

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

“Puesta a punto de un método para la
detección de mutantes EMS con
insensibilidad al ácido abscísico (ABA)”

Curso 2019/2020

Alumno/a:

Antonio Carbelo Martín

Director/es:

Cecilia Martínez Martínez
Jessica Iglesias Moya



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



Escuela Superior de Ingeniería

Ingeniería Agronómica

Trabajo Fin de Máster

**Puesta a punto de un método para la detección de mutantes
EMS con insensibilidad al ácido abscísico (ABA).**

Alumno:

Antonio Carbelo Martín

Directores:

Cecilia Martínez Martínez

Jessica Iglesias Moya

Almería, Junio 2020

Índice General

1	Interés y objetivos.....	1
1.1	Interés.....	1
1.2	Objetivos.....	1
1.2.1	Objetivos generales.....	1
1.2.2	Objetivos específicos.....	1
2	Revisión bibliográfica.....	3
2.1	Importancia económica del cultivo de calabacín (<i>Cucurbita pepo</i>).....	3
2.2	Origen y caracterización taxonómica de <i>Cucurbita pepo</i>	4
2.3	Ácido abscísico (ABA).....	6
2.3.1	Biosíntesis del ABA.....	7
2.3.2	Ruta de señalización del ABA.....	8
2.4	Germinación.....	9
2.4.1	La germinación y el ABA.....	11
2.5	Colecciones de mutantes.....	11
2.5.1	Colecciones de mutantes en cucurbitáceas.....	13
2.5.2	Generación de mutantes EMS en <i>Cucurbita pepo</i>	14
3	Materiales y métodos.....	15
3.1	Diseño de un método de evaluación para la detección de mutantes insensibles al ABA.....	15
3.1.1	Material vegetal.....	15
3.1.2	Tratamientos y concentraciones.....	15
3.1.3	Diseño experimental.....	16
3.1.3.1	Selección de semillas.....	17
3.1.3.2	Elaboración y aplicación de los tratamientos.....	18
3.1.3.3	Procedimiento y condiciones de ensayo.....	18
3.1.4	Medidas realizadas.....	20
3.1.4.1	Evaluación de la germinación.....	20
3.1.4.2	Evaluación del peso fresco.....	21
3.1.4.3	Evaluación de la longitud de raíz e hipocótilo.....	21

3.2	Ensayo de screening de 200 familias mutantes EMS, para la obtención de plantas insensibles al ABA.	22
3.2.1	Diseño experimental.....	23
3.2.1.1	Elaboración y aplicación de tratamientos.....	24
3.2.1.2	Procedimiento.	24
3.2.1.3	Evaluación de la germinación.....	25
3.3	Análisis estadístico.	25
4	Resultados y discusión.....	26
4.1	Evaluación de caracteres relacionados con la germinación y el crecimiento. 26	
4.1.1	Evaluación del retraso de la germinación ocasionada por la aplicación exógena de ABA.....	26
4.1.2	Evaluación del crecimiento longitudinal de la parte aérea y de la raíz. 30	
4.1.3	Evaluación del peso fresco de las plántulas.....	34
4.2	Screening de 200 familias para obtener mutantes insensibles al ABA. 37	
5	Conclusiones.	41
6	Bibliografía.	42

Índice de Figuras

Figura 1: Producción (A) y superficie (B) de calabacín en los principales países de la Unión Europea en el año 2018 (Elaboración propia a partir de los datos de FAOSTAT, 2018).	3
Figura 2: Producción (A) y superficie (B) de cultivo de calabacín en las principales provincias españolas en el año 2018 (Elaboración propia a partir de datos de MAPAMA, 2020).	4
Figura 3: Representación esquemática de los diferentes morfotipos de las dos spp más importantes de <i>Cucurbita pepo</i> (Elaboración propia con datos obtenidos de Paris <i>et al.</i> , 2001).	6
Figura 4: Esquema de la biosíntesis de ABA (Elaboración propia a partir de los datos obtenidos Xiong y Zhu, 2003).	8

Figura 5: Ruta de señalización de ABA en el citoplasma y en núcleo (Mauri, 2013).	9
Figura 6: Fases de la germinación y evolución del contenido de agua en la semilla en cada una de las fases de la germinación (Barral, 2016).	10
Figura 7: Relación entre ABA y GAs. Altas concentraciones de ABA inhiben la germinación y promueven la dormancia, mientras que bajas concentraciones de ABA y altas concentraciones de GAs, promueven la germinación (Nee <i>et al.</i> , 2017).	11
Figura 8: Esquema sintetizado de la actuación de EMS sobre la replicación celular.	13
Figura 9: Representación esquemática del proceso para la obtención de 3.751 líneas mutantes, trabajando con dos concentraciones de EMS (0,2 y 0,3%) (García <i>et al.</i> , 2018).	15
Figura 10: Representación esquemática del ensayo realizado para determinar un método de optimización para la obtención de mutantes insensibles al ABA, mediante la evaluación de la germinación, el crecimiento y el peso fresco de las plántulas de las tres variedades estudiadas (MUCU16, Prometheus y Victoria).	17
Figura 11: Selección de las semillas necesarias de la variedad Victoria, encontrándose detallados grupos de 5 semillas que conformaban una unidad experimental.....	17
Figura 12: Método de presiembra, realizado para favorecer la germinación de las semillas. A: Semillas embebidas en 20 mL del tratamiento en tubos Falcon; B: Proceso de agitación durante 24 horas, manteniéndose las condiciones necesarias para la operación.....	19
Figura 13: Procedimiento de la siembra de semillas. A: Pesada de 5 g de vermiculita en frascos de vidrio de 300 cm ³ de volumen en una balanza de precisión Metter Toledo de sensibilidad 0,001 g; B: Aplicación y riego con el tratamiento; C: Distribución de las semillas de forma equidistante en una campana extractora; D: Cierre de los botes con papel parafilm para mantener mejor las condiciones de humedad, realizando unas perforaciones en este material para favorecer el intercambio de gases; E: Cámara de control de condiciones ambientales.	20
Figura 14: Observación visual del número de semillas germinadas de cada uno de los tratamientos y de las repeticiones.	21
Figura 15: Imagen de referencia del crecimiento de las plántulas, para una posterior evaluación y medición de las longitudes de raíz y parte aérea mediante un programa informático (Imagej).	22

Figura 16: Representación esquemática del procedimiento para obtención de mutantes insensibles al etileno. Aplicación de EMS 0,2-0,3% a 8.000 semillas, obteniendo 8.000 plantas; Autopolinización de las 8.000 plantas obtenidas, dando lugar a 3.751 líneas; Realización screening triple respuesta a etileno, resultando 4 mutantes (3 semidominantes y 1 dominante). 23

Figura 17: Representación esquemática del ensayo realizado a 200 familias de mutantes EMS, para obtener plantas insensibles al ABA, para ello se estudió la evaluación de la germinación a 500 μ M de ABA. 24

Figura 18: Evaluación de la germinación de las tres variedades estudiadas: MUCU16 (MUC), Prometheus (PRO) y Victoria (VIC). Las gráficas de la izquierda (A,C,E) representan el porcentaje de la germinación acumulada de cada una de las variedades en los distintos tratamientos aplicados (H_2O , 100, 200, 300 y 400). Las gráficas de la derecha (B,D,F), muestran el tiempo en el que se alcanza el 50% de la germinación (G50). 28

Figura 19: Representación del inicio de la germinación en horas desde que se embebieron los diferentes tratamientos (H_2O , 100, 200, 300 y 400) y variedades analizadas en el estudio (MUCU16, Prometheus y Victoria). 29

Figura 20: Representación del porcentaje de crecimiento de las plántulas en MUCU16, diferenciando entre longitud de la raíz (A) y de la parte aérea (B), medido 13 días después de la siembra a diferentes concentraciones de ABA. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar. 31

Figura 21: Representación del porcentaje de crecimiento de las plántulas en Prometheus, diferenciando entre longitud de la raíz (A) y de la parte aérea (B), medido 13 días después de la siembra a diferentes concentraciones de ABA. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, una prueba mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar. 32

Figura 22: Representación del porcentaje de crecimiento de las plántulas, diferenciando entre longitud de la raíz (A y C) y de la parte aérea (B y D) a una concentración de 100 μ M (Ay B) y 200 μ M (C y D), medido 13 días después de la siembra en diferentes variedades. El porcentaje de cada tratamiento se obtiene por diferencias con su control. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante

análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, una prueba mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar. ... 33

Figura 23: Representación del porcentaje del peso fresco de las plántulas en MUCU16 y Prometheus, diferenciando entre peso de la raíz (A y C) y de la parte aérea (B y D), medido 13 días después de la siembra a diferentes concentraciones de ABA. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante un análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar..... 36

Figura 24: Representación del porcentaje del peso fresco de las plántulas con una concentración de ABA de $200\mu\text{M}$, (Biomasa total), medido 13 días después de la siembra en las tres variedades estudiadas (MUCU16 y Prometheus). La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, una prueba mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar. 36

Figura 25: Resultados de la evolución de la germinación a las 72h obtenidos tras realizar el screening a 200 familias. A) Control con agua; B) Línea mutante insensible a ABA (518); C) Familia no insensible a ABA (577). 39

Índice de Tablas

Tabla 1: Clasificación taxonómica (Andrés, I. M ^a , 2012).	5
Tabla 2: Fechas y dosis de la aplicación de los tratamientos del ensayo 1 y 2. .	18
Tabla 3: Resultados de germinación a $500\mu\text{M}$ de ABA en 200 líneas de mutagénesis EMS de <i>C. pepo</i>	38
Tabla 4: Estimación de chi cuadrado en la línea mutante 518, para un gen semidominante (segregación 1:2:1).	39

INTERÉS Y OBJETIVOS

1 Interés y objetivos.

1.1 Interés.

La especie *Cucurbita pepo* que es una de las especies cultivadas con mayor relevancia a nivel mundial (FAOSTAT, 2020). En la provincia de Almería 7.860 ha se dedican al cultivo de calabacín, por lo que hablamos del sexto cultivo en importancia en la provincia, tras el tomate, pimiento, sandía, melón y pepino (MAPAMA, 2020). Por ello, la búsqueda de nuevas variedades, que sean más productivas y se adapten mejor a las condiciones climáticas cambiantes en las que nos encontramos, es de gran importancia. En la actualidad, el cambio climático está provocando temperaturas cada vez más extremas en invierno y en verano, por ello la importancia de buscar variedades que toleren altas y bajas temperaturas (Iglesias *et al.*, 2011). Por otro lado, la desertización está causando la degradación o pérdida de suelo agrícola, siendo importante la búsqueda de resistencia a salinidad, sobre todo en la zona de Almería, donde las precipitaciones son cada vez más escasas y la calidad del agua de los pozos es cada vez peor (Valera *et al.*, 2016).

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona vegetal con papel en diferentes procesos del desarrollo de las plantas, además se induce por distintos tipos de estrés biótico y abiótico (Vishwakarma *et al.*, 2017). Por consiguiente, detectar mutantes insensibles al ABA, será de interés para especies cultivadas en los tiempos del cambio climático, para favorecer la adaptación de los cultivos a la salinización del suelo y los estreses abióticos asociados.

1.2 Objetivos.

Este TFM se enmarca en la búsqueda de materiales vegetales tolerantes a estreses abióticos, que pueden ser incorporados en programas de mejora genética de *C. pepo* para desarrollar variedades tolerantes a estreses como la salinidad, el exceso hídrico, etc. Para ello se proponen los siguientes objetivos generales y específicos.

1.2.1 Objetivos generales.

1. Optimización de un método de genética directa, a través de los tratamientos con ABA, para detectar mutantes EMS que no respondan a la aplicación de ABA.
2. Evaluación de mutantes EMS de colección de *C. pepo*, con objetivo de detectar mutantes de interés para ser incorporados a programas de mejora genética

1.2.2 Objetivos específicos.

- 1.1. Evaluación de la germinación de diferentes variedades (MUCU16, Prometheus y Victoria) a diferentes concentraciones de ABA (100, 200, 300 y 400 μ M).

Puesta a punto de un método para la detección de mutantes EMS con insensibilidad al ácido abscísico (ABA)

Interés y Objetivos

- 1.2.** Evaluación del crecimiento en el estadio de plántula de diferentes variedades (MUCU16, Prometheus y Victoria) a diferentes concentraciones de ABA (100, 200, 300 y 400 μ M).
- 2.1.** Evaluación de la germinación de 200 familias mutantes EMS de *C. pepo*, a una concentración de ABA establecida por el método de optimización del ensayo previo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2 Revisión bibliográfica.

2.1 Importancia económica del cultivo de calabacín (*Cucurbita pepo*).

El cultivo del calabacín es una de las plantaciones que presenta una mayor importancia económica en el sector hortofrutícola. A nivel mundial, es complicado conocer los datos de producción y superficie cultivada de calabacín, puesto que en la bibliografía encontrada aparece agrupado con otras especies de calabazas. Según la FAOSTAT (2020), en el año 2018, nos encontrábamos con una superficie de cultivo (donde se incluían *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata* y *Cucurbita maxima*) superior a los 2 millones de hectáreas y una producción mayor a los 27 millones de toneladas. Así mismo, en Europa la superficie cultivada de calabacín que nos encontramos es de 179.286 ha y una producción de 4,4 millones de toneladas, destacando países como España e Italia. En la **Figura 1**, se muestra la producción y superficie de calabacín en los principales países productores de la Unión Europea durante el año 2018.

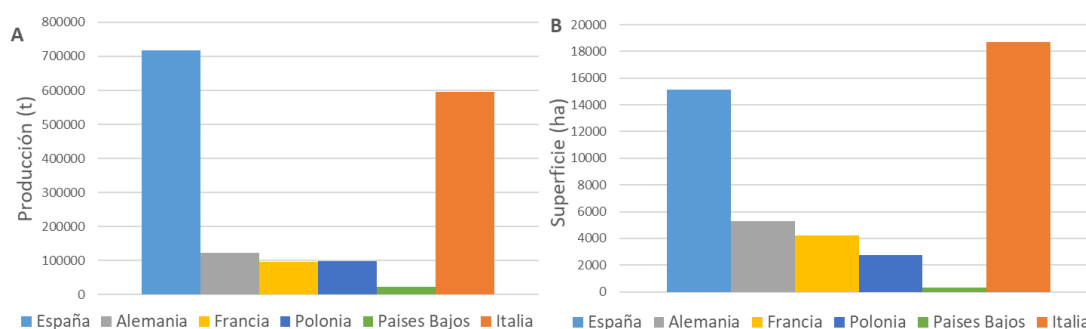


Figura 1: Producción (A) y superficie (B) de calabacín en los principales países de la Unión Europea en el año 2018 (Elaboración propia a partir de los datos de FAOSTAT, 2018).

España, siendo uno de los países de mayor importancia, dispone de una superficie de calabacín de 11.112 ha y una producción de 596.315 t. Andalucía es la Comunidad Autónoma con mayor superficie y producción de este cultivo. Destaca principalmente la provincia de Almería cuya producción supera los 450.000 t y una superficie únicamente de 7.860 ha, seguida de provincias como Granada (**Figura 2**). Esto implica que Almería representa el 76% de la producción y el 71% de la superficie de cultivo de calabacín en España, debido a su producción intensiva en invernadero, valores muy superiores al resto de provincias (MAPAMA, 2020).

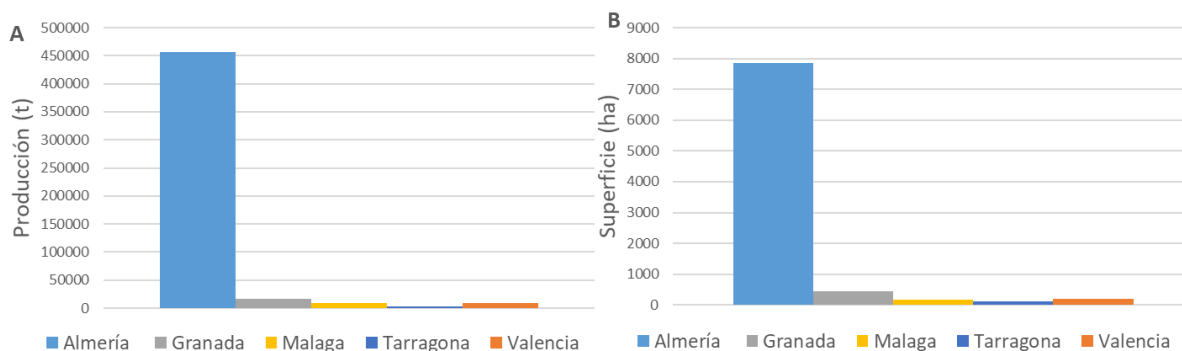


Figura 2: Producción (A) y superficie (B) de cultivo de calabacín en las principales provincias españolas en el año 2018 (Elaboración propia a partir de datos de MAPAMA, 2020).

