col, 1993; Manzano, 2009).	16
Figura 8. Modelo de regulación del etileno en la expresión sexual y desarrollo floral en <i>Cucurbita pepo</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucumis melo</i> (izquierda) y <i>Citrullus lanatus</i> (derecha). MA, meristemo apical; MF, meristemo floral femenino (Manzano y col., 2014).	17
Figura 9. Representación esquemática sobre la analogía entre los procesos de desarrollo del fruto y de la semilla (elaboración propia a partir de Varoquaux y col., 2000).	19
Figura 10. Emplazamiento del campo de prácticas de la Universidad de Almería. Fuente: Sistema de Información Geográfica de Identificación de Parcelas Agrícolas (SIGPAC).	21
Figura 11. Distribución del cultivo de sandía y sistema de riego en el ensayo. Arriba, la zona de sandía establecida en maceteros; abajo, la zona de sandía establecida en suelo.	22
Figura 12. Temperaturas máximas y mínimas diarias alcanzadas en la zona de ensayo durante los meses de Abril, Mayo y Junio (elaboración propia a partir de los datos obtenidos del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Estación Meteorológica de Almería).	23
Figura 13. Segundo trasplante a maceteros de mayor capacidad.	24
Figura 14. Imagen de las distintas etiquetas empleadas durante el ensayo.	25

Figura 15. Homogeneización de las muestras foliares tras añadir el tampón de extracción...	26
Figura 16. Genotipado de <i>CitACS4</i> en algunas plantas de la F2 resultante del cruce P84xP87. En cada una de las plantas analizadas, su ADN se utilizó para amplificar un fragmento de PCR del gen <i>CitACS4</i> de 271 pb. Nótese que las plantas que solo presentan la banda superior son homocigotas MM y que las que solo presentan la banda inferior son homocigotas AA. Aquellas que presentan ambas bandas son heterocigotas MA. NTC No Template Control (control negativo), C(M) Control alelo monoecia, C(A) Control alelo andromonoecia.....	28
Figura 17. Clasificación de las flores pistiladas según su Índice de Andromonoecia. (A) IA=1, flores con anteras incipientes; (B) IA=2, flores con anteras de tamaño medio; (C) IA=3, flores con anteras completas; (D) Flor masculina.....	29
Figura 18. Polinización manual de una de las flores seleccionadas.....	29
Figura 19. Porcentaje de cuajado en las líneas P84 y P87, y las generaciones F1 y F2. Se han establecido dos grupos dentro de las plantas heterocigotas de la F2: MA1 representa a aquellas plantas que han mostrado un comportamiento más monoico, mientras que MA2 representa a aquellas plantas que han mostrado un comportamiento más andromonoico. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).	35
Figura 20. Escala establecida para la evaluación del cierre pistilar.....	36
Figura 21. Tamaño del cierre pistilar en las líneas P84 y P87, y las generaciones F1 y F2. Se han establecido dos grupos dentro de las plantas heterocigotas de la F2: MA1 representa a aquellas plantas heterocigotas que han mostrado un comportamiento más monoico, mientras que MA2 representa a aquellas plantas heterocigotas que han mostrado un comportamiento más andromonoico. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).	36
Figura 22. Forma del fruto a los 14 días después de la antesis para cada uno de los genotipos estudiados.....	41
Figura 23. Evolución del crecimiento longitudinal de ovarios (arriba) y pétalos (abajo) de flores pistiladas en dos líneas monoicas (P86 y P84) y una andromonoica (P87). Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).	42
Figura 24. Evolución del crecimiento longitudinal de pétalos de flores masculinas en dos líneas monoicas (P86 y P84) y una andromonoica (P87). Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).	43
Figura 25. Evolución del tamaño de ovario y pétalos en flores femeninas (arriba), y sólo de pétalos en flores masculinas (abajo), de las líneas monoicas P86 y P84, y la línea andromonoica P87.....	44
Figura 26. Comparación del crecimiento de ovarios respecto al de estambres en flores pistiladas en dos líneas monoicas (P84 y P86) y una andromonoica (P87).	45

Figura 27. Comparación del crecimiento de pétalos respecto al de estambres en flores pistiladas en dos líneas monoicas (P84 y P86) y una andromonoica (P87). 46

Figura 28. Comparación del crecimiento de pétalos respecto al de ovarios en flores pistiladas en dos líneas monoicas (P84 y P86) y una andromonoica (P87). 47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Superficie y producción del cultivo de sandía en España (fuente: Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2014). ...	3
Tabla 2. Taxonomía de la sandía.....	8
Tabla 3. Humedades relativas óptimas en el cultivo de la sandía.	10
Tabla 4. Componentes de la PCR.....	26
Tabla 5. Condiciones de la PCR.....	27
Tabla 6. Genotipo y fenotipo de las líneas parentales P84 y P87, generación F1 y generación F2. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).	32
Tabla 7. Segregación de las plantas monoicas, parcialmente andromonoicas y andromonoicas en la generación F2 resultante del cruzamiento P84xP87.....	33
Tabla 8. Longitud, grosor y tasas de crecimiento en frutos de las líneas P84 y P87, y las poblaciones F1 y F2. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).	38
Tabla 9. Forma del fruto de sandía en antesis y 14 DPA de las líneas P84 y P87, y las poblaciones F1 y F2. R es la razón entre el diámetro longitudinal y transversal del fruto. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).	40

1. INTERÉS Y OBJETIVOS



1. INTERÉS Y OBJETIVOS

1.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LA SANDÍA A NIVEL MUNDIAL

La sandía (*Citrullus lanatus*) es una especie vegetal muy extendida geográficamente, con diversas y variadas técnicas culturales, ya sea en secano, regadío, aire libre o en invernadero (Reche, 1994). Pertenece a la familia de las Cucurbitáceas y presenta mucha variabilidad en relación a sus frutos (tamaño, forma, color, patrón de coloración, textura, etc.) y a sus características vegetativas (hábito de crecimiento, longitud y grosor de los entrenudos, tamaño de las hojas, etc).

Según la base de datos estadísticos de la F.A.O, en el año 2014, China fue el mayor país productor de sandía a nivel mundial con el 67,4% de la producción (74.843.000 t), seguida muy de lejos por Turquía e Irán con unas producciones de 3.885.617 t y 3.568.134 t respectivamente (Figura 1). España se sitúa en el puesto decimotercero con una producción de 858.575 t. Además, Asia es considerablemente el principal productor de sandía a nivel continental por delante de África, América, Europa y Oceanía.

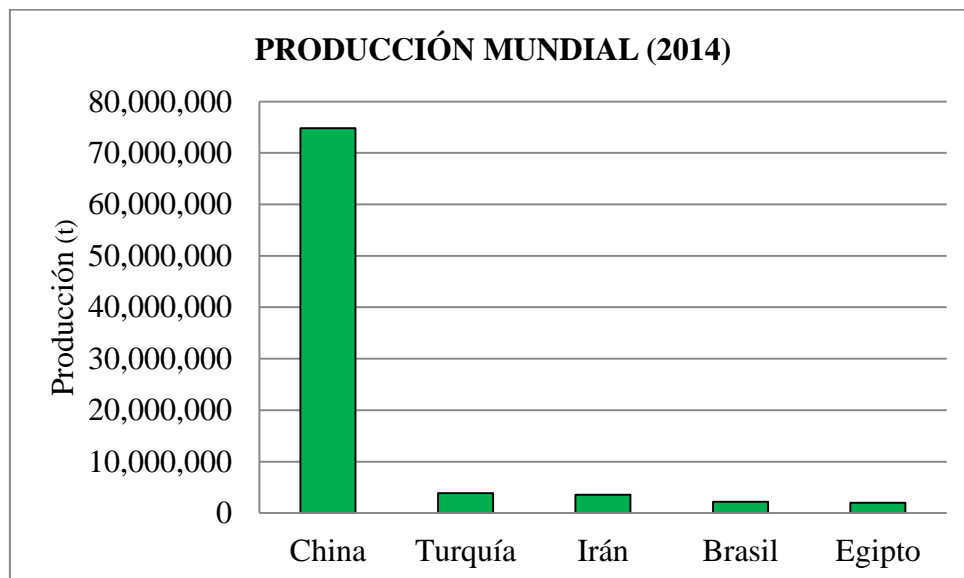


Figura 1. Principales países productores de sandía a nivel mundial (elaboración propia a partir de F.A.O 2014).

Dentro del marco de la Unión Europea, España es el mayor productor de sandía con 858.575 t producidas (Figura 2). Le siguen Grecia con una producción de 543.230 t, y Rumanía con una producción de 474.642 t.

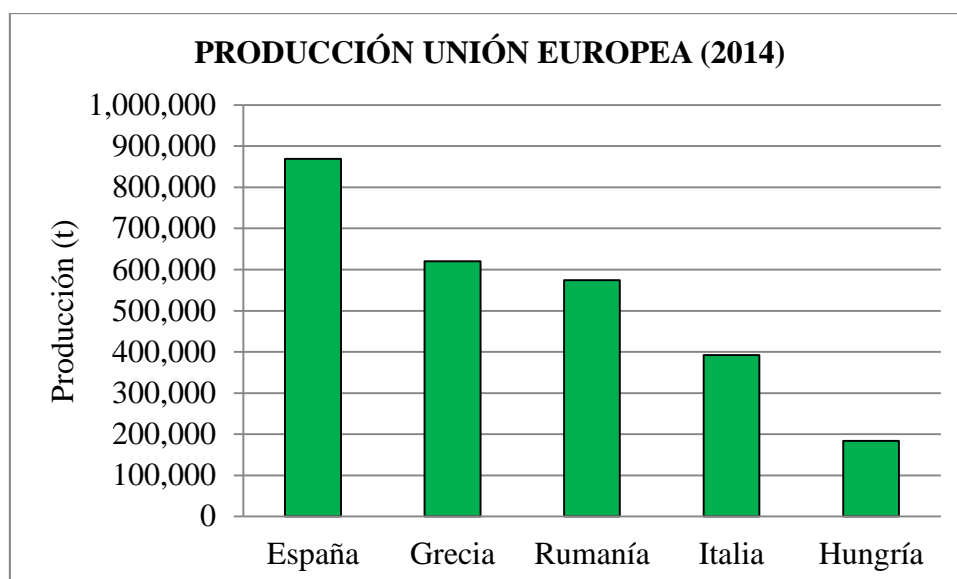


Figura 2. Principales países productores de sandía dentro de la Unión Europea (elaboración propia a partir de F.A.O 2014).

1.2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LA SANDÍA EN ESPAÑA Y ALMERÍA

Según los datos recogidos en el anuario de estadística del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, en 2014 la producción de sandía en España alcanzó las 923.320 t, y la superficie destinada a su cultivo se situó en las 18.059 ha. Andalucía es la principal comunidad autónoma productora representando el 61,5% de la producción y el 53,9% de la superficie cultivada. La provincia de Almería es la principal zona de producción en España; representa el 48,4% de la producción total con 447.120 t y el 39,3% de la superficie con 7.100 ha cultivadas. Le sigue Murcia con una producción de 141.311 t y una superficie de 2.214 ha (Tabla 1).

Tabla 1. Superficie y producción del cultivo de sandía en España (fuente: Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2014).

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (ha)			Total	Producción (t)
	Secano	Regadío			
		Aire libre	Protegido		
Castilla-La Mancha	626	2.126	-	2.752	111.431
R. de Murcia	-	2.142	72	2.214	141.311
Otras	166	2.096	1.097	3.358	102.860
Andalucía	93	3.886	5.756	9.735	567.718
Almería	-	1.622	5.478	7.100	447.120
Total	885	10.250	6.925	18.059	923.320

De hecho, la sandía es uno de los principales cultivos de la provincia de Almería según datos del Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería de Cajamar 2014/2015. La sandía representa el 15,6% de la producción total hortícola de la provincia, siendo el tercer cultivo en importancia después del tomate y el pimiento (Figura 3).

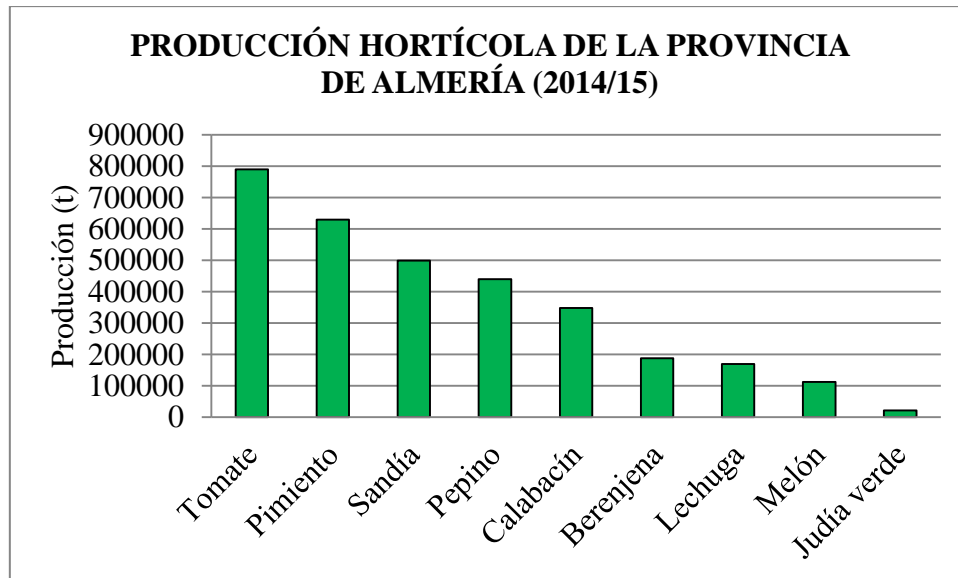


Figura 3. Producción de los principales cultivos hortícolas de la provincia de Almería (elaboración propia a partir del Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería de Cajamar, campaña 2014/2015).

También cabe destacar que, según datos del servicio estadístico ESTACOM del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del año 2015, Almería fue la mayor provincia exportadora de sandía con 287.360 t vendidas al exterior, lo que supone el 42,89% de la exportación nacional de este cultivo. El principal país destinatario fue Alemania con el 49,35% de la exportación, seguido de Francia con el 14,52% y Países Bajos con el 8,77% (Figura 4).

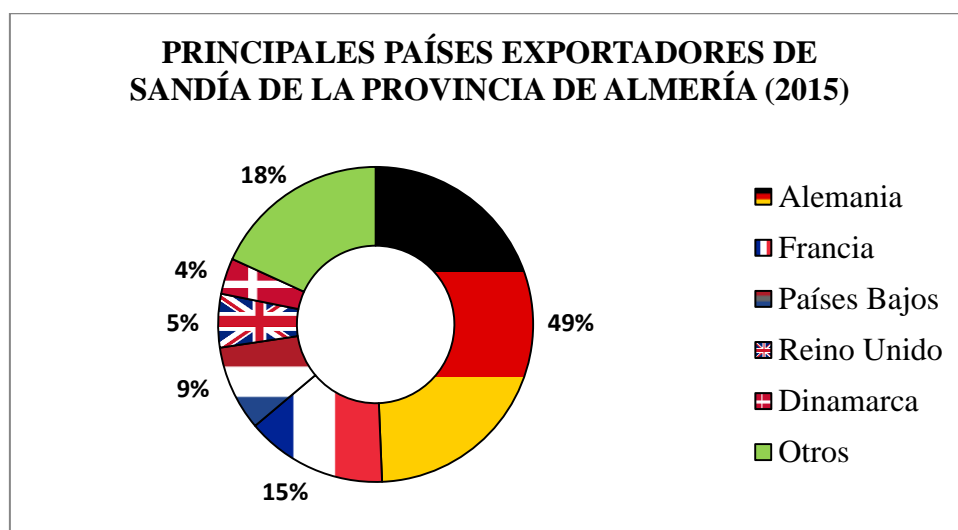


Figura 4. Principales países importadores de sandía de la provincia de Almería en el año 2015 (elaboración propia a partir del servicio estadístico ESTACOM del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, 2015).

1.3. INTERÉS DE LA INVESTIGACIÓN

La sandía es un cultivo útil para la investigación genética debido al pequeño tamaño de su genoma (424 millones de pares de bases), y a los muchos mutantes de genes disponibles (Guner y Wehner, 2004).

Se ha detectado que una de estas mutaciones (C364W) ocurre en el alelo A del gen responsable de la biosíntesis de etileno (*CitACS4*), una hormona que juega un papel esencial en el control de la expresión sexual en la familia de las Cucurbitáceas ya que regula el aborto de los estambres durante el desarrollo de las flores femeninas en sandías monoicas. Dicha mutación reduce la producción de etileno en las yemas florales femeninas, promoviendo la conversión de flores femeninas en hermafroditas y, por tanto, de monoecia en andromonoecia (Manzano y col., 2016).

Además, se ha demostrado que un aumento de la temperatura en el cultivo de sandía es suficiente para inducir una reducción en la producción de etileno en los meristemos apicales de las plantas de sandía, resultando también en inestabilidad a la monoecia y en la conversión de flores femeninas en flores hermafroditas (Manzano y col., 2014).

Esta masculinización de flores femeninas está asociada con una reducción en el cuajado de frutos, así como en la presencia de la flor pegada al fruto y el consiguiente aumento de la cicatriz del cierre pistilar, favoreciendo la podredumbre del mismo y repercutiendo negativamente en su calidad y comercialización.

La explicación a estos parámetros externos del fruto podría encontrarse en una descoordinación del desarrollo y maduración de los órganos florales en las flores hermafroditas, lo que impediría una correcta polinización y fertilización (Manzano y col., 2016).

Por tanto, el interés de este estudio es determinar si los alelos del gen *CitACS4*, además de cosegregar con la monoecia y andromonoecia, también lo hacen con otros rasgos externos en el desarrollo de flores y frutos de sandía que hasta ahora no han sido suficientemente investigados como el cuajado, la tasa de crecimiento del ovario y del fruto, el cierre pistilar y la forma del fruto.

1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

Primero. Analizar la cosegregación entre el gen *CitACS4* y la monoecia/andromonoecia en las poblaciones F1 y F2 resultantes del cruce de una línea pura monoica (P84) y una línea pura andromonoica (P87).

Segundo. Determinar la función del gen *CitACS4* en el control de rasgos de interés agronómico como el cuajado de la fruta, el cierre pistilar o la forma del fruto.

Tercero. Estudiar la implicación del gen *CitACS4* en el desarrollo de ovarios, pétalos y estambres de dos líneas puras monoicas (P84 y P86) y una línea pura andromonoica (P87).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE LA SANDÍA

2.1.1. Origen y utilización

El origen de la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) se sitúa en África central e India. Su cultivo se inició en el antiguo Egipto y se extendió desde allí a través de diferentes países del Mediterráneo, Oriente próximo y Asia. De hecho, se han encontrado restos de semillas que datan de entre 4.000 y 5.000 años en Egipto, Sudán y Libia (Paris, 2016).

La sandía fue introducida en Europa a través de España, observándose en Córdoba y Sevilla hacia los años 961 y 1158 respectivamente. La propagación de la sandía en el norte de Europa fue relativamente lenta, y no se introdujo en las Islas Británicas hasta finales del siglo XVI, tal vez debido al clima desfavorable para el cultivo en gran parte de Europa. Más tarde se introduciría la sandía en América y en otras partes del mundo a medida que se establecían nuevas rutas comerciales que favorecían el comercio (Wehner, 2008).

A pesar de su historia y en contraste con su evidente diversidad de tamaño, forma y coloración tanto externa como interna, las sandías poseen poca variación genética, lo que indica que en su evolución bajo domesticación han sido sometidas a un severo cuello de botella o a una serie de ellos, que han mejorado sus características agronómicas (Paris, 2016). Así, se ha logrado pasar de sandías con maduración tardía, pequeño tamaño de fruto y sabor amargo, a sandías con maduración temprana, mayor tamaño de fruto y sabor dulce, entre otras características (Wehner, 2008). Su citología, genética, reproducción y biotecnología han sido ampliamente estudiadas y, como resultado, se han desarrollado numerosas variedades de polinización abierta (diploides) e híbridos tanto diploides (con semillas) como triploides (sin semillas).

En cuanto a su utilización, la sandía se consume al natural, pero además puede emplearse en la preparación de zumos, helados, mermeladas, etc. Ha de ser jugosa, azucarada y de pulpa roja, y es considerado un alimento refrescante, depurativo y diurético (Reche, 1998).

2.1.2. Taxonomía y descripción botánica

La sandía es una hortaliza englobada en la familia *Cucurbitaceae*. Además de esta importante especie, dentro de la familia de las Cucurbitáceas podemos encontrar hasta 825 especies, agrupadas en 118 géneros (Zomlefer, 2004), los cuales están ampliamente distribuidos en países cálidos y con algunos representantes en áreas templadas y frías. Los géneros más grandes son *Cayaponia* con 60 especies, *Momordica* con 45 y *Gurania*, *Syclos* y *Trichosanthes* que cuentan con 40 especies cada uno (Jeffrey, 1990). Sin embargo, son más importantes las especies cultivadas que se encuentran en los géneros *Citrullus*, *Cucurbita* y *Cucumis*, como son la sandía (*Citrullus lanatus*), el calabacín (*Cucurbita pepo*), los diferentes

tipos de calabaza (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita argyrosperma*), el pepino (*Cucumis sativus*) y el melón (*Cucumis melo*).

Citrullus lanatus tiene 22 cromosomas ($2n=22$, $x=11$). Tras haber sido estudiado taxonómicamente, se dividió el género *Citrullus* en cuatro especies: *C. lanatus*, *C. ecirrhosus*, *C. clocynthis* y *C. rehmii* (Wehner, 2008).

En la Tabla 2, se detalla la organización taxonómica de la sandía (Reche, 1988):

Tabla 2. Taxonomía de la sandía.

Taxonomía	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Subfamilia	Cucurbitoideae
Tribu	Benincaseae
Subtribu	Benincasinae
Género	<i>Citrullus</i>
Especie	<i>C. lanatus</i> (Thunb) Matsum&Nakai

En cuanto a la descripción botánica, la sandía es una planta herbácea, anual, rastrera o trepadora si se le facilita un entutorado adecuado, propia de cultivos intensivos de secano y regadío (Reche, 1998).

Presenta una raíz principal que se ramifica en raíces primarias y éstas, a su vez, vuelven a subdividirse. En relación con las raíces secundarias, la raíz principal alcanza un gran desarrollo (Reche, 1998).

La planta comienza a desarrollarse con un brote principal hasta completar 5-6 hojas bien formadas. A partir de ese momento se inician las brotaciones de segundo orden, que nacen en los nudos del tallo principal. De estos nudos nacen, a su vez, ramas de tercer orden que van conformando la planta. Los tallos son herbáceos, cilíndricos, largos, asurcados longitudinalmente y muy pelosos. También son trepadores y disponen de zarcillos caulinares, cuyo extremo puede ser bífido o trifido (según esté hendido en dos o tres parte) (Reche, 1998).

Las hojas son pecioladas y lobuladas, disponiendo de entre 3-5 lóbulos que se insertan alternativamente a lo largo del eje principal. El haz del limbo es muy suave al tacto, mientras que el envés es muy áspero y con las nerviaciones muy pronunciadas (Reche, 1998).

De las axilas de las hojas nacen las yemas florales que dan lugar a las flores. Éstas son de color amarillo, solitarias y pedunculadas (Figura 5), atrayendo a los insectos por su color, aroma y néctar. La flor de la sandía puede ser masculina o estaminada, hermafrodita o

perfecta y femenina o pistilada. Las flores femeninas darán origen al fruto una vez polinizadas, diferenciándose fácilmente de las masculinas porque poseen un ovario ínfero que se aprecia notablemente (Reche, 1998). Los cultivares monoicos son los más comunes (flores unisexuales masculinas y femeninas coexistiendo en la misma planta) aunque también hay cultivares andromonoicos (flores hermafroditas y unisexuales masculinas coexistiendo en la misma planta) (Wehner, 2008).

Además, mientras que las flores unisexuales femeninas tienen un gineceo de tres carpelos, las flores unisexuales masculinas constan de cinco estambres. La corola de todas las flores está formada por cinco pétalos unidos por su base (Reche, 1988).

El fruto de la sandía es una baya grande con placenta carnosa y epicarpio quebradizo, generalmente liso, de color, forma y tamaño variables (según variedad), esférico y que puede llegar a los 20 kg de peso, aunque los tamaños más frecuentes oscilan entre 6-8 kg de peso. En su interior hay un porcentaje de agua entre el 90-95% y un gran número de semillas. Estas semillas son aplastadas, ovoides, duras y de peso y color también variables (Reche, 1988).

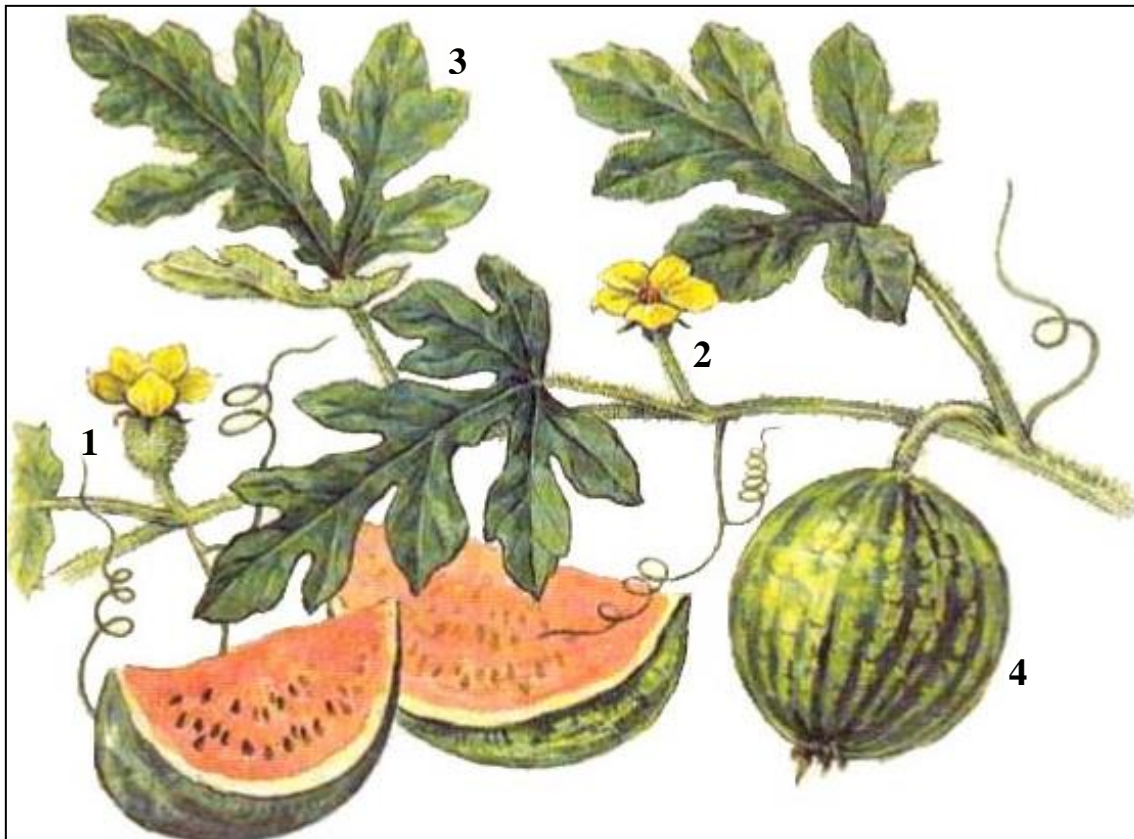


Figura 5. Morfología de la planta de sandía. 1: Flor femenina, 2: Flor masculina, 3: Hoja, 4: Fruto.

2.1.3. Requerimientos edafoclimáticos

2.1.3.1. Temperatura

La sandía requiere temperaturas de germinación de 15 °C como mínimo, aunque el óptimo se sitúa alrededor de los 25 °C. La floración requiere temperaturas que oscilen entre

18-25 °C ya que temperaturas más bajas pueden interferir negativamente en la polinización y cuajado de frutos, y éstos aunque se desarrollen pueden aparecer deformados. El crecimiento vegetativo y la maduración suelen requerir temperaturas entre 23-28 °C. Además, hay que tener en cuenta algunas temperaturas críticas de la planta de la sandía: a los 0 °C se hiela, y en el intervalo de 11-13 °C la planta detiene su desarrollo (Camacho, 2003).

2.1.3.2. Humedad

Es un factor climático importante en el desarrollo de las plantas tanto por la incidencia que tiene en el desarrollo de plagas y enfermedades como en el crecimiento de la planta, siendo crítico en algunos estados fenológicos como es la floración (Camacho, 2003). Cuando existe exceso de humedad ambiental, se produce una condensación de agua en las paredes y techo del invernadero que origina el goteo sobre las plantas y suelo, provocando el aumento de enfermedades aéreas (Reche, 1998). En la Tabla 3 se presentan las humedades relativas óptimas en las distintas fases de desarrollo en porcentaje (Gázquez, 2015).

Tabla 3. Humedades relativas óptimas en el cultivo de la sandía.

Humedad relativa (HR)	Porcentaje (%)
Inicio del desarrollo	65-80
Floración	60-70
Fructificación	60

2.1.3.3. Luminosidad

La luminosidad influye en el fotoperíodo, es decir, en la reacción e influencia que tiene la duración del día sobre las plantas y principalmente sobre el momento de la floración (Camacho, 2003).

Los tejidos del ovario de la flor se desarrollan estrechamente influenciados por la temperatura y las horas de iluminación. Se puede afirmar que días largos y temperaturas elevadas favorecen la formación de flores masculinas, mientras que días cortos con temperaturas bajas inducen el desarrollo de flores con ovarios (Gázquez, 2015).

La iluminación muy débil favorece el ahilamiento en los semilleros, y la iluminación intensa incrementa, en general, el número de flores y la precocidad en la maduración de los frutos (Reche, 1998).

2.1.3.4. Suelo

No se trata de un cultivo muy exigente en suelos, aunque se desarrolla correctamente en suelos francoarenosos bien drenados, ricos en materia orgánica y fertilizantes. La práctica del enarenado, hace que el suelo no sea un factor limitante en el cultivo de la sandía, ya que una vez implantado se adecuará la fertilización al medio (Gázquez, 2015).

2.2. DESARROLLO FLORAL

Para asegurar el éxito reproductivo, el proceso de transición floral en plantas angiospermas como la sandía está regulado por un complejo circuito de expresión génica que integra las múltiples señales ambientales recibidas (fotoperiodo, calidad y cantidad de luz, temperatura) con otras endógenas y de desarrollo (edad de la planta, nivel de sacarosa o de distintas fitohormonas) en una serie de rutas de transmisión de señales que termina en la expresión de los genes de tiempo de floración. De esta manera, se aseguran florecer en el momento en que hayan acumulado las reservas internas suficientes y en que las condiciones ambientales sean favorables (Seguí, 2011).

El desarrollo de las plantas con flores es una progresión ordenada desde el embrión hasta la planta madura. Esta transición se caracteriza por la transformación de un meristemo vegetativo hasta ese momento, en un meristemo floral que generará directamente una flor.

La mayoría de los embriones de plantas angiospermas sufren un patrón estereotípico de división celular para formar una estructura simple con un eje radial y un eje apical-basal. Mientras que en el eje radial se establecen los primordios foliares, en el eje apical se establece el meristemo apical vegetativo. Éste consta de una colección de células totipotentes capaces de generar cualquier tipo de tejido.

Después de un período de crecimiento vegetativo, una combinación de señales endógenas y ambientales induce el desarrollo floral. Durante esta transición floral, el meristemo apical se convierte en un meristemo floral que dará lugar exclusivamente a la flor, con los órganos que la componen. A partir de aquí, el patrón de desarrollo del meristemo floral variará mucho dependiendo de cada tipo floral. El crecimiento vegetativo seguirá a partir de la yema axilar de la hoja más cercana al meristemo apical, desplazando el meristemo floral (Krizek y Fletcher, 2005).

Las flores hermafroditas de las angiospermas están formadas por cuatro verticilos florales: los dos más externos son verticilos estériles (corola y cáliz), mientras que los dos más internos son los órganos sexuales (androceo y gineceo). Coen y Mayerowitz (1991) propusieron un modelo de interacción génica (Figura 6) en el cual, cada órgano floral se expresaba por la acción de determinados genes clasificados en tres grupos (A, B y C). Cada uno de estos grupos de genes se expresa únicamente en dos de los cuatro verticilos florales y, por tanto, en dos de los cuatro órganos florales. Así, los genes del grupo A controlan la diferenciación de los sépalos; los genes de los grupos A y B expresados conjuntamente dan lugar a los pétalos; los genes de los grupos B y C expresados conjuntamente determinan los estambres, y los genes del grupo C forman los carpelos.

Estos cuatro verticilos se han conservado a través de la evolución. Sin embargo, las flores unisexuales sólo poseen uno de los dos verticilos internos. Esto se debe a que en las etapas de desarrollo temprano la flor presenta los dos sexos, pero es en estadios avanzados cuando se produce la detención del desarrollo de uno de ellos. El momento en el que se produce el aborto es distinto según la especie (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993).

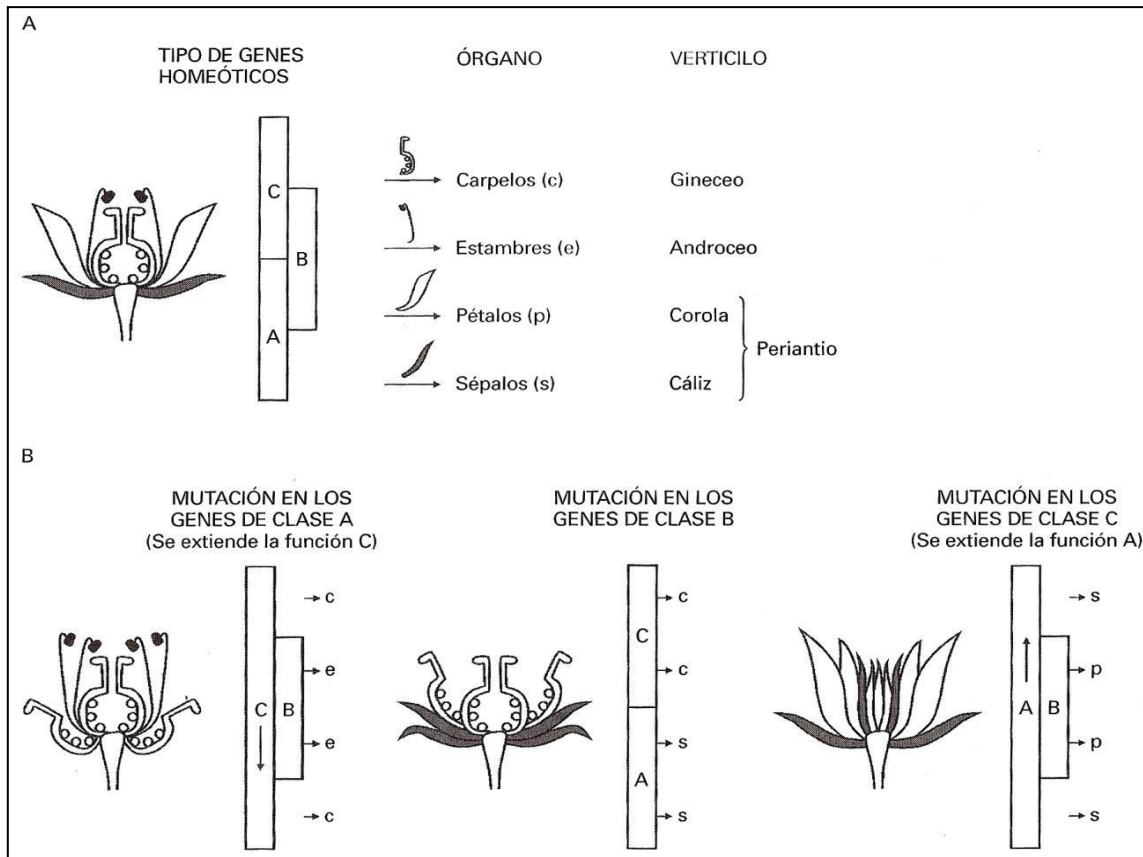


Figura 6. Modelo ABC de control genético de la identidad de los órganos florales. A: Tipos de genes homeóticos que controlan la identidad de los órganos florales. B: Ejemplos de fenotipos mutantes para cada uno de los grupos de genes homeóticos (Azón-Bieto y Talón, 2000).

2.3. DETERMINACIÓN DEL SEXO EN LAS PLANTAS

Tres tipos de flores han sido identificadas en angiospermas: estaminadas o masculinas, pistiladas o femeninas y hermafroditas o bisexuales. El fenotipo sexual de una planta es el resultado de la presencia/ausencia y distribución del patrón de estos tres tipos de flores en plantas individuales (Ji y col., 2015). Es decir, aquellas plantas cuyas flores tengan androceo (aparato reproductor masculino) serán masculinas; las que tengan gineceo (aparato reproductor femenino) serán femeninas, y las que presenten tanto androceo como gineceo serán hermafroditas (Taiz y Zeiger, 2006).

En función del tipo y distribución de los distintos tipos de flores en la planta, ésta podrá ser monoica, dioica o hermafrodita (Taiz y Zeiger, 2006). Aproximadamente el 90% de las especies de angiospermas producen flores hermafroditas en la que todos los verticilos se desarrollan correctamente, y los carpelos y estambres son fértiles. Sólo el 6% de las plantas con flores son especies dioicas, es decir, producen flores femeninas y masculinas en distintas plantas; y el 7% son especies monoicas, es decir, producen flores femeninas y masculinas en la misma planta (Diggle y col., 2011).

Históricamente, se han reconocido dos amplias categorías de flores unisexuales. En la categoría “tipo I”, las flores son hermafroditas en la iniciación y se convierten en unisexuales por la parada del desarrollo del androceo o gineceo, o por el aborto de los órganos

reproductivos. En la categoría “tipo II”, la diferenciación sexual se produce antes de la iniciación de los estambres y carpelos. Hay que tener en cuenta que el desarrollo de un androceo y gineceo funcionales es un proceso complejo que implica un gran número de genes. Además, cambios genéticos en cualquier punto del comienzo de su maduración podría conducir al desarrollo de flores unisexuales (Diggle y col., 2011).