Según datos de Cajamar, (2020), en Almería, en la campaña 2018/2019 ha habido un descenso en la superficie del cultivo de calabacín del 1,61% respecto las 5 últimas campañas. Sin embargo, ha aumentado la producción respecto la campaña precedente en un 0,7% con una producción de 459.420 t y un aumento del 9,2%, si tenemos en consideración varias campañas. En cuanto al precio medio del cultivo, en la campaña 2018/2019 fue de 0,534 Euros/Kg. Por consiguiente, a nivel económico el calabacín recibe unos ingresos de 239,8 millones de euros (ingresos de los agricultores), lo que supone un incremento del 2,3% respecto la campaña 2017/2018. Además, han incrementado las exportaciones de este cultivo respecto campañas previas en un 7,5%, exportándose así un total de 308.201 t y con un valor económico de 268,8 millones de euros.

2.2 Origen y caracterización taxonómica de *Cucurbita pepo*.

El Calabacín (*Cucurbita pepo*) pertenece a la familia botánica de las cucurbitáceas (Tabla 1). *Cucurbita* es un género que incluye 22 especies silvestres y 5 especies domesticadas como son: *C. pepo*, *C. moschata*, *C. maxima*, *C. ficifolia* y *C. argyrosperma* (Decker, 1988). De las especies cultivadas, la de mayor importancia en el sur de Europa es *C. pepo*, en particular el morfotipo “Zucchini” (calabacín), pero también son de importancia las calabazas (*C. maxima* y *C. moschata*). A esta familia pertenecen otros cultivos de gran importancia económica en el sector hortícola como el pepino, melón (pertenecientes al género *Cucumis*) y la sandía (que pertenece al género *Citrullus*).

Tabla 1: Clasificación taxonómica (Andrés, I. M^a, 2012).

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

En cuanto al origen de *Cucurbita pepo*, según López, (2017), la procedencia más antigua que se conoce proviene de Oxaca (México). Por otro lado, Paris *et al.*, (2012), citan dos eventos de domesticación, uno de ellos dió lugar a la variedad *C. pepo* spp. *pepo*, que tuvo lugar en el norte de México y un segundo evento en el suroeste de Estados Unidos, generando la variedad *C. pepo* spp. *texana*. Tras estos eventos de domesticación, se produjeron cruzamientos entre cultivares mexicanos y estadounidenses, apareciendo así nuevos cultivares que se extendieron por el norte de África y el Oriente Próximo (López, 2017). Se cree que ha sido cultivada durante millones de años por las culturas locales en Norteamérica (Whitaker, 1947), mientras que no llegó a Europa hasta después del descubrimiento de América en 1492. En el año 1550 existían referencias de la presencia de este cultivo en algunos herbarios (López *et al.*, 2017).

Cucurbita pepo es una de las especies más variables, principalmente en sus frutos (tamaño, color o forma), pero también presentan diferencias en sus características vegetales como tamaño de las hojas o entrenudos. Estas diferencias han permitido agrupar las variedades en tres subespecies. y hasta 8 morfotipos distintos (**Figura 3**). *C. pepo* spp *pepo* incluye los morfotipos; "Pumkin", "Vegetable Marrow", "Zucchini" y "Cocozelle"; y *C. pepo* spp. *ovífera* (*texana*); "Acorn", "Scallop", "Crookneck" y "Straightneck"; y *C. pepo* spp. *fraterna*.

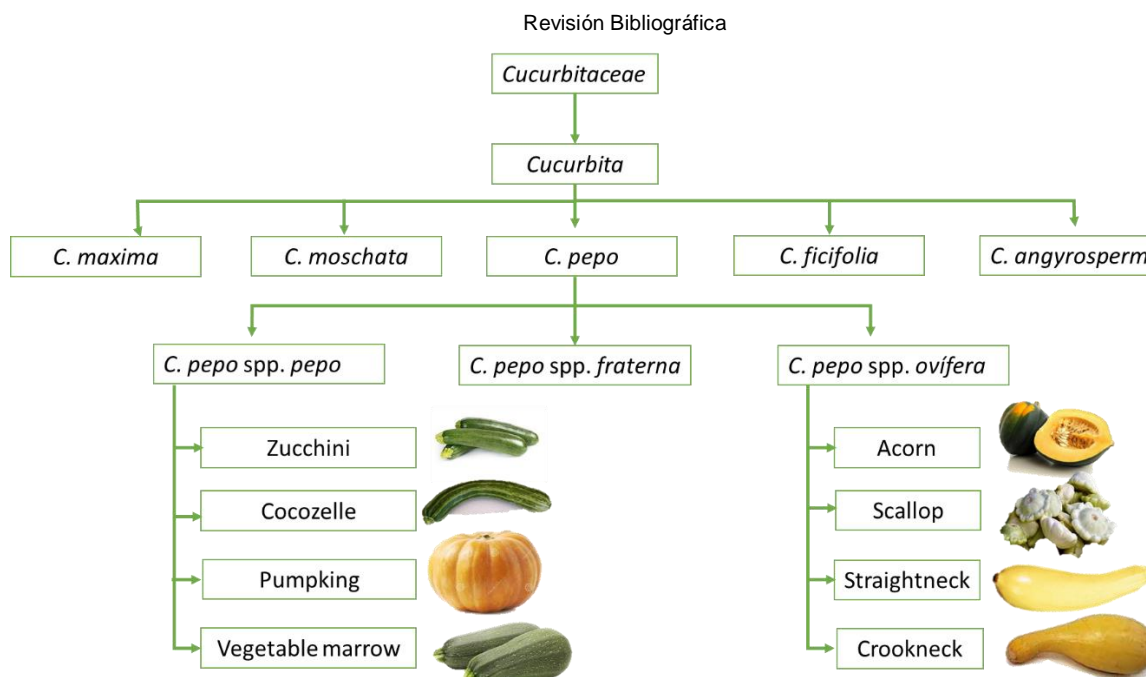


Figura 3: Representación esquemática de los diferentes morfotipos de las dos spp más importantes de *Cucurbita pepo* (Elaboración propia con datos obtenidos de Paris *et al.*, 2001).

El calabacín de mayor importancia económica y el cultivado principalmente en la agricultura intensiva de Almería, corresponde al morfotipo “Zucchini”. Se caracterizan por su forma cilíndrica y alargada, destacando el color verde. Según Camacho (2002), el calabacín es una planta anual vegetativa compacta, con crecimiento indeterminado, raíz principal axonomorfa de gran tamaño, tallo principal con atrofia de brotes secundarios, es decir, presenta solo un brote, y forma sinuosa. Además, presenta entrenudos cortos, hojas grandes y distribuidas de forma helicoidal. Cabe destacar que es una planta monoica, disponiendo así, flores masculinas y femeninas solitarias. La formación de flores femeninas se ve favorecida por la aparición de bajas temperaturas y días cortos, mientras que, con altas temperaturas y días largos, se ven favorecidas las flores masculinas.

2.3 Ácido abscísico (ABA).

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que representa una función principal en los mecanismos de respuesta frente a estreses bióticos y abióticos. Estos estreses pueden influir directamente en la reducción del crecimiento y de la producción de cualquier cultivo (Vishwakarma *et al.*, 2017). El ABA es una hormona clave en el desarrollo y el crecimiento de las plantas, influyendo en procesos como la latencia y germinación de las semillas, el desarrollo del sistema de raíces, senescencia de las hojas,

transformación de la floración, maduración de semillas y frutos y adaptación de la planta al estrés (Li *et al.*, 2019). Ha sido comprobado que el ABA se encuentra presente en estreses originados por metales pesados, sequía, alta salinidad, baja temperatura y estrés por radiación (Vishwakarma *et al.*, 2017). Por consiguiente, la aplicación exógena de ABA podría incrementar la resistencia al estrés oxidativo, que se encuentra inducido por el frío, al mejorar la eficiencia de los sistemas enzimáticos. Así mismo, el ABA podría servir como molécula de señalización para activar los sistemas de defensa celulares y paliar el frío (Zhang *et al.*, 2018).

2.3.1 Biosíntesis del ABA.

El ABA es una hormona vegetal, que se encuentra presente en organismos inferiores (algas, musgos e incluso hongos) y superiores. Este compuesto es un sesquiterpenoide, es decir, se encuentra formado por 15 carbonos. Así mismo, el ABA proviene de un precursor de 5 carbonos, llamado isopentenil pirofosfato (IPP) (Jordán y Casaretto, 2006). Según autores como Helander y Cutler (2018), el ABA es un compuesto derivado del β -caroteno, que en plantas se encuentra sintetizado mediante una ruta indirecta MEP/IPP, la cual se lleva a cabo en el interior de los cloroplastos, donde MEP corresponde al 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato.

Para el proceso de biosíntesis de ABA (**Figura 4**), el primer paso de la ruta es la epoxidación de zeaxantina y anteraxantina, dando lugar a un compuesto denominado violaxantina. Este paso se lleva a cabo en los cloroplastos y es catalizado por una enzima denominada zeaxantina epoxidasa (ZEP). Posteriormente, la violaxantina sufre una serie de modificaciones y se convierte en 9-cis-neoxantina, que es catalizada por la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) y da lugar a la xantonina. Esta xantonina, es transportada al citosol de la célula, y mediante la acción de un alcohol deshidrogenasa/reductasa (SDR) de cadena corta, es convertida en ABA-aldehído, el cual sufre un proceso de transformación llevado a cabo mediante la enzima ABA aldehído oxidasa (AAO) y produciendo el ácido abscísico (ABA) (Xiong y Zhu, 2003).

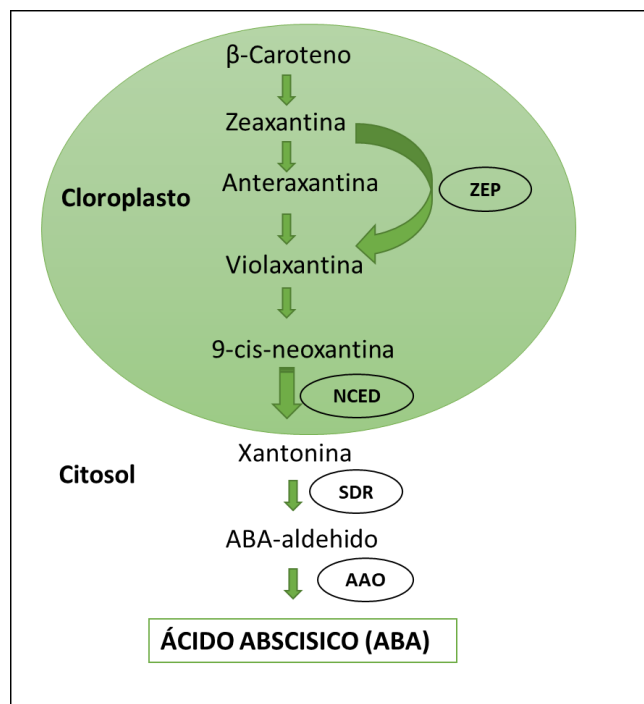


Figura 4: Esquema de la biosíntesis de ABA (Elaboración propia a partir de los datos obtenidos de Xiong y Zhu, 2003).

2.3.2 Ruta de señalización del ABA.

El inicio de la ruta de señalización del ABA se inicia cuando la hormona es percibida por sus receptores. Este receptor, es un complejo heteromérico, constituido por una proteína fosfatasa de tipo 2C, (PP2Cs), como es el ABI1 y RCAR, que actúa como proteína de unión. Estos receptores son los encargados de regular las proteínas quinasas, actuando estas últimas en sentido contrario, es decir, inhibiendo. Respecto a las proteínas quinasas, hablamos de SnRKs, cuando actúan en el núcleo y de OST1, cuando intervienen en el citosol. En ausencia de ABA, las proteínas receptoras PP2Cs, bloquean la actividad de las quinasas (SnRKs/OST1) (Raghavendra *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2012).

La ruta de señalización en una célula se produce en el citosol y en el núcleo (**Figura 5**). En el citosol de la célula actúa OST1, que interviene en el cierre estomático, como un regulador positivo, activando así los canales aniónicos (SLC1) e inhibiendo los canales catiónicos (KAT1) a través de una cascada de fosforilación. Se ha comprobado que estos canales no se encuentran regulados únicamente por ABA, sino que también juega un papel muy importante el Ca^{2+} , a través de la actividad de una proteína quinasa denominada CPK23 (Raghavendra *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2012). Por consiguiente, la señalización de ABA puede interferir en la actividad de los canales de iones como KAT o SLAC1 dando lugar a una despolarización y que estimule y provoque el cierre de los estomas (Mauri, 2013).

En el núcleo celular (**Figura 5**), para la expresión de los genes, que depende de la presencia de ABA, son fundamentales los factores de unión a compuestos de respuesta ABRE/ABFs, como es el ABI5. El tipo de cierre en la unión es un cierre de cremallera tipo ZIP, en el que en la región básica se encuentra presente la leucina. Además, ABI5 y otros ABFs, son fosforilados por quinasas como CPK4 y CPK11, cuya actuación es dependiente del Ca^{2+} . Del mismo modo, para aumentar la actividad, al factor ABI5, se unen otros factores de transcripción que cooperan en la especificidad del ABA, como el ABI3. También ABI4, que es un factor transcripcional de tipo AP2s, actúa como factor positivo de respuesta al ABA. La transcripción de los genes es inducible debido a que en los promotores de los genes de respuesta a ABA intervienen un heterodímero formado por ABI3 y ABI5 y su interacción con la caja ABRE. Por otro lado, ABI4, se une a elementos ricos en guanina y citosina (Raghavendra *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2012).

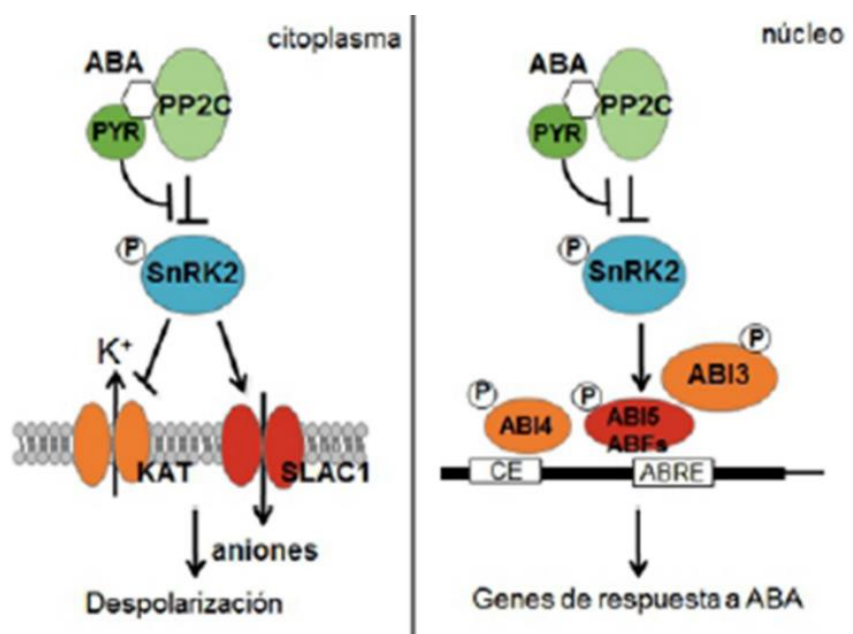


Figura 5: Ruta de señalización de ABA en el citoplasma y en núcleo (Mauri, 2013).

2.4 Germinación.

La definición de germinación según la RAE (2020), es la acción de germinar, es decir, la acción de comenzar a desarrollarse desde la semilla. Del mismo modo, otros autores la han definido como el conjunto de procesos metabólicos y morfológicos, que se inician con la toma de agua por parte de la semilla y cuyo final está marcado por la emergencia del embrión, a través de las estructuras que la rodean (germinación *sensu stricto*) (Bewley, 1977; Arbaizar, 2011; Herrero, 2016).

La germinación de las semillas ha sido dividida por numerosos autores en 3 fases bien diferenciadas (**Figura 6**) (Bewley, 1977; Arbaizar, 2011; Barral, 2016; Herrero, 2016):

Fase I o fase de hidratación: en ella se produce una rápida entrada de agua en el interior de la semilla de forma pasiva, debido a una diferencia de potencial hídrico con el medio. A causa de la hidratación de la semilla, se producen cambios en la permeabilidad de las cubiertas, y con ello la pérdida de solutos al medio. Entre los solutos que se pueden perder destacan azúcares, proteínas, inhibidores de germinación y ABA. En este proceso, y debido a la entrada de agua se desencadenan una serie de reacciones metabólicas, se retoman los procesos celulares.

Fase II o de estabilización: en esta fase, la toma de agua se ralentiza hasta detenerse casi por completo, debido a que el potencial hídrico se encuentra cerca del potencial del medio. Durante esta fase se produce una gran actividad metabólica. Además, tienen un papel muy importante el estado fisiológico de la semilla y los factores ambientales en esta fase, ya que estos, determinaran si se produce una entrada en la fase III y posterior germinación.

Fase III o de crecimiento: esta fase solo es alcanzada por semillas viables cuando se cumplen las condiciones climáticas requeridas para la germinación. En esta fase se reactiva la absorción de agua debido al metabolismo activo que sufre la semilla y la emergencia y crecimiento del embrión. Así mismo, se produce un cambio metabólico adaptándose al medio aeróbico, el cual se mantendrá en el desarrollo de la plántula y en la planta adulta.