El fenotipo sexual de los cultivares de sandía puede ser monoico o andromonoico aunque, en la actualidad, la mayoría son del primer tipo. Normalmente, en los cultivares de sandía, el número de flores pistiladas (o femeninas o hermafroditas) es bajo, con un intervalo fenotípico de 4-15 flores masculinas seguido por otro intervalo de flores pistiladas, dependiendo del genotipo. Tras la fase masculina comienza la fase reproductiva, que se caracteriza por una alternancia de flores masculinas y pistiladas en proporciones variables. Por último tiene lugar una fase de desarrollo femenino donde la planta produce mayormente flores pistiladas. No obstante, este patrón de desarrollo puede verse alterado como consecuencias de cambios ambientales y hormonales y por el genotipo de la variedad de la planta (Aguado, 2015).

2.3.1. Determinación del sexo en la familia de las Cucurbitáceas

En *Cucurbitaceae*, una amplia gama de fenotipos sexuales han evolucionado y, al igual que en otras especies de plantas unisexuales, el dimorfismo está genéticamente controlado por loci relacionados con el sexo y modificado por factores ambientales y hormonales (Salman-Minkov y col., 2008).

En esta familia, los primordios florales son inicialmente bisexuales. La determinación es realizada mediante la detención del desarrollo de los órganos masculinos o femeninos, dando lugar a flores unisexuales.

Esta variación está genéticamente controlada por genes determinantes del sexo que rigen el destino y desarrollo de las yemas florales individuales, así como el patrón sucesivo de flores masculinas, femeninas y hermafroditas a lo largo de la planta entera (Boualem y col., 2009). Los fenotipos sexuales del pepino (*Cucumis sativus*) están controlados por los loci *F* (femenino) y *M* (monoecia), cuya combinación produce fenotipos hermafroditas, andromonoicos, monoicos y ginoicos (Yamasaki y col., 2001). En melón (*Cucumis melo*), la herencia del sexo está basada en los loci *A* (andromonoico) y *G* (ginoico) (Kenigsbuch y Cohen, 1990). Por su parte, el fenotipo sexual en sandía está controlado por un solo gen que presenta dos alelos: el alelo dominante *A* que confiere monoecia, frente al alelo recesivo *a* que confiere andromonoecia (Rosa, 1928).

Sin embargo, la expresión sexual en esta familia también puede verse afectada por factores ambientales tales como la intensidad de la luz, el fotoperíodo y la temperatura (Manzano y col., 2014). Así, condiciones de invierno con días cortos, baja intensidad de luz y bajas temperaturas nocturnas promueven la producción de flores femeninas, mientras que condiciones de verano incrementan la producción de flores masculinas. En calabacín (*Cucurbita pepo*), bajas temperaturas inhiben el desarrollo de flores masculinas e incrementan

el número de flores femeninas por planta, mientras que altas temperaturas inducen una transformación parcial o completa de flores femeninas en bisexuales (Peñaranda y col., 2007).

En sandía se observa el mismo comportamiento. La mayoría de procesos relacionados con la floración y el crecimiento del tubo polínico se ven influenciados principalmente por la intensidad de la luz y la temperatura. La expresión del sexo y el crecimiento del tubo polínico también se ven afectados por la luz. Esto sugiere que la temperatura puede controlar la fructificación influyendo en el número de flores, tamaño del ovario, número de óvulos y la tasa de crecimiento del tubo polínico, y que la luz puede actuar a través de su efecto sobre el desarrollo del óvulo, además del crecimiento vegetativo (Sedgley y Buttrose, 1978). De hecho, en sandía, temperaturas altas que rondan los 32°C, suprimen la floración femenina y promueven una tendencia a la masculinidad (Rudich y Peles, 1976).

La expresión sexual también está regulada por diferentes hormonas. Mientras que las giberelinas promueven la producción de flores masculinas, las auxinas promueven la producción de flores femeninas, aunque su efecto parece estar mediado por la principal hormona reguladora de la expresión sexual en esta familia: el etileno (Peñaranda y col., 2007). Estudios previos han demostrado que tratamientos externos con etileno favorecen la formación de flores femeninas en cultivares monoicos de melón, pepino y calabacín. Por su parte, la aplicación de inhibidores de la biosíntesis del etileno, incluyendo el aminoetoxivinilglicina (AVG) o el tiosulfato de plata (STS), favorecen el desarrollo de flores masculinas por planta.

El etileno también es un importante regulador de la expresión sexual en sandía. Sin embargo, tratamientos externos con la hormona inducen la producción de flores masculinas, mientras que tratamientos externos con inhibidores del etileno aceleran la aparición de la primera flor femenina e incrementan el número de flores femeninas por planta, que es justamente lo contrario a lo que ocurre en otras Cucurbitáceas (Manzano y col., 2016). Además, los tratamientos con etefón retrasan la transición de la flor femenina y reducen el número de flores femeninas/bisexuales por planta (Manzano y col., 2014).

2.3.2. Regulación de la síntesis de etileno

La hormona vegetal etileno está involucrada en muchos aspectos del ciclo vital de las plantas y ve aumentada su producción en procesos como germinación de semillas, desarrollo radicular, nodulación de raíces, senescencia de flores, abscisión y maduración de frutos (Johnson and Ecker, 1998). Además, también es regulada por señales internas y en respuesta a estímulos ambientales de estreses bióticos y abióticos, tales como heridas, enfriamiento o congelación (Wang, Li y Ecker, 2002). Incluso el etileno puede regular su propia biosíntesis, ya sea incrementándola (autoestimación) o disminuyéndola (autoinhibición) (Manzano, 2009).

El etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina (Met) mediante tres reacciones principales (Figura 7).

La primera reacción está catalizada por la enzima S-adenosilmetionina sintasa (SAMS) y regula la conversión de la metionina en S-adenosilmetionina (SAM) con el requerimiento de una molécula de ATP por cada molécula de SAM sintetizada. Aproximadamente el 80% de la metionina celular es convertida en SAM. Esta molécula es el principal donante del grupo metilo en las plantas y es utilizado como sustrato de muchas vías bioquímicas. Por ello, participa en reacciones de metilación que modifican lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

La segunda reacción está catalizada por la enzima ACC sintasa (ACS) y regula la conversión de SAM en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). En este proceso, la ACC sintasa también produce 5'-metiltioadenosina (MTA), el cual puede volver a convertirse en metionina a través del ciclo de la metionina o ciclo de Yang en honor a su descubridor. El reciclaje de MTA a metionina permite mantener una concentración constante de la metionina celular incluso cuando el etileno se sintetiza rápidamente.

La tercera y última reacción está catalizada por la ACC oxidasa (ACO) y regula la conversión de ACC en etileno, produciendo también CO₂ y cianuro, el cual es desintoxicado a β-cianoalanina por la β-cianoalanina sintasa para prevenir la toxicidad por acumulación de altas tasas de cianuro durante la síntesis de etileno (Wang, Li y Ecker, 2002).

Como se ha descrito anteriormente, la biosíntesis de etileno es regulada positiva o negativamente por múltiples factores exógenos y endógenos. Así, procesos como la maduración de los frutos, los estreses bióticos o abióticos y las auxinas, son capaces de inducir la síntesis de ACC y de etileno a través de un aumento de la actividad de las enzimas ACS y ACO (Nakagawa y col., 1991; Liang y col., 1992; Mckeon y col., 1995; Vogel y col., 1998).

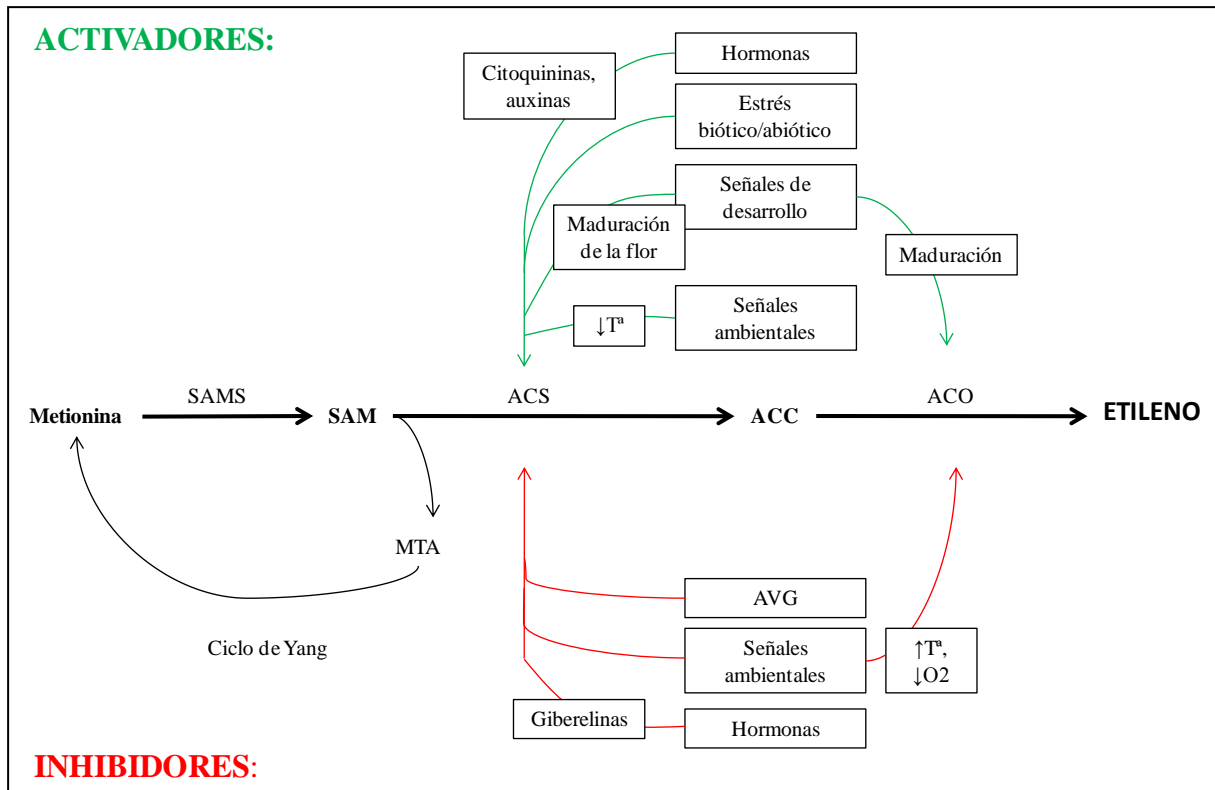


Figura 7. Ruta de la biosíntesis del etileno. Las reacciones mediadas por las enzimas ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO) son los pasos limitantes en la síntesis (elaboración propia a partir de Kierber y col., 1993; Manzano, 2009).

2.3.3. Determinación del sexo y genes ACS de biosíntesis de etileno

Como se ha expuesto en el apartado anterior, la expresión sexual en pepino está controlada por los loci *F* (femenino) y *M* (monoecia), cuya combinación produce fenotipos hermafroditas, andromonoicos, monoicos y ginoicos. El alelo dominante *F* es necesario para el desarrollo de flores pistiladas, mientras que el alelo *M* es requerido en la detención del desarrollo de los estambres en flores femeninas. El alelo recesivo *a* confiere el fenotipo andromonoico. En melón, la herencia del sexo está basada en los loci *A* (andromonoica) y *G* (ginoico). Al igual que en pepino, la supresión de los estambres en las flores pistiladas depende del alelo dominante *A*, el cual sería homólogo al locus *M* en pepino.

La expresión del sexo en el género *Cucumis* está estrechamente relacionada con la producción de etileno. Los loci *F* y *M* fueron clonados en pepino, y se correspondieron con dos genes miembros de la familia ACS (1-aminociclopropano-1-sintasa carboxilato): *CsACSIG* y *CsACS2* respectivamente. Dichos genes están implicados en la ruta de transducción de señales en el proceso de biosíntesis de etileno. El locus *A* en melón también codifica un gen implicado en la biosíntesis de etileno, *CmACS7*. Estos hechos ponen de manifiesto que los dos principales loci que participan en la determinación del sexo en pepino, y uno de los responsables de la determinación del sexo en melón, corresponden a genes involucrados en la biosíntesis de etileno. El programa de desarrollo que conduce a la bisexualidad en las flores en pepino, melón y calabacín es el resultado de la mutación en los genes de biosíntesis de etileno *CsACS2*, *CmACS7* y *CpACS27A*, respectivamente, indicando

que el aborto de los estambres en las flores femeninas de estas tres especies requiere de la producción específica de etileno mediada por estos tres genes en etapas muy tempranas del desarrollo de la flor pistilada (Manzano y col., 2016).

En sandía también existe un gen *ACS* ortólogo a los mencionados anteriormente, aunque su estudio fue llevado a cabo más tarde. Para ello se secuenciaron los genes conocidos del genoma de la sandía y se compararon con el de las otras Cucurbitáceas para detectar homologías en las secuencias de nucleótidos. De esta manera se identificó un gen denominado *CitACS4*, el cual fue clonado y caracterizado en líneas monoicas y andromonoicas (Manzano y col., 2016).

En otras Cucurbitáceas, la andromonoecia está conferida por una mutación en los genes de biosíntesis de etileno *CmACS7*, *CsACS2* y *CpACS27A*. Se ha detectado que la mutación C364W ocurrida en una línea andromonoica de sandía, cosegrega con el fenotipo andromonoico además de una reducción de la producción de etileno en las yemas florales. Sin embargo, no cosegrega con otros rasgos de la expresión del sexo como el número de flores pistiladas por plantas. Cabe destacar que tanto el control de la expresión del sexo, es decir, la precocidad y producción de flores femeninas por plantas, como el control de la determinación del sexo, es decir, los mecanismos que lideran el correcto desarrollo y diferenciación de flores unisexuales masculinas y femeninas, son procesos independientes en espacio y tiempo regulados por el etileno, por lo que la reducción de etileno en las yemas florales se relaciona con la supresión de los estambres durante el desarrollo de las flores femeninas (Manzano y col., 2016).

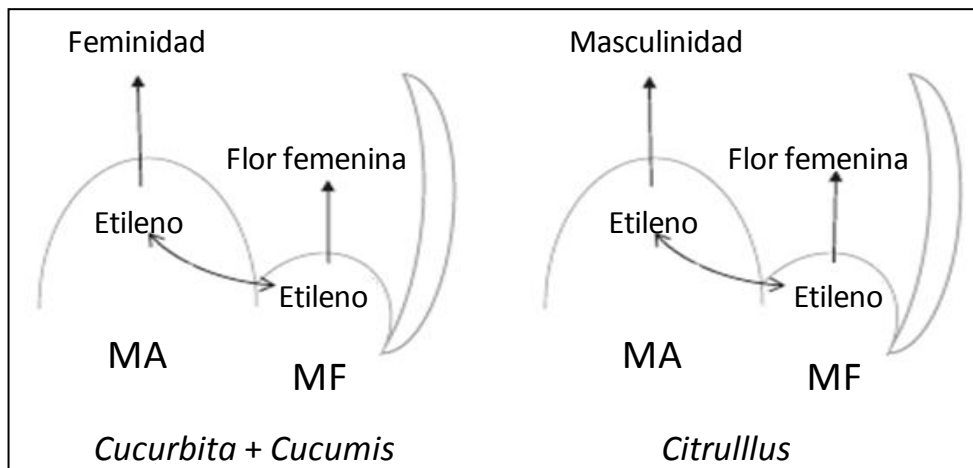


Figura 8. Modelo de regulación del etileno en la expresión sexual y desarrollo floral en *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo* (izquierda) y *Citrullus lanatus* (derecha). MA, meristemo apical; MF, meristemo floral femenino (Manzano y col., 2014).

Manzano y col. (2014) propuso un modelo (Figura 8) para sandía en el cual la producción y acción de etileno en el meristemo apical está regulada de manera diferente al producido en los meristemos florales femeninos. Mientras que el primero controla la expresión del sexo a lo largo del tallo, el segundo regula la diferenciación y el desarrollo de las flores femeninas.

2.4. FISIOLÓGÍA DEL CUAJADO Y DESARROLLO DEL FRUTO

De manera general, el desarrollo inicial del fruto se puede dividir en tres fases (Figura 9).

La primera fase comprende los procesos de desarrollo del ovario, fecundación y cuajado del fruto. En ella, el ovario toma la decisión de abortar o proseguir con el desarrollo del fruto, dependiendo de una o más señales de crecimiento positivas generadas durante o después de la polinización, y posiblemente tan tarde como la fecundación. En el proceso de polinización, el polen es transportado desde una flor masculina a otra femenina, ya sea realizado mediante abejas, otros insectos, viento o manualmente (Gillapsy, Ben-David y Gruissem, 1993). Una vez que el polen está sobre el estigma de la flor femenina se produce su germinación y, a través del tubo polínico, avanza por el interior del estilo hasta que llega a la cercanía del óvulo. Por la acción de las células sinérgidas, se produce la división del núcleo germinativo del grano de polen y la doble fecundación de la ovocélula y el núcleo secundario para formar el cigoto (Camacho, 2003). Es sabido que en estos procesos el polen produce giberelinas y que éstas a su vez inducen un incremento en el contenido de auxinas, las cuales conducen al cuaje del fruto (Varoquaux y col., 2000).

La segunda fase comprende los procesos de división celular, formación de semillas y desarrollo temprano del embrión. Durante esta fase, el aumento del tamaño del fruto es bajo debido a que las células en división son pequeñas y están fuertemente comprimidas. El tamaño final del fruto dependerá altamente del número de células que posea (Varoquaux y col., 2000).

La tercera y última fase comprende los procesos de expansión celular y maduración del embrión. En esta fase, el fruto crece a medida que la pared celular y la membrana citoplasmática se vuelven más delgadas, permitiendo a las vacuolas ocupar una mayor proporción del volumen celular hasta alcanzar su tamaño final, a causa de la acumulación de carbohidratos, ácidos orgánicos y otros compuestos necesarios para mantener la presión osmótica y el flujo de agua en las células en expansión (Patrick y col., 2008). Normalmente, la expansión celular aumenta el tamaño del fruto en cien veces y contribuye a alcanzar el tamaño final del fruto (Gillapsy, Ben-David y Gruissem, 1993). Esta expansión de las células en los tejidos del fruto no es paralela al proceso de desarrollo de la semilla, que no muestra un aumento comparable de tamaño (Varoquaux y col., 2000).