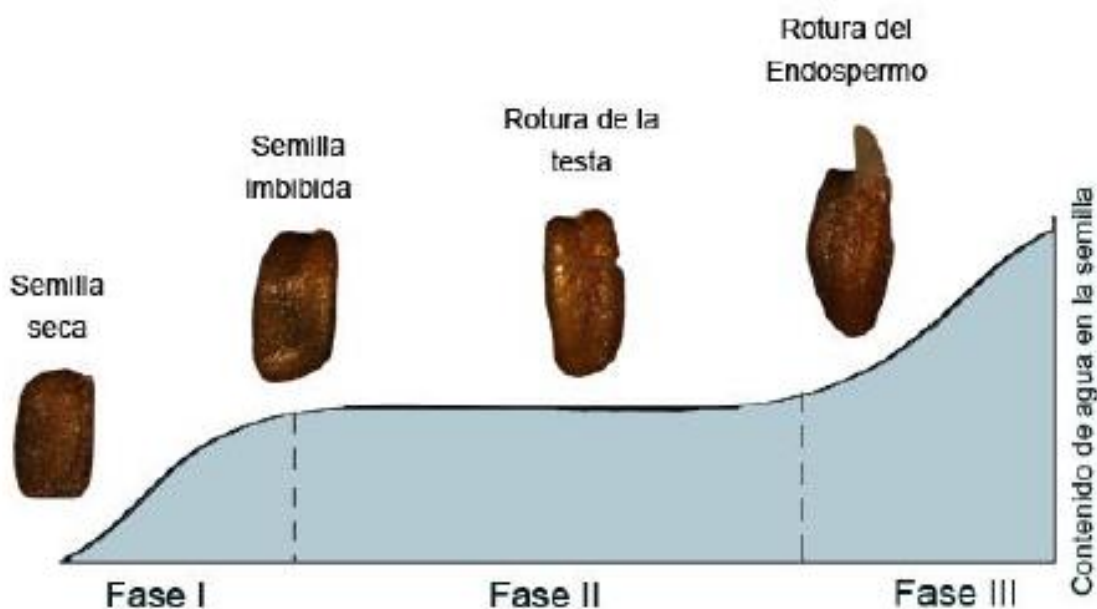


Figura 6: Fases de la germinación y evolución del contenido de agua en la semilla en cada una de las fases de la germinación (Barral, 2016).

La germinación está determinada por el periodo de latencia de las semillas, siendo esto un factor importante en la aptitud de las plantas. La latencia (inducción y liberación), está controlada por hormonas vegetales y proteínas (Neé *et al.*, 2017). El

ABA evita la germinación del embrión y disminuye cuando se van aumentando las concentraciones de este. Además, esta hormona reduce la capacidad que presenta el embrión de absorber agua cuando se encuentra con un estrés osmótico (Schopfer y Plachy, 1984).

2.4.1 La germinación y el ABA.

Son numerosas las hormonas vegetales que interactúan para que se lleve a cabo el proceso de germinación. Las hormonas más importantes son: ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs), etileno (ET), ácido jasmónico (JA) y brasinosteroides (BRs). Sin embargo, las dos fitohormonas indispensables para que se produzca la germinación son ABA y GAs. Concretamente, la relación entre ABA y GAs es lo que determina la capacidad de germinación de una semilla (**Figura 7**). Ambas hormonas influyen negativamente en la biosíntesis y señalización la una de la otra (Nee *et al.*, 2017).



Figura 7: Relación entre ABA y GAs. Altas concentraciones de ABA inhiben la germinación y promueven la dormancia, mientras que bajas concentraciones de ABA y altas concentraciones de GAs, promueven la germinación (Nee *et al.*, 2017).

El ABA es la fitohormona inhibidora de mayor importancia durante el proceso de germinación. Se encuentra en las semillas de forma extendida, estando comprobada la relación que existe entre la concentración endógena de ABA y la dificultad que presentan las semillas para germinar. En el proceso de estratificación los niveles de ABA disminuyen y esto hace pensar que una de sus funciones es evitar la germinación de la semilla antes de su maduración (Angosto, 1991). Las giberelinas, son las responsables de promover la germinación, puesto que tienen un papel inhibitorio de la dormición y contrarrestan la latencia promovida por el ABA. La síntesis de las GAs aumenta durante la imbibición, concretamente durante la fase II de la germinación (Barral, 2016).

2.5 Colecciones de mutantes.

La mutagénesis es uno de los mecanismos utilizados en la mejora genética. Tradicionalmente, la mejora vegetal se obtenía mediante hibridaciones entre individuos de la misma especie, empleando la variabilidad genética existente en la propia especie

(Herrera-Isidron, 2019). En los casos en los que los recursos naturales no presentan el carácter de mejora de interés se puede recurrir a la variabilidad artificial o inducida.

La mutagénesis es el proceso por el cual, se produce una alteración en la secuencia del ADN de un organismo, que se trasmite por herencia (RAE, 2020). Las mutaciones se pueden producir de forma natural o inducida. Cuando se producen de forma natural, los genes son alterados de una generación a otra de forma espontánea, pudiendo producir cambios fenotípicos visibles, o bien pasando desapercibidos, lo que se conoce como mutaciones silenciosas (Sosa, 2019). Por consiguiente, cuando se producen de forma inducida puede ser mediante diversos mecanismos, como la utilización de agentes mutagénicos físicos o químicos, o a través de un proceso denominado mutagénesis insercional. En el caso de mutaciones inducidas, principalmente con utilización de factores físicos o químicos, se realizan en el mayor número de familias posible, puesto que las mutaciones se producen de forma aleatoria, sin controlar en que gen se van a producir ni que efectos van a tener. En el caso de la mutagénesis insercional eso no ocurre, puesto que si se conoce sobre que gen se va a realizar la mutación (Medina, 2019).

Los agentes mutagénicos físicos lo componen los distintos tipos de radiaciones ionizantes como ultravioleta, rayos X, rayos gamma, neutrones y protones. El poder de ionización y de penetración difiere entre cada una de las radiaciones y la utilización de cada una de ellas dependerá del objetivo a buscar y del tipo de material vegetal (Prina, 2010). Los agentes químicos están constituidos por una gran cantidad de sustancias mutagénicas. Los mutágenos químicos que se han venido utilizando tradicionalmente son el ácido nitroso y productos análogos de bases. Sin embargo, para la mejora genética los más utilizados han sido los agentes alquilantes, los cuales producen la incorporación de un grupo alquilo en las macromoléculas. A este grupo pertenecen agentes como el etil metano sulfonato (EMS), el metil metano sulfonato (MMS), el dimetilsulfato (DMS) y el dietilsulfato (DES) (Prina, 2010).

El agente mutagénico más utilizado en la producción de alteraciones en la secuencia del ADN para la mejora genética es el EMS, presentando mutaciones principalmente de tipo de transición G/C a A/T. Su utilización, tan extendida, se debe al fácil manejo, la baja toxicidad para los operarios y la facilidad de adquisición del producto (Prina, 2010; Andrés, 2012). En la **Figura 8**, se observa de forma sintetizada la actuación de EMS sobre el ADN celular. Así mismo, podemos ver cómo actúa en la replicación y emparejamiento de las bases. Produciendo un cambio estructural en la Guanina, confundiendo así esta con una Adenina, por lo que el emparejamiento se produce con una Timina. Al producirse una segunda replicación la Timina, se empareja

con su correspondiente Adenina, produciéndose una alteración en la planta la cual queda fijada y transmitida a su herencia (Andrés, 2012).

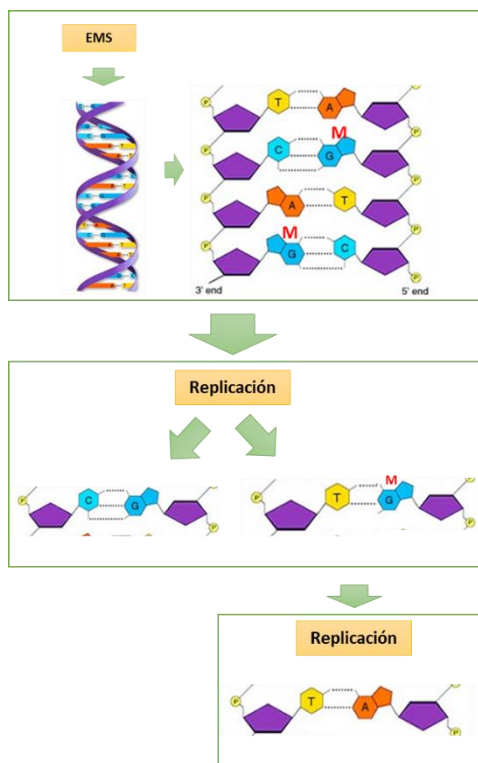


Figura 8: Esquema sintetizado de la actuación de EMS sobre la replicación celular.

2.5.1 Colecciones de mutantes en cucurbitáceas.

Las mutagénesis son una herramienta muy utilizada en la mejora genética, por ello han sido numerosas las especies donde han sido establecidas mutaciones con un posible interés agronómico. En la familia de las cucurbitáceas nos encontramos diversas mutaciones en *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus* y *Cucumis melo*.

En el cultivo de calabacín (*Cucurbita pepo*), se han desarrollado en los últimos años dos colecciones de mutantes sobre el mismo fondo genético MUCU16 (Vicente-Dólera *et al.*, 2014; García *et al.*, 2018). La colección de mutantes EMS publicada por García *et al.*, (2018) fue evaluada a través de la secuenciación de dos líneas (familias), denominadas 1 y 2, mientras que la colección de Vicente-Dólera *et al.*, (2014) fue evaluada a través de TILLING. La calidad de ambas es similar, la tasa de mutación es de 1/133 kb en la colección de Vicente-Dólera *et al.*, (2014), la línea 1 muestra una tasa de mutación de 1/85 kb y la línea 2 1/167 kb. Paralelamente, la colección de García *et al.*, (2018) se ha evaluado con una estrategia de genética directa, en una estrategia similar a la perseguida en este TFM. Se realizó una prueba de la triple respuesta al etileno y se identificaron dos mutantes insensibles a etileno semidominantes, denominados *etr1a* y *etr2b*. Las dos mutaciones producían un cambio fenotípico en las flores, convirtiendo las flores femeninas en hermafroditas, dando lugar así a plantas de calabacín

andromonoicas. Las mutaciones están localizadas en la región codificante de *CpETR1A* y *CpETR2B*, encontrada gracias a la secuenciación del genoma completo (García *et al.*, 2020). Del mismo modo, en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) se han desarrollado dos colecciones Boualem *et al.*, (2014) y Chen *et al.*, (2016). En la colección publicada por Nie *et al.*, (2015) ha sido posible localizar un gen de resistencia a la enfermedad fúngica como es el mildiu polvoriento. Esta resistencia corresponde a una mutación natural la cual se expresa principalmente en hojas y cotiledones. Se observó que la resistencia era conferida debido a la pérdida de la función de *CsMLO1*, sin embargo, no son los únicos factores involucrados (Nie *et al.*, 2015). Por otro lado, en melón también se han desarrollado colecciones de mutantes que están siendo explotadas para la mejora genética. Autores como Galpaz *et al.*, (2013), descubrieron una mutación en el gen *CRTISO*, que proporciona un color de carne amarillo-naranja. La mutación provoca la acumulación de prolicopeno, cuando se debería incorporar β -caroteno, que es el pigmento que le da ese color naranja característico al melón.

2.5.2 Generación de mutantes EMS en *Cucurbita pepo*.

Para la obtención de una colección de mutantes EMS, primeramente, se debe determinar cuál es la concentración óptima de EMS a la que se produce una mayor alteración sin afectar de forma muy significativa a la germinación de las semillas. García *et al.*, (2018), sometieron 200 semillas de la variedad MUCU16, con concentraciones de 0-2% de EMS, en 200 mL de agua, en agitación durante 12 o 24 h en oscuridad para estudiar como el mutágeno EMS afectaba a la germinación de las semillas tratadas (semillas M0) y a la fertilidad de las plantas M1 (plantas derivadas de la semilla tratada con EMS). Tras evaluar la germinación y el desarrollo de las semillas, y la fertilidad determinaron, que la concentración más idónea de EMS para producir mutaciones en *C. pepo*, es de 0,3% de EMS y 12 horas en agitación. Aun teniendo una dosis óptima, decidieron utilizar dos dosis de EMS, estableciendo dos lotes de semillas. Se trataron 6.000 y 2.000 semillas de la variedad MUCU16 con EMS 0,3% y 0,2% respectivamente, durante 12 horas. Estas dosis no vieron afectada la germinación de las semillas, sin embargo, sí se causaron reducciones del 50% en la fertilidad de las plantas, obteniendo 2.822 y 929 frutos. Así bien, el total de familias M2 de la colección de mutantes generadas es de 3.751 que están siendo explotadas para la búsqueda de caracteres de interés agronómico a través de estrategias de genética directa (**Figura 9**). Este TFM se orienta a establecer los parámetros necesarios para, de forma similar al ensayo de triple respuesta que ha conducido a la detección de mutantes de insensibilidad a etileno (García *et al.*, 2018), explorar una colección de mutantes para la búsqueda de mutantes en la ruta del ABA.

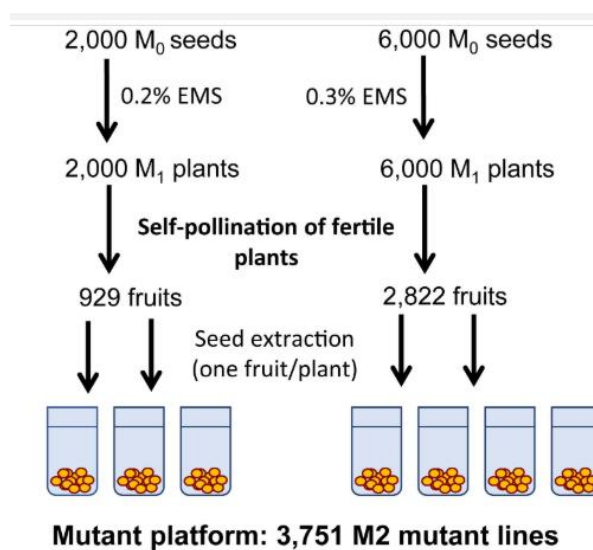


Figura 9: Representación esquemática del proceso para la obtención de 3.751 líneas mutantes, trabajando con dos concentraciones de EMS (0,2 y 0,3%) (García *et al.*, 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS

3 Materiales y métodos

En este TFM se muestra el diseño y la puesta a punto de un método para detectar mutantes insensibles al ABA, evaluando concentraciones y estadios de desarrollo, fase de germinación o crecimiento en plántula. En una segunda fase se evalúan 200 líneas de la colección de mutantes EMS para su insensibilidad al ABA, en base a los resultados obtenidos durante el diseño del método.

3.1 Diseño de un método de evaluación para la detección de mutantes insensibles al ABA.

3.1.1 Material vegetal.

En este estudio se trabajó con 3 variedades de calabacín (*Cucurbita pepo*), pertenecientes al morfotipo *Zuchini*. Las variedades fueron Victoria, Prometheus y MUCU16.

Victoria es una variedad híbrida proveniente de la casa de semillas HM Clause. Se caracteriza por ser la primera en producción en invernadero en España y una de las variedades más cultivadas en el poniente almeriense. Es una planta abierta, adaptada a condiciones cálidas, presenta una producción elevada y precoz, y una calidad excelente de su fruto. Además, es resistente a enfermedades como Oídio (*Podosphaera xanthii*), al virus del mosaico de la sandía (WMV) y al virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) (HM Clause, 2020).

Prometheus, es una variedad híbrida producida por Syngenta. Se caracteriza por ser muy vigorosa, obtener una productividad y calidad de fruto elevada. Es recomendable para cultivos de invierno temprano (trasplante septiembre-octubre) o cultivo de primavera (trasplante en diciembre). Presenta resistencia intermedia a enfermedades como Oídio (*Golovinomyces cichoracearum* o *Podosphaera xanthii*), CMV (virus del mosaico del pepino), WMV (virus del mosaico de la sandía) y ZYMV (virus del mosaico amarillo del calabacín) (Syngenta, 2020).

MUCU16, es una variedad local que ha sido utilizada para secuenciar el genoma del calabacín y para la generación de colecciones de mutantes EMS en esta especie. Ha sido conservada en el banco de germoplasma de la Universidad Politécnica de Valencia (COMAV). Se caracteriza por presentar frutos de color verde oscuro y de buen tamaño. Además, presenta una tendencia a desarrollar una mayor proporción de flores masculinas, factor no deseable para nuestros cultivos (Vidaña, 2016).

3.1.2 Tratamientos y concentraciones.

En el estudio se trabajó con 4 concentraciones de ABA (100, 200, 300 y 400 μM) y un tratamiento testigo tratado con agua destilada. A cada una de las variedades usadas en el experimento (Victoria, Prometheus y MUCU16) se les aplicó los mismos

tratamientos y se mantuvieron en las mismas condiciones durante todo el tiempo de ensayo. A continuación, se encuentran detallados los tratamientos que se han llevado a cabo en el estudio y las etiquetas a los que se asocian:

MUC H₂O: tratamiento testigo con agua.

MUC 100: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 100 µM.

MUC 200: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 200 µM.

MUC 300: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 300 µM.

MUC 400: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 400 µM.