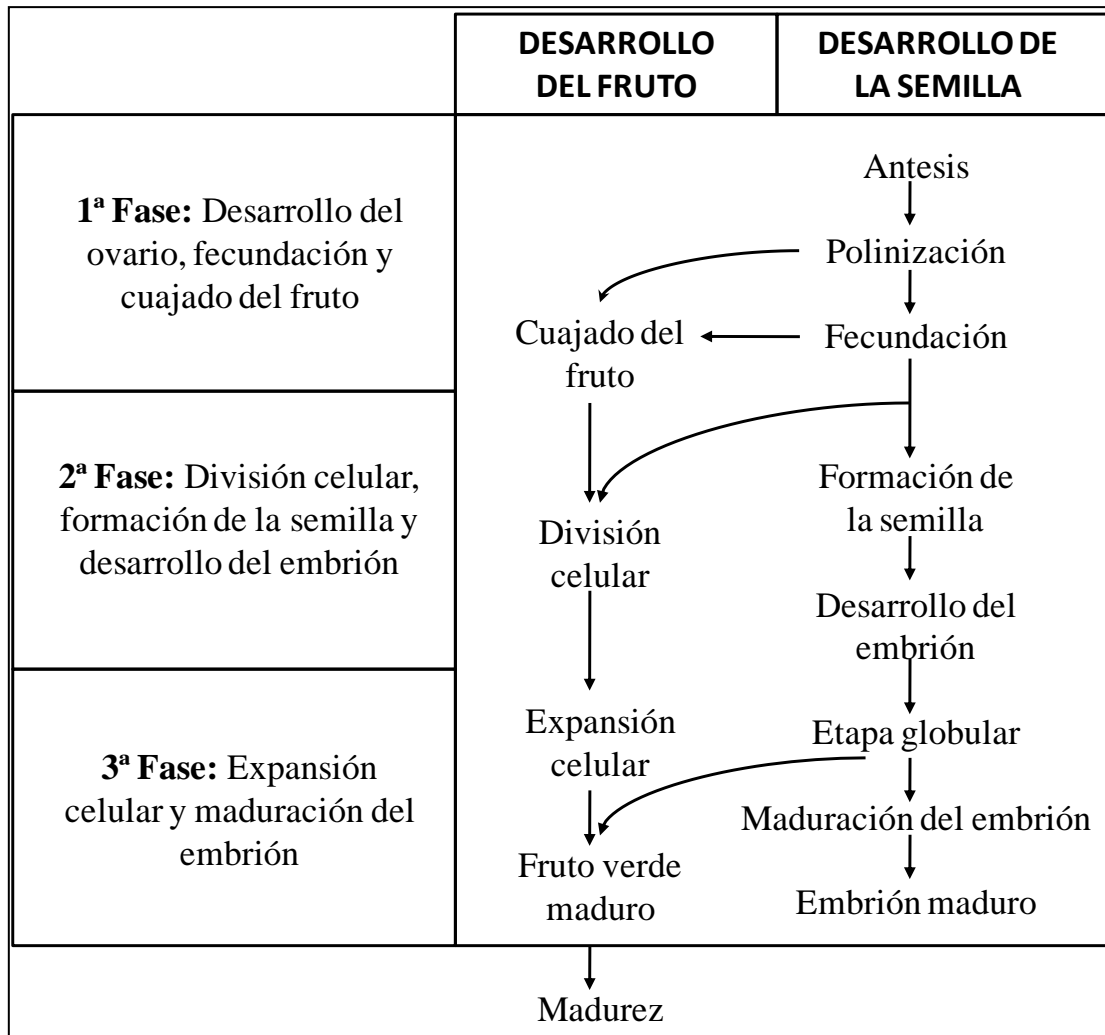
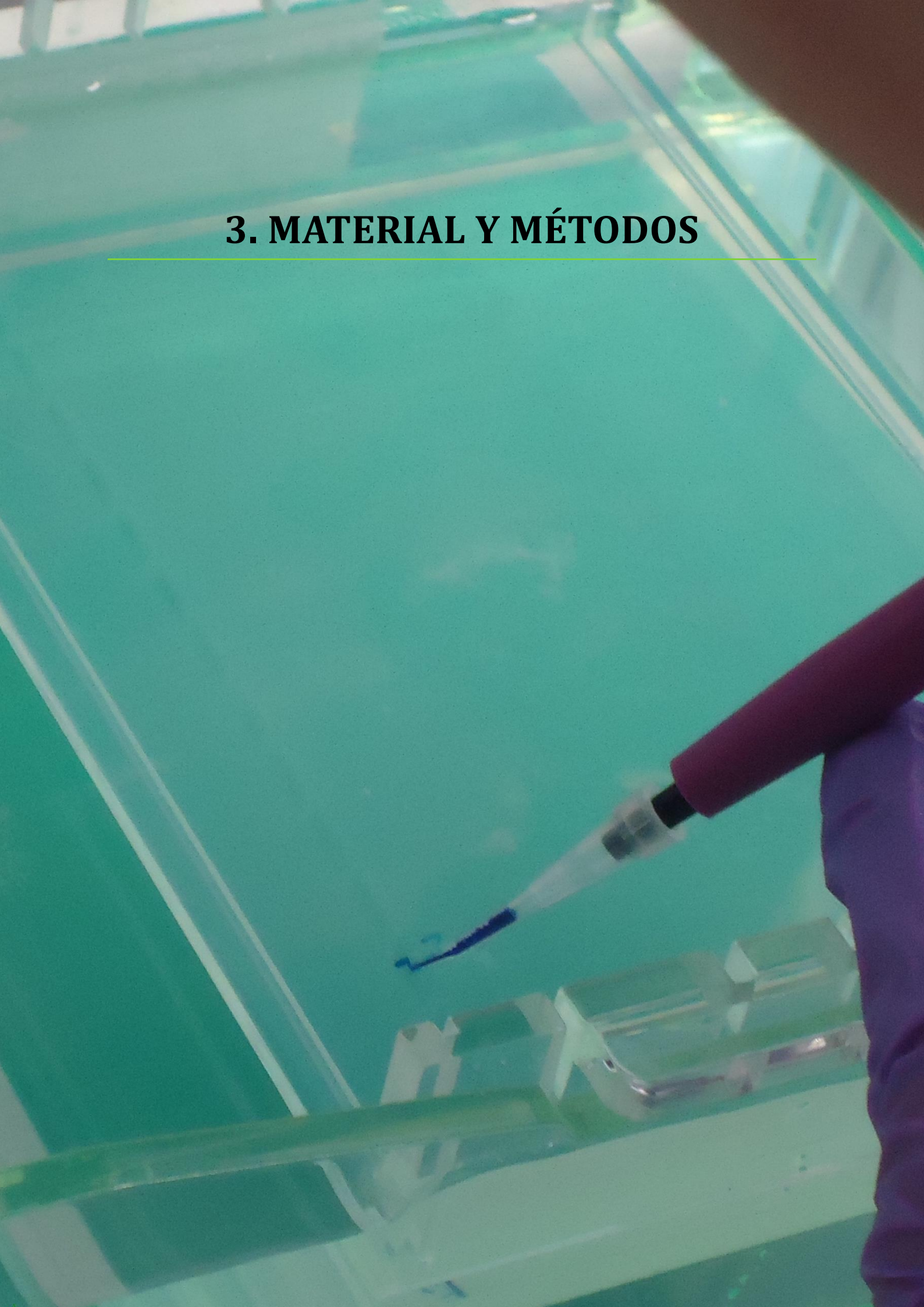


Figura 9. Representación esquemática sobre la analogía entre los procesos de desarrollo del fruto y de la semilla (elaboración propia a partir de Varoquaux y col., 2000).

Al final del desarrollo inicial, el fruto ha alcanzado su máximo tamaño e inicia el proceso de maduración. Durante la maduración del fruto, hay cambios en los pigmentos y compuestos volátiles aromáticos, conversión del almidón en azúcares, y una mayor susceptibilidad a los patógenos de postcosecha. Los procesos estructurales, bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante la expansión celular y la fase de maduración, conforman el sabor, la textura y el atractivo global de los frutos maduros (Patrick y col., 2008).

3. MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de analizar la implicación del gen *CitACS4* en el desarrollo de flores y frutos en sandía (*Citrullus lanatus*), se realizó un ciclo de cultivo primavera-verano en el que se evaluaron varios caracteres de interés agronómico como el cierre pistilar, el cuajado o la forma del fruto de una línea pura monoica (P84) y una línea pura andromonoica (P87), así como la población F1 resultante del cruce de ambas, y su F2. Por otro lado, se comparó el crecimiento de ovarios, pétalos y estambres de otra línea pura monoica (P86) con las dos líneas puras mencionadas anteriormente.

3.1. EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO E INSTALACIONES

El trabajo de investigación se realizó en el campo de prácticas de la Universidad de Almería. Está situado en La Cañada de San Urbano, en el municipio de Almería, cuya identificación catastral corresponde al polígono 58, parcela 79. En la Figura 10 se puede observar el emplazamiento exacto del campo de prácticas, que se encuentra junto a la carretera local AL-3202. Las coordenadas UTM aproximadas del invernadero donde se realizó el ensayo son: X=553.034,09 e Y=4.075.837,66. Es un invernadero tipo parral de 1.500 m² de superficie y dotado de ventilación lateral.



Figura 10. Emplazamiento del campo de prácticas de la Universidad de Almería. Fuente: Sistema de Información Geográfica de Identificación de Parcelas Agrícolas (SIGPAC).

El cultivo de las plantas destinadas a la recopilación de datos referentes a caracteres de interés agronómico se estableció en maceteros sobre el suelo, utilizando fibra de coco como sustrato. Por su parte, las plantas destinadas a la evaluación del crecimiento de ovarios, pétalos y estambres se establecieron en el suelo (Figura 11). En ambos casos, el marco de plantación del cultivo fue de 1 x 0,5 m.

Las necesidades hídricas del cultivo se satisficieron mediante un sistema de riego compuesto por dos bidones de riego, una bomba inyectora, cinco ramales portagoteros con treinta y cinco goteros por ramal de tipo estaca en la zona de sandías establecidas en maceteros, y cuatro ramales portagoteros con ocho goteros por ramal de tipo interlínea en la zona de sandía establecidas en suelo.



Figura 11. Distribución del cultivo de sandía y sistema de riego en el ensayo. Arriba, la zona de sandía establecida en maceteros; abajo, la zona de sandía establecida en suelo.

3.2. CONDICIONES AMBIENTALES DEL INVERNADERO, MATERIAL VEGETAL Y MANEJO DEL CULTIVO

3.2.1. Condiciones ambientales

El ensayo se realizó entre los meses de Abril y Junio de 2016, ciclo de cultivo primavera-verano, debido a que la inestabilidad a la monoecia es notable sólo cuando las temperaturas diurnas superan los 30 °C (Martínez, 2013).

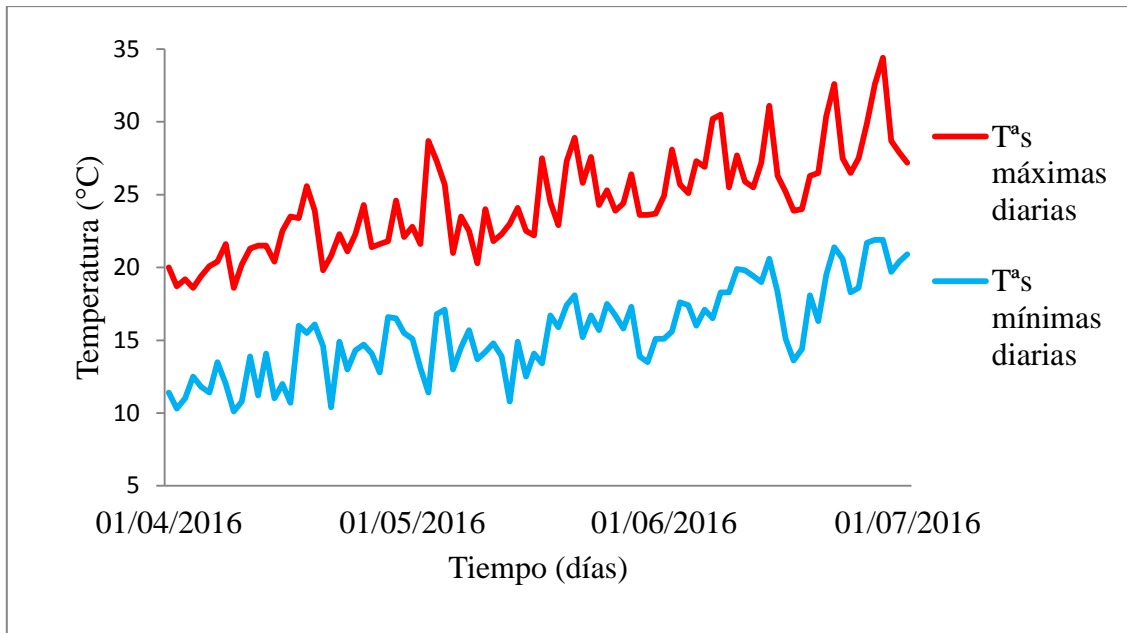


Figura 12. Temperaturas máximas y mínimas diarias alcanzadas en la zona de ensayo durante los meses de Abril, Mayo y Junio (elaboración propia a partir de los datos obtenidos del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Estación Meteorológica de Almería).

La temperatura máxima alcanzada durante el transcurso del ensayo fue de 34 °C, mientras las temperaturas mínimas nocturnas no superaron los 22 °C (Figura 12). Estos saltos térmicos favorecieron las condiciones del ensayo para estudiar los caracteres que se pretendían observar. Además, las temperaturas se verán en gran medida moduladas por el efecto del invernadero tipo parral, alcanzándose en el cultivo valores más altos entre el día y la noche.

3.2.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado en este trabajo fue cedido por la casa de semillas Nunhems Spain SA (Bayer CropScience). Es el siguiente:

- 25 plantas de la línea pura P87 de fenotipo sexual andromonoico. Se caracteriza por presentar una fase inicial masculina muy larga, seguida de una fase mixta en la que se alternan flores masculinas y flores hermafroditas con desarrollo completo de estambres.
- 15 y 13 plantas de las líneas puras P84 y P86 respectivamente, de fenotipo sexual monoico. Se caracterizan por presentar una menor fase inicial masculina en comparación con la línea P87, seguida de una fase mixta en la que se alternan flores masculinas y flores pistiladas con distinto grado de desarrollo de los estambres, bajo las condiciones ambientales del ensayo.
- 12 plantas de la generación F1 procedente del cruce P84xP87.
- 141 plantas de la generación F2 procedente de la autofecundación de la F1.

3.2.3. Manejo del cultivo

La siembra se realizó entre los días 25 de Febrero y 7 de Marzo de 2016 en el semillero Vital-Plant. El 14 de Abril de 2016 se procedió al trasplante de las plántulas en el suelo y en maceteros. El 23 de Mayo de 2016 se volvieron a trasplantar en maceteros de mayor capacidad (Figura 13) para favorecer el correcto desarrollo de las raíces. Además, este mismo día se entutoraron las plantas a un brazo.

Conforme se iban tomando las correspondientes medidas, se fueron eliminando aquellos frutos que habían abortado para que los frutos seleccionados tuvieran un mejor desarrollo y pudieran evaluarse mejor.



Figura 13. Segundo trasplante a maceteros de mayor capacidad.

3.3. TOMA DE DATOS

Para facilitar la toma de datos, desde el primer día del ensayo se identificó cada macetero con una rotulación que hacía referencia a la población a la que pertenecía y a la posición que ocupaba dentro de dicha población. En la zona de las plantas establecidas en el suelo se utilizaron carteles rotulados.

Tras realizar el segundo trasplante a maceteros más grandes, se optó por marcar cada planta con una etiqueta alargada rectangular en la que se indicaba su genotipo y la posición que ocupaba dentro de dicha generación.

Con respecto al seguimiento de las flores seleccionadas, éstas se marcaban con escapularios en los que se indicaban la población a la que pertenecía, la posición que ocupaba dentro de dicha población, la fecha de polinización y su fenotipo sexual (Figura 14).



Figura 14. Imagen de las distintas etiquetas empleadas durante el ensayo.

3.3.1. Toma de muestras foliares y extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN, se tomaron dos muestras foliares por planta cuando éstas desarrollaron la primera hoja verdadera, empleando para ello una lanceta. Después, se introducían en tubos Eppendorf previamente rotulados con la población a la que pertenecía la planta y la fecha de recogida del material. Por último, se congelaban en campo en nieve carbónica para más tarde ser almacenados en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El método utilizado en la extracción de ADN se adaptó a partir del protocolo del método CTAB (Levi y Thomas, 1999). El proceso fue el siguiente:

- Añadir $700\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de extracción (2% CTAB, EDTA 20 mM, Tris 100 mM, NaCl 1,42 M, pH 8) y $1,4\text{ }\mu\text{l}$ de β -mercaptoetanol.
- Homogeneizar el tejido con ayuda de un vástago (Figura 15).
- Agitar y centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf con cuidado.
- A partir del sobrenadante, realizar diluciones 1:10 del ADN extraído con agua destilada miliQ.



Figura 15. Homogeneización de las muestras foliares tras añadir el tampón de extracción.

3.3.2. Genotipado de las plantas

El gen *CitACS4* es el gen *ACS* de sandía que mayor homología tiene con los genes *CmACS7* en melón, *CsACS2* en pepino y *CpACS27A* de *Cucurbita*.

Debido a que estos genes están implicados en el control de la monoecia de diversas especies, Manzano y col. (2016) secuenciaron el gen *CitACS4* para cada genotipo parental estudiado (monoico y andromonoico) y detectaron un polimorfismo de un solo nucleótido, el cual fue utilizado para diseñar primers o cebadores específicos que permitieran amplificar un fragmento genómico que incluyera al polimorfismo mediante PCR. Para cada una de las plantas se han realizado dos PCR: una amplificaba el alelo *M* y otra amplificaba el alelo *A*. Los componentes, así como las condiciones de amplificación de la PCR, se presentan en las Tablas 4 y 5 respectivamente.

Tabla 4. Componentes de la PCR.

Componentes	Volumen (µl)/reacción
Buffer 5X	5
Mezcla de dNTPs	2
MgCl ₂	2
Agua miliQ	12,375
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
ADN molde	1,5
Go Taq ADN polimerasa	0,125
Total	25

Tabla 5. Condiciones de la PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos de repetición
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min.	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	30 s.	35 ciclos
Anillamiento	60 °C	30 s.	
Extensión	72 °C	90 s	
Extensión	72 °C	7 min.	1 ciclo
	16 °C	Infinito	

Los primers específicos mencionados anteriormente también fueron empleados en este ensayo. La pareja *CitACS4S-F* y *CitACS4M-R* se utilizó para amplificar el alelo *M*, mientras que la pareja *CitACS4S-F* y *CitACS4A-R* se utilizó para amplificar el alelo *A*. Las secuencias nucleotídicas de los primers son las siguientes:

- Primer Forward (*CitACS4S-F*): TCCCGGGTTTAGAATCG.
- Primer Reverse (*CitACS4M-R*): CGGGCTTAAATTCATCCAG.
- Primer Reverse (*CitACS4A-R*): CGGGCTTAAATTCATCCAC.

Tras la PCR, se llevaron a cabo las electroforesis en geles de agarosa de tamaño medio realizados a partir de 1 g de agarosa, 5 µl de bromuro de etidio y 100 mL de tampón TBE 1X. En el gel se dispusieron dos peines de veinte pocillos cada uno para poder cargar las muestras después. También se utilizó un marcador de peso molecular y concentración de 1 Kb ladder (0,7 µg/línea). Cabe destacar que, a la hora de cargar el gel, se dispusieron las muestras con los primers que amplificaban el alelo *M* en la fila superior de pocillos, mientras que las muestras con los primers que amplificaban el alelo *A* se dispusieron en la fila inferior. Así se facilitaría la identificación de los alelos presentes en cada planta.