PRO H₂O: tratamiento testigo con agua.

PRO 100: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 100 µM.

PRO 200: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 200 µM.

PRO 300: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 300 µM.

PRO 400: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 400 µM.

VIC H₂O: tratamiento testigo con agua.

VIC 100: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 100 µM.

VIC 200: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 200 µM.

VIC 300: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 300 µM.

VIC 400: tratamiento donde se le aplicó una concentración de 400 µM.

3.1.3 Diseño experimental.

Se realizaron dos ensayos en el tiempo, el primero se inició a fecha de 4 de noviembre de 2019 y el segundo el 18 de noviembre de 2019. El objetivo es poder mantener las semillas en la misma cámara de cultivo y por lo tanto en las mismas condiciones de humedad y temperatura. Un total de 30 semillas por variedad y concentración fueron sometidas a estudio en dos tiempos, con 3 réplicas de 5 semillas por tiempo, para cada tratamiento y variedad. De esta forma se permite realizar todas las evaluaciones en la misma cámara de crecimiento, garantizando las mismas condiciones. A continuación, se muestra todo el procedimiento paso a paso.

Materiales y Métodos

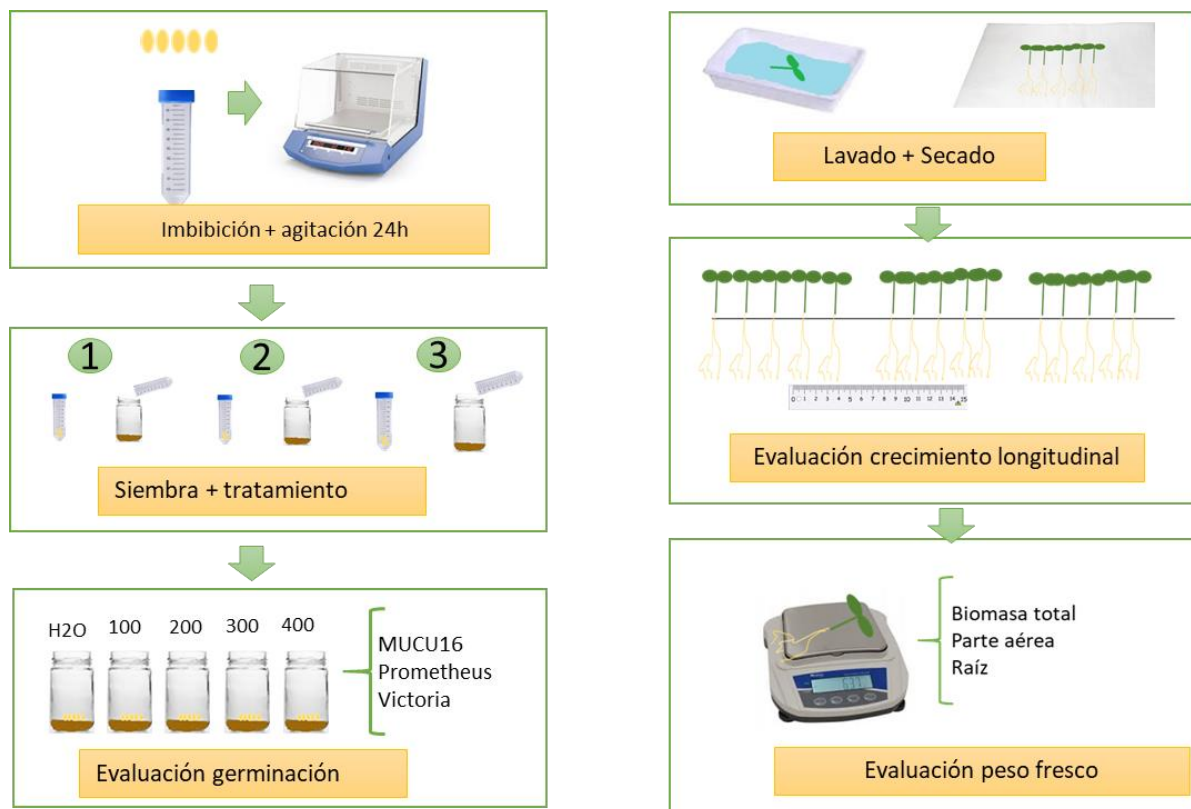


Figura 10: Representación esquemática del ensayo realizado para determinar un método de optimización para la obtención de mutantes insensibles al ABA, mediante la evaluación de la germinación, el crecimiento y el peso fresco de las plántulas de las tres variedades estudiadas (MUCU16, Prometheus y Victoria).

3.1.3.1 Selección de semillas.

Para efectuar el experimento en unas condiciones idóneas, se seleccionaron las 30 semillas de cada una de las variedades, eligiendo aquellas que presentaban unas condiciones morfológicas óptimas (**Figura 11**). Se descartaban semillas con mala formación de cotiledones o deformes.



Figura 11: Selección de las semillas necesarias de la variedad Victoria, encontrándose detallados grupos de 5 semillas que conformaban una unidad experimental.

3.1.3.2 Elaboración y aplicación de los tratamientos.

Todos los tratamientos se hicieron a partir de una solución madre que presentaba una concentración de 400 μM de ABA, siendo esta la mayor concentración que se utilizó en el ensayo. Los demás tratamientos, de una concentración menor, se realizaron mediante una dilución de la solución madre con agua destilada previamente autoclavada a 121°C durante una hora y una atmósfera de presión. Esta solución, la solución madre, se mantuvo conservada en el frigorífico a una temperatura de 3°C y en condiciones de oscuridad.

Los tratamientos se suministraron en 3 ocasiones para cada réplica temporal como se indica en la **Tabla 2**. De tal modo, se realizó una primera aplicación con una dosis inicial de choque con 20 mL, y así asegurarnos de que todo el sustrato quedaba humedecido con el tratamiento, y posteriormente, se realizaron dos tratamientos, esta vez con una dosis de mantenimiento de 5 mL.

Tabla 2: Fechas y dosis de la aplicación de los tratamientos del ensayo 1 y 2.

Fecha aplicación	DDS*	Dosis	Ensayo
05/11/2019	0	20 mL	Ensayo 1
12/11/2019	7	5 mL	
15/11/2019	10	5 mL	
19/11/2019	0	20 mL	Ensayo 2
26/11/2019	7	5 mL	
29/11/2019	10	5 mL	

*DDS: Días después de la siembra

3.1.3.3 Procedimiento y condiciones de ensayo.

Las semillas se embebieron en 20 mL (**Figura 12A**) en tubos Falcon de 50 mL al inicio del ensayo. Los tubos Falcon con las semillas en solución se mantuvieron en agitación continua a una velocidad de 90 rpm, una temperatura de 24°C y en total oscuridad, empleando un agitador de incubación modelo ika KS 4000 (**Figura 12B**) durante 24 horas. Este procedimiento se efectuó para favorecer la germinación de las distintas variedades empleadas en el ensayo.

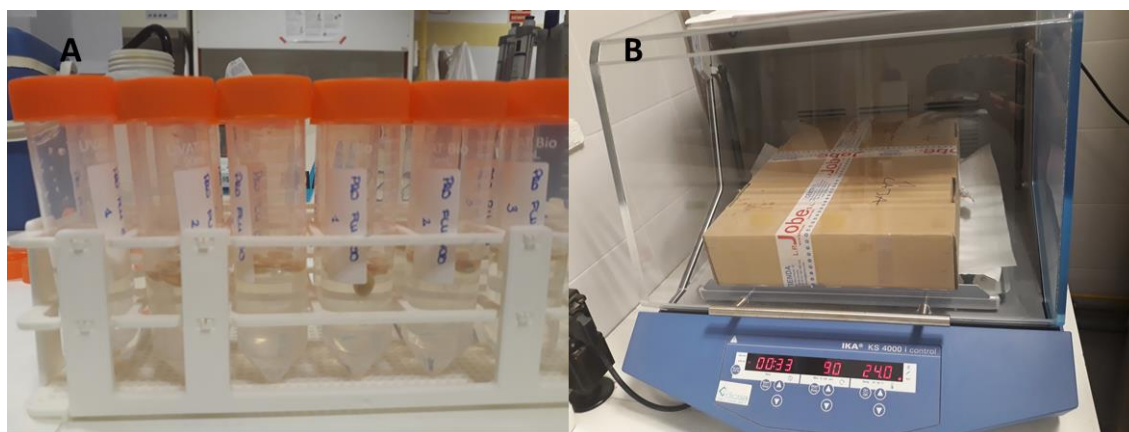


Figura 12: Método de presembrado, realizado para favorecer la germinación de las semillas. A: Semillas embebidas en 20 mL del tratamiento en tubos Falcon; B: Proceso de agitación durante 24 horas, manteniéndose las condiciones necesarias para la operación.

Pasadas las 24 horas se realizó la siembra de las semillas en botes de vidrio con un volumen aproximado de 300 cm³. Estos eran autoclavados previamente para evitar cualquier contaminación. Como medio de cultivo se utilizó la vermiculita, aplicándole un procedimiento de desinfección térmica análogo al de los recipientes de vidrio. 5g de vermiculita se usaron como sustrato en cada uno de los botes que fueron rotulados con el nombre del tratamiento y la repetición. La balanza utilizada en este procedimiento corresponde al modelo Mettler Toledo con una precisión de 0,001 g (**Figura 13A**).

Las semillas se sembraron en estas condiciones en una campana extractora, previamente desinfectada con alcohol etílico y bajo condiciones de asepsia. Para evitar una contaminación en la concentración, esta operación fue ascendente, comenzando por el que presentaba una menor dosis de tratamiento (testigo) y terminando por el tratamiento de mayor dosis (400µM de ABA). La siembra consistía en verter los 20 mL del tratamiento humedeciendo todo el sustrato utilizado (**Figura 13B**), y posteriormente, colocar las 5 semillas de manera equidistante, con ayuda de unas pinzas (**Figura 13C**). Tras la siembra de cada tratamiento, se tapaba el recipiente con parafilm, realizando un pequeño orificio para permitir el intercambio gaseoso, y así conseguir mantener unas condiciones de humedad óptimas para la germinación (**Figura 13D**). Los botes con las semillas se mantuvieron en una cámara con la humedad, alrededor del 75% controlada, y fase oscuridad durante 1 día (24horas), y después un programa que alternaba oscuridad/luz de 8h/16h. La primera fase tiene por objeto favorecer que la germinación se produjera de forma idónea y la segunda en la que alterna luz y oscuridad para favorecer el crecimiento de las plántulas. (**Figura 13E**).

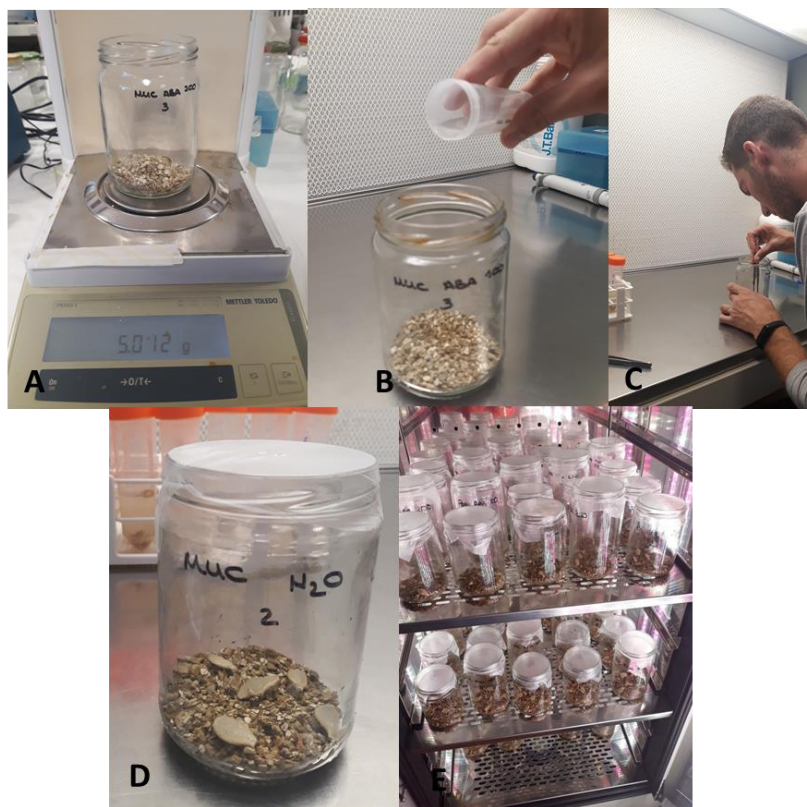


Figura 13: Procedimiento de la siembra de semillas. A: Pesada de 5 g de vermiculita en frascos de vidrio de 300 cm³ de volumen en una balanza de precisión Mettler Toledo de sensibilidad 0,001 g; B: Aplicación y riego con el tratamiento; C: Distribución de las semillas de forma equidistante en una campana extractora; D: Cierre de los botes con papel parafilm para mantener mejor las condiciones de humedad, realizando unas perforaciones en este material para favorecer el intercambio de gases; E: Cámara de control de condiciones ambientales.

Las plántulas se arrancaron 2 semanas (14 días) después de que fueron embebidas en el tratamiento. En este paso se realizan las últimas medidas, se eliminó la vermiculita sobre una bandeja. Posteriormente, se sometieron las plántulas a un abundante lavado en agua hasta conseguir eliminar cualquier resto de sustrato. A continuación, se dejaron secar, poniéndolas sobre papel de filtro.

3.1.4 Medidas realizadas.

3.1.4.1 Evaluación de la germinación.

El ABA juega un papel fundamental en la regulación de la germinación (Leung y Giraudat, 1998). Por esta razón la germinación es el proceso a evaluar de mayor importancia. Se anotaron las semillas que habían germinado de cada uno de los tratamientos, tomando como germinadas aquellas donde aparecía la radícula de 1 mm o más. Se anotaron las semillas germinadas a las 0, 24, 32, 35, 38, 41, 56, 62, 68, 78, 184,

206 y 232 horas. Las 0 horas corresponden con el momento en el que son embebidas las semillas en sus correspondientes tratamientos.



Figura 14: Observación visual del número de semillas germinadas de cada uno de los tratamientos y de las repeticiones.

Para la interpretación de los datos, se evaluó el porcentaje de germinación acumulada. Esto se realizó, siguiendo la expresión que se muestra a continuación:

$$\% \text{ Germinación acumulada} = \frac{n^{\circ} \text{ semillas germinadas}}{n^{\circ} \text{ semillas totales}} \times 100$$

Por otro lado, se consideró también evaluar otros parámetros como el tiempo en alcanzar el 50% de la germinación (G50) o el inicio de la germinación de cada uno de los tratamientos y variedades.

3.1.4.2 Evaluación del peso fresco.

Al finalizar el ensayo, las plántulas fueron evaluadas para su peso fresco, tomando así, los valores de la biomasa total y por separado, la parte aérea y radicular. El peso se midió con una balanza de precisión Metter Toledo, cuyo valor mínimo de medida es 0,001 g.

Con estos datos, se procedió a evaluar el porcentaje del peso fresco de cada uno de los tratamientos respecto el control con agua. En este caso el control del agua se consideró con un porcentaje del peso fresco del 100%. El porcentaje del peso fresco de los tratamientos, se calculó según la siguiente expresión:

$$\% \text{ peso fresco} = 100 - \left(\left(\frac{P. \text{ frescotrat} - P_{\text{frescomedioagua}}}{P_{\text{frescomedioagua}}} \right) \times 100 \right)$$

3.1.4.3 Evaluación de la longitud de raíz e hipocótilo.

Una vez lavadas y secadas, todas las plántulas se disponían sobre un papel de filtro, estando bien diferenciadas según su tratamiento. Además, se realizó una línea horizontal sobre el papel de filtro, sobre el que se colocaron las plántulas, ayudando a

diferenciar la parte aérea de la raíz. Una vez dispuestas se les realizó una fotografía, con una regla cuya precisión es de 0,1 cm (**Figura 15**). Finalmente, con ayuda de un programa informático, denominado ImageJ, se realizaron las medidas de longitud de las raíces y los hipocótilos de todas las plántulas.

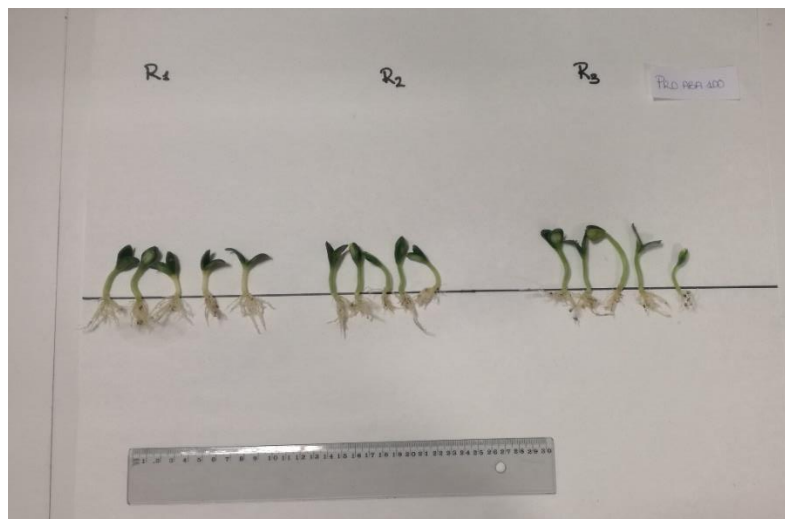


Figura 15: Imagen de referencia del crecimiento de las plántulas, para una posterior evaluación y medición de las longitudes de raíz y parte aérea mediante un programa informático (Imagej).