Por último y, una vez terminada la electroforesis, se introdujo el gel de agarosa en un sistema de imagen AlphaImager dotado de una cámara ultravioleta y el software AlphaView. El resultado puede observarse en la Figura 16.

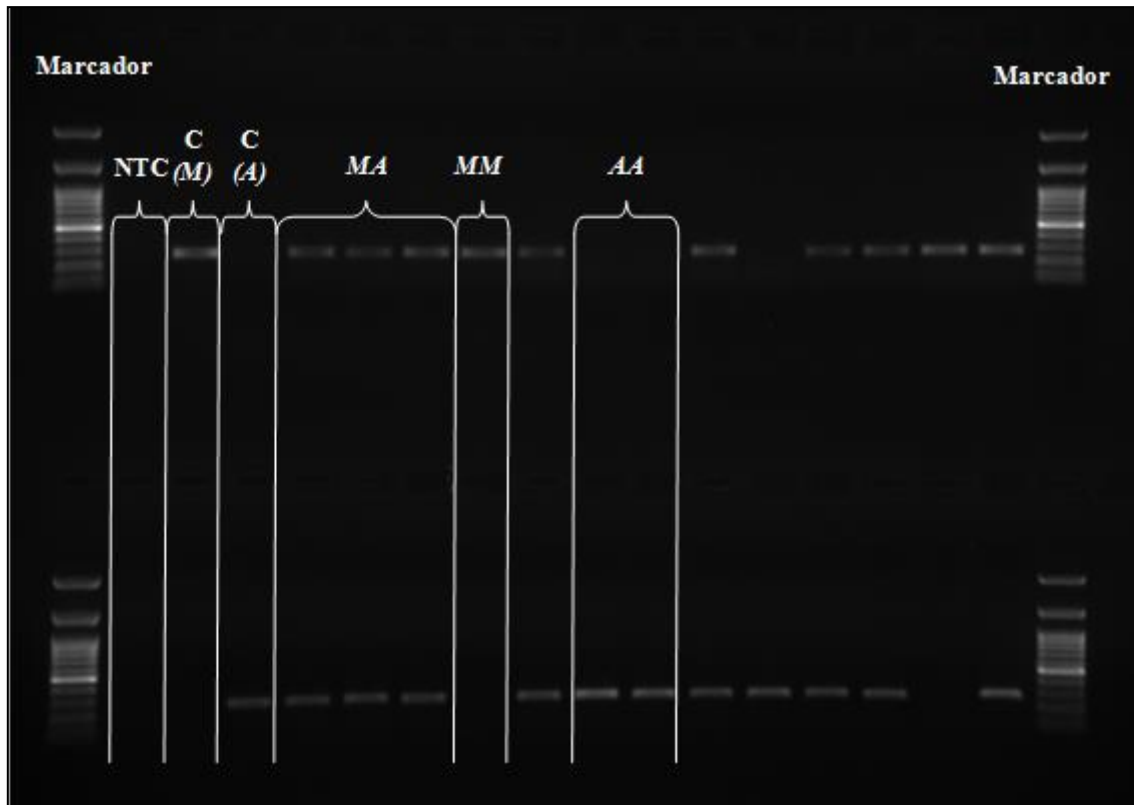


Figura 16. Genotipado de *CitACS4* en algunas plantas de la F2 resultante del cruce P84xP87. En cada una de las plantas analizadas, su ADN se utilizó para amplificar un fragmento de PCR del gen *CitACS4* de 271 pb. Nótese que las plantas que solo presentan la banda superior son homocigotas MM y que las que solo presentan la banda inferior son homocigotas AA. Aquellas que presentan ambas bandas son heterocigotas MA. NTC No Template Control (control negativo), C(M) Control alelo monoecia, C(A) Control alelo andromonoecia.

3.3.3. Fenotipado del sexo

En sandía se ha observado que en determinadas condiciones climáticas (altas temperaturas) las plantas pueden presentar flores femeninas, flores hermafroditas y flores con tendencia al hermafroditismo. Para evaluar el fenotipo sexual de cada planta, población y genotipo, se definió el Índice de Andromonoecia (IA). Las flores pistiladas tanto del tallo principal como de los tallos secundarios se puntuaron de 1 a 3 según el grado de desarrollo que presentaban sus estambres, siguiendo la escala descrita por Martínez (2013) en *C. pepo*. Así, las flores pistiladas con anteras incipientes se puntuaron como 1, las flores pistiladas con anteras de tamaño medio se puntuaron como 2 y las flores pistiladas que mostraban estambres con anteras completamente desarrolladas se puntuaron como 3 (Figura 17).



Figura 17. Clasificación de las flores pistiladas según su Índice de Andromonoecia. (A) IA=1, flores con anteras incipientes; (B) IA=2, flores con anteras de tamaño medio; (C) IA=3, flores con anteras completas; (D) Flor masculina.

3.3.4. Relación entre la monoecia/andromonoecia y el cuajado de frutos

Para comparar el cuajado de los frutos, quince flores pistiladas de las líneas parentales P84 y P87, generación F1 y cada genotipo de la generación F2, fueron polinizadas el día de antesis (Figura 18). A continuación, se realizó un seguimiento de los frutos y también se evaluó el aborto de los mismos hasta 14 días después de antesis (DPA).



Figura 18. Polinización manual de una de las flores seleccionadas.

3.3.5. Relación entre la monoecia/andromonoecia, la forma del fruto y el cierre pistilar

En relación a la forma del fruto, nueve flores pistiladas de las líneas parentales P84 y P87, generación F1 y cada genotipo de la generación F2, fueron polinizadas el día de antesis. A continuación, se realizaron mediciones tanto del diámetro longitudinal como del diámetro ecuatorial de cada fruto hasta 14 DPA, que posteriormente serían utilizadas para establecer la ratio de cada fruto (R). Si $R=1$, el fruto se considera redondo, y si $R>1$, el fruto se considera ovalado. Por último, se clasificó cada fruto dentro de una escala en función del tamaño de su cierre pistilar, asignando 1 a los frutos con el menor tamaño, y 5 a los frutos con el mayor.

3.3.6. Relación entre la monoecia/andromonoecia y el desarrollo inicial del fruto

Con respecto al desarrollo inicial del fruto, se seleccionaron y polinizaron quince flores pistiladas de las líneas parentales P84 y P87, generación F1 y cada genotipo de la generación F2, y se procedió a medir la longitud y el grosor del ovario cada dos días desde el día de antesis hasta 14 DPA. Las medidas se realizaron con un calibre digital.

3.3.7. Comparación del crecimiento de ovario y pétalos en flores pistiladas y masculinas de distintas líneas

A la hora de evaluar el crecimiento de ovario y pétalos, se seleccionaron quince flores masculinas y quince flores pistiladas de 2 mm de tamaño de las líneas P84, P86 y P87 para su posterior seguimiento longitudinal cada dos días desde el día de antesis hasta 14 DPA. Las medidas se realizaron con un calibre digital.

3.3.8. Comparación del crecimiento de estambres, ovario y pétalos en flores pistiladas de distintas líneas

Para comparar el crecimiento de los órganos florales, doce flores pistiladas de las líneas P84, P86 y P87 en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo preantesis fueron seleccionadas para la medición en campo de pétalos y ovarios utilizando un calibre digital. Posteriormente, estas flores se almacenaron en tubos Falcon para más tarde medir los estambres en la lupa con ayuda de papel milimetrado.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron analizados con el programa de análisis estadístico Statistix Version 8.0, donde se realizó un análisis a la varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con un nivel de confianza del 95% para determinar las diferencias significativas entre las líneas puras y las generaciones F1 y F2.

La comparación de grupos se realizó mediante el método de mínimas diferencias de Fisher (LSD). También se realizó el test Chi cuadrado para determinar si la proporción fenotípica observada en la generación F2 se ajustaba a la proporción mendeliana esperada para un gen.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COSEGREGACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL GEN *CitACS4*

Con el fin de comprobar si las variantes alélicas *M* y *A* del gen *CitACS4* cosegregan con los fenotipos monoico y andromonoico en sandía, se ha determinado el genotipo y fenotipo de 138 plantas de la F2 resultantes del cruce de las líneas P84xP87.

Para amplificar mediante la técnica de la PCR las variantes alélicas *M* y *A*, se emplearon las dos parejas de primers específicas mencionadas en el apartado “Material y métodos”: la pareja *CitACS4S-F* y *CitACS4M-R* para amplificar el alelo *M*, y la pareja *CitACS4S-F* y *CitACS4-A* para amplificar el alelo *A*.

El fenotipo de las plantas se basó en el Índice de Andromonoecia (IA, Martínez y col., 2014). Así, las plantas con IA=1-1,19 se consideraron monoicas; las plantas con IA=1,2-2,27 se consideraron parcialmente andromonoicas, y las plantas con IA=2,28-3 se consideraron andromonoicas. Los resultados se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Genotipo y fenotipo de las líneas parentales P84 y P87, generación F1 y generación F2. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).

Generación	Genotipo	IA	Fenotipo		
			Plantas monoicas	Plantas parcialmente andromonoicas	Plantas andromonoicas
P84	MM	1,2622±0,0512 c	3	6	0
P87	AA	2,9896±0,0990 a	0	0	12
F1	MA	1,9442±0,1116 b	0	10	2
F2	MM	1,2207±0,0343 c	24	17	0
	MA	1,8014±0,0599 b	7	47	9
	AA	2,8036±0,0372 a	0	0	33

La línea andromonoica P87 ha producido flores masculinas y hermafroditas con estambres completamente desarrollados (IA=2,99). La línea monoica P84 ha producido flores femeninas además de flores hermafroditas (IA=1,26). El fenotipo sexual de la población híbrida F1 derivada del cruce entre P84xP87 mostró un fenotipo intermedio (IA=1,94). Cabe destacar que, de las doce plantas que formaban parte de la generación F1, diez presentaron fenotipo parcialmente andromonoico, dos presentaron fenotipo andromonoico y ninguna presentó fenotipo monoico. Este hecho evidencia que la línea P84 presenta un fenotipo inestable para la monoecia, y que el fenotipo monoico no es completamente dominante sobre el andromonoico, difiriendo de los resultados obtenidos por Rosa (1928), Porter (1937) y Poole y Grimball (1944), quienes han indicado que la monoecia es un carácter dominante sobre la andromonoecia en sandía. Con respecto a la generación F2, las plantas con genotipo MM se comportaron de manera similar al parental monoico y presentaron tanto flores femeninas como hermafroditas (IA=1,22). Por su parte, las plantas con genotipo MA

presentaron flores femeninas, masculinas y hermafroditas (IA=1,80), mientras que las plantas con genotipo AA solo presentaron flores masculinas y hermafroditas (IA=2,80).

Aguado (2015) comprobó en su ensayo las diferencias existentes entre tres líneas de fenotipo monoico con respecto a una línea de fenotipo andromonoico y realizó además un análisis genético formal para determinar el modo de herencia de este carácter. En sus resultados observó que no todas las líneas monoicas se comportaron de la misma forma y que había líneas más inestables para la monoecia que otras bajo las condiciones de cultivo utilizadas, similares a las del presente trabajo. El diferente comportamiento de la F1 de los cruzamientos que realizó indicaba que los alelos *M* de las diferentes líneas monoicas podrían ser también diferentes.

Por su parte, Ji y col. (2015) realizaron diferentes cruces entre parentales monoicos, andromonoicos y ginoicos, demostrando que la andromonecia está controlada por un alelo recesivo. También, sugirieron que las formas sexuales en sandía están controladas por tres alelos recesivos: andromonoecia (*a*), ginoecia (*gy*) y trimonoecia (*tm*), siendo el alelo *a* epistático a *tm*, es decir, la acción del alelo *a* enmascara o inhibe la acción del alelo *tm*. Además, identificaron las plantas trimonocias como aquellas que producían flores femeninas, masculinas y hermafroditas. Entre las posibles causas de que la línea parental monoica P84 sea tan inestable a la monoecia es que pueda presentar el alelo *tm*, o a la presencia en esta línea de otro locus implicado en la expresión sexual que todavía no ha sido identificado.

El gen *CitACS4* se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo de las flores femeninas. Dado que es una enzima implicada en la biosíntesis de etileno, esta mayor producción de etileno en las flores femeninas durante las etapas más tempranas del desarrollo floral es la responsable del aborto de los estambres en las flores femeninas de sandía y, por tanto, de la monoecia (Manzano y col., 2014). El hecho de que las plantas heterocigotas MA de la F1 y F2 muestren un fenotipo más inestable para la monoecia o incluso puedan tener un fenotipo andromonoico, indicaría que la función de este gen es dependiente de dosis, y que una única dosis del alelo *M* no es suficiente para mantener la producción de etileno necesaria para la parada del desarrollo de estambres en todas las flores femeninas de la planta (Aguado, 2015).

Tabla 7. Segregación de las plantas monoicas, parcialmente andromonoicas y andromonoicas en la generación F2 resultante del cruzamiento P84xP87.

Generación	Fenotipo			Segregación	X ²	Valor-p
	Plantas monoicas	Plantas parcialmente andromonoicas	Plantas andromonoicas			
P84	3	6	0			
P87	0	0	12			
F1	0	10	2			
F2	31	64	42	1:2:1	2,35	0,307

La segregación entre monoecia, andromonoecia y andromonoecia parcial de las plantas de la F2 estudiada demostró que este rasgo está controlado por un solo gen con dominancia parcial entre monoecia (*M*) y andromonoecia (*A*), ya que la segregación de las plantas monoicas, andromonoicas y parcialmente andromonoicas de la población F2 se ajustaba a la proporción 1:2:1 ($X^2=2,35$, $p=0,307$) (Tabla 7). Los resultados han demostrado que el alelo *A* del parental andromonoico P87 cosegrega con el fenotipo andromonoico en la F2 estudiada, ya que todas las plantas con genotipo AA tuvieron fenotipo andromonoico.

Manzano y col. (2016) también estudiaron el fenotipo del sexo en dos líneas monoicas y otra andromonoica, así como de las generaciones F1 y F2 resultantes de sus cruces. En sus resultados observaron que la F2 mostraba un fenotipo intermedio entre ambos parentales, aunque también notaron que el alelo de la monoecia era semidominante sobre el andromonoico, al contrario de lo ocurrido en este trabajo. Ellos también coincidieron con Aguado (2015) sobre la existencia de diferentes alelos para la monoecia y la andromonoecia. Además, la segregación de monoecia, andromonoecia parcial y andromonoecia de la F2 se ajustaba a la proporción 1:2:1, demostrando que este rasgo está controlado por un solo gen.

4.2. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL CUAJADO DE FRUTOS

Para comparar el cuajado y el desarrollo precoz de los frutos en plantas MM, AA y MA, quince flores de cada genotipo y generación fueron polinizadas y examinadas desde el día de antesis hasta 14 DPA.

Aguado y col. (2016) realizaron y estudiaron diversos ensayos para comprobar la implicación del gen *CitACS4* en varios caracteres de interés agronómico en sandía como el cuajado de frutos. En ellos, analizaron el porcentaje de cuajado de dos líneas monoicas y una andromonoica, así como el de las generaciones F1 resultantes del cruce de cada línea monoica por la andromonoica, y de sus respectivas generaciones F2 separadas según los genotipos MM, MA y AA. De manera general, el porcentaje de cuajado de las plantas con genotipo AA tanto del parental andromonoico como de las dos poblaciones segregantes de cada población, fue menor en comparación al que presentaban las plantas con genotipo MM y MA, sugiriendo que la andromonoecia afecta adversamente en el cuajado del fruto. Sin embargo, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre la línea andromonoica y una de las líneas monoicas que actuaban como parentales, mientras que la otra línea monoica no lo hizo. Esto puede deberse también al hecho de que una línea monoica era más inestable a la monoecia que la otra, comportándose de una manera parecida a la línea andromonoica en cuanto al cuajado de frutos se refiere.

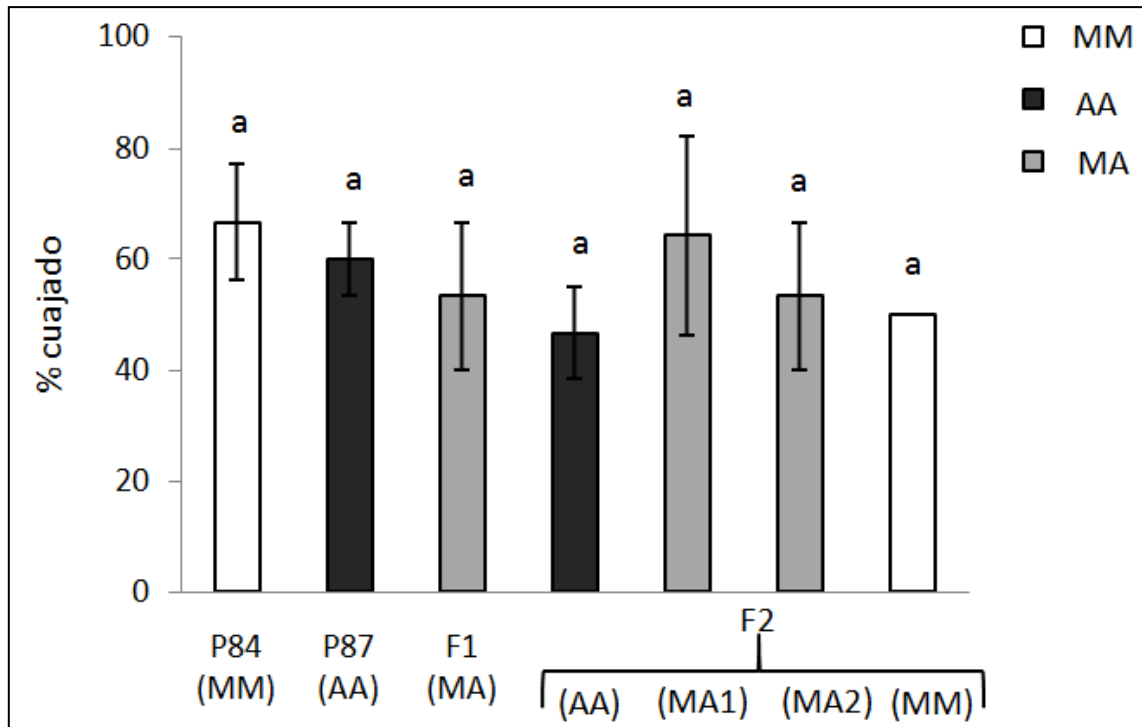


Figura 19. Porcentaje de cuajado en las líneas P84 y P87, y las generaciones F1 y F2. Se han establecido dos grupos dentro de las plantas heterocigotas de la F2: MA1 representa a aquellas plantas que han mostrado un comportamiento más monoico, mientras que MA2 representa a aquellas plantas que han mostrado un comportamiento más andromonoico. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).