Estos datos se normalizaron respecto al control, suponiendo un crecimiento del 100%, para valorar el porcentaje del crecimiento longitudinal aéreo y radicular debido al tratamiento. Esto se realizó, tal y como se muestra en la siguiente relación:

$$\% \text{ crecimiento longitudinal} = 100 - \left(\left(\frac{\text{longtrat} - \text{longmediaagua}}{\text{longitudmediaagua}} \right) \times 100 \right)$$

3.2 Ensayo de screening de 200 familias mutantes EMS, para la obtención de plantas insensibles al ABA.

El material vegetal usado en este trabajo procede de una colección de mutantes *Etilmetanosulfonato* (EMS) de *Cucurbita pepo* desarrollada por el grupo de investigación “Genética de Hortícolas” de la Universidad de Almería. Esta colección de mutantes se generó sobre el fondo genético MUCU16 y está formada por 3.751 líneas mutantes en la generación M2 (**Figura 16**).

La primera caracterización de esta colección se realizó a través de una estrategia de genética directa buscando mutantes insensibles a etileno. Plántulas de todas las familias de la colección de mutantes fueron expuestas a concentraciones de etileno con el objetivo de observar la triple respuesta. La ausencia de triple respuesta indicaba mutación. De esta manera se llegaron a identificar cuatro familias con esta insensibilidad que se denominan *ein1*, *ein2*, *ein3* y *EIN4*.

El procedimiento para la obtención de estas familias insensibles, es el que se muestra en la **Figura 16**. Primeramente, se aplicó el agente mutagénico EMS a 8.000 semillas que componen la generación M0, de las cuales se obtuvieron 8.000 plantas (M1). Estas plantas se atopolinizaron y se obtuvieron 3.751 líneas mutantes (M2). Sobre estas líneas, se realizó un screening de triple respuesta al etileno, obteniendo así finalmente 4 familias insensibles al etileno. Así mismo, de las cuatro líneas obtenidas 3 de ellas presentan una segregación semidominante (*ein1*, *ein2* y *ein3*) y una dominante (*EIN4*).

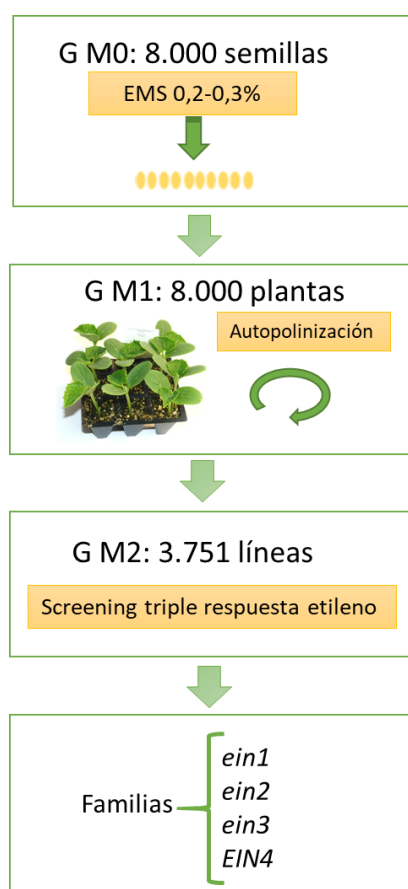


Figura 16: Representación esquemática del procedimiento para obtención de mutantes insensibles al etileno. Aplicación de EMS 0,2-0,3% a 8.000 semillas, obteniendo 8.000 plantas; Autopolinización de las 8.000 plantas obtenidas, dando lugar a 3.751 líneas; Realización screening triple respuesta a etileno, resultando 4 mutantes (3 semidominantes y 1 dominante).

3.2.1 Diseño experimental.

Una vez concluida la realización de un método de optimización y el estudio de diversas concentraciones de ABA, se optó por someter a 200 familias de una colección de mutantes EMS a un tratamiento basado en una aplicación de 500 μ M de ABA, con el objetivo de seleccionar las plántulas que presentasen una alta insensibilidad de ABA, superando los valores mostrados en la variedad Prometheus empleada en este ensayo.

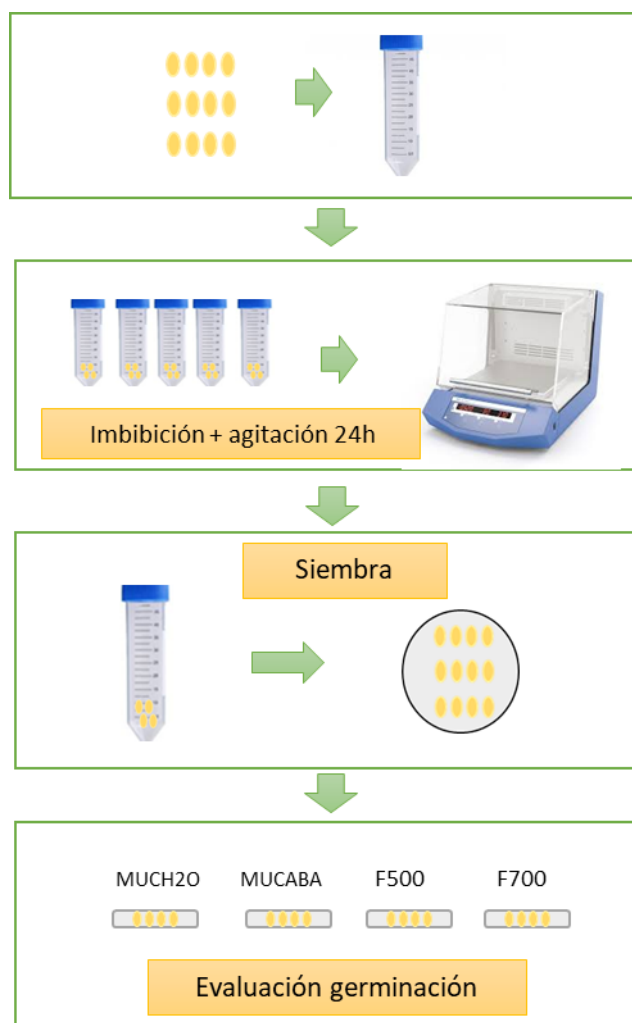


Figura 17: Representación esquemática del ensayo realizado a 200 familias de mutantes EMS, para obtener plantas insensibles al ABA, para ello se estudió la evaluación de la germinación a 500 μM de ABA.

3.2.1.1 Elaboración y aplicación de tratamientos.

En este ensayo se contó con dos tratamientos de control, ambos con la variedad MUCU16. En uno de ellos se aplicó agua y en el otro un tratamiento de ABA 500 μM . además, contamos con un tratamiento por cada familia (200) tratados con una dosis de 500 μM ABA. Los tratamientos de ABA se realizaron con una disolución del producto como se describe en el apartado 3.1.3.2.

3.2.1.2 Procedimiento.

12 semillas de cada una de las 200 familias se seleccionaron por su morfología (desarrollo y formación adecuada), para asegurarnos que estas se encontraban en las condiciones idóneas para germinar.

De forma análoga a la descrita para la puesta a punto del método de evaluación (3.1.3.3.), las semillas se embebieron en la solución madre a una concentración 500 μM

preparada previamente, durante 24 horas. Para ello se rellenaron hasta los 20 mL en un tubo Falcon, donde posteriormente se introdujeron las semillas (12 semillas en cada tubo). Los tubos estaban debidamente etiquetados con cada uno de los tratamientos. Posteriormente, se introdujeron en un agitador de incubación modelo ika KS 4000 (**Figura 12B**), con unas condiciones de agitación continua a una velocidad de 90 rpm, una temperatura de 24°C y en total oscuridad.

A continuación, se procedió a la siembra de las semillas en placas de Petri. La siembra se realizó en una campana extractora previamente esterilizada con alcohol etílico para así evitar posibles contaminaciones y cumplir con las condiciones de asepsia. La cámara húmeda estaba formada por dos papeles de filtro humedecidos con el tratamiento, sobre los que se colocaron las semillas de una forma equidistante con ayuda de unas pinzas. La dosis del tratamiento aplicada fue de 10 mL, la idónea para humedecer el papel de filtro.

Finalmente, se introdujeron en una cámara donde se controlaba la humedad, alrededor del 75%, y en oscuridad, para que la germinación se produjera de forma idónea.

3.2.1.3 Evaluación de la germinación.

Para la obtención de mutantes insensibles a ABA se procedió a evaluar la germinación en el tratamiento aplicado. Esta evaluación se realizó a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra. En esa evaluación se iban anotando el número de semillas que había germinadas hasta el momento.

3.3 Análisis estadístico.

Para el estudio de los resultados se empleará el paquete estadístico Statgraphics Centurión que permite realizar comparaciones entre los tratamientos y variedades. Se estudiará la normalidad de los datos y en caso de cumplir con la hipótesis se realizarán análisis de varianza ANOVA, simples y múltiples. En caso de no cumplir con la hipótesis de normalidad, será necesario realizar la transformación de los datos o evaluar el efecto de los tratamientos con métodos no paramétricos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 Resultados y discusión.

4.1 Evaluación de caracteres relacionados con la germinación y el crecimiento.

Con el objetivo de establecer un método para seleccionar mutantes insensibles al ABA, se trataron a distintas concentraciones de esta hormona 2 variedades híbridas y la variedad tradicional MUCU16. La elección de estas tres variedades es debida a que en pruebas preliminares parecen presentar diferencias de insensibilidad al ABA, permitiendo elaborar un método más exacto. En cuanto a las variedades utilizadas fueron Prometheus desarrollada por la compañía de semillas Syngenta, Victoria, híbrido desarrollado por HM Clause y MUCU16.

Para la elaboración del método de optimización se evaluaron los efectos del ABA sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas, debido a que es en los procesos en los que juega un papel importante.

4.1.1 Evaluación del retraso de la germinación ocasionada por la aplicación exógena de ABA.

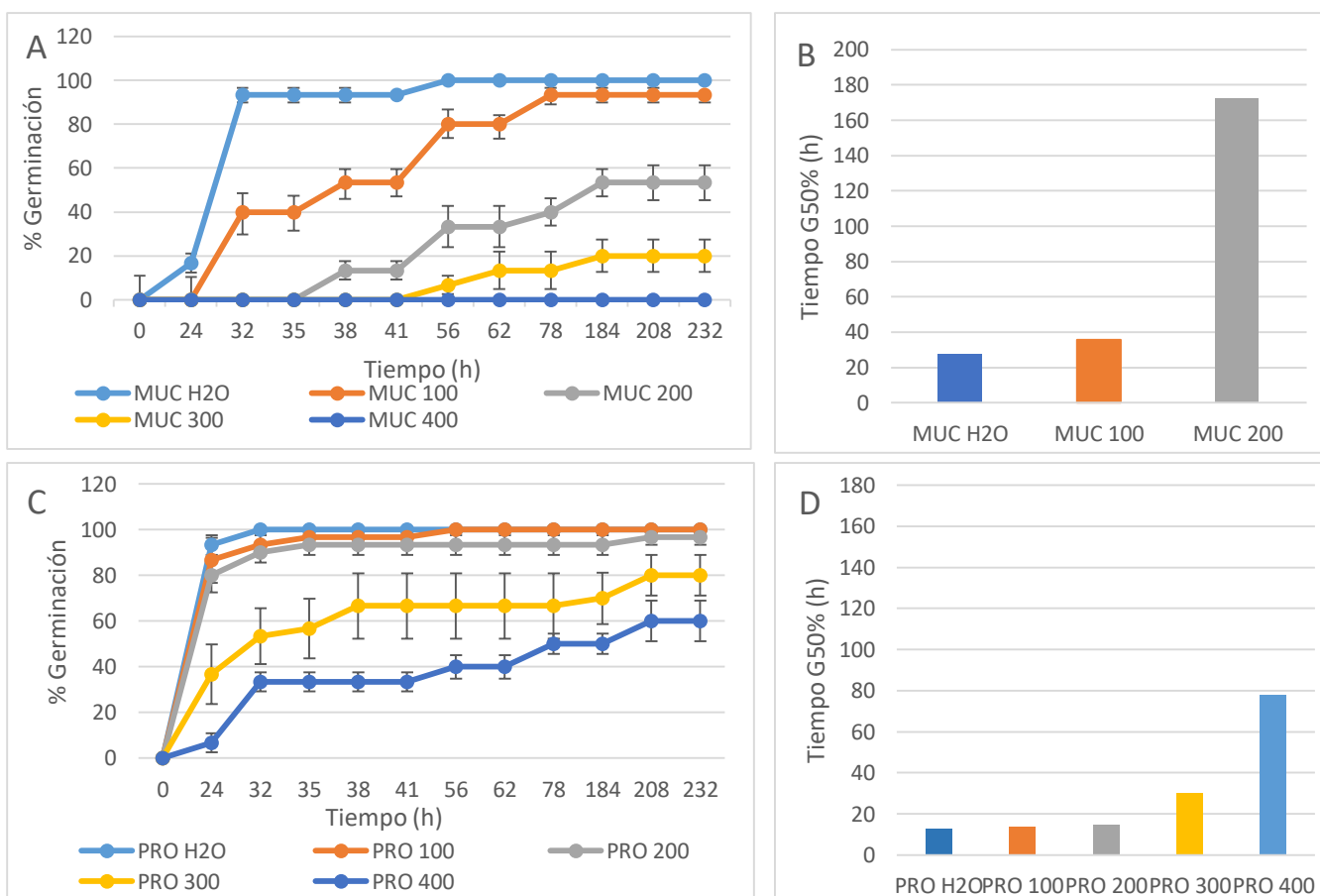
La germinación es uno de los procesos regulados por el ABA, puesto que una disminución de la concentración de esta hormona en la semilla se correlaciona con el inicio del crecimiento del embrión (Nee *et al.*, 2017). Por ello ha sido evaluada la germinación, midiendo el número de semillas germinadas a distintos tiempos, para diferentes concentraciones de ABA (100, 200, 300 y 400 μM).

En la **Figura 18A**, se encuentra representado el porcentaje de la germinación acumulada de MUCU16. Se puede observar como para el tratamiento MUC 100 (tratamiento a 100 μM), la germinación sufre un retraso temporal. Sin embargo, la germinación final es igual al control. En los otros tratamientos, el retraso y descenso de la germinación respecto el control es bastante elevado y, de hecho, en el tratamiento MUC 400, no llega a germinar ninguna de las semillas. Al mismo tiempo, ha sido evaluado el parámetro G50, que es el tiempo en alcanzar el 50% de la germinación. Solo los tratamientos a 100 y 200 μM alcanzan el 50% de la germinación y en MUC 200 se alcanza después de las 170 h de ensayo (**Figura 18B**), lo que supone un retraso respecto el control de 155 horas. MUC 100 alcanza G50 a las 35 horas, 18 horas después que el control.

Al contrario que el control de MUCU16 (MUC H₂O) que no alcanza el 100% de la germinación hasta las 32h (**Figura 18A**), el control de Prometheus (PRO H₂O) tiene el 100% de las semillas germinadas a las 24 horas (**Figura 18C**). Los tratamientos de la variedad Prometheus, muestran como para concentraciones de 100 y 200 μM , no tiene un efecto de retraso de la germinación respecto el control. Sin embargo, las concentraciones de ABA mayores 300 y 400 μM sí produce un retraso y un descenso en la germinación (**Figura 18C**). Aun así, en los tratamientos 300 y 400 hay una germinación

acumulada ascendente alcanzando valores de germinación del 60 y 80% de media al final del ensayo. En esta variedad el valor G50 (**Figura 18D**), es alcanzado en todos los tratamientos. Los dos tratamientos de menor concentración tienen un valor G50 comparable al control e inferior a las 15h (en los 3 casos). Sin embargo, el tratamiento 300 tiene un valor G50 mayor (30h) y sólo la concentración máxima de análisis (400 μ M) tiene un retraso de germinación significativo y alcanza el G50 a las 78 horas.

Por último, la germinación en la variedad Victoria (**Figura 18E-F**) solo germina el tratamiento control (VIC H2O) y su germinación acumulada máxima es de 93% al final del ensayo (232 h). Aun así, el 50 % de la germinación del control se produce alrededor de las 58 h de ensayo, valores muy superiores a los obtenidos en los controles de las otras variedades.



Resultados y Discusión

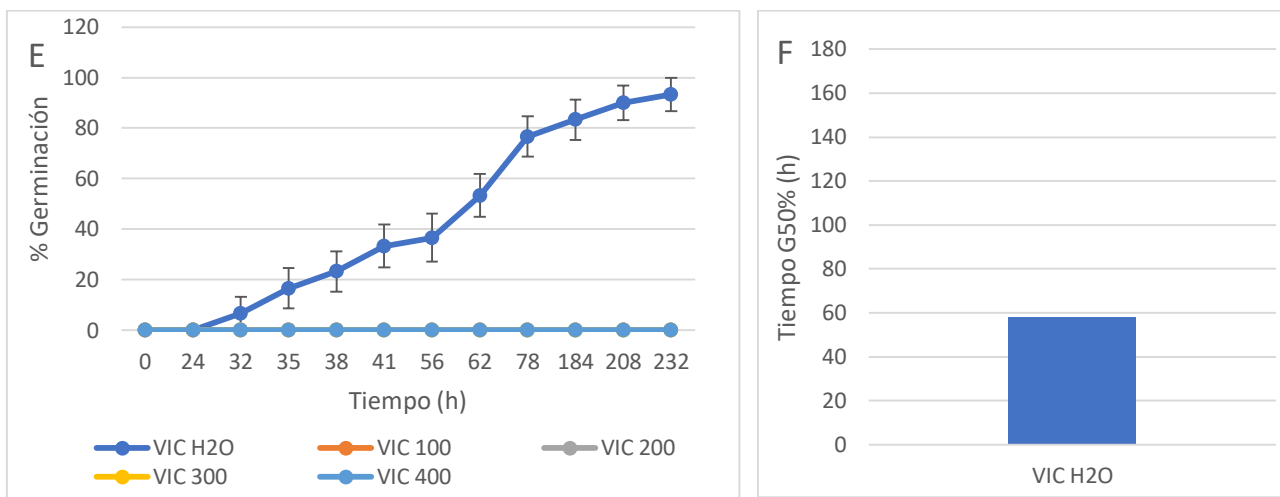


Figura 18: Evaluación de la germinación de las tres variedades estudiadas: MUCU16 (MUC), Prometheus (PRO) y Victoria (VIC). Las gráficas de la izquierda (A,C,E) representan el porcentaje de la germinación acumulada de cada una de las variedades en los distintos tratamientos aplicados (H₂O, 100, 200, 300 y 400). Las gráficas de la derecha (B,D,F), muestran el tiempo en el que se alcanza el 50% de la germinación (G50).

Para completar el análisis de los resultados de germinación otro parámetro a tener en cuenta, debido al retraso de la germinación producida por la aplicación de ABA, es el inicio de la germinación de las distintas variedades en todos los tratamientos realizados (**Figura 19**). Se puede observar como el retraso en el inicio de la germinación varía en función de la variedad. Prometheus no ha sufrido ningún retraso en este proceso debido a los tratamientos con ABA, cuando se comparan con el control. La variedad Victoria, tiene un inicio de la germinación en el control más tardío que el control de Prometheus y MUCU16, y en ningún tratamiento se observa inicio de la germinación. Por último, en MUCU16 sí se observa un retraso del comienzo de la germinación debido al ABA, el control inicia su germinación de forma más temprana que el resto de los tratamientos, y hay correlación entre el incremento de la concentración y un inicio de la germinación, si bien las diferencias entre 100 y 200 μ M no son tan evidentes como el incremento entre 200 y 300 μ M.

Resultados y Discusión

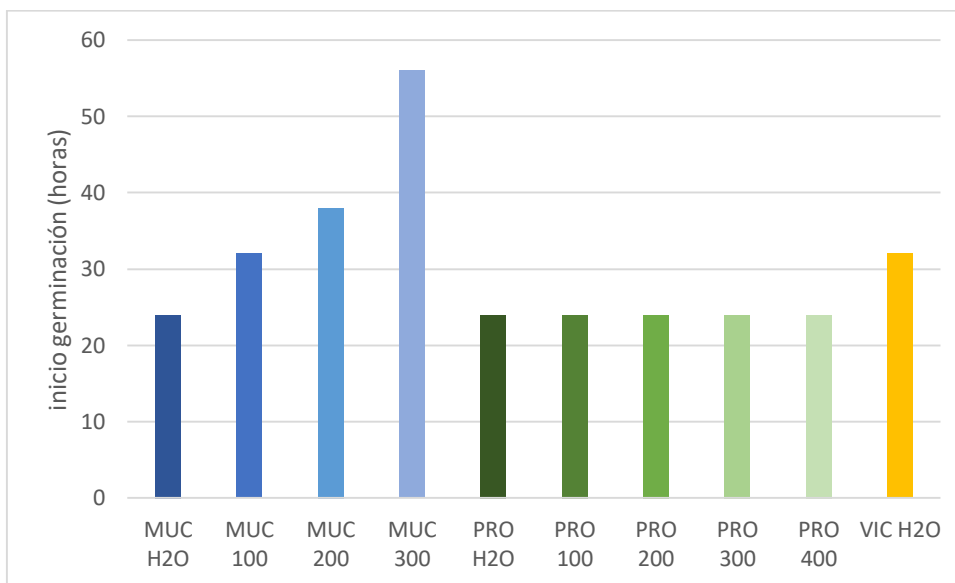


Figura 19: Representación del inicio de la germinación en horas desde que se embebieron los diferentes tratamientos (H₂O, 100, 200, 300 y 400) y variedades analizadas en el estudio (MUCU16, Prometheus y Victoria).

En el ensayo realizado, se ha podido observar como un aumento de la concentración de ABA aplicada de forma exógena, producía un descenso en la germinación de las semillas, tal y como ya se había observado en estudios anteriores por Schopfer y Plachy (1984). Sin embargo, el comportamiento respecto a los tratamientos es diferente entre variedades y la sensibilidad respecto al ABA también varía, mientras que Prometheus y MUCU16 son capaces de germinar a todas las concentraciones ensayadas (excepto el tratamiento MUC 400), Victoria sólo germina en el control. Estos resultados apuntan a una mayor sensibilidad de Victoria al ABA, o un mayor contenido endógeno. Además, demuestran variabilidad en la respuesta al ABA para distintos fondos genéticos, por lo que pueden considerarse otras estrategias para estudiar la variabilidad en la sensibilidad a ABA como el bloqueo de la ruta de biosíntesis.

MUCU16 es el fondo genético sobre el que se desarrolló la colección de mutantes EMS que se ha testado, parcialmente, en este proyecto. De las 3 variedades ensayadas, es la que presenta una sensibilidad intermedia, germina a las concentraciones más bajas, pero no a 300 y 400 μM , lo que tendrá que ser considerado para determinar la concentración de análisis de la colección de mutantes.

El retraso de la germinación observado de forma general en todos los tratamientos, también ha sido observado en otras especies como el fríjol chicharo *Cajanus Cajan* (L) a una concentración de 100 μM (Sneideris *et al.*, 2015). Por otro lado, también ha sido estudiado que el efecto inhibitorio del ABA sobre *Hordeum vulgare* a una concentración 10^{-4}M , es mayor cuando la germinación se produce en iluminación que cuando se produce en la oscuridad. Aun así, en ambas ocasiones y a

concentraciones bajas de la hormona se produjo una inhibición de la germinación (Jacobsen et al., 2002). Del mismo modo, y aún más importante, en estudios realizados anteriormente en *C. pepo*, en la variedad MUCU16, se producía un ligero descenso y retraso de la germinación a partir de 0,75 μ M (Alonso, 2019), resultados coherentes con los presentados en este TFM.

4.1.2 Evaluación del crecimiento longitudinal de la parte aérea y de la raíz.

Además de la germinación, ha sido evaluado el crecimiento de las plántulas en los primeros días del desarrollo (tras 13 días desde el inicio de la siembra).

En el epígrafe anterior se presentan los resultados del impacto de los tratamientos de ABA sobre la germinación. En este epígrafe estudiamos el impacto sobre el crecimiento en las 3 variedades analizadas de las plántulas que crecieron a partir de las semillas germinadas. En la **Figura 20** se presentan los datos del porcentaje del crecimiento longitudinal respecto al control de la raíz (**Figura 20A**) y de la parte aérea (**Figura 20B**) para la variedad MUCU16, calculado evaluando el crecimiento en comparación con su respectivo control, considerando el crecimiento de este un 100%, tal y como se explica detalladamente en el apartado de materiales y métodos. Conforme se incrementa la concentración hay un descenso del crecimiento que es mayor en los tratamientos MUC 300 y MUC 400. Esto conlleva que en estos dos tratamientos no se observa crecimiento en ninguno de los dos parámetros evaluados, debido a que MUC 400 no había germinado y en MUC 300 a pesar de haber germinado no presentaba ningún desarrollo de crecimiento. El crecimiento de la raíz de los tratamientos de menor concentración de ABA, MUC 100 y MUC 200, hay una reducción significativa de la longitud de la raíz y el tallo (**Figura 20A y 20B**). El efecto es mayor en la raíz que en el tallo (parte aérea), para los dos tratamientos, mientras que el tamaño de MUC 100, de la raíz se reduce del 100% al 26 % en la raíz (**Figura 20A**), la reducción en el tallo es al 56 % (**Figura 20B**). El tratamiento MUC 200 tiene más efecto y el porcentaje de reducción del crecimiento de la raíz es del 13 % y el crecimiento del tallo 19% (**Figura 20**).

Resultados y Discusión

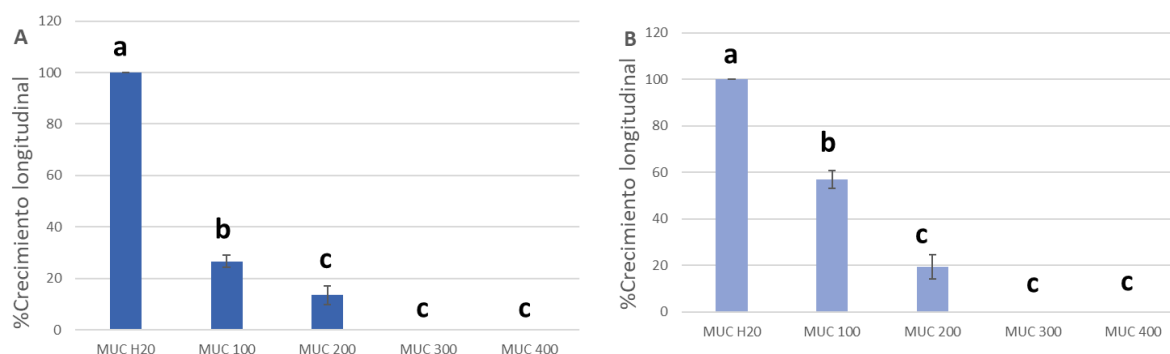


Figura 20: Representación del porcentaje de crecimiento de las plántulas en MUCU16, diferenciando entre longitud de la raíz (A) y de la parte aérea (B), medido 13 días después de la siembra a diferentes concentraciones de ABA. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante análisis de varianza ANOVA (P -valor=0) y, en ausencia de normalidad, mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor- P =0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar.

El efecto del ABA sobre el crecimiento longitudinal de tallo y raíz observado en MUCU16 está también presente en Prometheus como se puede apreciar en la **Figura 21**. Hay un descenso del crecimiento cuando aumenta la concentración de ABA, si bien para esta variedad las concentraciones a 300 y 400 μM sí pudieron ser evaluadas porque hubo crecimiento. La longitud de la raíz se reduce a más de la mitad en comparación con el control en los tratamientos 100 y 200 μM (**Figura 21A**). En concentraciones más elevadas el crecimiento de la raíz se reduce aún más, alcanzando un 22% de crecimiento respecto del control en el tratamiento PRO 300 y un 8% en el tratamiento PRO 400. De tal modo, podemos apreciar tres grupos diferenciados en cuanto a las diferencias significativas establecidas, por un lado, el control presentando diferencias con todos los tratamientos de ABA, después PRO 100 y PRO 200 que no presentan diferencias significativas entre sí y finalmente, los tratamientos 200, 300 y 400 tampoco presentan ninguna diferencia significativa entre ellos. Por consiguiente, el tratamiento 200 lo vemos agrupado en dos grupos, presentando unos valores intermedios. En la **Figura 21B** se observa como el crecimiento de la parte aérea en los tratamientos a 100 y 200 μM no tienen efecto en el crecimiento, siendo igual al del control. En el tratamiento PRO 300 se aprecia una reducción del crecimiento del tallo significativa (50% respecto el control). De este modo, los tratamientos PRO 300 y PRO 400 presentan diferencias significativas con el resto de tratamientos, pero no entre ellos, a excepción de PRO 200 y PRO 300 que no presentan diferencias significativas entre sí.

Resultados y Discusión

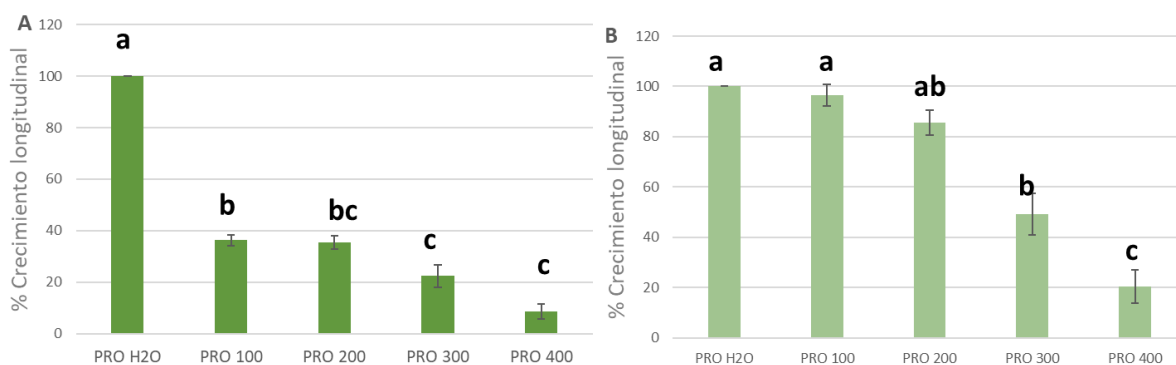


Figura 21: Representación del porcentaje de crecimiento de las plántulas en Prometheus, diferenciando entre longitud de la raíz (A) y de la parte aérea (B), medido 13 días después de la siembra a diferentes concentraciones de ABA. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante análisis de varianza ANOVA (P -valor=0) y, en ausencia de normalidad, una prueba mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor- P =0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar.

Al contrario que lo observado en MUCU16 y Prometheus, no ha sido posible estudiar el efecto de las concentraciones de ABA sobre el crecimiento de la raíz y tallo de las plántulas de Victoria. Las semillas tratadas con ABA de esta variedad no germinaron.

En la **Figura 22** se analizan los resultados de las distintas variedades a las concentraciones de 100 y 200 μ M. Al comparar el crecimiento de la raíz entre MUCU16 y Prometheus (**Figura 22A**), no muestran diferencias significativas a 100 μ M, pero sí en el crecimiento del tallo (**Figura 22B**). Las longitudes de las plántulas en el tratamiento 200 μ M (**Figura 22C y 22D**) muestran que el crecimiento de la raíz de MUCU16 se redujo debido al aumento de concentración, de 100 μ M a 200 μ M, mientras que en Prometheus, el incremento de concentración de ABA no tiene un impacto significativo, indicando que Prometheus puede tener mayor tolerancia al ABA. Las diferencias en el porcentaje de reducción del tamaño del hipocótilo respecto al control en las plántulas tratadas a 200 μ M son comparables a los de la raíz, mientras MUCU16 acusa el aumento de concentración y hay una mayor reducción (del 57% al 19%), Prometheus reduce su crecimiento debido al incremento, pero sólo un 10%.

Resultados y Discusión

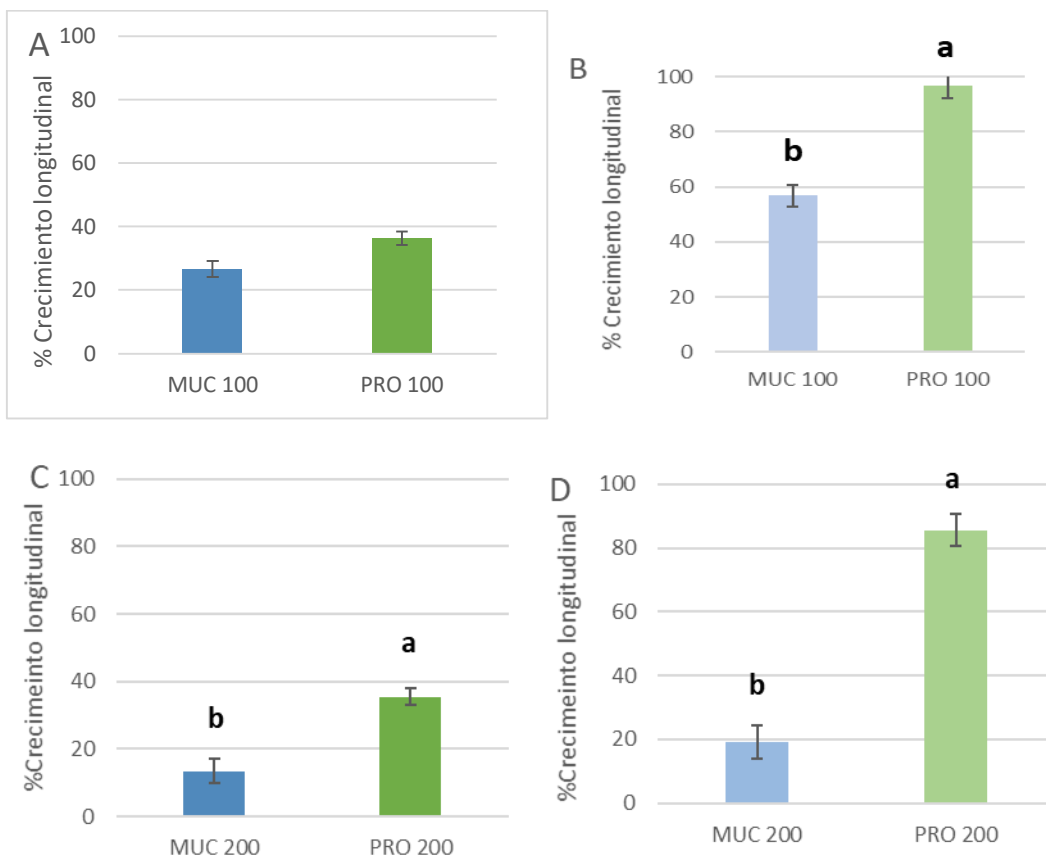


Figura 22: Representación del porcentaje de crecimiento de las plántulas, diferenciando entre longitud de la raíz (A y C) y de la parte aérea (B y D) a una concentración de 100 μ M (Ay B) y 200 μ M (C y D), medido 13 días después de la siembra en diferentes variedades. El porcentaje de cada tratamiento se obtiene por diferencias con su control. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, una prueba mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar.