Según el análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos en este trabajo, no se observaron diferencias significativas entre genotipos (Figura 19), indicando que todas las plantas se comportaban de una forma parecida y evidenciando que la línea monoica P84 es muy inestable a la monoecia. Aún así, puede apreciarse cómo las plantas con genotipo MM muestran un porcentaje de cuajado ligeramente superior a las plantas con genotipo AA tanto en las líneas parentales como en las poblaciones de la F2, al igual que sucedió en el ensayo de Aguado y col. (2016). Este resultado sugiere que, aunque no se pueda afirmar que existe cosegregación entre el cuajado de los frutos y el gen *CitACS4* de las líneas P84 y P87, la andromonoecia y el alelo A del gen *CitACS4* afectan adversamente en el cuajado de los frutos de sandía, posiblemente a causa de una reducción de la producción de etileno de las yemas florales de las plantas con genotipo AA.

4.3. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL CIERRE PISTILAR

En relación a este parámetro, se estableció en primer lugar una escala de tamaño del cierre pistilar (Figura 20) y, a continuación, se procedió a asignar un número del 1 al 5 dentro de la escala a cada uno de los frutos seleccionados para cada genotipo, siendo 1 el valor asignado a los frutos con el menor cierre pistilar, y 5 a los frutos con el mayor cierre pistilar.

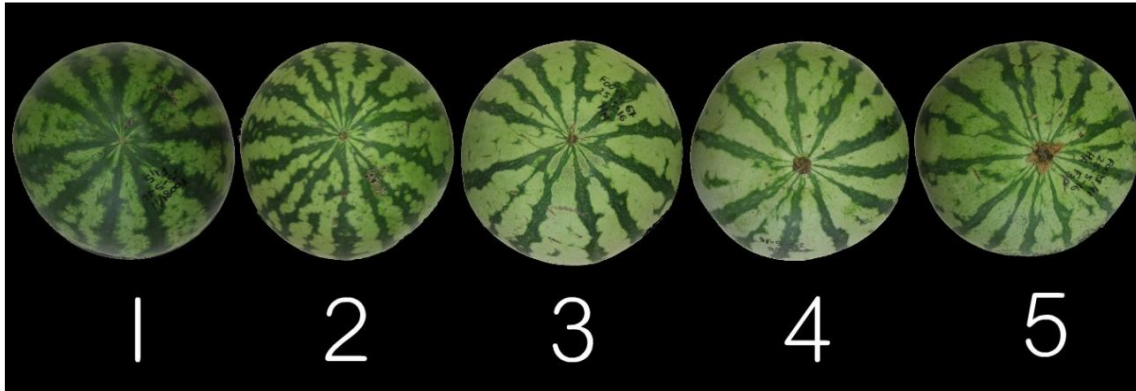


Figura 20. Escala establecida para la evaluación del cierre pistilar.

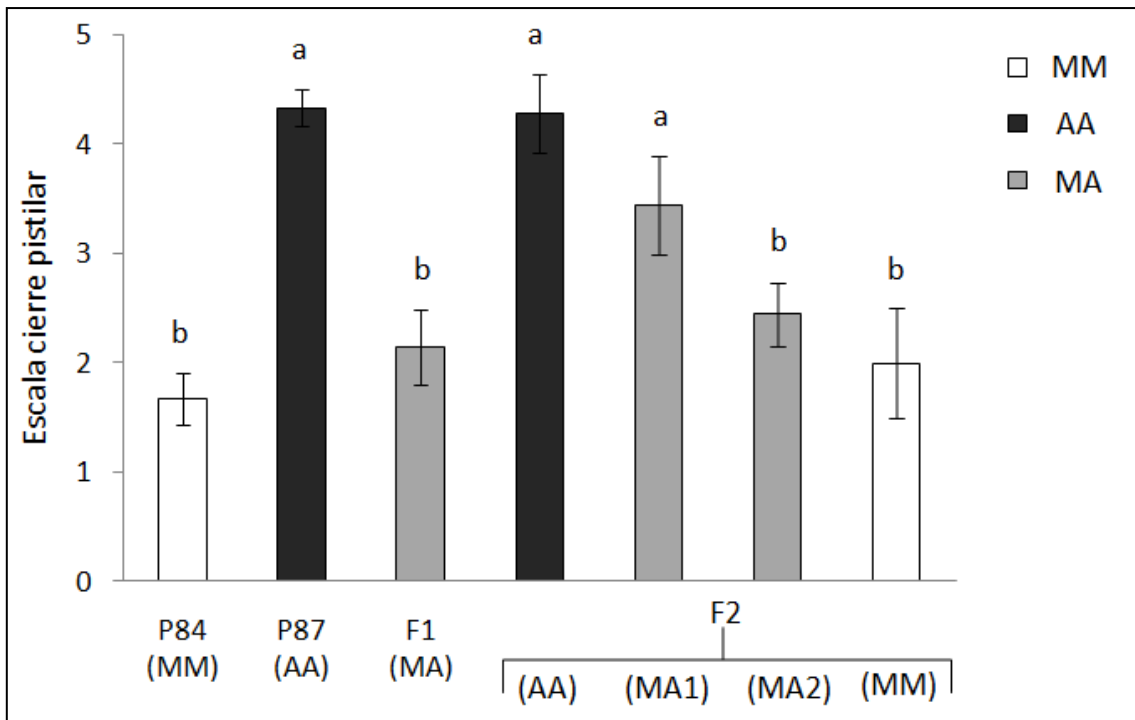


Figura 21. Tamaño del cierre pistilar en las líneas P84 y P87, y las generaciones F1 y F2. Se han establecido dos grupos dentro de las plantas heterocigotas de la F2: MA1 representa a aquellas plantas heterocigotas que han mostrado un comportamiento más monoico, mientras que MA2 representa a aquellas plantas heterocigotas que han mostrado un comportamiento más andromonoico. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).

Según el análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos, sí se observaron diferencias significativas entre genotipos (Figura 21). Así, el tamaño del cierre pistilar en las plantas de genotipo AA tanto del parental andromonoico P87 como de la población

andromonoica de la F2, fue mayor que en las plantas de genotipo MM tanto del parental monoico P84 como de la población monoica de la F2.

Por su parte, la población F1 que presentó un genotipo MA, mostró un tamaño de cierre pistilar muy parecido al del parental monoico P84. Las plantas con genotipo MA de la F2 se separaron en dos poblaciones: la población MA1 que mostró un tamaño de cierre pistilar similar al de las plantas con genotipo MM, y la población MA2 que mostró un tamaño de cierre pistilar parecido al de las plantas con genotipo AA. Estos resultados demuestran que la andromonoecia está asociada con un mayor tamaño del cierre pistilar, y que la monoecia está asociada con uno menor.

Como se ha descrito en la revisión bibliográfica, las flores pistiladas de sandía, tanto femeninas como hermafroditas, presentan un ovario ínfero, es decir, el ovario se encuentra debajo del receptáculo en el que se insertan el resto de verticilos. Las plantas andromonoicas producen flores hermafroditas y, sobre el receptáculo, se sitúan el androceo, gineceo, corola y cáliz. En cambio, las plantas monoicas producen flores femeninas, por lo que presentan los mismos verticilos que las flores hermafroditas a excepción del androceo. Dado que las flores hermafroditas poseen un verticilo más, el tamaño de la cicatriz pistilar tras el proceso de abscisión floral es también mayor. Esta podría ser la causa de que el cierre pistilar observado en las plantas andromonoicas haya sido mayor que el observado en las plantas monoicas.

4.4. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y EL DESARROLLO TEMPRANO DEL FRUTO

Como ya se indicó en el apartado de “Material y métodos”, para evaluar el crecimiento del ovario se seleccionaron 15 flores de cada genotipo y se procedió a medir la longitud y el grosor del ovario cada dos días desde el día de antesis hasta 14 DPA.

En antesis, la longitud del ovario en el parental andromonoico de genotipo AA fue mayor a la del parental monoico de genotipo MM (Tabla 8). El mismo comportamiento se observó en la F2, siendo la longitud del ovario de las plantas con genotipo AA mayor a la de las plantas con genotipo MM. De manera general, podrían establecerse dos grupos diferenciados: las plantas con genotipo AA de la F2 mostraron la mayor longitud del ovario en antesis, al contrario que ocurría con el parental monoico. Estos resultados indican que el desarrollo inicial de fruto está bajo el control del gen *CitACS4*, y que una menor producción de etileno promovida por el alelo A del gen, favorecería el crecimiento del ovario hasta antesis.

De la misma manera, el grosor del ovario en antesis del parental andromonoico fue mayor al del parental monoico. Lo mismo ocurrió en la F2. El grosor del ovario de las plantas con genotipo AA era mayor al de las plantas con genotipo MM. En este caso, podrían establecerse tres grupos diferenciados entre todas las poblaciones, aunque dos de ellos tienen más relevancia: por una parte, las plantas con genotipo MM de la F2 presentaron el menor grosor de ovario de todas las poblaciones y, por otra parte, las plantas con genotipo AA de la F2 presentaron el mayor grosor de ovario.

Tabla 8. Longitud, grosor y tasas de crecimiento en frutos de las líneas P84 y P87, y las poblaciones F1 y F2. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).

Población	Genotipo	Longitud ovario en antesis (mm)	Incremento de la longitud (mm)	
			Antesis-4 DPA	4 DPA-10 DPA
P84	MM	12,90±0,35 b	24,40±2,57 ab	59,48±3,87 ab
P87	AA	13,88±0,64 ab	23,22±1,99 ab	41,66±3,14 d
F1	MA	13,15±0,65 ab	24,97±3,24 a	45,60±3,02 cd
F2	MM	13,20±0,59 ab	30,01±3,26 a	66,09±3,84 a
	AA	14,72±0,75 a	15,38±2,90 b	51,49±1,87 bc
	HM	14,18±0,55 ab	30,00±3,33 a	56,10±2,77 b
	HA	14,02±0,67 ab	27,20±4,09 a	44,95±3,23 cd
Población	Genotipo	Grosor ovario en antesis (mm)	Incremento del grosor (mm)	
			Antesis-4 DPA	4 DPA-10 DPA
P84	MM	8,71±0,25 c	17,55±1,81 c	58,13±3,23 ab
P87	AA	10,87±0,62 ab	20,71±1,77 ab	49,91±3,40 ab
F1	MA	9,66±0,41 bc	21,25±2,93 bc	49,81±2,23 ab
F2	MM	7,37±0,21 d	18,22±2,08 d	56,20±2,13 ab
	AA	11,31±0,64 a	14,15±3,10 a	60,63±2,48 b
	HM	8,82±0,39 c	20,42±2,39 c	54,68±2,71 ab
	HA	10,50±0,55 ab	22,76±3,59 ab	53,18±2,09 a

Durante los días inmediatamente después de antesis (0-4 DPA), no hubo diferencias significativas en cuanto al crecimiento longitudinal del ovario en ambos parentales. No obstante, no ocurrió lo mismo con las poblaciones de la F2, donde los ovarios de las plantas con genotipo AA mostraron la menor tasa de crecimiento durante este período de tiempo. En relación al grosor, la tasa de crecimiento del parental andromonoico fue mayor al del monoico. Sin embargo, las plantas con genotipo AA de la F2 mostraron el menor crecimiento de todas las poblaciones.

Por su parte, entre los días 4-10 DPA, la tasa de crecimiento longitudinal del parental monoico fue bastante mayor a la del parental andromonoico. El mismo comportamiento se observó en la F2. En cuanto a la tasa de crecimiento del grosor, no se observaron diferencias significativas entre los parentales. En la F2 sí que hubo diferencias significativas ya que las plantas con genotipo AA mostraron la menor tasa de crecimiento en grosor del ovario.

El mayor tamaño del ovario de las plantas con genotipo AA en antesis podría deberse a una reducción en la producción de etileno en las yemas florales, lo que ocasionaría un aumento de la tasa de crecimiento del ovario o un retraso en la maduración del pétalo, extendiendo así el período de preantesis (Manzano y col., 2016). Resultados similares fueron encontrados en cultivares parcialmente andromonoicos y mutantes andromonoicos de *C. pepo*, donde la extensión del período de preantesis además de correlacionar con un mayor tamaño de ovario, también lo hacía con un desarrollo partenocárpico del fruto (Martínez y col., 2013).

Este retraso en la maduración del pétalo no solo aumentaría el tamaño del ovario en antesis, sino que también provocaría que el estigma madurase antes de la apertura de la flor, repercutiendo en la producción de frutos y el número de semillas (Manzano y col., 2016). La reducción de la tasa de crecimiento de las plantas con genotipo AA durante los días inmediatamente posteriores a antesis, podría también estar relacionado con la reducción de la receptividad del estigma, y el consecuente nivel de fecundación de los óvulos.

4.5. RELACIÓN ENTRE LA MONOECIA/ANDROMONOECIA Y LA FORMA DEL FRUTO

Para evaluar la forma del fruto se estableció la ratio entre el diámetro longitudinal y el diámetro ecuatorial de cada fruto (R) desde el día de antesis hasta 14 DPA. Si $R=1$, el fruto se considera redondo, y si $R>1$, el fruto se considera ovalado.

En 1928, Rosa, además de demostrar que la monoecia en sandía es un carácter dominante sobre la andromonoecia, también observó una correlación entre el fenotipo sexual y la forma del fruto en melón, pepino y sandía, sugiriendo que la forma del fruto podría deberse a la acción pleitrópica del gen encargado de la determinación del sexo.

En 1937, Weetman realizó un ensayo en el que evaluó la herencia de la forma del fruto, cruzando variedades de sandía con fenotipo redondo y variedades con fenotipo alargado. En todos los cruces, los frutos de la F1 mostraron un fenotipo intermedio entre ambos parentales. Por su parte, los frutos de la F2 mostraron tres fenotipos distintos (alargado, intermedio y redondo) que se ajustaban a la proporción 1:2:1. Estos resultados le llevaron a la conclusión de que el fenotipo en sandía estaba controlado por un solo gen, presentando la forma alargada una dominancia incompleta sobre la forma redonda. Poole y Grimball (1945) confirmaron los resultados obtenidos por Weetman y, además, demostraron que existía una cosegregación entre el fenotipo redondo del fruto con el fenotipo sexual andromonoico, y entre el fenotipo alargado del fruto con el fenotipo sexual monoico.

En 2009, Li y col. observaron una cosegregación entre frutos de pepino redondeados y flores hermafroditas, lo que podría explicarse por la pleitropía en el locus *m*. Sin embargo, Tan y col. (2015) encontraron una línea andromonoica que en vez de presentar frutos con fenotipo redondeado, presentaron frutos con fenotipo ovalado al igual que producían las plantas monoicas, evidenciando la existencia de un nuevo alelo. Además, comprobaron que esta nueva variación alélica se debía a la presencia de varias mutaciones en el gen *CsACS2*, el cual es el principal candidato para el locus *m* en pepino (Boualem y col., 2009). Tras realizar un cruce con este alelo y observar su F2, Tan y col. (2015) llegaron a la conclusión de que la forma del fruto está influenciada por el balance endógeno transitorio del etileno.

Según los datos obtenidos en este trabajo, el fenotipo en antesis de todos los ovarios era alargado independientemente de su genotipo (Tabla 9), aunque las plantas que tenían genotipo MM tanto en la línea parental como en la población F2 presentaron un R mayor que el de las plantas con genotipo AA, indicando en un principio que los frutos de las plantas monoicas eran más alargados que los frutos de las plantas andromonoicas.

Tabla 9. Forma del fruto de sandía en antesis y 14 DPA de las líneas P84 y P87, y las poblaciones F1 y F2. R es la razón entre el diámetro longitudinal y transversal del fruto. Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).

Población	Genotipo	R del ovario en antesis (mm)	R del ovario 14 DPA (mm)
P84	MM	1,45±0,09 bc	1,07±0,03 bc
P87	AA	1,26±0,05 c	0,93±0,01 d
F1	MA	1,42±0,02 bc	0,99±0,02 bcd
F2	MM	1,87±0,14 a	1,21±0,07 a
	AA	1,33±0,04 c	0,93±0,02 cd
	MA1	1,62±0,10 b	1,11±0,07 ab
	MA2	1,33±0,08 c	0,96±0,06 cd

Este comportamiento se apreciaba también en los frutos transcurridos 14 DPA, aunque el fenotipo de la forma para cada genotipo estaba más establecido (Figura 22). Los frutos de las plantas con genotipo MM presentaban el mayor R, al contrario que les ocurría a los frutos de las plantas con genotipo AA (Tabla 9). Dado que el gen *CsACS2* en pepino es ortólogo al gen *CitACS4* en sandía y ambos son responsables del proceso de biosíntesis de etileno, hace pensar que la forma del fruto en sandía también está regulada por el balance endógeno de etileno, y que el gen *CitACS4* está implicado en ello, repercutiendo tanto en la forma ovalada de los frutos con genotipo monoico como en la forma redonda de los frutos con genotipo andromonoico.

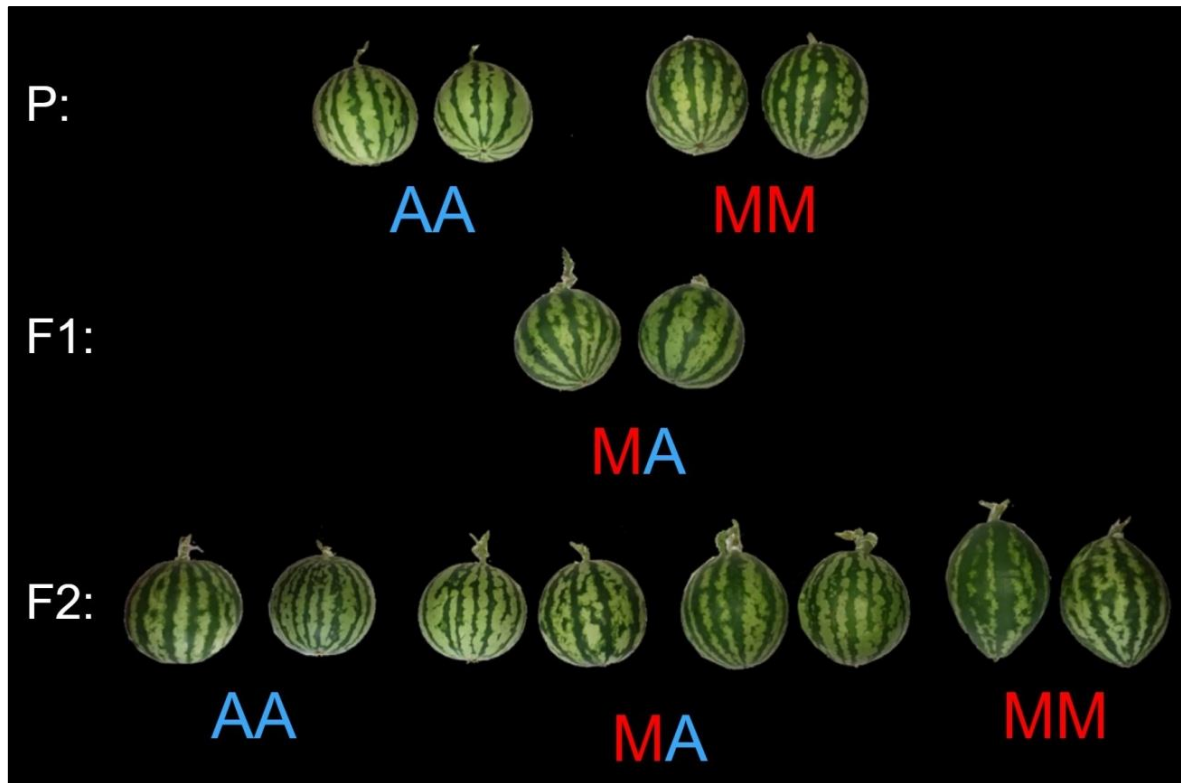


Figura 22. Forma del fruto a los 14 días después de la antesis para cada uno de los genotipos estudiados.

4.6. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE OVARIO Y PÉTALOS EN FLORES PISTILADAS Y MASCULINAS DE DISTINTAS LÍNEAS

Con el fin de comparar el crecimiento de las flores de líneas monoicas y andromonoicas de sandía, se seleccionaron 15 flores de 2 mm de tamaño (tanto masculinas como pistiladas) de dos líneas monoicas (P86 y P84), junto con otra andromonoica (P87). De estas flores se hizo un seguimiento de longitud de ovarios y pétalos hasta el día de antesis.

Los resultados han demostrado que los pétalos y ovarios de flores femeninas y hermafroditas tienen diferentes tasas de crecimiento longitudinal (Figura 25). En relación a la evolución de la longitud del ovario, no se apreciaron grandes diferencias hasta llegar al día 4 (Figura 23), donde el tamaño alcanzado en la línea andromonoica era inferior al alcanzado por las líneas monoicas. Sin embargo, el tamaño alcanzado el día 8 era muy parecido entre todas las líneas, aunque el ovario de la línea andromonoica seguía siendo inferior.

Por su parte, en cuanto a la evolución de la longitud de los pétalos, se aprecia cómo desde el primer día la longitud de los pétalos en la línea andromonoica es mayor a la de las líneas monoicas. El día 6 se observaron diferencias significativas entre las líneas, siendo la andromonoica la que menor longitud de pétalo ha desarrollado, y la monoica P84 la que más. Aún así, a partir del día 8, el patrón de crecimiento del pétalo entre las líneas monoicas empieza a cambiar, y ahora es la línea monoica P86 la que muestra mayor tamaño que la P84, evidenciando esta última línea un retroceso considerable en su tasa de crecimiento. Mientras, la línea andromonoica sigue siendo la que menos crece.

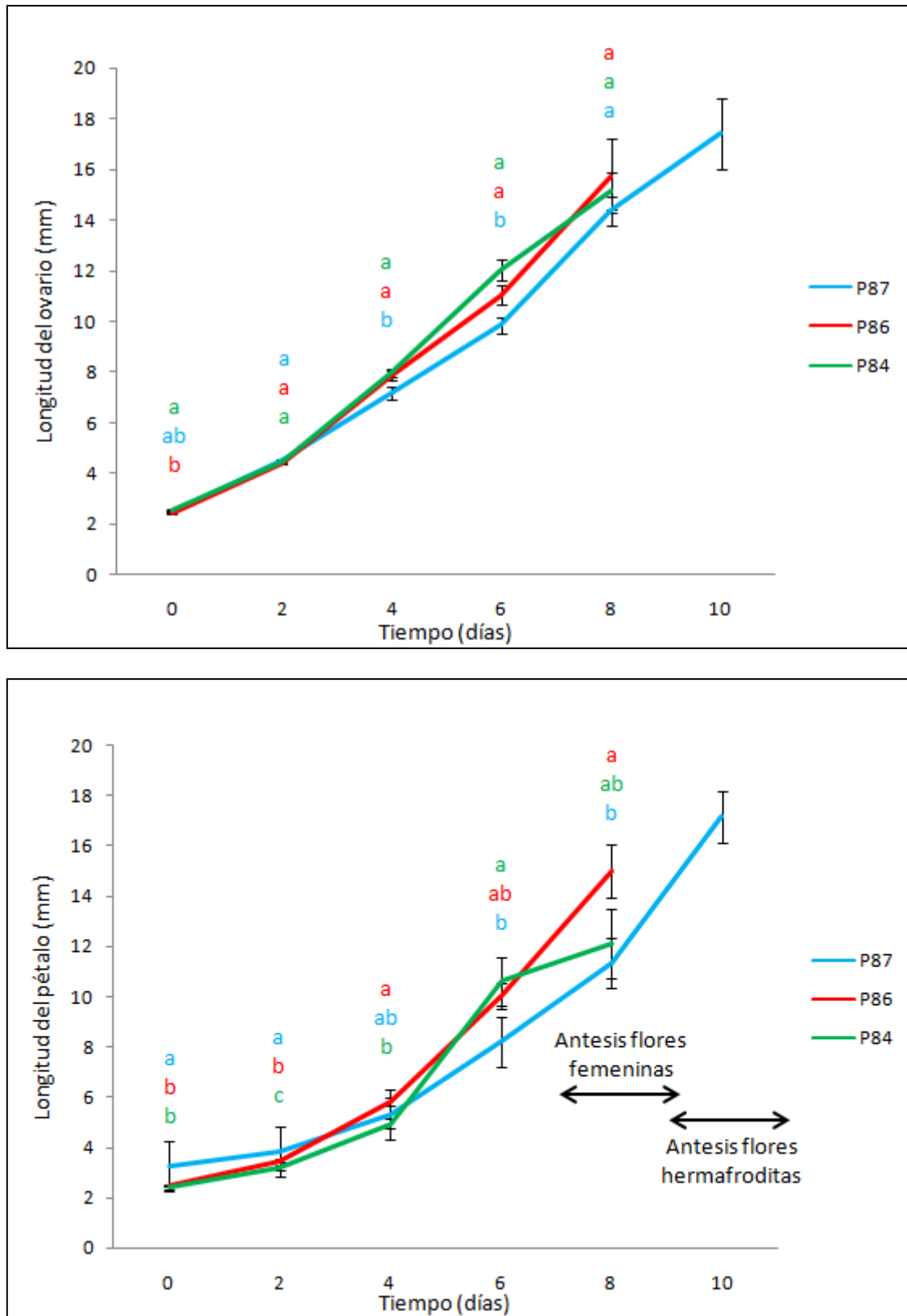


Figura 23. Evolución del crecimiento longitudinal de ovarios (arriba) y pétalos (abajo) de flores pistiladas en dos líneas monoicas (P86 y P84) y una andromonoica (P87). Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).

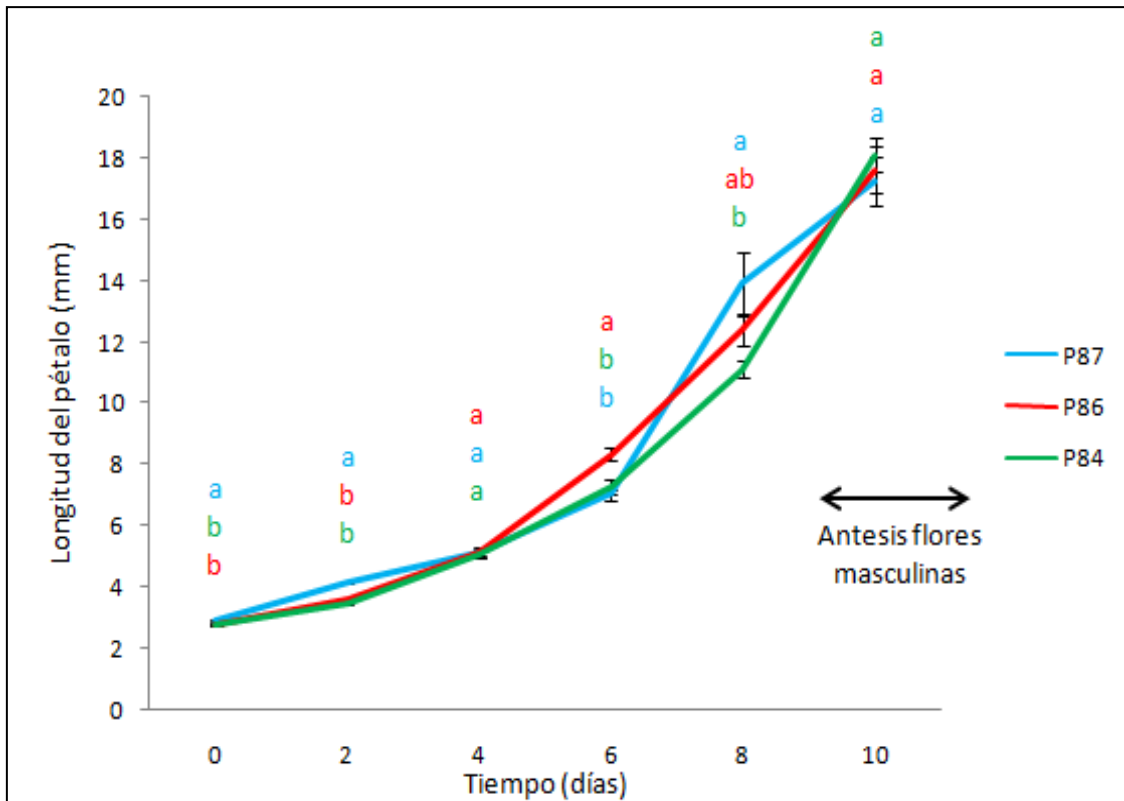


Figura 24. Evolución del crecimiento longitudinal de pétalos de flores masculinas en dos líneas monoicas (P86 y P84) y una andromonoica (P87). Las letras indican diferencias estadísticas entre genotipos ($p \leq 0,05$).

Cabe destacar que las flores pistiladas de la línea andromonoica abrieron a los 10 días de empezar a tomar las medidas, mientras que las flores femeninas de las líneas monoicas abrieron a los 8 días. Además, si tenemos también en cuenta la evolución de las flores masculinas de las líneas objeto de estudio (Figura 24), todas ellas abrieron a los 10 días y mostraron un tamaño muy similar por lo que, estadísticamente hablando, no se apreciaron diferencias significativas.

Al igual que en otras Cucurbitáceas, el etileno es necesario para detener el crecimiento de los estambres durante el desarrollo correcto de una flor femenina. En etapas tempranas de desarrollo, la producción de etileno entre flores masculinas y femeninas es similar. En etapas más tardías, sin embargo, el nivel de etileno producido por flores femeninas es significativamente mayor que el producido en flores masculinas (Manzano y col., 2014). El gen *CitACS4* es el encargado de parar el desarrollo de los estambres en sandía, pero una mutación recesiva en este gen reduce la producción de etileno en la yema floral, desembocando en la conversión de una flor femenina en una hermafrodita, es decir, en el paso de monoecia a andromonoecia (Manzano y col., 2016). Además, Manzano y col. (2016) demostraron que la producción de etileno en el desarrollo de una flor hermafrodita era similar a la producida por una flor masculina, sugiriendo que las flores hermafroditas podrían resultar de una reducción de etileno en la yema floral femenina.

Dicha reducción en el nivel de etileno en las yemas florales, además de afectar a la parada del crecimiento de los estambres, también podría regular el crecimiento y maduración de los pétalos, cuya principal consecuencia sería el retraso en su maduración, alargando así el período de preantesis y, por consiguiente, el día de antesis (Aguado y col., 2016). Es por este motivo que la línea andromonoica tarda más tiempo en entrar en antesis que las líneas monoicas, y lo que podría explicar también el mayor tamaño de los ovarios de las flores andromonoicas en antesis.

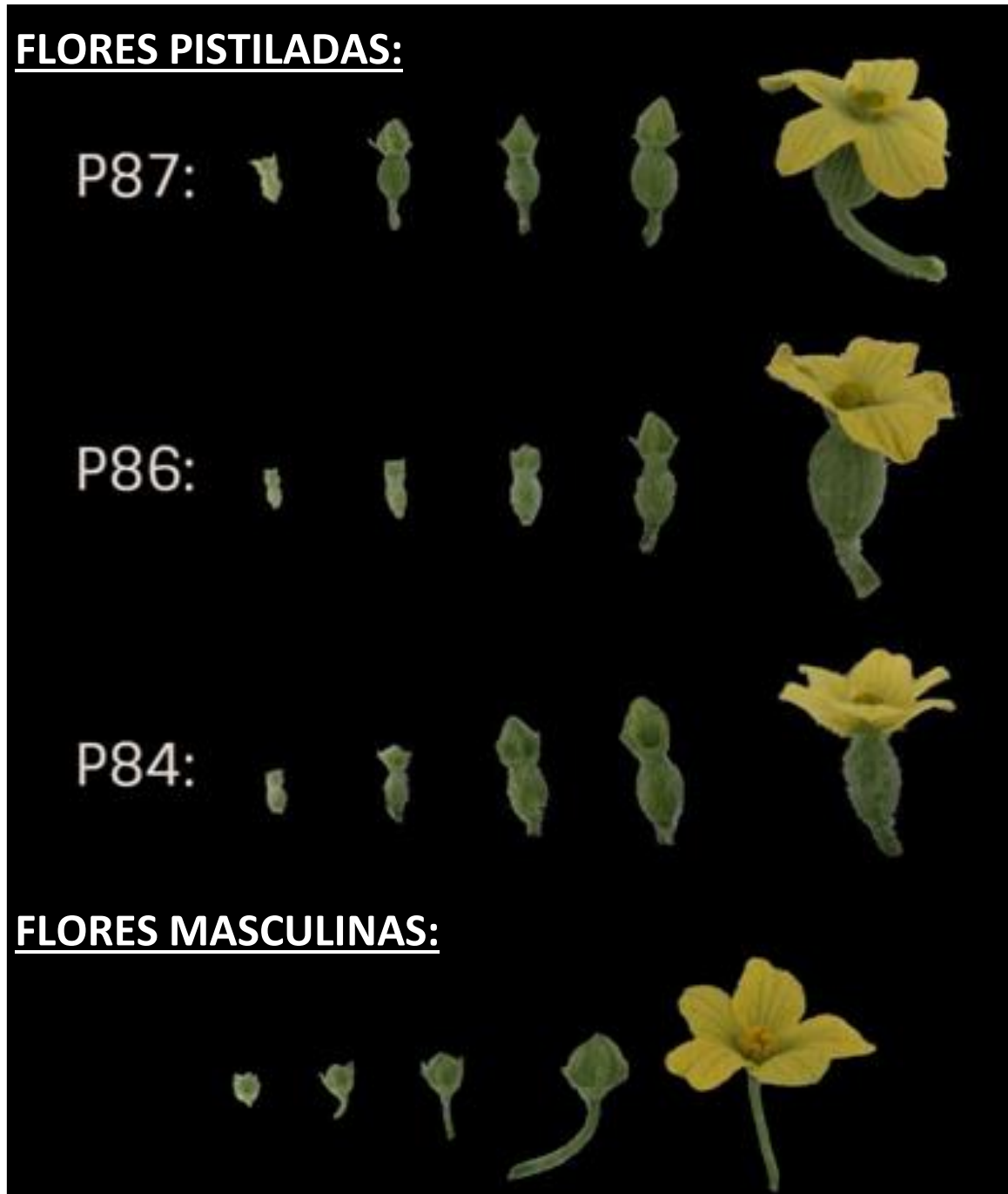


Figura 25. Evolución del tamaño de ovario y pétalos en flores femeninas (arriba), y sólo de pétalos en flores masculinas (abajo), de las líneas monoicas P86 y P84, y la línea andromonoica P87.

4.7. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ESTAMBRES, OVARIO Y PÉTALOS EN FLORES PISTILADAS DE DISTINTAS LÍNEAS

Como ya se ha descrito previamente, *C. lanatus* es una especie monoica que produce flores masculinas y femeninas en el mismo pie de planta. En condiciones de alta temperatura (primavera y verano), algunos cultivos de *C. lanatus* presentan cierta inestabilidad para la monoecia, evidenciando una andromonoecia parcial o total, es decir, las flores femeninas se convierten en hermafroditas con diferentes grados de desarrollo en los estambres.

Las flores hermafroditas de la línea andromonoica P87 llegaron a un completo desarrollo de estambres con $IA=2,99$, alcanzando un tamaño máximo medio de $6,69\pm 0,21$ mm. Este tamaño de estambres se corresponde también con un tamaño máximo medio de ovario de $18,73\pm 0,85$ mm, y con un tamaño máximo medio de pétalo de $19,52\pm 0,72$ mm. En cambio, en flores femeninas, no se desarrollaron los estambres por completo y solo mostraron unos pequeños filamentos debajo del pistilo, alcanzando un tamaño máximo medio de $3,29\pm 0,13$ mm para la línea monoica P84, y $2,95\pm 0,10$ mm para la línea monoica P86. Además, mientras que la línea P84 alcanzaba un tamaño máximo medio de $14,34\pm 0,49$ mm y $12,89\pm 0,57$ mm en ovario y pétalo respectivamente, la línea P86 alcanzaba un tamaño máximo medio de $15,27\pm 0,31$ mm en ovario, y de $15,73\pm 0,14$ mm en pétalo (Figura 26).

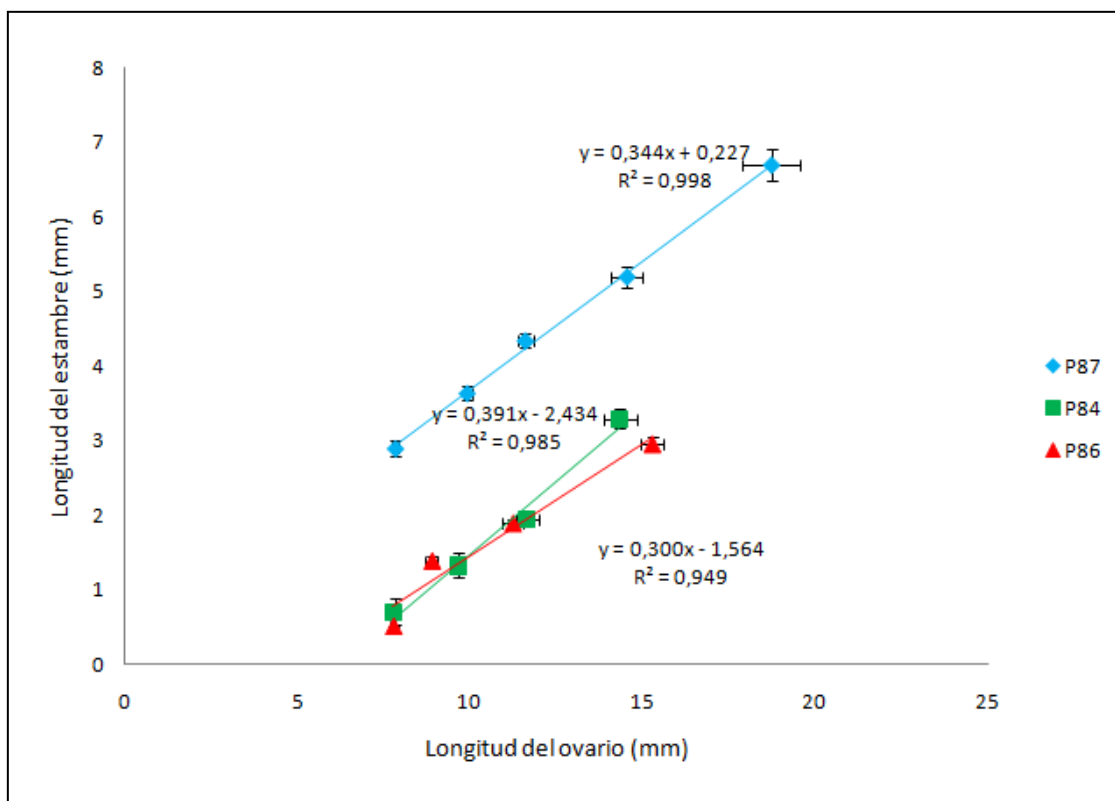


Figura 26. Comparación del crecimiento de ovarios respecto al de estambres en flores pistiladas en dos líneas monoicas (P84 y P86) y una andromonoica (P87).

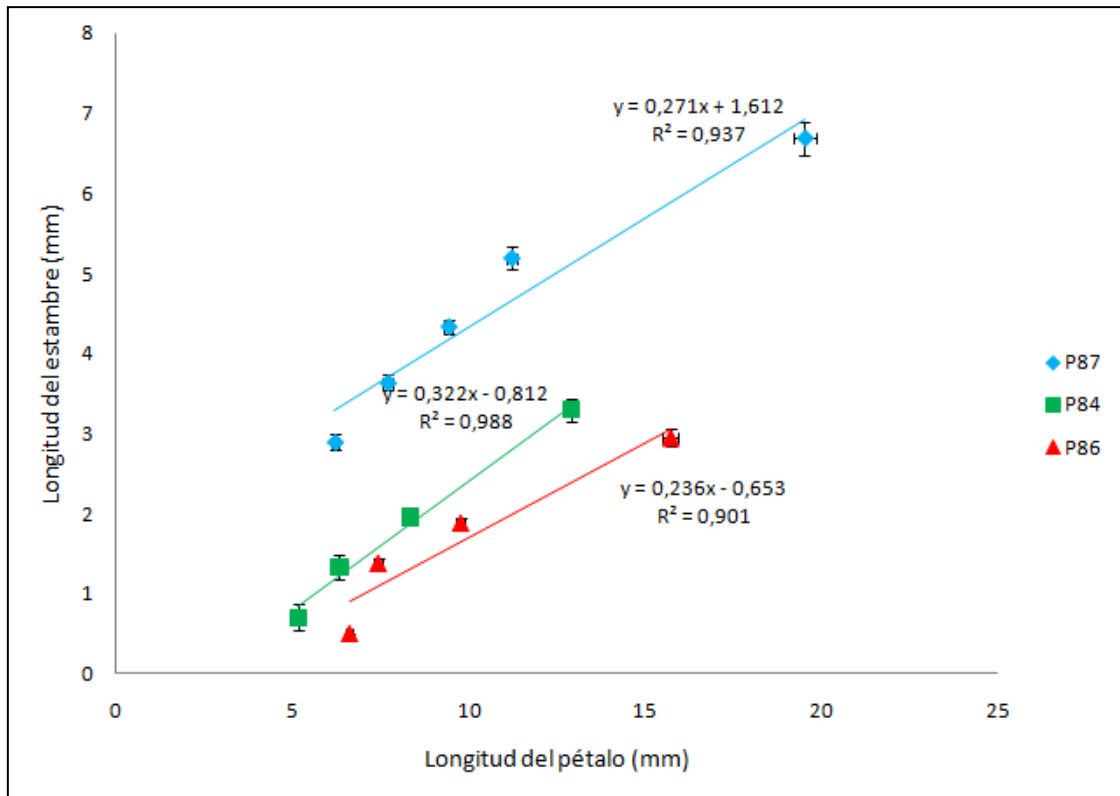


Figura 27. Comparación del crecimiento de pétalos respecto al de estambres en flores pistiladas en dos líneas monoicas (P84 y P86) y una andromonoica (P87).

Por lo que respecta al tamaño de los estambres, éste es mucho menor en las flores pistiladas de las líneas monoicas que en el de la línea andromonoica. Cuando comparamos el crecimiento de estambres respecto al de pétalos y ovario en cada una de las líneas, observamos que el coeficiente de regresión R^2 es mayor de 0,9, lo que implica una correlación directamente proporcional entre las variables analizadas. Sin embargo, el crecimiento de estambres respecto al de ovario y pétalos fue superior en la línea monoica P84 que en la línea monoica P86, lo que indica que en las flores de la línea P86 se lleva a cabo un menor desarrollo de estambres y que, por lo tanto, la línea monoica P84 es ligeramente más inestable a la monoecia que la línea P86 (Figura 27).

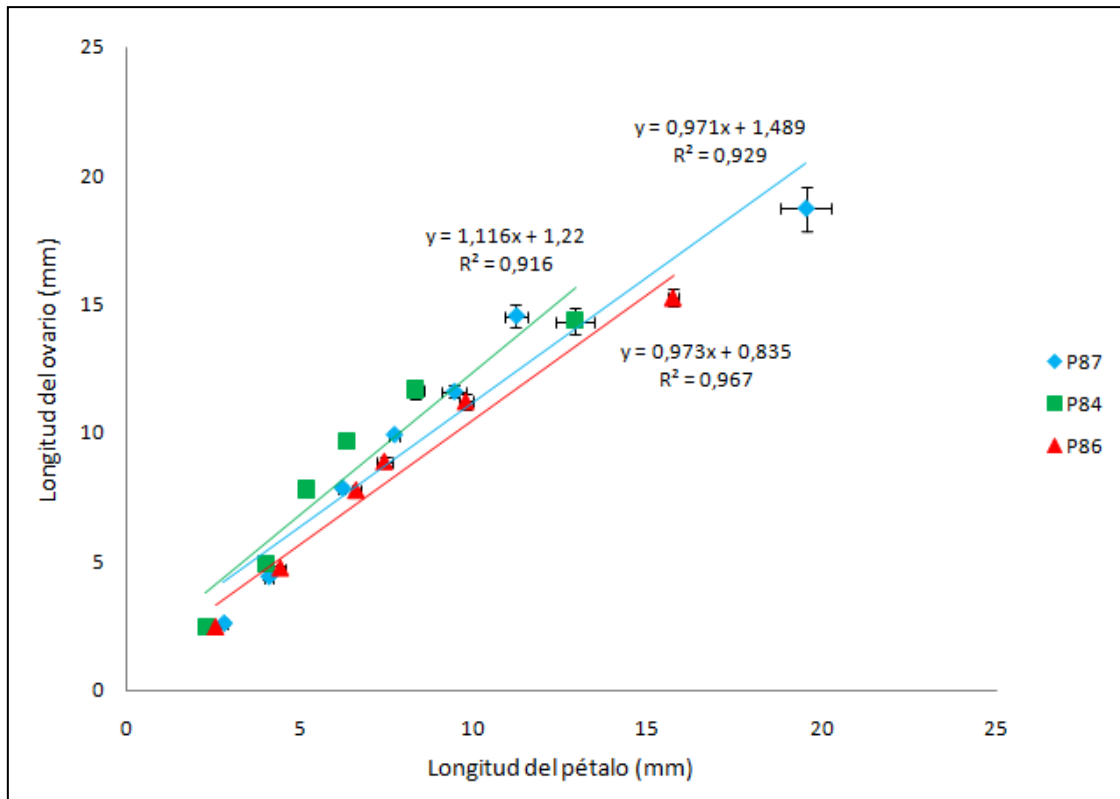


Figura 28. Comparación del crecimiento de pétalos respecto al de ovarios en flores pistiladas en dos líneas monoicas (P84 y P86) y una andromonoica (P87).

Por otro lado, al comparar el crecimiento de ovarios con respecto al de pétalos, también se observa que el coeficiente de correlación es mayor de 0,9. Además, aunque el tamaño alcanzado por ovarios y pétalos en la línea andromonoica P87 sea mayor al de las líneas monoicas P84 y P86, las recta de regresión indican que las tasas de crecimiento son muy parecidas entre ellas (Figura 28).

Estos resultados demuestran que el crecimiento de ovarios, pétalos y estambres está relacionado entre sí, es decir, no crecen de manera independiente. Aún así, no puede afirmarse que el gen *CitACS4* esté implicado en esta conducta dado que no se ha estudiado su comportamiento en la generación F2. Este tema podría ser objeto de estudio para un ensayo en un futuro.

5. CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

PRIMERA. La caracterización fenotípica del Índice de Andromonoecia (IA) en las generaciones F1 y F2 derivadas del cruce entre las líneas puras monoica (P84) y andromonoica (P87), demuestra en este ensayo que el fenotipo sexual en *C. lanatus* está controlado por un solo locus semidominante.

SEGUNDA. La evaluación del cuajado de los frutos de las líneas puras P84 y P87, y las generaciones F1 y F2, ha demostrado que no existe cosegregación entre el cuajado de los frutos y el gen *CitACS4*. Aun así, puede apreciarse cómo el alelo *A* responsable de la andromonoecia afecta adversamente al cuajado, evidenciando que este carácter está influenciado por el etileno.

TERCERA. El gen *CitACS4* cosegrega con el tamaño del cierre pistilar. Mientras que el alelo *A* de la línea andromonoica cosegrega con un mayor tamaño, el alelo *M* de la línea monoica lo hace con uno menor.

CUARTA. El gen *CitACS4* regula el desarrollo inicial del fruto. El alelo *A* promueve una menor producción de etileno en las yemas florales, retrasando la maduración del pétalo y extendiendo así el período de preantesis, provocando a su vez que el tamaño longitudinal y transversal del ovario en antesis sea mayor al de las plantas que presentan el alelo *M*.

Este retraso en la maduración del pétalo repercute también en una menor receptividad del estigma, provocando que la tasa de crecimiento del ovario entre antesis y 14 DPA en plantas que presentan el alelo *A* sea menor a la de las plantas que presentan el alelo *M* en este mismo período de tiempo.

QUINTA. El gen *CitACS4* cosegrega con la forma del fruto. Mientras que el alelo *A* está relacionado con una forma más redonda del fruto, el alelo *M* lo está con una forma más alargada.

SEXTA. Las flores pistiladas de la línea andromonoica P87 entran en antesis 2 días más tarde que las flores pistiladas de las líneas monoicas P84 y P87, demostrando que una disminución en la producción de etileno en las yemas florales extiende el período de preantesis y provoca que el tamaño del ovario de las plantas andromonoicas en antesis sea mayor al de las plantas monoicas.

SÉPTIMA. Se ha detectado una correlación significativa entre el crecimiento de ovarios, pétalos y estambres de las flores pistiladas tanto en las líneas monoicas P84 y P86 como en la línea andromonoica P87.

6. BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado E (2015). Análisis de la función de *CitACS4* en la regulación de la monoecia de sandía (*Citrullus lanatus*). Proyecto fin de máster monográfico. Máster interuniversitario en mejora genética vegetal. Universitat Politècnica de València.
- Aguado E, Manzano S, García A, Jamilena M (2016). The andromonoecious allele of *CitACS4* reduces seed and fruit set in watermelon. En: Kozik EU, Paris HS (editors). The XIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics & Breeding. Proceedings of Cucurbitaceae 2016: 29-33.
- Azcón-Biento J, Talón M (2000). Fisiología y bioquímica vegetal. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, pp: 403-417. ISBN 8448600339.
- Boualem A, Troadec C, Kovlaski I, Sari M-A, Perl-Treves R, Bendahmane A (2009). A conserved ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in two *Cucumis* species. PLoS ONE 4: e6144. Doi:10.1371/journal.pone.0006144.
- Cabrera A, Uclés D, Agüera T (2015). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería. Campaña 2014/2015. Ed. Fundación Cajamar. Almería, España.
- Camacho F (2003) (coordinador). Técnicas de producción en cultivo protegido. Caja Rural Intermediterránea, Cajamar, Almería, pp: 400. ISBN 849553116X.
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature Publishing Group* 353: 31-37.
- Dellaporta SL, Calderón-Urrea A (1993). Sex determination in flowering plants. *Plant Cell Physiol.* 5: 1241-1251.
- Diggle PK, Di Stilio VS, Gschwend AR, Golenberg EM, Moore RC, Russell JR, Sinclair JP (2011). Multiple developmental processes underlie sex differentiation in angiosperms. *Trends Genet* 27: 368-376.
- FAO (2014). FAOSTAT. Base de datos estadísticos. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Gázquez JC (2015) (coordinador). Técnicas de cultivo y comercialización de la sandía. Cajamar Caja Rural, Almería, pp: 332. ISBN 9788495531704.
- Gillapsy G, Ben-David H, Gruissem W (1993). Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439-1451.
- Guner N, Wehner TC (2004). The genes of watermelon. *HortScience* 39: 1175-1182.
- Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de agricultura, pesca y desarrollo rural. Junta de Andalucía. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/ria/servlet/FrontController>

- Jeffrey C (1990). Systematics of the cucurbitaceae: an overview. En: Bates DM, Robinson RW, Jeffrey C (eds.). *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, New York, U.S.A., pp: 449-463.
- Ji G, Zhang J, Gong G, Shi J, Zhang H, Ren Y, ..., Xu Y (2015). Inheritance of sex forms in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Scientia Horticulturae* 193: 367-373.
- Johnson PR, Ecker JR (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual Review of Genetics* 32: 227-254.
- Kenigsbuch D, Cohen Y (1990). The inheritance of gynoecy in muskmelon. *Genome* 33: 317-320.
- Kierber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993). CTR 1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein Kinases. *Cell* 72: 427-441.
- Krizek BA, Fletcher JC (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* 6: 688-698.
- Levi A, Thomas C (1999). An improved procedure for isolation of high quality DNA from watermelon and melon leaves. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 22: 41-42.
- Li Z, Huang SW, Liu SQ, Pan JS, Zhang ZH, Tao QY, ..., Cai R (2009). Molecular isolation of the M gene suggests that a conserved-residue conversion induces the formation of bisexual flowers in cucumber plants. *Genetics* 182: 1381-1385.
- Liang X, Abel S, Keller JA, Shen NF, Theologis A (1992). The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11046-11050.
- Manzano S (2009). Regulación genética de la determinación sexual en *Cucurbita pepo*: clonación, caracterización y análisis funcional de genes implicados en la biosíntesis, percepción y respuesta a etileno. Tesis, Universidad de Almería.
- Manzano S, Martínez C, García JM, Megías Z, Jamilena M (2014). Involvement of ethylene in sex expression and female flower development in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Physiology and Biochemistry* 85: 96-104.
- Manzano S, Aguado E, Martínez C, Megías Z, García A, Jamilena M (2016). The ethylene biosynthesis gene *CitACS4* regulates monoecy/andromonoecy in watermelon (*Citrullus lanatus*). *PLoS ONE* 11 (5): e0154362.doi:10.1371/journal.pone.0154362.
- Martinez C (2013). Involvement of ethylene biosynthesis and signaling genes in sex determination and parthenocarpic fruit set development in Zucchini (*Cucurbita pepo* L.). Tesis, Universidad de Almería.

- Martinez C, Manzano S, Megías Z, Garrido D, Picó B, Jamilena M (2013). Involvement of ethylene biosynthesis and signaling in fruit set and early fruit development in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *BMC Plant Biol* 13.
- Martínez C, Manzano S, Megías Z, Barrera A, Boualem A, Garrido D, Bendahmane A, Jamilena M (2014). Molecular and functional characterization of *CpACS27A* gene reveals its involvement in monoecy instability and other associated traits in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Planta* 239: 1201-1215.
- McKeon TA, Fernández-Maculeit JC, Yang SF (1995). Biosynthesis and metabolism of ethylene. En: PJ Davies Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Kluwer. Dordrecht, Netherlands, pp: 118-139.
- Ministerio de Agricultura y Pesca. Alimentación y Medio Ambiente (2014). Estadísticas. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/default.aspx>
- Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (2015). ESTACOM. Disponible en: <http://www.icex.es/icex/es/navegacion-principal/todos-nuestros-servicios/informacion-de-mercados/estadisticas/sus-estadisticas-a-medida/estadisticas-espanolas-estacom/index.html>
- Nakagawa N, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1991). Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. *Plant and Cell Physiol* 32: 1153-1163.
- Paris HS (2016). Overview of the origins and history of the five major cucurbit crops: issues for ancient DNA analysis of archaeological specimens. *Veget Hist Archaeobot* 25: 405-414.
- Patrick W, Levi A, Harris KR, Davis AR, Fei Z, Katzir N, ..., Trebitsh T (2008). Gene expression in developing watermelon fruit. *BMC Genomics* 9: 275.
- Peñaranda A, Payán C, Garrido D, Gómez P, Jamilena M (2007). Production of fruits with attached flowers in zucchini squash is correlated with the arrest of maturation of female flowers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 82: 579-584.
- Poole CF, Grimbball PC (1944). Inheritance of sex, shape, and weight genes in *watermelon*. *Agr Res* 71: 533-552.
- Porter DR (1937). Inheritance of certain fruit and seed character in watermelon. *Hilgardia* 10: 489-509.
- Reche J (1988). La sandía. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp: 227. ISBN 8471141817.
- Reche J (1994). Cultivo de la sandía en invernadero. Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Almería. ISBN 8460090825.

- Reche J (1998). Hoja divulgadora nº 2106 HD del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente: Cultivo intensivo de la sandía. ISBN 8449104645.
- Rosa JT (1928). The inheritance of flower types in *Cucumis* and *Citrullus*. *Hilgardia* 3: 233-250.
- Rudich J, Peles A (1976). Sex expression in watermelon as affected by photoperiod and temperature. *Scientia Hort.*, 5: 339-344.
- Salman-Minkov A, Levi A, Wolf S, Trebitsh T (2008). ACC synthase genes are polymorphic in watermelon (*Citrullus* spp.) and differentially expressed in flowers and in response to auxin and gibberellins. *Plant Cell Physiol.* 49: 740-750.
- Sedgley M, Buttrose MS (1978). Some effects of light intensity, daylength and temperature on flowering and pollen tube growth in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Annals of Botany* 42: 609-616.
- Seguí JM (2011). Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. Ed. Universidad Politécnica de Valencia, pp: 457. ISBN 9788483636824.
- Sistema de Información Geográfica de Identificación de Parcelas Agrícolas (SIGPAC): <http://sigpac.mapa.es/fega/visor/>
- Taiz L, Zeiger E (2006). Fisiología vegetal. Vol 2. Ed. Universitat Jaume I. Castellón, pp: 654. ISBN 978-84-8021-600-5.
- Tan J, Tao Q, Niu H, Zhang Z, Li D, Gong Z, Weng Y, Li Z (2015). A novel allele of monoecious (m) locus is responsible for elongated fruit shape and perfect flowers in cucumber (*Cucumis Sativus* L.). *Theor Appl Genet* 128: 2483-2493.
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P (2000). Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol* 18: 233-242.
- Vogel JP, Schuerman P, Woeste K, Brandstatter I, Kieber JJ (1998). Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* 149: 417-427.
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: 131-151.
- Weetman LM (1935). Inheritance and correlation of shape, size, color and time of maturity in the watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad). *Retrospective Theses and Dissertations*. Paper 13064.
- Wehner TC (2008): Watermelon. En: Prohens J, Nuez F. Vegetables I. *Asteraceae, brassicaceae, chenopodiaceae, and cucurbitaceae*. New York, Springer, pp: 381-418.

Yamasaki S, Fujii N, Matsuura S, Mizusawa H, Takahashi H (2001). The M locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants. *Plant and Cell Physiology* 42: 608-619.

Zomlefer WB (2004). Guía de las familias de plantas con flor. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España, pp: 456.