Los resultados obtenidos en las longitudes de raíz y parte aérea (hipocótilo), muestran un comportamiento similar, observándose un descenso gradual en ellas cuando las concentraciones de ABA aumentan, esto implica un menor crecimiento de las plántulas, tal y como ya habían apreciado otros autores en la longitud del tallo y de las raíces de *Ipomoea batatas* (Reyes *et al.*, 2004).

Como muestran las **Figura 20, 21 y 22**, en ambas variedades (MUCU16 y Prometheus), el crecimiento radicular responde más al tratamiento con ABA que el hipocotilo. Tal es así, que en la variedad Prometheus el crecimiento de la parte aérea en los tratamientos PRO 100 y PRO 200 apenas sufre una disminución respecto al control, sin embargo, el tamaño de la raíz es apenas un 40% de la del control. Las longitudes de las raíces se ven afectadas a pequeñas dosis de ABA en ambas variedades. En estudios realizados en *Arabidopsis* sobre el efecto de la aplicación exógena de ABA en el

crecimiento radicular, se observa que aplicaciones a bajas concentraciones (0,1 M) estimulan el crecimiento de las raíces en un 20%, mientras que con aplicaciones superiores a 10 M se presenta un efecto inhibitorio (inhibición del 40% para una concentración de 10 M) (Li *et al.*, 2017). El ABA es una hormona que se acumula en condiciones de estrés en las plantas. La acumulación de ABA a causa de estreses por salinidad se produce en la parte aérea y en las raíces en plántulas de tomate (*S. lycopersicum*). Si la salinidad es moderada la concentración de ABA no difiere entre raíz y hojas. En cambio, en condiciones más severas, esto es de mayor concentración de sal, la producción de ABA es mayor en raíces (Lovelli *et al.*, 2012). Lo que podría estar relacionado con una mayor sensibilidad de este órgano o puede ser debido a una mayor exposición al estrés. Por el contrario, autores como Jordán y Casaretto (2006), determinan que el ABA inhibe el crecimiento longitudinal de los tallos más que en raíces y que solamente en algunos casos ocurre de forma contraria. Además, estos mismos autores, defienden que el proceso mediante el cual el ABA inhibe la elongación de los tallos es mediante un bloqueo de las bombas de protones, las cuales se encuentran activadas por auxinas, acidificando así la pared celular, reduciendo por lo tanto el crecimiento celular.

En nuestras condiciones de ensayo, las semillas fueron germinadas en distintas concentraciones de ABA y posteriormente regadas con las mismas soluciones para evaluar los parámetros de crecimiento de las plántulas. La menor concentración ensayada en este caso es 100 μ M. En esta concentración se observa efecto en la reducción del crecimiento de los genotipos, en raíz y tallo, esta concentración, no obstante, es mucho menor que la concentración sin efecto evaluada en *Arabidopsis* por (Li *et al.*, 2017) (0,1M), lo que podría apuntar a una mayor sensibilidad de *C. pepo* al ABA. Esta variabilidad entre especies es observada también entre los genotipos ensayados, así el efecto en el crecimiento de raíz y tallo en Prometheus es menor que en MUCU16 en las dos concentraciones comparadas (100 y 200 μ M). Los resultados obtenidos en este ensayo indican que la raíz sufre mayor reducción del crecimiento, pero también es el órgano directamente expuesto a la solución de ABA, de forma similar a lo observado para soluciones salinas por (Lovelli *et al.*, 2012) y que podría explicar el mayor efecto en el crecimiento de este órgano.

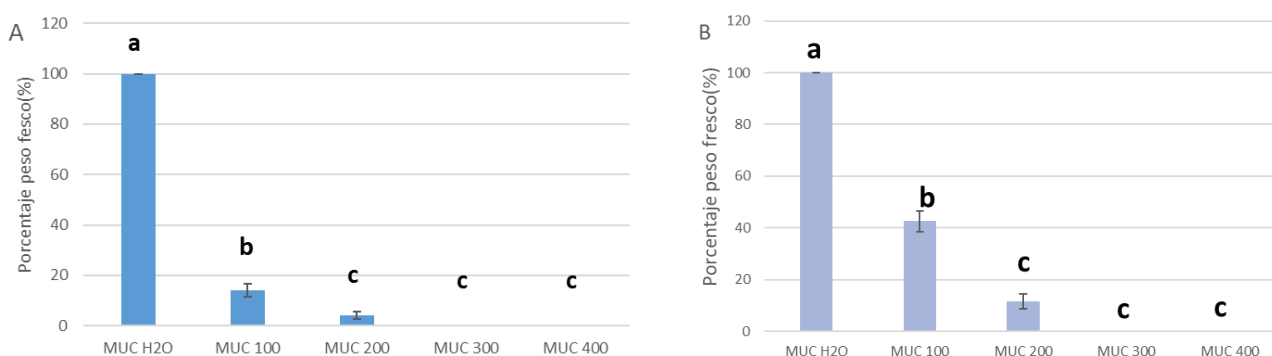
4.1.3 Evaluación del peso fresco de las plántulas.

Uno de los principales papeles del ABA en las plantas es regular el crecimiento. Se evaluó el peso fresco de las variedades Prometheus y MUCU16 a las distintas concentraciones ensayadas, considerando las posibles diferencias entre el peso de la raíz y el peso de la parte aérea. Para ello se estimó el porcentaje de crecimiento en peso

fresco de la parte aérea y la raíz, considerando que el control presentaba un crecimiento del 100% y comparando el crecimiento de los tratamientos frente al control, tal y como ha sido especificado en el apartado de materiales y métodos.

A continuación, se puede apreciar como en MUCU16, el incremento en la concentración de ABA está correlacionado con un descenso gradual del peso fresco respecto al control (tratamiento con agua). Este efecto es más evidente en las concentraciones mayores, 300 y 400 μM , que no presentan ningún crecimiento (**Figura 23A y 23B**). La respuesta de MUCU16 a los tratamientos intermedios (100 y 200), muestran resultados con diferencias significativas entre sí, puesto que estadísticamente a pesar de presentar cierto crecimiento el tratamiento 200 se comporta como los dos de mayor concentración. El tratamiento 100 también sufre una gran reducción frente al control, presentando diferencias significativas con este y con todos los tratamientos. Observados globalmente hay una reducción. También se puede observar en la **Figura 23** como las mayores diferencias entre tratamientos se dan en el peso de la parte aérea (**Figura 23A**). Mientras que, en el peso de la raíz, hay menores diferencias entre los tratamientos, sin embargo, una mayor diferencia de estos respecto al control.

En la variedad Prometheus (**Figura 23C y 23D**), los resultados obtenidos siguieron el mismo patrón anterior. Sin embargo, en esta ocasión, vemos como el descenso es más progresivo y sí que presentan crecimiento a concentraciones altas de ABA (300 y 400 μmol). Así mismo, podemos decir que, para los resultados obtenidos en las dos variables medidas, se observan diferencias significativas entre todos los tratamientos con el control. Sin embargo, entre los tratamientos 100 y 200 no existen diferencias significativas. Por otro lado, se observan diferencias significativas del tratamiento 100 con los tratamientos 300 y 400. Mientras que el tratamiento 200 solo presenta diferencias con el de mayor concentración (400).



Resultados y Discusión

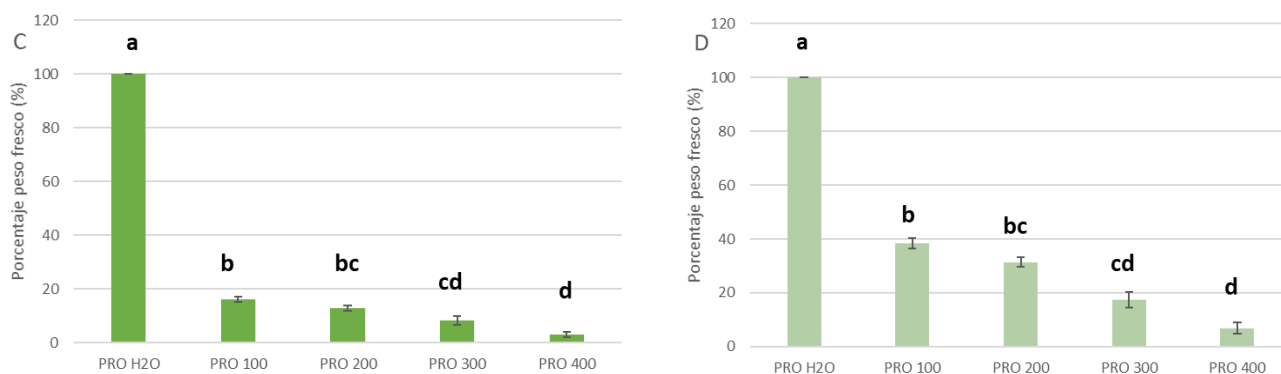


Figura 23: Representación del porcentaje del peso fresco de las plántulas en MUCU16 y Prometheus, diferenciando entre peso de la raíz (A y C) y de la parte aérea (B y D), medido 13 días después de la siembra a diferentes concentraciones de ABA. La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante un análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar.

Finalmente, se ha elegido la concentración 200 μM para comparar el comportamiento de las variedades a una misma concentración y se encuentran representados en la **Figura 24**. De tal modo, se puede observar como la variedad que mejores resultados ha tenido en esta concentración para todos los parámetros evaluados ha sido Prometheus, presentando diferencias significativas con la variedad MUCU16.

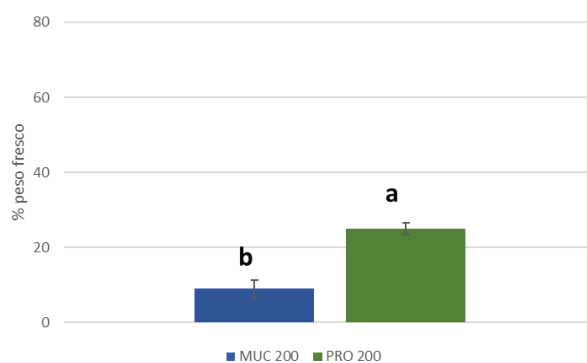


Figura 24: Representación del porcentaje del peso fresco de las plántulas con una concentración de ABA de 200 μM , (Biomasa total), medido 13 días después de la siembra en las tres variedades estudiadas (MUCU16 y Prometheus). La diferencia entre distintos tratamientos, se determinó mediante análisis de varianza ANOVA (P-valor=0) y, en ausencia de normalidad, una prueba mediante el método de Kruskal-Wallis (Valor-P=0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar.

En resumen, podemos apreciar como el porcentaje del peso fresco disminuye cuando se aumentan la concentración de ABA exógena aplicada. Esto es debido a lo comentado en los apartados anteriores, es decir, por un retraso y una menor

germinación de las plántulas, y por un menor crecimiento de esta, debido al efecto inhibitorio del crecimiento que presenta ABA. En cambio, en cultivares de tomate transgénicos sobreproductores de ABA utilizados como pies, sobre las que se ha injertado otra variedad, se ha visto como aumenta el vigor vegetativo, indicando que el ABA sintetizado en la parte radicular, es capaz de influir y ser transportado a la parte aérea (Martínez *et al.*, 2014).

Finalmente, el estudio realizado ha aportado los datos necesarios y esperados para poder hacer una selección de la dosis adecuada para seleccionar posteriormente mutantes insensibles a ABA. El parámetro de mayor importancia y más determinante para la selección de una variedad insensible al ABA, es la germinación, por ser esta hormona clave en la maduración y germinación de las semillas (Leung y Giraudat, 1998) y por afectar al inicio del crecimiento de la plántula. Sin embargo, no debe ser el único, puesto que no solo es necesaria una germinación de las plantas, sino un correcto crecimiento radicular y aéreo, puesto que otro de los factores regulados por ABA son el crecimiento vegetativo y el desarrollo radicular (Li *et al.*, 2019). Por ello, en este estudio han sido evaluados dos parámetros de crecimiento como son el peso fresco y las longitudes, en ambos casos diferenciando entre parte aérea y radicular. Sin embargo, hemos podido apreciar que ambas medidas arrojan unos resultados similares, por lo que no parece interesante hacer una evaluación de ambos. En cambio, si destacar la importancia de hacer una diferencia de medidas entre la parte radicular y la parte aérea, debido a las diferencias encontradas.

La germinación es un estadio de gran interés para discriminar entre plantas insensibles y sensibles al ABA, en esta sección hemos determinado que se puede observar diferencias entre variedades que podrían ser trasladadas a líneas mutantes. Como ventaja es un parámetro fácil de evaluar, en tanto en cuanto permite estudiar a la vez gran número de líneas, y además, es un estadio precoz en el desarrollo de las plántulas, por lo que se pueden eliminar las líneas que no sean de interés. Para una primera determinación de plantas insensibles al realizar un screening en una población de mutantes, será importante realizar un estudio de la germinación acumulada, hasta un rango aproximado de al menos 78 horas, puesto que se ha determinado que es cuando se producen los resultados más significativos. Por otro lado, dependiendo del objetivo se pueden usar distintas concentraciones de ABA, a mayor concentración germinarán únicamente plantas con alta insensibilidad a esta hormona.

4.2 Screening de 200 familias para obtener mutantes insensibles al ABA.

Los resultados presentados en el epígrafe 4.1 permitieron la puesta a punto de un método de evaluación de mutantes EMS insensibles al ABA. En base a los resultados

obtenidos, pensamos que el tiempo de germinación ofrece información suficiente para discriminar entre plantas mutantes y no mutantes dentro de una línea. Si bien los posibles mutantes detectados serán evaluados para parámetros del crecimiento, como el crecimiento longitudinal y la biomasa en estadios más avanzados de análisis.

Habitualmente las mutaciones EMS son monogénicas recesivas (Calderón, 2006 y Praena, 2017), por lo que la segregación esperada en una línea mutante será de $\frac{1}{4}$, siendo importante el tiempo de germinación seleccionado para determinar que semillas dentro de la línea son mutantes. La germinación se evaluó en las primeras 72 horas desde la imbibición de las semillas en una solución con alta concentración de ABA. Tras la evaluación de los resultados de las variedades MUCU16, Prometheus y Victoria, y en particular en base a los resultados del fondo genético de la mutagénesis, MUCU16, y de la variedad con mayor insensibilidad al ABA, Prometheus, se determinó emplear una concentración de 500 μM . Esta concentración es mayor que todas las ensayadas, porque pretendemos encontrar mutantes altamente insensibles al ABA y el ensayo anterior demostró la existencia de genotipos tolerantes, como Prometheus.

Se estudió la germinación en 12 semillas de 200 familias mutantes EMS en M2 de la colección del grupo (3.751 líneas) (García *et al.*, 2018). Estas líneas M2 se han obtenido por autofecundación de la M1 (semilla de MUCU16 tratada con EMS al 0,3%). De las 200 líneas evaluadas (DE LA LÍNEA 500 A LA 700 a altas concentraciones de ABA, solamente una familia ha mostrado indicios de insensibilidad, y parte de las semillas evaluadas, de un total de 12, germinaron a la concentración de 500 μM .

Solo una de las líneas estudiadas ha dado signos de ser insensible, al menos a la germinación (**Tabla 3**). Esta línea (518) presenta una baja germinación en las primeras horas (24h) y la mayor germinación se produce a las 72 horas. Indicando que tiene diferentes grados de sensibilidad dentro de la familia. A partir, de este tiempo no se produce ninguna nueva germinación. Por ese motivo, la hipótesis que se establece es que la insensibilidad a ABA observada en esta línea podría estar controlada por un único gen semidominante y la segregación esperada sería 1:2:1, a diferencia de lo que han establecido a diferencia de lo que han establecido otros autores como Calderón (2006) y Praena (2017).

Tabla 3: Resultados de germinación a 500 μM de ABA en 200 líneas de mutagénesis EMS de *C. pepo*.

	Germinadas a 24h	Germinadas a 72h	No germinadas
Insensible (línea 518)	3	5	4
Sensibles (500-517 y 519-700)	0	0	0

Del mismo modo, en la **Figura 25** podemos observar las diferentes respuestas respecto a la germinación en función de tratamientos y de variedades. En la **Figura 25A**, tratada con agua, podemos apreciar una germinación total, además de una mayor longitud radicular, señal de que la germinación fue más temprana. En cambio, en la **Figura 25B**, se muestran los resultados de germinación a las 72h de una de las familias mutantes, encontramos una germinación, aunque en menor medida y con radículas de menor tamaño. Lo que indica que parte de las semillas de esta línea son capaces de germinar a altas concentraciones de ABA y presentan cierta insensibilidad. Por último, podemos apreciar en la **Figura 25C**, una variedad mutante sensible a esas concentraciones de ABA y que no ha germinado.

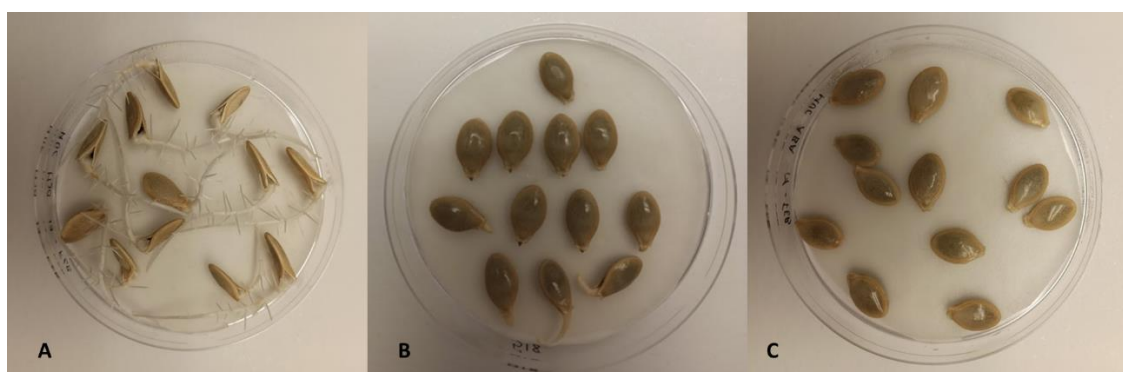


Figura 25: Resultados de la evolución de la germinación a las 72h obtenidos tras realizar el screening a 200 familias. A) Control con agua; B) Línea mutante insensible a ABA (518); C) Familia no insensible a ABA (577).

Para comprobar la hipótesis de control de insensibilidad al ABA en la familia 518 se realizó un contraste de hipótesis por medio de una chi cuadrado (**Tabla 4**). En la tabla se indican las clases fenotípicas, el número de semillas observadas y el número de semillas esperadas para una segregación de un gen semidominante, 1:2:1. Puesto que la X^2_{Real} es menor que $X^2_{\text{Teórica}}$, se acepta la hipótesis.

Tabla 4: Estimación de chi cuadrado en la línea mutante 518, para un gen semidominante (segregación 1:2:1).

Clases fenotípicas	Observados	Esperados	Chi cuadrado
Clase 1 (24h)	3	3	
Clase 2 (72h)	5	6	
Clase 3 (no germinadas)	4	3	
X^2_{Real}			0,5
$X^2(0,05;2)_{\text{Teórica}}$			5,9915

La colección de mutantes cuenta con un total de 3.751 familias, de las cuales en este estudio se han evaluado 200. Esta colección de mutantes, ha sido caracterizada

previamente a través de un *screening* directo para evaluar la triple respuesta al etileno. De ese trabajo se obtuvieron 4 mutantes insensibles a etileno, 3 de ellos presentaban una segregación de semidominancia (*ein1*, *ein2* y *ein3*) y uno de dominancia (*EIN4*) (García *et al.*, 2018; 2019). La segregación en el mutante detectado en este trabajo, insensible a ABA, parece comportarse de manera similar, obteniéndose una mutación monogénica semidominante. Estos resultados serán contrastados con mayor número de semillas para asegurar la segregación semidominante, así como para detectar otros fenotipos asociados a la insensibilidad a ABA. En cuanto a la caracterización de los mutantes *ein*, siguen evaluándose y presentan un fenotipo con rasgos vegetativos y reproductivos diferentes al WT, principalmente en la floración (García *et al.*, 2018; 2019). Este estudio presenta una estrategia de genética directa, para poder seleccionar mutantes insensibles a ABA, que muestren un fenotipo diferente y posteriormente proceder a la secuenciación genómica que permita determinar la localización de la mutación responsable del fenotipo.

Para *C. pepo*, y en base a los estudios previos realizados en diferentes variedades, la concentración de 500 μM se ha considerado que puede ser la idónea y la línea 518 germinó a altas concentraciones de ABA. En *Arabidopsis thaliana* se han detectado mutantes a una concentración diez veces inferior (40 μM) (Berriel, 2005), lo que apunta a variabilidad de sensibilidad entre especies. La detección de la familia 518, una familia mutante de 200, correspondería a 10 en 2000, siendo esta proporción muy elevada, en comparación con el comportamiento de los estudios realizados en etileno por García *et al.*, (2018). Es probable que conforme avance la evaluación sobre las 3.751 líneas de la colección se detecten nuevas líneas mutantes, pero en menor proporción. En *Arabidopsis* se conocen hasta 30 mutaciones en la ruta del ABA, que dan lugar a fenotipos muy diversos. Estos mutantes tienen distintas respuestas cuando son expuestos al ABA. Algunos presentan efectos en el crecimiento de las plántulas y otros acumulan prolina o proteínas reguladas por ABA (Finkelstein y Somerville, 1990), por lo que la línea 518 requiere una caracterización más profunda.

CONCLUSIONES

5 Conclusiones.

1. El ácido abscísico, presenta una influencia directa en la germinación de las 3 variedades analizadas, viéndose esta disminuida en su presencia. Esta influencia es diferente en las variedades analizadas, y se ve más afectada cuando las concentraciones de ABA son más elevadas.
2. El ácido abscísico, afecta al crecimiento en los primeros días del desarrollo de las plantas, esto es, en el estadio de plántula. Altera tanto al desarrollo del hipocótilo o parte aérea de la planta, como al crecimiento radicular. Sin embargo, el crecimiento de las raíces es el que más afectado se ve y a dosis más bajas.
3. En base a los resultados obtenidos, se puede establecer un método de genética directa basado en la insensibilidad al ácido abscísico que evalúe la germinación o el crecimiento en el estadio de plántula. El ácido abscísico afecta ambos procesos del crecimiento.
4. De entre las concentraciones ensayadas, con el objetivo de detectar mutantes insensibles, y puesto que Prometheus fue tolerante a todas las concentraciones, es de interés usar la concentración (400 μM) o mayor. Así, la dosis de 500 μM ABA es adecuada para la selección de familias insensibles a ABA. Esta concentración permite la germinación únicamente de aquellas familias que verdaderamente son insensibles. Mientras que a concentraciones más bajas puede producirse germinación de familias que no sean totalmente insensibles a ABA.
5. La segregación de la mutación de insensibilidad a ABA en la familia 518, se corresponde con una segregación 1:2:1 y se ajusta al control del carácter insensibilidad al ABA por un solo gen semidominante.

BIBLIOGRAFÍA

6 Bibliografía.

Alonso, M^a. M. (2019). Interacciones entre etileno y ABA en el control genético de la germinación de la semilla de *Cucurbita pepo*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Almería.

Andrés, I. M^a. (2012). Estudio preliminar para el desarrollo de una colección de mutantes en calabacín (*Cucurbita pepo*). Trabajo Fin de Estudios. Universidad de Almería.

Angosto, T. (1991). Estudio sobre la germinación y cubierta seminal de semillas silvestres de diferentes habitats: niveles de aba, poliaminas y proteínas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Arbaizar, A. F. (2011). Caracterización funcional de nuevos componentes moleculares implicados en la señalización del ácido abscísico (ABA) durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

Barral, N. C. (2016). Influencia del nitrato, ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) en la transición dormición-germinación de semillas de *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. sometidas a "post-maduración". Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Berriel, V. A. (2005). Aislamiento y caracterización de un mutante de *Arabidopsis thaliana* alterado en la sensibilidad a ácido abscísico (No. 581.13 BER).

Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.

Boualem, A., Fleurier, S., Troadec, C., Audigier, P., Kumar, A. P., Chatterjee, M., Alsadon, A., Sadler, M.T., Wahb-Allah, M.A., Al-Doss, A. A. y Bendahmane, A. (2014). Development of a *Cucumis sativus* TILLING platform for forward and reverse genetics. *PLoS One*, 9(5).

Cajamar Caja Rural (2020). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería. Campaña 2018/2019. (Consultado: 11 de Marzo, 2020 en <https://infogram.com/analisis-de-la-campana-hortofruticola-1hd12y9wyv3x6km>).

Calderón, L. (2006). Caracterización genética de las respuestas morfo-fisiológica del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a la deficiencia de fósforo. Tesis Doctoral. Centro de investigación y estudios avanzados. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética. Campus Guanajuato.

Camacho, F. (2002). El cultivo del calabacín bajo invernadero. Almería: Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería.

Chen, H., Sun, J., Li, S., Cui, Q., Zhang, H., Xin, F., Wang, H., Lin, T., Gao, D., Wang, S., Li, X., Wang, D., Zhang, Z., Xu, Z. y Huang, S. (2016). An ACC oxidase gene essential for cucumber carpel development. *Molecular plant*, 9(9), 1315-1327.

Decker, D. S. (1988). Origin (s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany*, 42(1), 4-15.

FAOSTAT (Consultado: 20 de Marzo, 2020 en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>).

Finkelstein, R. R. y Somerville, C. R. (1990). Three classes of abscisic acid (ABA) insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant physiology*, 94(3), 1172-1179.

Galpaz, N., Burger, Y., Lavee, T., Tzuri, G., Sherman, A., Melamed, T., Eshed, R., Meir, A., Portnoy, V., Bar, E., Shimoni-Shor, E., Feder, A., Saar, Y., Saar, U., Baumkoler, F., Lewinsohn, E., Schadder, A., Katzir, N. y Tadmor, Y. (2013). Genetic and chemical characterization of an EMS induced mutation in *Cucumis melo* CRTISO gene. *Archives of biochemistry and biophysics*, 539(2), 117-125.

García, A., Aguado, E., Martínez, C., Loska, D., Beltrán, S., Valenzuela, J. L., Garrido, D. y Jamilena, M. (2020). The ethylene receptors CpETR1A and CpETR2B cooperate in the control of sex determination in *Cucurbita pepo*. *Journal of Experimental Botany*, 71(1), 154-167.

García, A., Aguado, E., Parra, G., Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Cebrián G., Romero J., Beltrán S., Garrido, D. y Jamilena, M. (2018). Phenomic and genomic characterization of a mutant platform in *Cucurbita pepo*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1049.

Helander, J. D. M. y Cutler, S. R. (2018). Abscisic acid signaling and biosynthesis: protein structures and molecular probes. En Hejátko, J. y Hakoshima, T. (eds.). *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*: 113-146. Cham: Springer.

Herrera-Isidron, L., Valencia-Lozano, E. y Cabrera-Ponce, J. L. (2019). Plantas editadas en el genoma. *Agrociencia*, 53(8), 1139-1959.

Herrero, P. F. (2016). Characterization of two PP2Cs-D interactors during germination and seedling development of *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

HM Clause. (2020). (Consultado en https://hmclause.com/es/varieties/victoria_sp/)

Iglesias, A., Quiroga, S. y Sotes, V. (2011). La agricultura española y el cambio climático. *Economistas*, 29(127), 19-26.

Jacobsen, J. V., Pearce, D. W., Poole, A. T., Pharis, R. P. y Mander, L. N. (2002). Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum*, 115(3), 428-441.

Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile*.

Leung, J. y Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual review of plant biology*, 49(1), 199-222.

Li, X., Chen, L., Forde, B. G. y Davies, W. J. (2017). The biphasic root growth response to abscisic acid in Arabidopsis involves interaction with ethylene and auxin signalling pathways. *Frontiers in plant science*, 8, 1493.

Li, X., Wu, L., Qiu, Y., Wang, T., Zhou, Q., Zhang, Q., Zhang, W. y Liu, Z. (2019). Abscisic Acid Receptors Modulate Metabolite Levels and Phenotype in Arabidopsis Under Normal Growing Conditions. *Metabolites*, 9(11), 249.

López, J. (2017). Cultivos Hortícolas al aire libre. Publicaciones Cajamar, Calabacín, 595-623. (Consultado: 15 de Marzo, 2020 en <https://www.publicacionescajamar.es/uploads/cultivos-hortícolas-al-aire-libre/22-cultivos-hortícolas-al-aire-libre.pdf>).

Lovelli, S., Scopa, A., Perniola, M., Di Tommaso, T. y Sofo, A. (2012). Abscisic acid root and leaf concentration in relation to biomass partitioning in salinized tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 169, 226-233.

MAPAMA (Consultado: 20 de Febrero, 2020, en <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>).

Martínez, A., Albacete, A., Iglesias, S., del Puerto, M., Pérez, F. y Martínez, C. (2014). Efectos de la sobreproducción de ácido abscísico y citoquininas en la respuesta fisiológica y agronómica de tomate bajo estrés salino en invernadero. Universidad Politécnica de Cartagena, Servicio de Documentación, 2014. 139-142 p. ISBN: 978-84-697-1358-7.

Mauri, N. (2013). GEM, una proteína con dominio GRAM, es un regulador negativo de la señalización por ABA durante la germinación en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Medina, I. (2019). Identificación y caracterización de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano en líneas T-DNA de tomate. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.

Neé, G., Xiang, Y. y Soppe, W. J. J. (2017). The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. *Current Opinion in Plant Biology*, 35: 8-14.

Nie, J., Wang, Y., He, H., Guo, C., Zhu, W., Pan, J., Li, D., Lian, H., Pan, J. y Cai, R. (2015). Loss-of-function mutations in CsMLO1 confer durable powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in plant science*, 6, 1155.

Paris, H. S. (2001). History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *HORTICULTURAL REVIEWS-WESTPORT THEN NEW YORK*-, 25, 71-170.

Paris, H. S., Lebeda, A., Křístkova, E., Andres, T. C. y Nee, M. H. (2012). Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated subspecies of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany*, 66(1): 71-90.

Peña, E. M. B., Ortiz, S. B. y Bucio, J. L. (2012). Bases moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas. *Ciencia Nicolaita*, (56), 20-34.

Praena, J. (2017). Identificación y caracterización de mutantes afectados en el desarrollo temprano en líneas T-DNA de tomate y de *Solanum pimpinellifolium*. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.

Prina, A., Landau, A., Pacheco, M. G. y Hopp, E. H. (2010). II. CAPÍTULO 4 Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING.

RAE. (2020). Real Academia Española (Consultado en <https://www.rae.es/>).

Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A. y Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in plant science*, 15(7), 395-401.

Reyes, A. E., Hernández, L. S., Paneque, O. G. y Pupo, J. J. S. (2002). Empleo de ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación in vitro de *Ipomoea batatas*. *Biotecnología Vegetal*, 2(1).

Schopfer, P. y Plachy, C. (1984). Control of seed germination by abscisic acid: II. Effect on embryo water uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, 76(1), 155-160

Sneideris, L. C., Gavassi, M. A., Campos, M. L., D'Amico-Damiao, V. y Carvalho, R. F. (2015). Effects of hormonal priming on seed germination of pigeon pea under cadmium stress. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(3), 1847-1852.

Sosa, G., Cohn, D. y Svendsen, L. (2019). Proyecto para la obtención de mutantes, la propagación y el registro de nuevas variedades vegetales. *Anuario de Investigación USAL*, (6).

Syngenta. (2020). (Consultado en <https://www.syngenta.es/cultivos/calabacin/verde/prometheus>)

Valera, D. L., Marín, P., Camacho, F., Belmonte, L. J., Molina-Aiz, F. D. y López, A. (2016). El Agua Desalada en Los Invernaderos de Almería: Tecnología de Regadío Y Efecto Sobre El Rendimiento Y Calidad de Cultivo de Tomate. In *II Simposio Nacional de Ingeniería Hortícola: Almería, Spain*.

Vicente-Dólera, N., Troadec, C., Moya, M., del Rio-Celestino, M., Pomares-Viciano, T., Bendahmane, A., Picó, B., Román, B. y Gómez, P. (2014). First TILLING platform in *Cucurbita pepo*: a new mutant resource for gene function and crop improvement. *PLoS One*, 9(11).

Vidaña, J. M. (2016). Efectos del etileno y el 1-mcp sobre la calidad post-cosecha de los frutos de calabacín MUC-16 conservados en frío. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Almería.

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M. y Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8: 161.

Whitaker, T.W. (1947) American origin of the cultivated cucurbits. *Ann Mo Bot Gard* 34(2): 101–111.

Xiong, L. y Zhu, J. K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), 29-36.

Zhang, Q., Zhang, L., Geng, B., Feng, J. y Zhu, S. (2018). Interactive effects of abscisic acid and nitric oxide on chilling resistance and active oxygen metabolism in peach fruit during cold storage.



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA