

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología



Facultad de ciencias experimentales

Estudio de los efectos de la mutación
lox3/4 en diferentes líneas precomerciales
de calabacín (*Cucurbita pepo L.*)

Alumno/a:

Carlota García Clemente

Tutor: Manuel Jamilena Quesada

Cotutor: José Javier Regalado González

Grupo de investigación Genética de hortícolas

Departamento: Biología y Geología

Área: Genética

Curso académico 2020-2021



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 La familia <i>Cucurbitaceae</i>	2
1.2 El cultivo del calabacín (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	4
1.2.1 Clasificación taxonómica	4
1.2.2 Descripción botánica y características genéticas	5
1.2.3 Centro de origen y disposición geográfica	6
1.2.4 Requerimientos climatológicos y de sustrato	7
1.2.5 Principales patógenos del cultivo	7
1.2.6 Trascendencia del cultivo de calabacín a nivel nacional y provincial	8
1.3 Colecciones de mutantes EMS en <i>C. pepo</i> L.	9
1.4 Partenocarpia en <i>C. pepo</i> L.	11
1.5 Mutación <i>lox3/4</i> en <i>C. pepo</i> L.	11
2. OBJETIVOS PRINCIPALES DEL PROYECTO	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Instalaciones usadas en el desarrollo del TFG	15
3.2 Material vegetal empleado	15
3.3 Genotipado de las poblaciones F2 (13B x <i>lox3/4</i>) y F2 (60B x <i>lox3/4</i>)	18
3.4 Caracterización de la maduración de la corola en las flores	19
3.5 Caracterización cualitativa de los frutos	20
3.6 Caracterización fenotípica de las plantas	20
3.7 Estudio de la productividad	21

3.8 Caracterización fenotípica de los frutos	21
3.9 Análisis estadístico	22
4. RESULTADOS	24
4.1 Genotipado de las poblaciones F2 (13B x <i>lox3/4</i>) y F2 (60B x <i>lox3/4</i>)	24
4.2 Evaluación de la maduración de la corola en las poblaciones F2 (13B x <i>lox3/4</i>) y F2 (60B x <i>lox3/4</i>)	28
4.3 Caracterización cualitativa de los frutos	29
4.4 Caracterización fenotípica de las plantas	30
4.5 Estudio de la productividad	31
4.6 Caracterización fenotípica de los frutos	35
5. DISCUSIÓN	40
6. CONCLUSIONES	44
7. BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

El calabacín (*C. pepo* L.) es una especie caracterizada por producir frutos voluminosos con variabilidad de colores, tamaños y texturas, además de poseer gran funcionalidad tanto en el terreno dietético como medicinal e industrial, haciendo que sea una de las especies de mayor relevancia económica dentro de la familia *Cucurbitaceae*. Sin embargo; las tendencias de consumo actuales se dirigen hacia una producción más ecológica, fomentando la generación de variedades comerciales partenocárpicas. Siendo este el objetivo de este trabajo fin de grado, apoyándonos en la detección de la mutación *lox3/4* dentro de la colección de mutantes EMS de calabacín generada por el departamento BIO293 de la Universidad de Almería (UAL), la cual afecta al gen *13-LIPOXYGENASE (LOX3/4)* del cromosoma 12 del genoma de *C. pepo*, confiriendo partenocarpia con un fenotipo característico de falta de maduración de la corola y flor pegada en el fruto. Para estudiar su modo de herencia y características fenotípicas asociadas, se ha introgresado dicha mutación en poblaciones F2 de las líneas precomerciales 13B y 60B pertenecientes al programa de mejora de *C. pepo* de la empresa "Green Breeding Biotech S. L." (GBB). Demostrando que estamos ante la segregación mostrada por un gen simple de herencia recesiva, el cual ofrece en estado homocigótico un suave incremento en la producción y en la cantidad de frutos comerciales, reduciendo a su vez el tamaño del cierre pistilar ligado a los frutos. Sin efectos aparentes sobre el color, moteado, rayado, peso medio, curvatura, relación longitud/diámetro, brillo y costillas de los frutos ni sobre el porte, vigor, arquitectura y grado de ramificación de las plantas que conforman estas poblaciones. Confirmando, la posible aplicación comercial de la mutación *lox3/4* en estudios futuros o su incorporación dentro de programas de mejora de índole comercial.

ABSTRACT

Zucchini (*C. pepo* L.) is a species characterized by producing voluminous fruits with variability of colors, sizes and textures, moreover possesses great functionality both in the dietary, medicinal and industrial fields, making it one of the most popular species of economic relevance within the *Cucurbitaceae* family. However; current consumption trends are directed towards a more ecological production, promoting the generation of parthenocarpic commercial varieties. This being the objective of this final degree project, based on the detection of the *lox3/4* mutation within the collection of EMS mutants generated by the BIO293 department of the University of Almería (UAL), which affects gene *13-LIPOXYGENASE (LOX3/4)* of chromosome 12 of the *C. pepo* genome, conferring parthenocarpy with a characteristic phenotype of lack of maturation of the corolla and flower attached to the fruit. To study its mode of inheritance and associated phenotypic characteristics, this mutation has been introgressed into F2 populations of pre-commercial lines 13B and 60B belonging to the *C. pepo* breeding program of the company "Green Breeding Biotech S. L." (GBB). Demonstrating that we are facing the segregation shown by a simple recessive inheritance gene, which in homozygous state offers a slight increase in production and in the amount of commercial fruits, reducing in turn the size of the pistillary closure linked to the fruits. No apparent effects were detected on the color, speckled, striped, average weight, curvature, length/diameter ratio, brightness and ribs of the fruits or on the bearing, vigor, architecture and degree of branching of the plants that make these populations. Confirming the possible commercial application of the *lox3/4* mutation in future studies or its incorporation into commercial breeding programs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La familia *Cucurbitaceae*

La familia *Cucurbitaceae* integra entre 950-980 especies, distribuidas en 95 géneros diferentes (Schaefer & Renner, 2011). Presentan atributos propios del orden *Cucurbitales*, como la producción de flores unisexuales y su naturaleza dicotiledónea (Schaefer & Renner, 2011). Se caracterizan por ser herbáceas, aunque pueden tener un carácter leñoso, escaladoras con zarcillos simples o ramificados dispuestos en cada nodo, anuales o perennes, con tallos frondosos y raíces fibrosas o tuberosas. Sus hojas son simples, lobuladas y con ausencia de estipulas (Grosch & Belitz, 1987; de Wilde & Duyfjes, 2010). En lo que a su sistema sexual se refiere, la dioecia es la opción originaria, no obstante; su desarrollo evolutivo ha provocado que puedan ser monoicas, dioicas o andromonoicas (Zhang et al., 2006; Volz & Renner, 2009; Schaefer & Renner, 2010a). Las flores son usualmente actinomorfas, con un desarrollo de en torno a 6 días (Kater et al., 2001). El cáliz y la corola, suelen ser pentámeros, con pigmentación amarilla o blanca (Renner & Schaefer, 2016). Las flores femeninas, presentan un ovario ínfero de 3 lóculos, con semillas de embrión grande y sin endospermo. Mientras que las flores masculinas, pueden contar con uno o cinco estambres (de Wilde & Duyfjes, 2010; Renner & Schaefer, 2016). Las cucurbitáceas son plantas de ascendencia tropical o subtropical (Cobbley et al., 1976), con multitud de centros de origen, repartidos por Europa, Asia, América y África (Esquinas-Alcázar & Gulick, 1983; Choudhury, 1996) (Tabla 1).

Tabla 1. Nombres científicos, comunes y zonas geográficas de origen, de las cucurbitáceas con mayor relevancia económica (Choudhury, 1996; París, 2001).

Nombre común	Nombre científico	Origen
Calabacín y calabaza	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Perú y México
Calabaza	<i>Cucurbita maxima</i>	Sudamérica
Calabaza moscada	<i>Cucurbita moschata</i>	Perú y México
Melón	<i>Cucumis melo</i>	África tropical
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	India
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	África tropical

Esta familia posee un enorme peso económico, debido a su funcionalidad a nivel nutricional, medicinal e industrial (Jeffrey, 1990). A nivel dietético, presentan una elevada cantidad de vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y minerales. Así, el calabacín y la calabaza (*Cucurbita spp.*), el melón (*Cucumis melo*) y la calabaza puntiaguda (*Trichosanthes dioica*), son ricos en caroteno (provitamina A) y hierro (Liska et al., 2004), siendo esta última, también abundante en calcio; mientras que la calabaza espinosa (*Momordica dioica* y *Momordica cochinchinensis*) posee un elevado contenido proteico (Roy & Chakrabarti, 2003). Por otro lado, estudios clínicos realizados por El Batran et al. (2006) y Wu & Ng (2008) mostraron como el melón amargo (*Momordica charantia* L.) contaba con una enorme capacidad antioxidante, antidiabética y de protección hepatorenal. Además, pueden adjudicarse otros usos que han contribuido en el desarrollo de la cultura americana como su empleo para fiestas nacionales y patronales, como instrumento, recipiente... (Cutler & Whitaker, 1961).

Los datos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) indican que la producción de cucurbitáceas se ha incrementado en los últimos años. El área cosechada y la producción mundial de melón (inc. Cantaloupe), pepino y pepinillos; ha aumentado de forma progresiva desde la década de los 90 hasta el año 2019. Mientras que el cultivo de calabaza, calabacín y otras cucurbitáceas alcanzó sus valores máximos en el año 2017, con 2.071 miles de hectáreas cultivadas (ha) y 27.679 kilotoneladas producidas (kt) (Figura 1 y 2).

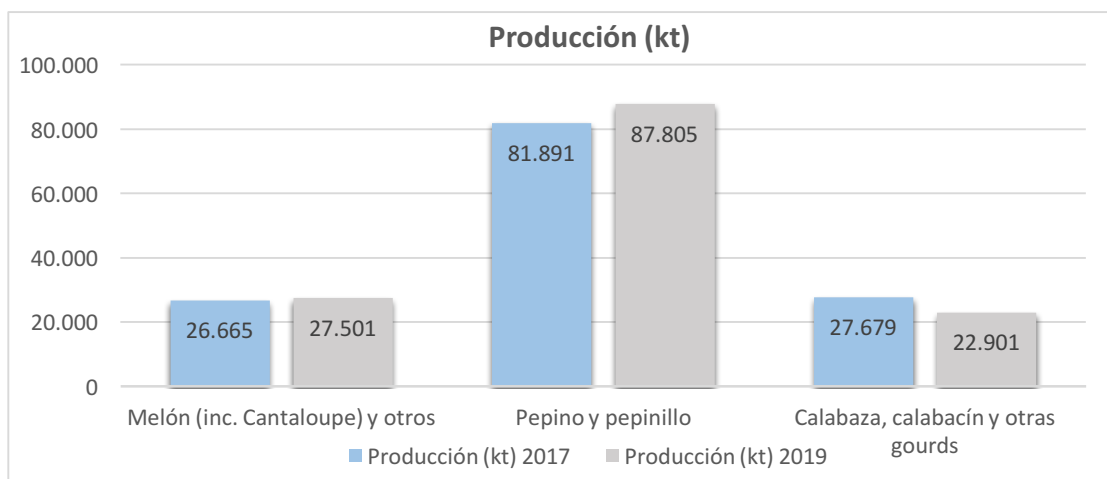


Figura 1. Valores de producción en kilotoneladas de melón (inc. Cantaloupe), pepino, pepinillos, calabaza, calabacín y otros, durante los años 2017 y 2019. Fuente: FAO, FAOSTAT.

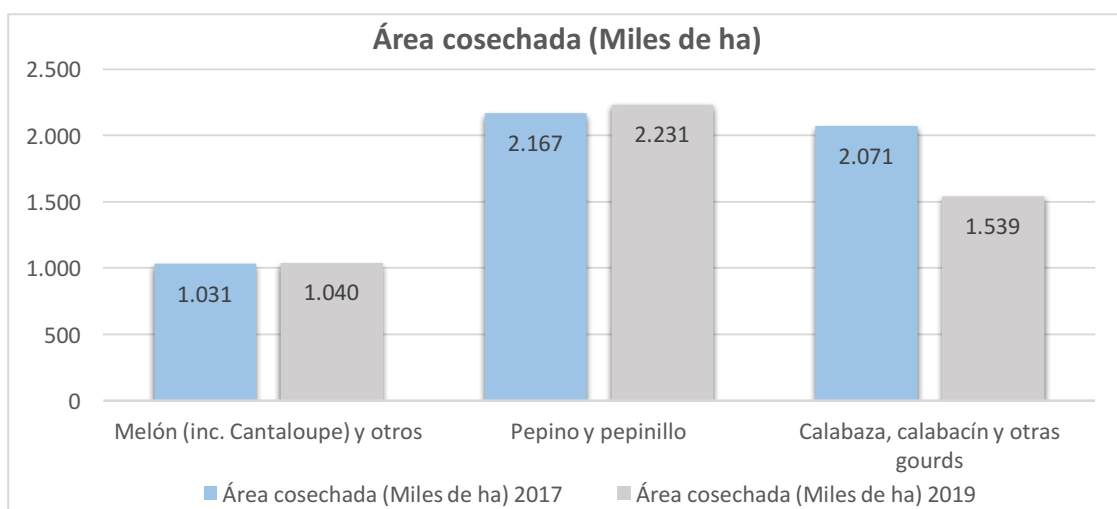


Figura 2. Área cosechada en miles de hectáreas (ha) de melón (inc. Cantaloupe), pepino, pepinillos, calabaza, calabacín y otros, durante los años 2017 y 2019. Fuente: FAO, FAOSTAT.

En cuanto al rendimiento económico de las cucurbitáceas, se estima que en el 2017 se facturaron 8.997 millones de euros en la venta de melón (inc. Cantaloupe), 30.004 millones para pepino y pepinillo, y 7.379 millones para calabaza, calabacín y otros (FAO, 2017). Los países con mayor producción de las principales especies de cucurbitáceas se muestran en la tabla 2, destacando China Continental como líder mundial.

Tabla 2. Clasificatoria de los países con mayor producción mundial durante los años 1990-2019 para los principales cultivos de cucurbitáceas. Fuente: FAO, FAOSTAT.

Cucurbitácea muestreada	Países productores		
	1º puesto	2º puesto	3º puesto
Melón (inc. Cantaloupe) y otros	China Continental	Turquía	Irán
Pepino y pepinillo	China Continental	Turquía	Irán
Calabaza, calabacín y otros	China Continental	India	Federación Rusa

1.2 El cultivo del calabacín (*Cucurbita pepo* L.)

1.2.1 Clasificación taxonómica

La especie *C. pepo* L., integrada en la familia *Cucurbitaceae*, destaca por su relevancia económica y será el objeto de estudio de este trabajo. Engloba a 3 subespecies distintas: *C. pepo ssp. fraterna*, *C. pepo ssp. ovifera* y *C. pepo ssp. pepo* (Decker, 1988). Las dos últimas son cultivadas y bastantes polimórficas, pudiéndose agrupar en ocho morfotipos distintos (París, 2001; Blanca et al., 2012; París et al., 2012), mientras que *C. pepo ssp. fraterna*, es completamente silvestre (Castellanos-Morales et al., 2019).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Cucurbita pepo* L. (Linné, 1753).

<i>Cucurbita pepo</i> L.			
Reino	<i>Plantae</i>	Familia	<i>Cucurbitaceae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>	Subfamilia	<i>Cucurbitoideae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	Género	<i>Cucurbita</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>	Especie	<i>Cucurbita pepo</i>
Orden	<i>Cucurbitales</i>		

Morfotipos de *C. pepo ssp. pepo*

- » Zucchini (*C. pepo* L. var. *cilíndrica* Paris): morfotipo con mayor relevancia comercial. Frutos cilíndricos o afilados con estrecheces en sus extremos distales y percepción externa regular y compacta. Su cata, se efectúa antes de alcanzar su desarrollo completo y sus colores varían, pero siempre dentro de la gama amarillo-verde.
- » Cocozelle (*C. pepo* L. var. *longa* Paris): frutos alargados con epicarpio pulido y coloración con trazados verde intenso, verde pálido o amarillento. Consumo en estado inmaduro.
- » Pumpkin (*C. pepo* L. var. *pepo* Bailey): representa a lo que comúnmente conocemos como “calabaza”, generando frutos esféricos, con pigmentación anaranjada u amarillenta, textura consistente y sabor dulce. Se consumen en estado maduro.

- » Vegetable Marrow (*C. pepo* L. var. *fastigata* Paris): frutos de naturaleza cilíndrica, sin cuello, tacto uniforme y epicarpio grueso y compacto, al contar con mayor cantidad de lignina. Su pigmentación tiene diferentes graduaciones (verde a amarillo) y se consume inmaduro.

Morfotipos de *C. pepo* ssp. *ovifera*

- » Acorn (*C. pepo* L. var. *turbinata* Paris): También nombrado como “Table Queen”. Coloración típicamente verde y frutos de tipo ovoide o puntiagudos, con una epidermis con 10 surcos de profundidad media y tacto pulido, lo cual favorece su consumo en estado maduro.
- » Scallop (*C. pepo* L. var. *Clypeata* Alefeld): Coloración amarilla, blanquecina o verde tenue; fruto aplanado, discoidal y con bordes festoneados. Consumo inmaduro, aproximadamente siete días después del periodo de floración.
- » Straightneck (*C. pepo* L. var. *recticollis* Paris): frutos con apariencia externa verrugosa, cilíndricos y pigmentación amarilla; con una estrechez en la región cercana al pedúnculo. Se emplean en estado inmaduro.
- » Crookneck (*C. pepo* L. var. *torticollia* Alefeld): frutos de pigmentación amarilla o blanquecina, acompañada de una textura externa rugosa y de una extensión de su ápice con extremos arqueados. Al igual que “Scallop”, se degustan en estado inmaduro.

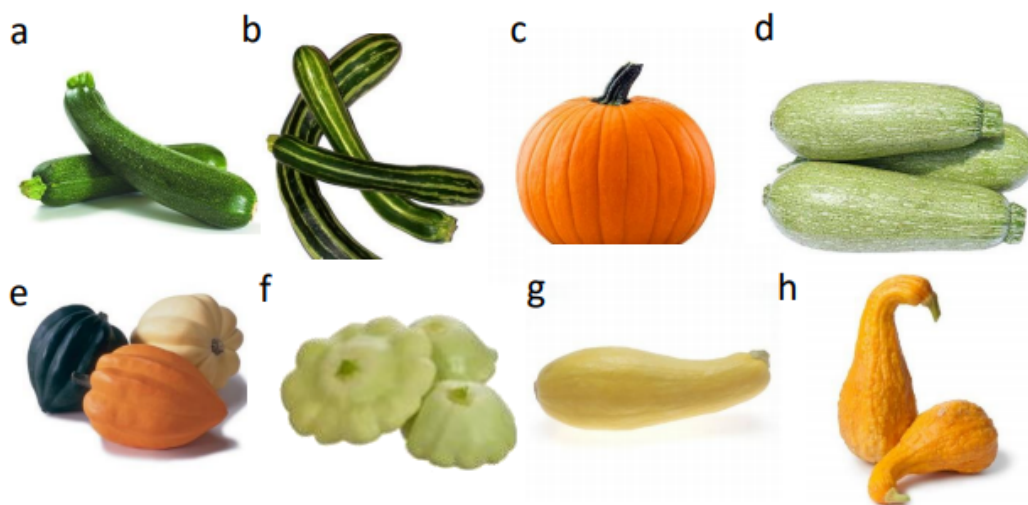


Figura 3. Morfotipos establecidos por París (2001) dentro de las subespecies *C. pepo* ssp. *ovifera*, y *C. pepo* ssp. *pepo* (a-h). a) zucchini b) cocozelle c) pumpkin d) vegetable marrow e) acorn f) scallop g) straightneck h) crookneck.

1.2.2 Descripción botánica y características genéticas

Todos los morfotipos cultivados de *C. pepo* se diferencian de otras especies del género *Cucurbita*. Sus flores y hojas son de mayores dimensiones y colores más intensos, estando las flores conformadas por 5 lóbulos fusionados entre sí. Sus tallos son más gruesos, con menos ramas y menos apéndices epidérmicos, para facilitar su manejo (Whitaker & Bemis, 1964).

En cuanto a su raíz, su arquitectura general es axonomorfa, poseyendo una raíz principal, de la cual pueden surgir otras raíces secundarias de menor longitud o raíces adventicias (López, 2016). Además, su capacidad de enraizamiento es ligeramente menor que otras especies del género, lo que obliga a sustentar su desarrollo con mayor volumen de agua (Ertek, et al., 2004). Los frutos presentan una enorme gama de colores, tamaños, texturas... tal y como hemos descrito anteriormente. Sin embargo; de forma global, se puede afirmar que estos son de gran magnitud, dulzura y con semillas voluminosas (Duchesne, 1786; Naudin, 1856; Paris, 2007). De hecho, su presencia puede inhibir el desarrollo floral, tal y como describen Mann & Robinson (1950) y Schapendonk & Brouwer (1984).



Figura 4. A) Arquitectura general y apariencia del tallo, de la especie *C. pepo*. B) Flor femenina de *C. pepo*. C) Flor masculina de *C. pepo*.

En lo referente a su genoma, es una especie diploide con 20 pares de cromosomas ($2n = 2x = 40$), los cuales han sido secuenciados con un total de 263 Mb y 34.240 genes (Whitaker & Davis, 1962; Montero-Pau et al., 2018). El genoma de *C. pepo* está disponible en bases de datos públicas como *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) o *Cucurbit genomics Database* (CuGenDB, <http://cucurbitgenomics.org/>). La secuenciación completa de su genoma, ha favorecido la aparición de nuevos instrumentos de análisis genético para esta especie, entre los que se incluyen el desarrollo de marcadores moleculares como SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido) o SSR (Secuencias simples repetidas), plataformas de genotipado GBS (Genotipado basado en secuencias) y estudios de asociación de genoma completo (GWAS) (Blanca et al., 2011; Esteras et al., 2012; Gur et al., 2017; Galpaz et al., 2018).

1.2.3 Centro de origen y disposición geográfica

Las características distintivas de *C. pepo* están ligadas a las condiciones ambientales dadas en el centro de origen de esta especie, el cual se sitúa en América central, concretamente en México (Choudhury, 1996). Esta afirmación está sustentada por diferentes yacimientos arqueológicos, como: las cuevas de Romero y Valenzuela en Tamaulipas; Coxcatlán en Tehuacán y Guilá Naquitz en Oaxaca (Smith, 1997a). Donde se han encontrado muestras de *C. pepo* que datan su domesticación hace 10.000 años (Decker, 1988; Smith, 1997a).

Decker en 1988 acotó las zonas de procedencia, fijando México como centro de origen primario de *C. pepo ssp. fraterna* y *C. pepo ssp. pepo*. y el este de Norteamérica como centro de origen de *C. pepo ssp. ovifera*, zona en la que se puede encontrar gran cantidad de morfotipos endémicos. Por otra parte, la creación de los diferentes cultivares existentes dentro de *C. pepo ssp. ovifera*, y *C. pepo ssp. pepo*, surgió de su expansión hacia Europa, Asia y África, debido al flujo de transporte afincado por los colonos castellanos, siendo el morfotipo “Cocozelle” el que sirvió de base para la pluralización, favoreciendo la creación de distintas variedades comerciales (Maroto Borrego, 2002; Ferriol et al., 2003).

1.2.4 Requerimientos climatológicos y de sustrato

La creación de variedades comerciales de calabacín destinadas al consumo, ha favorecido el conocimiento de sus necesidades climáticas y edáficas, para asegurar una óptima producción (Pathak et al., 2003). La temperatura es una de las variables con mayor alcance; varios autores coinciden en que la temperatura ambiental idónea para el cultivo de calabacín debe encontrarse entre los 25-35°C, mientras que la temperatura del sustrato adecuada, es de 20-30°C (Serrano Cermeño, 1973; Reche Mármol, 1997; Smith, 1997b). Cambios bruscos, pueden afectar gravemente al porcentaje de germinación, tal y como describe Roberts (1988), así como a la antesis y la formación de las primeras flores (Reche Mármol, 1997). La humedad es otro factor elemental, situándose su óptimo entre un 65-80% de humedad relativa (HR) (López, 2016). En cuanto a la intensidad lumínica, requiere de altos niveles para mantener una producción alta, así lo demuestra la investigación efectuada por Wien (1997), donde se observó que reducciones en torno a 20-70% de luz, redujeron de forma significativa la proporción de flores femeninas por planta y fomentó la generación de flores masculinas (Wien et al., 2004). Centrándonos en las propiedades edáficas, *C. pepo* muestra una disposición general hacia suelos con salinidad media (Villora et al., 1995; Graifenberg et al., 1996; Villora et al., 1997), aguantando pH comprendidos entre 5,5-6,8 (Valadez, 1990). La disponibilidad de agua también es básica, al ser una especie sensible que muestra daños tanto por exceso como por ausencia de la misma (El-Keblawy & Lovett-Doust, 1996).

1.2.5 Principales patógenos del cultivo

En cuanto a los principales patógenos que afectan al cultivo de calabacín encontramos virus, insectos, hongos, bacterias o nematodos (Zitter et al., 1996). Los virus son los que más inciden sobre el cultivo de calabacín, destacando el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV), el virus del mosaico del pepino (CMV) y en los últimos años, el virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV) (Blancard et al., 1994; MacNab et al., 1994). Siendo este último, el que está generando mayores pérdidas durante la última década (Juárez et al., 2014). Los insectos suelen actuar como vectores de estos virus, provocando además daños mecánicos sobre las plantas, destacando la mosca blanca (familia *Aleyrodidae*), los pulgones (*Aphis gossypii/Myzus persicae*) o los trips (*Frankliniella occidentalis*). Adicionalmente los hongos también generan enfermedades muy extendidas en el calabacín, como el oídio (*Erysiphe Cichoracearum*), el mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*) o la podredumbre carbonosa (*Macrophomina Phaseolina*). La presencia de estos hongos se ve favorecida

por aumentos de temperatura o de humedad (Zitter 1986; Kacprzak & Mańka, 2000). Por otro lado, algunas de las bacterias más comunes son: *tracheiphila* (productora de la marchitez bacteriana), *Pseudomonas lachrymans* (productora de la mancha foliar angular) o *Xanthomonas campestris* pv. *Cucurbitae* (responsable de la mancha foliar bacteriana), aunque generan menores pérdidas que los hongos (Zitter, 1986; Zitter et al., 1996). Por último, entre los nematodos que atacan a este cultivo, predominan los formadores de agallas como *Meloidogyne* spp. (Sharma et al., 2016).

1.2.6 Trascendencia del cultivo de calabacín a nivel nacional y provincial

Los requerimientos edafoclimáticos necesarios para el cultivo de *C. pepo* hacen a España, en concreto a la provincia de Almería, una de las regiones más apropiadas para su cultivo. Así lo demuestran los datos recogidos por la Base de datos estadísticos corporativos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) del año 2019. Estos datos sitúan a España como cuarto productor mundial, con una producción y rendimiento por hectárea que no han dejado de crecer entre los años 2010-2018 (Figura 5 y 6).

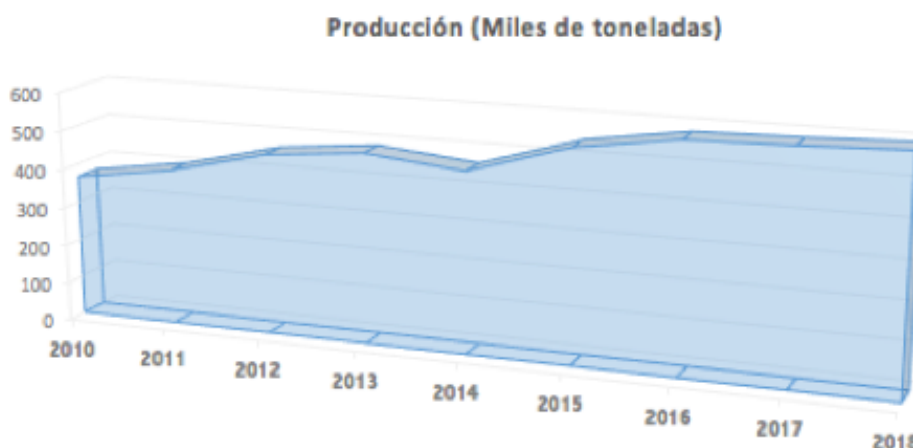


Figura 5. Producción de *C. pepo* L. en miles de toneladas en España, durante los años 2010-2018. Fuente: Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA).

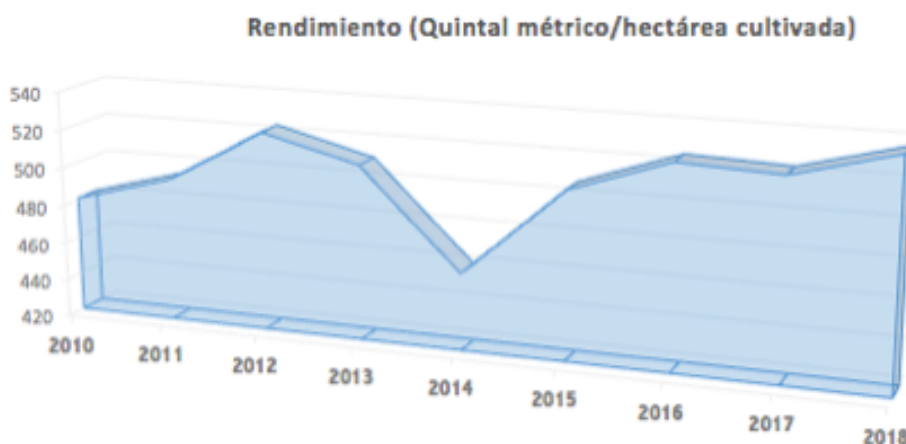


Figura 6. Rendimiento de *C. pepo* L. en quintales métricos/hectárea (qm/ha) en España, durante los años 2010-2018. Fuente: MAPAMA.

A nivel autonómico, Andalucía concentra el 82,90% de la producción española con un total de 494.374 toneladas (t) en el año 2018. Le siguen Canarias con un 4,92% de producción, la Región de Murcia con un 2,84% y la Comunidad Valenciana con un 2,48%; siendo además todas estas comunidades, las áreas con mayor superficie de cultivo protegido (MAPAMA, 2018). Dentro de Andalucía, la provincia de Almería es la que cuenta con mayor peso en cuanto a producción y superficie cultivada; con porcentajes del 92,17%, y 88,86%, respectivamente (MAPAMA, 2018).

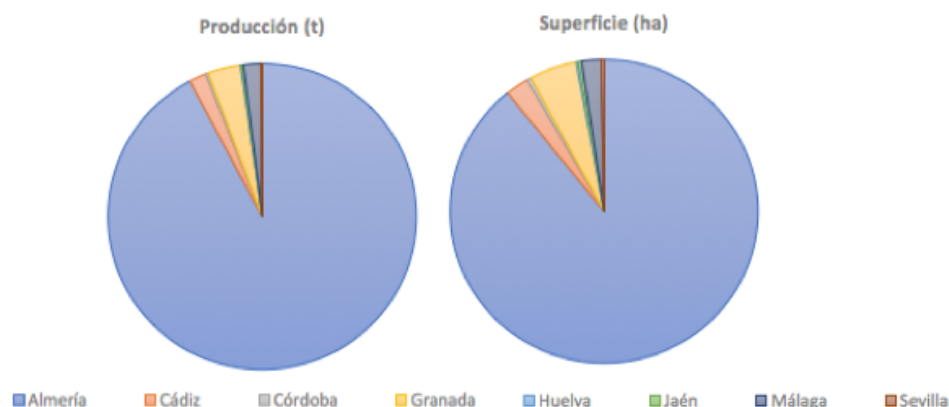


Figura 7. Producción (t) y superficie cultivada (ha) de *C. pepo* L. en el año 2018 en las diferentes provincias andaluzas. Fuente: MAPAMA.

La concentración de la producción de calabacín en la provincia de Almería es debida a una mayor tradición y a unas mejores características climatológicas y de sustrato para este cultivo (Reche Mármol, 1997). Una gran parte de esta producción está destinada a su comercialización en el extranjero, alrededor de un 82%, lo cual supuso unas ganancias de 325.254.701 euros en el año 2020, según datos aportados por la Federación española de asociaciones de productores exportadores de frutas, hortalizas, flores y plantas vivas (FEPEX).

1.3 Colecciones de mutantes EMS en *C. pepo* L.

La expansión del cultivo de calabacín generada durante los últimos años ha supuesto un incremento de las enfermedades que atacan al cultivo y las tasas de incidencia de las mismas, así como una mayor demanda de nuevas variedades de calabacín. Si a esto le sumamos los efectos del cambio climático y la necesidad de variedades más tolerantes al estrés hídrico y salino, nos encontramos con que es necesario ampliar la variabilidad genética natural presente en esta especie para obtener nuevas variedades que den respuesta a estos problemas. La generación de mutaciones, descritas como modificaciones en la secuencia o en la disposición del ADN, mediante agentes químicos, físicos o biológicos son una fuente de variabilidad frecuentemente utilizada en diferentes especies (Jorde et al., 2020). El etilmetanosulfonato (EMS), es uno de los agentes químicos más empleados como mutágeno, actuando por la adición de un grupo metilo sobre las bases del DNA Guanina (G) y Citosina (C), transformándolas en Adenina (A) y Timina (T) respectivamente. De este modo el EMS provoca mutaciones puntuales transicionales ($G \rightarrow A$; $C \rightarrow T$) en la secuencia del genoma durante la replicación del mismo (Rojas et al., 2016).

En el año 2014 Vicente-Dólera et al. desarrollaron la primera colección de mutantes EMS de *C. pepo*. Para la caracterización de los mutantes de esta colección, se utilizaron técnicas de genética inversa, es decir, primero se detecta un mutante que presente una mutación en un gen de interés y después se comprueba que esta mutación provoca un cambio en el fenotipo asociado al gen. En este contexto, el grupo de investigación Genética de Hortícolas de la Universidad de Almería (UAL) (BIO293), especializado en la genética de cucurbitáceas, creó una segunda colección de mutantes EMS de *C. pepo*, compuesta por 3.751 familias M2 (García et al., 2018). En el desarrollo de esta colección se utilizaron semillas de la variedad tradicional de morfotipo Zucchini MUC-16, procedente del banco de germoplasma de la Universidad Politécnica de Valencia-Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (UPV-COMAV). MUC-16 es una variedad ampliamente usada en trabajos de genética de calabacín (García et al. 2016, 2020a, 2020b), cuyo genoma está secuenciado íntegramente y disponible en *Cucurbit genomics Database*. Para la creación de la colección, se trataron 6000 y 2000 semillas MUC-16 con EMS al 0,3% y al 0,2%, respectivamente (M0). Las semillas que germinaron tras el tratamiento fueron sembradas en tierra, conformando las plantas adultas de la generación M1. Cada una de las plantas de esta generación M1, fue autopolinizada para obtener la generación M2. Las semillas obtenidas de cada una de estas autopolinizaciones conformaron las diferentes familias M2 de la colección de mutantes (Figura 8). Para la caracterización de las diferentes familias mutantes M2, se emplearon técnicas de genética directa, es decir, primero se detecta el fenotipo de interés tras lo cual se localiza la mutación responsable de dicho fenotipo (García et al., 2018). Permitiendo detectar esta caracterización, diferentes familias mutantes con fenotipos de alto potencial comercial, entre otras: tolerancia a la salinidad (Cebrián et al., 2021b), insensibilidad parcial al ABA, insensibilidad parcial al etileno (García et al., 2020c), partenocarpia (García et al., 2020b) o resistencia al frío durante la postcosecha (García et al., 2020a).

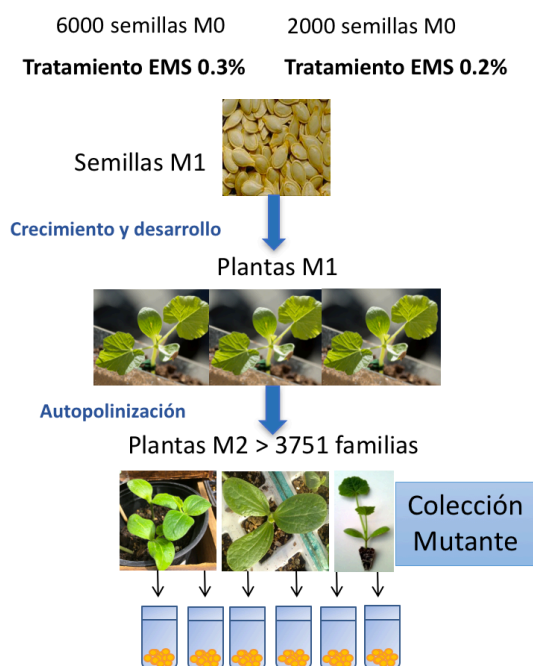


Figura 8. Esquema general de la metodología empleada para la obtención de una colección EMS de mutantes en calabacín (García et al., 2018).

1.4 Partenocarpia en *C. pepo* L.

La partenocarpia puede definirse como la generación de frutos en ausencia de polinización y fecundación, dando por consiguiente frutos libres de semillas (Noll, 1902). Este fenómeno presupone una doble ventaja. A nivel del consumidor, son preferibles aquellos frutos sin semillas para facilitar la ingesta del producto. Por otro lado, a nivel fisiológico, la formación de frutos partenocárpicos no depende tan estrictamente de las condiciones ambientales, vitales en el ciclo de vida de los insectos polinizadores (Schwabe et al., 1981; Vidal et al., 2010). La partenocarpia tiene una gran importancia en el cultivo de calabacín en invernadero, mayoritario en la provincia de Almería, dada la ausencia de polinizadores dentro de los mismos (Ayala-Tafoya et al., 2012). Para inducir la formación de frutos partenocárpicos, las plantas son tratadas con auxinas sintéticas, las cuales estimulan un correcto cuajado del fruto en ausencia de polinización (Kim et al., 1992; Li et al., 2003; Fu et al., 2008; Manzano et al., 2010). El tratamiento con auxinas sintéticas altera el balance de fitohormonas presente en el fruto, induciendo las auxinas naturales y giberelinas la partenocarpia, mientras que el etileno influye en sentido contrario (Martínez et al., 2013; Shinozaki et al., 2018; Shnaider et al., 2018). De este modo, se obtienen frutos partenocárpicos más firmes y carnosos (Varoquaux et al., 2000). No obstante; se debe considerar que el empleo continuado de este tipo de sustancias químicas actúa perjudicialmente sobre el medioambiente, favoreciendo la acumulación de las mismas en el sustrato y repercutiendo directamente sobre la producción y el desarrollo de los frutos (Agbaje et al., 2012). Por tanto, el desarrollo de variedades comerciales partenocárpicas, que no necesiten un tratamiento con auxinas exógenas, es de vital importancia en los programas de mejora de calabacín. En este sentido, diferentes estudios indican que mutantes parcialmente insensibles al etileno son también partenocárpicos (Martínez et al. 2013; García et al. 2016; García et al. 2020c). En estos mutantes el desarrollo de órganos florales como pétalos o estambres, está directamente relacionado con la percepción al etileno, produciendo una descoordinación en su maduración y partenocarpia, la cual suele estar ligada a la presencia de un fenotipo de flor cerrada con ausencia de abscisión floral (Peñaranda et al., 2007). Sin embargo; en la colección de mutantes EMS de *C. pepo* descrita anteriormente (García et al., 2018), se han identificado mutantes partenocárpicos que no están relacionados con la respuesta a etileno, entre los que destaca el mutante *lox3/4* (Cebrián et al., 2021a).

1.5 Mutación *lox3/4* en *C. pepo* L.

La mutación *lox3/4* consiste en una transición G>A en el gen *13-LIPOXYGENASE (LOX3/4)* presente en el cromosoma 12 del genoma de *C. pepo*. Esta mutación impide el procesamiento adecuado del ARNm de este gen, generando una proteína truncada (Cebrián et al., comunicación personal). Los genes *LOX* de vegetales catalizan la hidroperoxidación de determinados ácidos grasos (C-18), sirviendo los mismos como intermediarios de la ruta de biosíntesis del ácido jasmónico (Vick & Zimmerman, 1987). Esta mutación fue detectada en la familia 1443 de la colección de mutantes EMS del grupo BIO293 gracias a su rasgo fenotípico más característico: la falta de maduración de la corola floral, estando la maduración de los pétalos descoordinada del resto del desarrollo floral, tanto en flores femeninas como masculinas. La falta de maduración de los pétalos hace que no se produzca la apertura floral y

que la flor permanezca pegada al fruto, pero sin afectar al desarrollo floral y a la determinación del sexo.

La localización de esta mutación en el genoma de *C. pepo* se efectuó mediante un análisis de grupos o “bulks” segregantes compaginado con una secuenciación de nueva generación (BSA-seq) de 30 plantas mutantes, que presentaban el fenotipo característico, y 30 plantas “Wild type” (WT) seleccionadas en una población segregante BC₂S₁. Esta población fue obtenida tras un doble retrocruzamiento entre una planta mutante M2 con su fondo genético MUC-16 (Figura 9). Posteriormente ambos grupos o “bulks” se sometieron a una secuenciación del genoma completo (WGS), para reconocer de forma rápida la mutación causal del fenotipo.

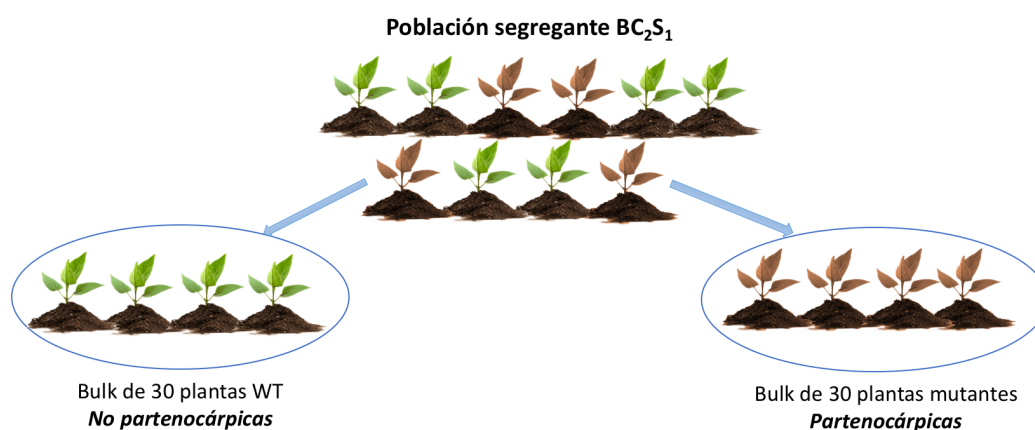


Figura 9. Procedimiento ejecutado para la realización del análisis BSA-seq.

Finalmente, los resultados obtenidos se compararon con el genoma de MUC-16, genoma de referencia para *C. pepo*, y la mutación causal se identificó como una mutación con una frecuencia de 1 en el bulk mutante y una frecuencia aproximada de 0.5 en el bulk WT. La mutación fue ratificada en otras 300 plantas segregantes por medio de un genotipado mediante tecnología KASP, siendo este mecanismo de genotipado el más adecuado para variaciones de tipo SNP, junto con las sondas TaqMan (Neelam et al., 2013). Con este análisis se determinó que el fenotipo en estudio era producido por la mutación *lox3/4* y que se trataba de una mutación recesiva, siendo necesario su presencia en homocigosis para que se exprese el fenotipo asociado a la misma (Cebrián, comunicación personal). Además de la no maduración de la corola, las plantas con la mutación *lox3/4* en homocigosis presentaron un alto grado de partenocarpia, una mayor productividad, un menor vigor y una arquitectura más abierta, en comparación con las plantas WT de la misma familia en las cuales la mutación estaba ausente o en heterocigosis.

Como ya hemos visto, la mutación *lox3/4* se ha generado en el genoma de MUC-16, variedad tradicional utilizada en la obtención de la colección de mutantes EMS. Sin embargo, las características de MUC-16 en cuanto a productividad y partenocarpia no se pueden comparar con las líneas precomerciales utilizadas en la actualidad en los programas de mejora de *C. pepo* (Esteras et al., 2012; Martínez-Valdivieso et al., 2012; Sierra, 2016). Por este motivo es fundamental comprobar si los efectos de la mutación *lox3/4* sobre la productividad y partenocarpia de MUC-16, se mantienen en otras líneas precomerciales. Con este fin, la mutación *lox3/4* fue introgresada en dos líneas

precomerciales ligeramente partenocárpicas y productivas, 13B y 60B, provenientes del programa de mejora de calabacín de la empresa “Green Breeding Biotech S. L.” (GBB). GBB es una empresa de base biotecnológica creada para la explotación comercial de las investigaciones desarrolladas por el grupo de investigación BIO-293 (Genética de Hortícolas) entre cuyas actividades destaca la implantación de un programa de mejora en calabacín.

2. OBJETIVOS PRINCIPALES DEL PROYECTO

En este contexto se han establecido los siguientes objetivos para este TFG:

- » Estudiar la segregación entre la mutación *lox3/4* y la falta de maduración de la corola, fenotipo asociado a la mutación, en dos poblaciones F2 derivadas de los cruzamientos 13B x *lox3/4* y 60B x *lox3/4*.
- » Evaluar los efectos de la mutación *lox3/4* sobre la productividad, porte, vigor, arquitectura y grado de ramificación en las poblaciones F2 indicadas.
- » Evaluar los efectos de la mutación *lox3/4* sobre las características de los frutos producidos por las plantas F2 estudiadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Instalaciones usadas en el desarrollo del TFG

Las actividades realizadas durante la elaboración de este TFG fueron llevadas a cabo en dos instalaciones diferentes: la finca experimental de la fundación UAL-Anecoop y el laboratorio del grupo de investigación de Genética de Hortícolas de la UAL (BIO293).

Las actividades de campo fueron realizadas en la parcela U17 de la finca experimental UAL-Anecoop (Figura 10). Entre estas actividades encontramos el crecimiento y caracterización de las diferentes plantas de *C. pepo* usadas en este TFG y la caracterización de los frutos producidos por las mismas. Mientras que el genotipado de las plantas, fue llevado a cabo en el laboratorio del grupo de investigación de Genética de Hortícolas de la UAL (BIO293), ubicado en la Escuela Superior de Ingeniería de esta misma universidad.



Figura 10. Mapa de la finca experimental de la fundación UAL-Anecoop. Marcado en rojo el invernadero U17, parcela utilizada en el desarrollo de este TFG.

3.2 Material vegetal empleado

En el presente trabajo, se utilizaron plantas de calabacín de diferentes poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*). Como control se utilizaron plantas M5 WT y mutantes M5 *lox3/4* en el fondo genético MUC-16.

Las líneas precomerciales 60B y 13B provienen del programa de mejora de calabacín de la empresa Green Breeding Biotech (GBB):

- La línea 13B fue obtenida a partir del híbrido “True French”. Presentando sus frutos una coloración verde media con lustre intermedio y muy poco moteado, sin rayado, con costillas prácticamente inexistentes y curvatura moderada, con cuello de cisne en el extremo apical de los mismos (Figura 11A). Se trata de una línea ligeramente partenocárpica y altamente productiva.
- La línea 60B proviene de un cruce entre los híbridos comerciales “True French” y “Cavali”. Esta línea al igual que la anterior se caracteriza por ser altamente productiva y producir frutos ligeramente partenocárpicos, presentando en este caso un color blanco pálido con poco lustre y moteado, con un ligero rayado, suavemente acostillados y ligeramente curvados (Figura 11B).



Figura 11. A) Frutos de la línea precomercial 13B. B) Frutos de la línea precomercial 60B. C) Frutos producidos por plantas mutantes M5 *lox3/4*. D) Frutos producidos por plantas Wild Type (WT). Escala: 1cm.

Las plantas M5 se obtuvieron de la siguiente manera:

- Las plantas M5 del mutante *lox3/4* se obtuvieron seleccionando las plantas de la familia 1443 de la colección de mutantes EMS, en las que se había fijado la mutación *lox3/4* tras 5 autopolinizaciones. Estas plantas poseen un porte semirastrero, un vigor medio, una arquitectura bastante abierta permitiendo la aireación de la planta y ausencia de ramificaciones. Además, se caracterizan por la producción de frutos altamente

partenocárpicas y flores con ausencia de maduración de la corola. De color verde claro, lustre intermedio, poco moteado, sin rayado y costillas ligeramente marcadas, con curvatura casi recta (Figura 11C).

- Las plantas WT se obtuvieron seleccionando las plantas de la misma familia 1443, en la cuales se había perdido la mutación *lox3/4* tras 5 autopolinizaciones. Estas plantas a diferencia de las anteriores, poseen un vigor medio-alto y una arquitectura más cerrada. No obstante, mantienen una sola cabeza y un porte semirastrero. Caracterizándose, por su baja producción, siendo no partenocárpicas y por la generación de flores abiertas, gracias a la correcta maduración de su corola. Los frutos poseen una coloración verde media, con alto lustre, poco moteado, sin rayado, costillas suaves y curvatura casi recta (Figura 11D).

Para la obtención de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*), se llevó a cabo un programa de cruces iniciado en la campaña de la primavera de 2020. Para la población F2 (13B x *lox3/4*), se polinizó dos plantas de la generación F9 de la línea precomercial 13B (Planta 1 y 2), con polen de una planta de la generación M5 del mutante *lox3/4* (*lox/lox*). Logrando una F1 (13B x *lox3/4*).1 y F1 (13B x *lox3/4*).2. Se sembraron 10 semillas de cada uno de estos cruces en la campaña de otoño de 2020. De estas semillas F1, se seleccionaron las plantas 1, 2, 3 y 5 de la F1 (13B x *lox3/4*).1 y las plantas 1, 3 y 4 de la F1 (13B x *lox3/4*).2, las cuales fueron autopolinizadas dando lugar a las semillas que conforman la población F2 (13B x *lox3/4*), que fueron las utilizadas en este TFG durante la primavera 2021 (Figura 12A).

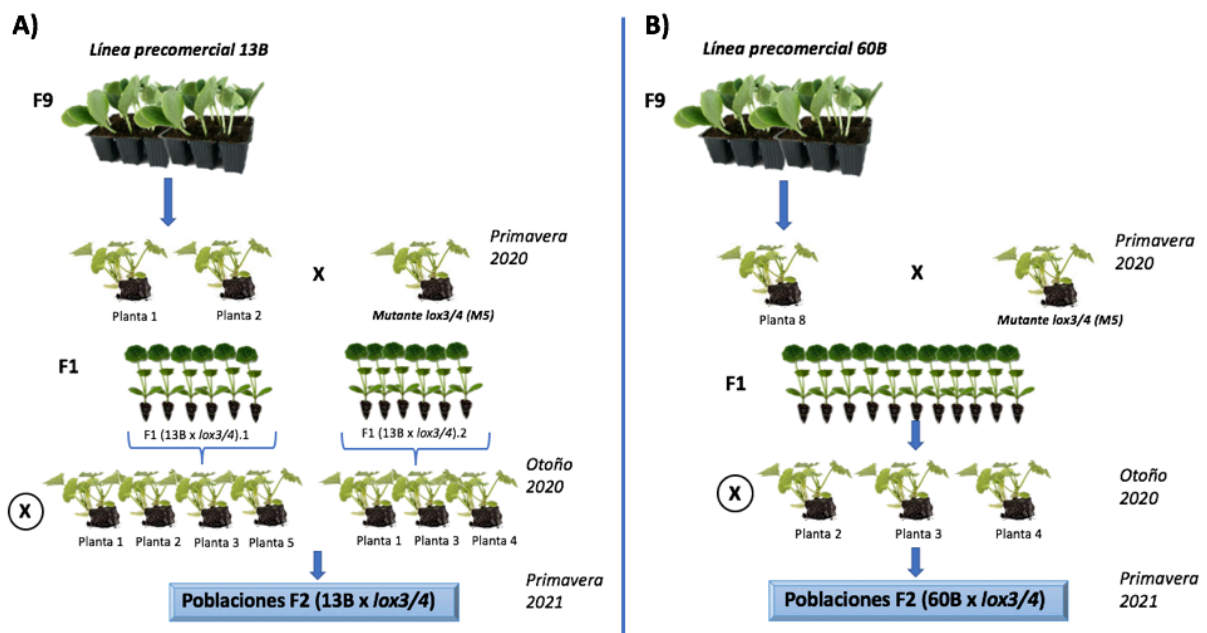


Figura 12. Esquema del programa de cruces realizado para la obtención de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) (A) y F2 (60B x *lox3/4*) (B).

En el caso de la población F2 (60B x *lox3/4*), una planta de la generación F9 de la línea precomercial 60B (Planta 8) se polinizó con polen proveniente de una planta de la generación M5 del mutante *lox3/4*

(*lox/lox*). De esta polinización se obtuvieron las semillas F1 (*wt/lox*). De forma que 10 de estas semillas se sembraron en campo durante la campaña de otoño de 2020, y las plantas número 2, 3 y 4, fueron autopolinizadas dando lugar a las semillas que componen las poblaciones F2 (60B x *lox3/4*) de estudio en este TFG (Figura 12B).

Para conseguir las semillas de las diferentes poblaciones, tras las polinizaciones de las flores femeninas, se dejaron madurar los frutos durante 45 días en las campañas de verano y 60 días en las campañas de invierno. Tras la recolección de los frutos, se realizó la extracción de las semillas, su desinfección y su secado durante 7 días, para eliminar toda la humedad posible. Las semillas fueron guardadas en sobres, a los que se añadió bolsas de sílice para reducir la humedad, debidamente etiquetados y almacenados en el Banco de Germoplasma de la Finca Experimental UAL-ANECOOP en bandejas selladas y etiquetadas.

En todas las campañas del programa de cruces (primavera 2020, otoño 2020 y primavera 2021), las diferentes semillas usadas fueron sembradas en Semilleros Laimund S. L., a principio de febrero, en el caso de las campañas de primavera de 2020 y 2021, y a finales de agosto en el caso de la campaña de otoño de 2020. Tras 10-12 días, las plántulas obtenidas fueron trasplantadas a diferentes invernaderos de la Finca Experimental UAL-Anecoop. En concreto en la campaña de primavera de 2021 se trasplantaron un total de 49 plantas de la población F2 (13B x *lox3/4*) y 50 plantas de la población F2 (60B x *lox3/4*) en el invernadero U17, que fueron las utilizadas en el desarrollo del TFG.

3.3 Genotipado de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*)

El primer paso de este TFG fue estudiar la segregación de la mutación *lox3/4* en las diferentes plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*). Con este fin, las plantas de estas poblaciones fueron genotipadas para comprobar la presencia de la mutación utilizando el sistema de genotipado KASP. Como control positivo se usaron dos plantas M5 del mutante *lox3/4*, en las que la mutación está presente en homocigosis, y dos plantas WT como control negativo, en las cuales la mutación *lox3/4* no está presente. Se tomó como material vegetal, un fragmento de hoja joven de cada una de las plantas que conforman las poblaciones F2, 49 plantas de la población F2 (13B x *lox3/4*) y 50 plantas de la población F2 (60B x *lox3/4*). Las muestras se guardaron en eppendorfs de 2mL con dos pequeñas bolas de acero inoxidable en su interior y se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la extracción de ADN, mediante el método CTAB (Murray & Thompson, 1980). La homogeneización del lisado celular se realizó en un molino Bead Mill 24 (FISHER BRAND) durante 1 minuto. La concentración de ADN obtenida en las diferentes muestras se cuantificó mediante un espectrofotómetro MULTISKAN Sky (Thermo Scientific™). Seguidamente, se diluyeron las muestras a una concentración de 30 ng/μL

Finalmente, cada una de las plantas de las poblaciones F2 fue genotipada utilizando un sistema KASP (Kompetitive allele specific PCR) diseñado por la empresa LGC Limited © a partir de la secuencia del genoma de *C. pepo* alrededor de la mutación *lox3/4*. La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante en microplacas de 96 pocillos de la marca Thermo Scientific™ en un termociclador Thermal Cycler de BioRad C1000 Touch™ (Eppendorf™). La mezcla de reactivos utilizada por muestra se indica en la tabla 4 y el programa de PCR empleado en la figura 13.

Tabla 4. Mezcla de reactivos utilizados por muestra, en la PCR efectuada para el genotipado mediante KASP de la mutación *lox3/4*.

2 μ L Muestra de ADN
3 μ L Agua MiliQ
5 μ L Master Mix
0,14 μ L KASP primer Mix
TOTAL de 10 μL

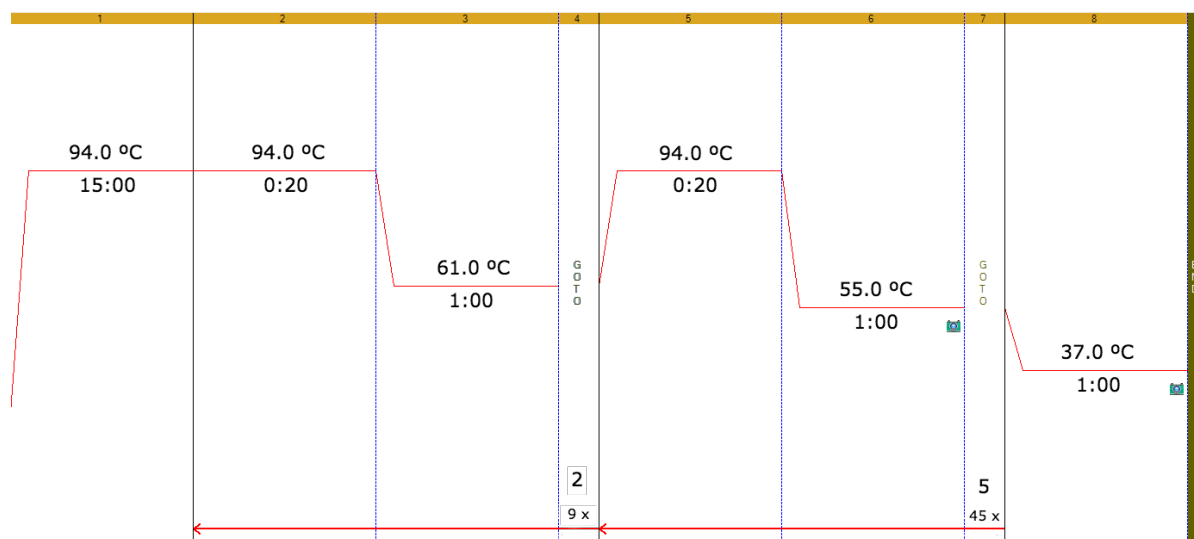


Figura 13. Programa de amplificación empleado durante la PCR de las distintas muestras pertenecientes a las poblaciones F2.

Si en la PCR solo producía señal fluorescente el fluorocromo asociado a la mutación *lox3/4*, misma respuesta que el control positivo M5 *lox3/4*, esto indicaría que dicha mutación se encontraba en homocigosis en la planta estudiada (*lox/lox*). En el caso de que ocurriera una señal fluorescente para ambos fluorocromos, la mutación sería genotipada como heterocigota (*wt/lox*). Finalmente, si solo se produce señal para el fluorocromo no asociado a la mutación, como el control negativo WT, la planta se genotipó como homocigota (*wt/wt*).

3.4 Caracterización de la maduración de la corola en las flores

En una primera caracterización se determinó visualmente si la corola de las flores, tanto masculinas como femeninas, de cada una de las plantas de las poblaciones F2 de estudio, presentaban o no maduración, produciéndose o no la apertura de estas flores. Como controles se utilizaron 5 plantas M5 *lox3/4*, las cuales se caracterizan por la no maduración de la corola, generando un fenotipo de flor cerrada, y 5 plantas WT en las que, si hay maduración de los pétalos de la corola, abriéndose de forma normal las flores.

3.5 Caracterización cualitativa de los frutos

Para estudiar la posible relación entre la mutación *lox3/4* y tres de las principales características cualitativas de los frutos de calabacín (color, moteado y rayado), se analizaron las mismas en los frutos generados por cada una de las plantas de las poblaciones F2 estudiadas y en las plantas control M5 *lox3/4* y WT. Estas tres características fueron evaluadas visualmente diferenciando las siguientes categorías para cada una de ellas:

- » **Color:** blanco, negro-verde muy oscuro, verde oscuro, verde medio y verde claro.
- » **Moteado:** ausencia de moteado, muy poco moteado, poco moteado, bastante moteado y muy moteado.
- » **Rayado:** rayado, no rayado.

3.6 Caracterización fenotípica de las plantas

Cada una de las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) fueron caracterizadas para cuatro parámetros clave: porte, vigor, arquitectura y ramificación de la planta:

- » **Porte:** este parámetro hace referencia a la naturaleza arbustiva o rastrera de las plantas. Siendo: el grado 1, plantas de naturaleza rastrera; el grado 3, plantas semirastreras y el grado 5, plantas arbustivas. Los grados 2 y 4, sirven para mostrar fenotipos intermedios, aumentando el grado de precisión durante la caracterización.
- » **Vigor:** alude al tamaño general de la planta, en un rango de 1-5. Asignando el grado 5, a aquellas plantas que presentaron el máximo vigor.
- » **Arquitectura:** indica la distribución de la parte aérea de la planta y cuan abierta o compacta es la misma. El grado 5, se asignó a plantas cuya parte aérea tuviera una distribución muy abierta y por tanto una gran aireación. En cambio, el 1 se asignó a plantas con una parte aérea muy compacta y en la que por tanto haya poca aireación.
- » **Grado de ramificación:** establece el número de cabezas, o ramificaciones con ápices, que presenta cada planta. Se estableció un rango de 1-5: una única cabeza o ausencia de ramificación (1), dos cabezas (2), tres (3), cuatro (4) o más de 4 cabezas (5).

Como controles se usaron las mismas 5 plantas M5 *lox3/4* y 5 plantas WT, empleadas en el punto anterior y que serán utilizadas en el resto del TFG. Para el análisis estadístico de todos estos parámetros, evaluados del 1 al 5; las plantas se agruparon en función del genotipo de las plantas para *lox3/4*: plantas *lox/lox*, plantas *wt/lox* y plantas *wt/wt*.

3.7 Estudio de la productividad

Se estudió la productividad de las diferentes plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*). El primer paso de este estudio fue realizar “una limpieza” de las diferentes plantas analizadas, en esta limpieza se eliminaron todos los frutos presentes en las plantas desde el último fruto con flor sin abrir hacia la parte inferior de las mismas. La recolección se realizó tres veces por semana durante 3 semanas, contabilizando el número de frutos producidos por cada una de las plantas estudiadas. Los frutos fueron cosechados con un tamaño de entre 18 y 20 cm de longitud (tamaño comercial), y caracterizados para diferentes factores que veremos en el siguiente apartado de este TFG. Para el análisis estadístico de la producción en número de frutos producidos por planta y semana, las plantas se agruparon en función de su genotipo. Para calcular la producción en gramos de calabacín de cada una de las plantas por semana, se tuvo en cuenta el peso medio de los frutos en cada genotipo. Finalmente, para estimar la producción comercial, tanto en número de frutos comerciales como en gramos de calabacín comercial producidos por planta y semana, se utilizó el porcentaje de frutos comerciales en cada genotipo.

3.8 Caracterización fenotípica de los frutos

Los frutos cosechados en el apartado anterior, junto con 20 frutos procedentes de las 5 plantas control M5 *lox3/4* y WT, fueron caracterizados para los siguientes factores:

- » **Peso:** se registró el peso en gramos (gr) de cada fruto mediante una balanza de precisión de la marca Fisherbrand™.
- » **Tamaño del cierre pistilar:** se aportaron valores de 1-5, para definir el tamaño de la cicatriz dejada tras la caída de la flor: muy pequeño (1); pequeño (2); medio (3); grande (4) o muy grande (5).
- » **Frutos de carácter comercial:** son considerados comerciales, aquellos frutos que muestran un desarrollo homogéneo, sin reducción de su diámetro en la zona apical (Figura 14 C y D). Este parámetro fue analizado como porcentaje de frutos comerciales.



Figura 14. A) Fruto con flor pegada. B) Fruto sin flor pegada. C) Fruto no comercial o “chupado”, con

ausencia de un desarrollo homogéneo debido al estrechamiento que presenta en su extremo apical.
D) Fruto comercial, desarrollado uniformemente. Escala: 1 cm.

- » **Curvatura del fruto:** se establecieron cinco valores en función de la curvatura de los frutos: recto (1), casi recto (2), ligeramente curvado (3), curvado (4) y muy curvado (5).
- » **Relación entre la longitud y el diámetro máximo del fruto:** el diámetro máximo de los frutos se estimó por el empleo de un calibre PCE-DCP 150I.
- » **Presencia de flor pegada:** se registró la presencia de la flor pegada al fruto en el momento de su recolección (Figura 14 A y B). Este parámetro fue analizado como porcentaje de frutos con flor pegada.
- » **Brillo:** se establecieron 5 grupos en función del brillo que presentaban los frutos en el momento de su cosechado: mate (1), ligeramente brillante (2), intermedio (3), brillante (4) o muy brillante (5).
- » **Costillas:** hace referencia a las protuberancias que surgen en la superficie de los frutos, clasificando los frutos en cinco grupos: ausencia de costillas (1), costillas suaves (2), costillas intermedias (3), costillas profundas (4) y costillas muy profundas (5).

Para el análisis estadístico de los diferentes caracteres evaluados en la caracterización de los frutos, estos se agruparon en función de su genotipo: frutos *lox/lox*, frutos *wt/lox* y frutos *wt/wt*.

3.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el genotipado para la presencia de la mutación *lox3/4* en las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) se sometieron a un análisis estadístico de heterogeneidad Chi-Cuadrado ($\alpha = 0,01$) para determinar si la presencia de esta mutación se corresponde con la distribución 1 (*wt/wt*): 2 (*wt/lox*): 1 (*lox/lox*), esperada para la autopolinización de las plantas heterocigotas (*wt/lox*). Del mismo modo, los datos obtenidos en la caracterización de la corola de las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*), también fueron sometidos a un análisis estadístico de heterogeneidad Chi-Cuadrado ($\alpha = 0,01$) para confirmar si la maduración o no de la corola, corresponde con la distribución esperada de 3 plantas con flores con corola madura: 1 planta con flores con corola no madura.

Todos los datos logrados de la caracterización de las plantas, la producción de las mismas y la caracterización de los frutos cosechados han sido analizados con el paquete de software SPSS (versión 22.0; SPPS INC., Chicago. IL, USA). Las variables normales están expresadas como la media para los genotipos: *wt/wt*, *wt/lox* y *lox/lox*, más menos el error estándar. Estas variables normales fueron analizadas mediante un ANOVA unidireccional, usando el test HSD-Tukey en el análisis post-hoc, para llevar a cabo las comparaciones entre los diferentes tipos de plantas. Mientras que las variables con una distribución binomial, como el porcentaje de frutos comerciales o el porcentaje de frutos con flor pegada, fueron expresadas como un porcentaje más menos el error estándar y analizadas mediante un modelo lineal generalizado, en el que se usó una función de enlace Logit y una distribución de

probabilidad binomial. Las comparaciones entre los diferentes tipos de plantas fueron realizadas por un test Fisher's LSD (Diferencia mínima significativa).

4. RESULTADOS

4.1 Genotipado de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*)

En la figura 15 se muestra la discriminación alélica mediante KASP de la presencia de la mutación *lox3/4* en las plantas de la población F2 (13B x *lox3/4*), y en la tabla 5 se puede observar el genotipo individual confirmado para cada una de las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*), así como las 5 plantas control M5 *lox3/4* y WT.

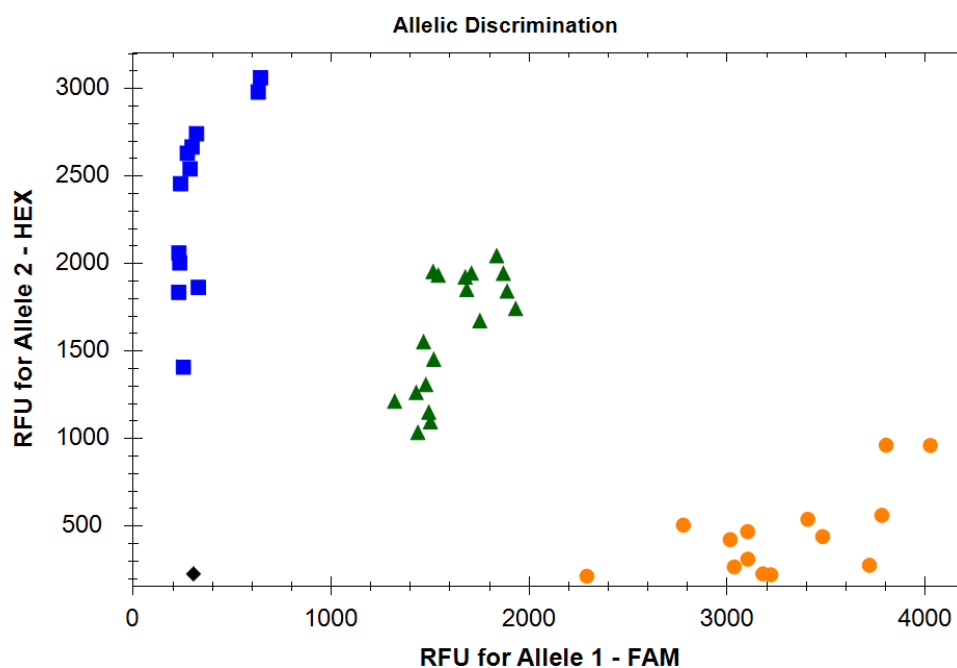


Figura 15. Discriminación alélica mediante KASP de la presencia de la mutación *lox3/4* en las distintas plantas de la población F2 (13B x *lox3/4*) y en los controles M5 *lox3/4* y WT. Las diferentes plantas se agrupan según su genotipo en *wt/wt* (naranja), *wt/lox* (verde) y *lox/lox* (azul). La marca negra se corresponde con el control negativo sin ADN (NTC).

Tabla 5. Genotipo obtenido para cada planta de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) y plantas control, con uso de tecnología KASP. Se incluye los atributos fenotípicos: maduración de la corola, color, moteado y rayado de los frutos. Plantas 1.5.6, 2.1.7 y 2.3.2, murieron antes de dar frutos por lo que estos no pudieron caracterizarse.

	Planta	Genotipado KASP	Maduración de la corola (SI/NO)	Color	Moteado	Rayado
CONTROLES	WT1	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado
	WT2	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado
	WT3	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado
	WT4	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado
	WT5	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado
	M5.1	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado
	M5.2	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado

	M5.3	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
	M5.4	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
	M5.5	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
13B x <i>lox3/4</i>	1.1.1	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Muy poco moteado	No rayado	
	1.1.2	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Muy poco moteado	No rayado	
	1.1.3	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado	
	1.1.4	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Ausencia de moteado	No rayado	
	1.1.5	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
	1.1.6	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado	
	1.1.7	<i>wt/wt</i>	SI	Verde oscuro	Muy poco moteado	No rayado	
	1.2.1	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Muy poco moteado	No rayado	
	1.2.2	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado	
	1.2.3	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado	
	1.2.4	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado	
	1.2.5	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Bastante moteado	No rayado	
	1.2.6	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado	
	1.2.7	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Bastante moteado	No rayado	
	1.3.1	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado	
	1.3.2	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
	1.3.3	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado	
	1.3.4	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Muy poco moteado	No rayado	
	1.3.5	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Bastante moteado	No rayado	
	1.3.6	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
	1.3.7	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Bastante moteado	No rayado	
	1.5.1	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado	
	1.5.2	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Bastante moteado	No rayado	
	1.5.3	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Muy poco moteado	No rayado	
	1.5.4	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado	
	1.5.5	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Ausencia de moteado	No rayado	
	1.5.6	<i>wt/lox</i>	SI	Planta fallida sin recolección de frutos			
	2.1.1	<i>wt/wt</i>	SI	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
	2.1.2	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Muy poco moteado	No rayado	
	2.1.3	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Muy poco moteado	No rayado	
	2.1.4	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Bastante moteado	No rayado	
	2.1.5	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado	
	2.1.6	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado	
2.1.7	<i>wt/wt</i>	SI	Planta fallida sin recolección de frutos				
2.3.1	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado		
2.3.2	<i>wt/lox</i>	SI	Planta fallida sin recolección de frutos				
2.3.3	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Poco moteado	No rayado		

	2.3.4	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado
	2.3.5	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Bastante moteado	No rayado
	2.3.6	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado
	2.3.7	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado
	2.4.1	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado
	2.4.2	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Poco moteado	No rayado
	2.4.3	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado
	2.4.4	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Poco moteado	No rayado
	2.4.5	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Bastante moteado	No rayado
	2.4.6	<i>wt/wt</i>	SI	Verde claro	Bastante moteado	No rayado
	2.4.7	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Bastante moteado	No rayado
2.4.8	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Poco moteado	No rayado	
60B x <i>lox3/4</i>	2.1	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado
	2.2	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Ausencia de moteado	No rayado
	2.3	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
	2.4	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Bastante moteado	No rayado
	2.5	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
	2.6	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado
	2.7	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Bastante moteado	No rayado
	2.8	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Bastante moteado	No rayado
	2.9	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Bastante moteado	No rayado
	2.10	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Poco moteado	No rayado
	2.11	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Poco moteado	No rayado
	2.12	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Poco moteado	No rayado
	2.13	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Muy moteado	Rayado
	2.14	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado
	2.15	<i>wt/lox</i>	SI	Verde claro	Bastante moteado	No rayado
	2.16	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Poco moteado	No rayado
	2.17	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy moteado	No rayado
	2.18	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
	3.1	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
	3.2	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado
	3.3	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy moteado	No rayado
3.4	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado	
3.5	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado	
3.6	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado	
3.7	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado	
3.8	<i>lox/lox</i>	NO	Verde claro	Muy moteado	No rayado	
3.9	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado	
3.10	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Poco moteado	No rayado	
3.11	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado	

3.12	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
3.13	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Bastante moteado	No rayado
3.14	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
3.15	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
3.16	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
3.17	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Poco moteado	No rayado
3.18	<i>wt/lox</i>	SI	Verde medio	Muy moteado	No rayado
4.1	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
4.2	<i>lox/lox</i>	NO	Verde medio	Bastante moteado	Rayado
4.3	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Ausencia de moteado	No rayado
4.4	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
4.5	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado
4.6	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
4.7	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Muy poco moteado	No rayado
4.8	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Poco moteado	No rayado
4.9	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Bastante moteado	No rayado
4.10	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
4.11	<i>wt/wt</i>	SI	Blanco	Muy poco moteado	No rayado
4.12	<i>wt/lox</i>	SI	Blanco	Bastante moteado	No rayado
4.13	<i>wt/wt</i>	SI	Verde medio	Bastante moteado	No rayado
4.14	<i>lox/lox</i>	NO	Blanco	Ausencia de moteado	No rayado

Para la población F2 (13B x *lox3/4*), pudimos observar 26 plantas heterocigotas para el alelo mutante (*wt/lox*) (53,06%), 8 plantas que no presentaban la mutación (*wt/wt*) (16,33%) y 15 plantas que presentaron la mutación en homocigosis (*lox/lox*) (30,61%). Mientras que en la población F2 (60B x *lox3/4*) el número de plantas *wt/lox* fue de 23, 46%; observándose 15 plantas *wt/wt* y 12 plantas *lox/lox*, con porcentajes del 30% y 24%, respectivamente.

Con los datos obtenidos, se efectuó una prueba χ^2 para comprobar si la distribución de la mutación *lox3/4* corresponde a la proporción esperada para esta mutación en ambas poblaciones F2, siendo esta de 1 *wt/wt*: 2 *wt/lox*: 1 *lox/lox* (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la prueba estadística Chi-cuadrado para la distribución de la mutación *lox3/4* en las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*). No existen diferencias significativas entre el ratio de segregación de la mutación observado y esperado (1 *wt/wt*: 2 *wt/lox*: 1 *lox/lox*) en estas poblaciones con $\alpha=1\%$.

<i>lox3/4</i> ($\alpha=1\%$)							
POBLACIÓN	TOTAL DE PLANTAS	Plantas <i>wt/wt</i>	Plantas <i>wt/lox</i>	Plantas <i>lox/lox</i>	χ^2 Experimental	χ^2 Teórica	Valor <i>p</i>
13B x <i>lox3/4</i>	49	8	26	15	0,75	22,962	<0,01
60B x <i>lox3/4</i>	50	15	23	12	0,68	24,674	<0,01

La χ^2 experimental alcanzada para ambas poblaciones presentaron valores inferiores que la χ^2 teórica (Tabla 6). La ausencia de diferencias significativas entre la distribución esperada y la observada confirmó que la mutación *lox3/4* segrega 1 *wt/wt*: 2 *wt/lox*: 1 *lox/lox* en las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*), segregación típica de un gen único.

4.2 Evaluación de la maduración de la corola en las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*)

En la población F2 (13B x *lox3/4*), 34 plantas presentaron maduración de su corola (69,39 %) y en 15 plantas no se produjo la maduración de la corola (30,61%) (Tabla 5). Paralelamente, en la población F2 (60B x *lox3/4*), se contabilizaron 38 plantas con maduración de la corola (76%) y 12 plantas sin maduración de las mismas (24%) (Tabla 5).

Con la información obtenida se efectuó una prueba χ^2 al igual que en el apartado anterior, para comprobar si la distribución de los fenotipos maduración de la corola y no maduración de la misma correspondía con la proporción esperada para este fenotipo en ambas poblaciones F2, siendo esta de 3 plantas con maduración de la corola: 1 planta sin maduración de la corola (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de la prueba estadística Chi-cuadrado para la distribución de las plantas con maduración o no maduración de la corola en las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*). No existen diferencias significativas entre la ratio de segregación del fenotipo observado y esperado (3 con maduración de la corola: 1 sin maduración de la corola) en estas poblaciones con $\alpha=1\%$.

<i>lox3/4</i> ($\alpha= 1\%$)						
POBLACIÓN	TOTAL DE PLANTAS	Plantas con maduración de la corola	Plantas sin maduración de la corola	χ^2 Experimental	χ^2 Teórica	Valor <i>p</i>
13B x <i>lox3/4</i>	49	34	15	0,82	22,962	<0,01
60B x <i>lox3/4</i>	50	38	12	0,03	24,674	<0,01

Se alcanzan en ambas poblaciones χ^2 experimentales menores que las χ^2 teóricas, lo cual indica la ausencia de diferencias significativas para la proporción esperada y observada de plantas con maduración o no maduración de su corola (3 con maduración de la corola: 1 sin maduración de la corola), pudiendo confirmar que las plantas presentan una distribución fenotípica de 3:1, propia de un gen de carácter recesivo.

Al agrupar los resultados obtenidos para la maduración de la corola de cada planta en función de los genotipos confirmados por el genotipado KASP de las poblaciones F2 (Figura 16), pudimos observar que existe una correlación perfecta entre el genotipado y la maduración de las corolas. En el 100 ± 0 % de plantas *wt/wt* y *wt/lox* de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*), al igual que pasaba en las plantas WT control, las corolas de sus flores maduraron sin problemas, produciéndose la apertura floral. Mientras que la maduración de la corola no se produjo en ninguna de las plantas *lox/lox* de estas poblaciones ni en los controles M5 *lox3/4*, no produciéndose la apertura de sus flores. Estos resultados confirmaron que la mutación *lox3/4* en homocigosis impide la maduración de las corolas y la apertura floral independientemente del fondo genético en el que esta mutación esté insertada.

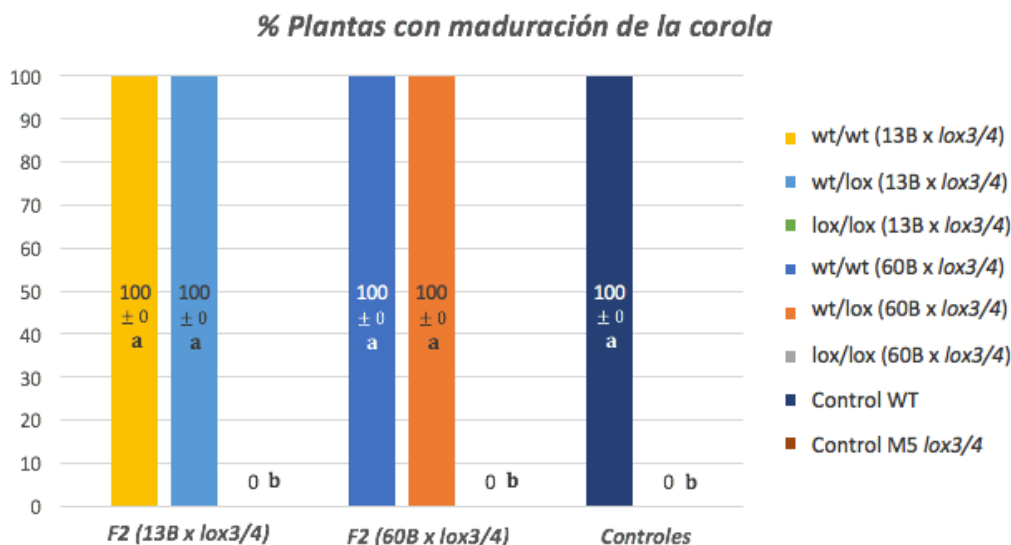


Figura 16. Porcentaje de plantas control WT, control M5 *lox3/4* y plantas procedentes de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*), con maduración de la corola, agrupadas por genotipo. Las distintas letras en cada parámetro indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

4.3 Caracterización cualitativa de los frutos

La evaluación de las principales características cualitativas de los frutos de calabacín (color, moteado y rayado) en cada una de las plantas de las poblaciones F2 estudiadas y en las plantas control M5 *lox3/4* y WT, se muestra en la tabla 5.

El color de los frutos varió para la población F2 (13B x *lox3/4*) entre las diferentes tonalidades de verde: verde claro, verde medio y verde oscuro (Figura 17A). Mientras que en la población F2 (60B x *lox3/4*) los frutos blancos fueron los predominantes, apareciendo también frutos verdes medios y claros (Figura 17B). En cuanto al moteado, ambas poblaciones presentaron frutos muy diversos: frutos sin moteado, muy poco moteados, poco moteados y bastante moteados, a lo que habría que añadir muy moteados en el caso de la población F2 (60B x *lox3/4*). Por último, en la población F2 (13B x *lox3/4*) no aparecieron frutos rayados (Figura 17A) y tan solo dos plantas de la población F2 (60B x *lox3/4*) produjeron frutos rayados (Figura 17B).

Al comparar los resultados de esta caracterización fenotípica de los frutos con el genotipo de las plantas que los produjeron, pudimos concluir que no hay una relación entre la segregación de la mutación *lox3/4* y la segregación del color, moteado o rayado en las poblaciones F2 estudiadas.



Figura 17. Frutos procedentes de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) (A) y F2 (60B x *lox3/4*) (B). Escala: 1 cm.

4.4 Caracterización fenotípica de las plantas

En lo referido al porte y el grado de ramificación de las plantas, no se apreciaron diferencias significativas entre los controles ni ninguno de los grupos establecidos por el genotipado KASP, presentando todos ellos valores cercanos a tres y a uno, respectivamente (Tabla 8 y 9). De este modo las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) presentaron un porte semirastrero y la mayoría de ellas una única cabeza, sin ramificaciones, independientemente de la presencia o no de la mutación *lox3/4*.

Tabla 8. Caracterización del porte, vigor, arquitectura y grado de ramificación, de las plantas de la población F2 (13B x *lox3/4*), agrupadas por genotipo, y de las plantas control WT y M5 *lox3/4*. Las distintas letras en cada parámetro indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

		Porte de las plantas	Vigor	Arquitectura	Grado de ramificación de las plantas
CONTROL	Controles WT	3,40 ± 0,25 a	4,00 ± 0 b	3,20 ± 0,20 b	1,00 ± 0 a
	Controles <i>lox3/4</i>	3,00 ± 0 a	3,00 ± 0 a	4,80 ± 0,20 a	1,00 ± 0 a
F2 (13B x <i>lox3/4</i>)	<i>wt/wt</i>	3,29 ± 0,18 a	3,29 ± 0,18 ab	3,57 ± 0,37 b	1,14 ± 0,16 a
	<i>wt/lox</i>	3,31 ± 0,23 a	3,31 ± 0,12 ab	3,35 ± 0,19 b	1,19 ± 0,14 a
	<i>lox/lox</i>	3,40 ± 0,16 a	3,47 ± 0,19 ab	3,40 ± 0,16 b	1,20 ± 0,11 a

Tabla 9. Caracterización del porte, vigor, arquitectura y grado de ramificación, de las plantas de la población F2 (60B x *lox3/4*), agrupadas por genotipo, y de las plantas control WT y M5 *lox3/4*. Las distintas letras en cada parámetro indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

		Porte de las plantas	Vigor	Arquitectura	Grado de ramificación de las plantas
CONTROL	Controles WT	3,40 ± 0,25 a	4,00 ± 0 a	3,20 ± 0,20 b	1,00 ± 0 a
	Controles <i>lox3/4</i>	3,00 ± 0 a	3,00 ± 0 b	4,80 ± 0,20 a	1,00 ± 0 a
F2 (60B x <i>lox3/4</i>)	<i>wt/wt</i>	3,20 ± 0,11 a	3,40 ± 0,13 ab	3,20 ± 0,18 b	1,00 ± 0 a
	<i>wt/lox</i>	3,09 ± 0,11 a	3,65 ± 0,12 ab	3,39 ± 0,14 b	1,09 ± 0,09 a
	<i>lox/lox</i>	2,83 ± 0,17 a	3,00 ± 0,17 b	3,25 ± 0,18 b	1,08 ± 0,08 a

Por otro lado, como ya se ha comentado en la introducción, las plantas control M5 *lox3/4* presentaron una arquitectura más abierta y un menor vigor que las plantas control WT. El análisis de la arquitectura de las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) agrupadas por genotipo, indicó que no había diferencias significativas entre las plantas de los diferentes genotipos, siendo la arquitectura de estas plantas más similar a las de las plantas WT que a las de las plantas control M5 *lox3/4* (Tabla 8 y 9), no pudiendo relacionar la presencia de la mutación con los cambios en la arquitectura dados entre las plantas control M5 *lox3/4* y las plantas WT control. Lo mismo ocurrió para el vigor de las plantas en el caso de la población F2 (13B x *lox3/4*), donde no se encontraron diferencias significativas entre el vigor de los distintos grupos de plantas, siendo el vigor de todos los genotipos intermedio entre las plantas control M5 *lox3/4* y las plantas WT control (Tabla 8). Mientras que el vigor de las plantas *lox/lox* de la población F2 (60B x *lox3/4*) si fue significativamente menor que el de las plantas WT control, pero no fue estadísticamente diferente al resto de grupos de plantas (*wt/wt* y *wt/lox*) de esta población (Tabla 9). De este modo tampoco pudimos relacionar los cambios en el vigor de las plantas con la mutación *lox3/4*.

4.5 Estudio de la productividad

Las plantas *lox/lox* de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) produjeron de media 3,02 ± 0,20 y 3,28 ± 0,25 frutos por semana y planta respectivamente (Figura 18). Esta producción, como número de frutos, fue ligeramente mayor que la producida por las plantas *wt/wt* y *wt/lox*. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas y estuvieron muy lejos de las diferencias observadas entre las plantas control M5 *lox3/4* y las plantas WT control. En este caso las plantas control M5 *lox3/4* produjeron hasta 5 veces más frutos por planta y semana que las plantas WT control (2,93 ± 0,25 frente a 0,60 ± 0,25). Es de destacar que el número de frutos producidos por las plantas WT control fue notablemente inferior al producido por el resto de plantas analizadas, incluidas las plantas *wt/wt* de las dos poblaciones F2 estudiadas.

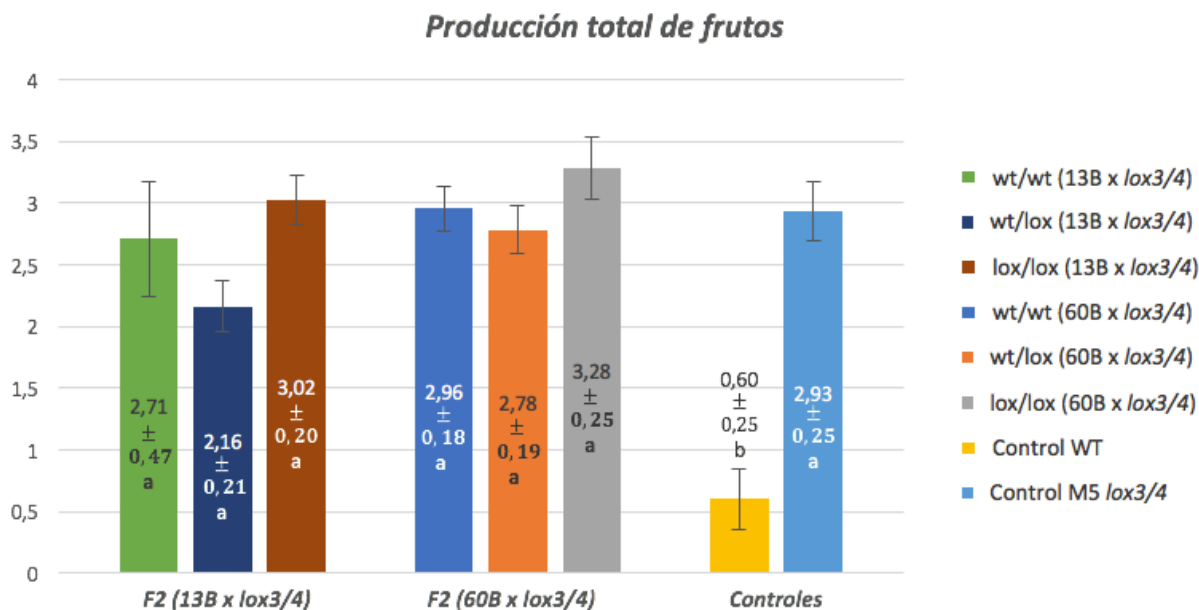


Figura 18. Número de frutos generados por planta y semana, para las plantas control M5 *lox3/4*, control WT y las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) agrupados por genotipo. Las distintas letras en cada parámetro indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

Para calcular la producción en función de los gramos de calabacín producidos por planta y semana en cada uno de los tipos de plantas estudiados, se tuvo en cuenta el peso medio de los frutos de cada tipo y en su análisis se observó dos pequeñas variaciones respecto a la producción medida en número de frutos (Figura 19). En el caso de la población F2 (13B x *lox3/4*) las diferencias en la producción entre las plantas *lox/lox* y *wt/wt* desaparecieron, llegando a superar la producción de las plantas *wt/wt* ($582,31 \pm 99,93$ gr por planta y semana) a la de las plantas *lox/lox* ($569,59 \pm 38,52$ gr por planta y semana). En cambio, en la población (60B x *lox3/4*) las diferencias entre la producción en gramos de las plantas *lox/lox* y los otros dos tipos de plantas se acrecentaron ($728,30 \pm 56,08$ gr frente a $611,87 \pm 37,42$ gr y $565,82 \pm 38,50$ gr) pero siguieron sin ser estadísticamente significativos.

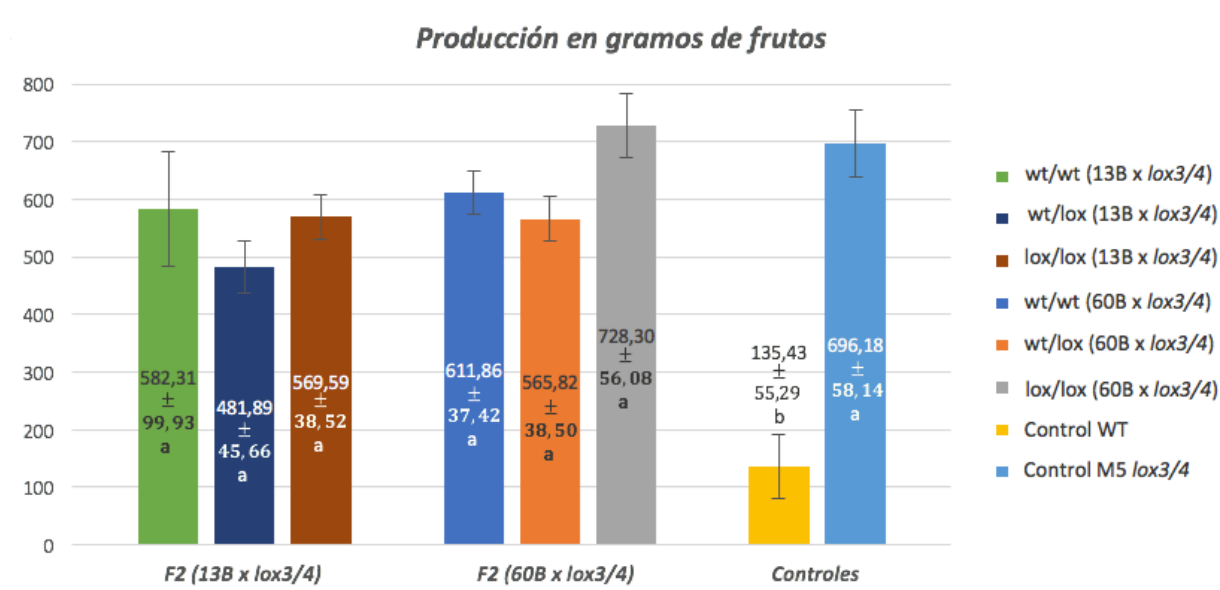


Figura 19. Producción en gramos de frutos generados por planta y semana, para las plantas control M5 *lox3/4*, control WT y las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) agrupados por genotipo. Las distintas letras dentro de cada población indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas de la misma y con los controles, en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

Como ya hemos comentado en el desarrollo de este TFG, el porcentaje de frutos comerciales producidos por cada tipo de planta es vital para calcular la producción comercial de las mismas. Como veremos en el siguiente apartado de estos resultados, este porcentaje de frutos comerciales varía entre los diferentes grupos de plantas estudiados, haciendo que los datos de producción comercial alcanzados no siguieran el mismo patrón exacto que los datos de producción total. Al analizar la producción comercial en función del número de frutos, pudimos observar que, al igual que ocurría para la producción total (Figura 20), las plantas *lox/lox* de las dos poblaciones en estudio produjeron un mayor número de frutos comerciales que las plantas *wt/lox* y *wt/wt*. Pero en este caso estas diferencias se incrementaron, llegando a ser estadísticamente significativas en el caso de la población F2 (13B x *lox3/4*) (Figura 20). Estas diferencias también aumentaron entre el número de frutos comerciales producidos por las plantas control M5 *lox3/4* ($2,93 \pm 0,25$ frutos comerciales por planta y semana) y los producidos por las plantas WT control ($0,48 \pm 0,20$), llegando las plantas control M5 *lox3/4* a multiplicar por 6 el número de frutos comerciales producidos por las plantas WT control por planta y semana.

Producción de frutos comerciales

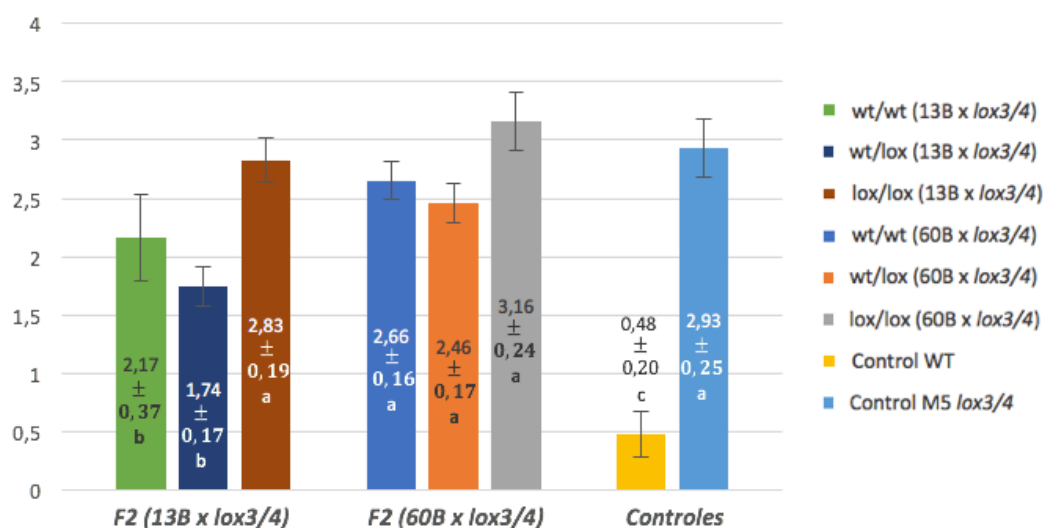


Figura 20. Número de frutos comerciales generados por planta y semana, para las plantas control M5 *lox3/4*, control WT y las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) agrupados por genotipo. Las distintas letras dentro de cada población indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas de la misma y con los controles, en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

Los datos obtenidos de producción comercial como gramos de calabacín generados por planta y semana presentaron las mismas tendencias, que la producción comercial expresada como frutos comerciales por planta y semana (Figura 21). Las plantas *lox/lox* de la población F2 (13B x *lox3/4*) produjeron más gramos que los otros dos grupos de la población, pero sin diferencias significativas. Estas diferencias si fueron estadísticamente significativas entre la producción de las plantas *lox/lox* de la población F2 (60B x *lox3/4*) y las plantas *wt/lox* y *wt/wt*, multiplicando por seis los gramos de calabacín por planta y semana producidos por las plantas WT control.

Producción en gramos de frutos comerciales

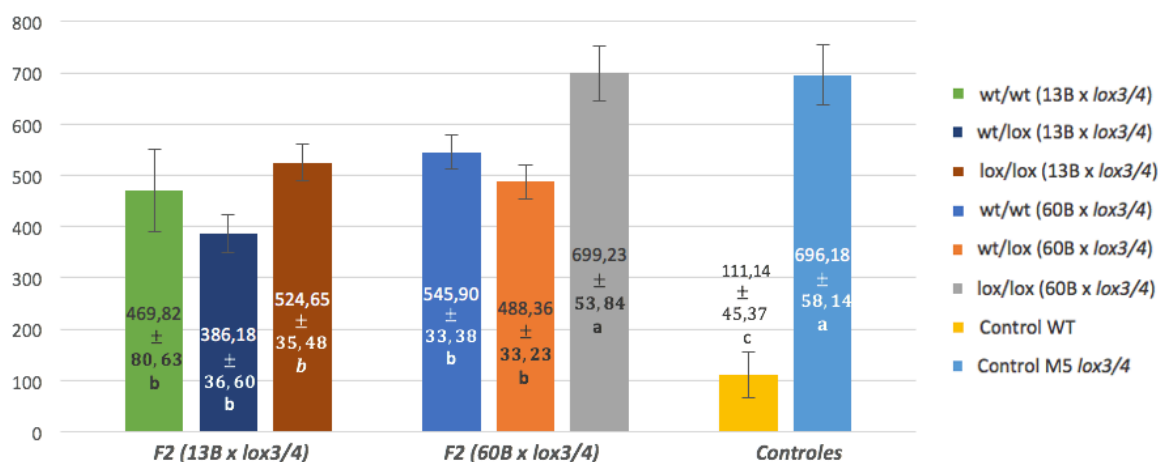


Figura 21. Producción en gramos de frutos comerciales generados por planta y semana, para las plantas control M5 *lox3/4*, control WT y las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) agrupados por genotipo. Las distintas letras dentro de cada población indican la existencia de

diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas de la misma y con los controles, en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

4.6 Caracterización fenotípica de los frutos

Los frutos cosechados de las diferentes plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) mostraron una importante variabilidad fenotípica, especialmente en el caso de la población F2 (60B x *lox3/4*) (Figuras 22 y 23).



Figura 22. Frutos de la población F2 (13B x *lox3/4*), A) Frutos cosechados de plantas *wt/wt*. B) Frutos cosechados de plantas *wt/lox*. C) Frutos cosechados de plantas *lox/lox*. Escala: 1 cm.



Figura 23. Frutos de la población F2 (60B x *lox3/4*), A) Frutos cosechados de plantas *wt/wt*. B) Frutos cosechados de plantas *wt/lox*. C) Frutos cosechados de plantas *lox/lox*. Escala: 1 cm.

Un $94,65 \pm 3,11$ % y un $96,43 \pm 2,54$ % de los frutos producidos por las plantas *lox/lox* de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) fueron catalogados como frutos comerciales (Figura 24), mientras que este porcentaje subió hasta el 100% en los frutos producidos por las plantas control M5 *lox3/4* (Figura 14D). Estos porcentajes de frutos comerciales obtenidos en las plantas *lox/lox* fue en todos los casos superior al de las plantas *wt/lox* o *wt/wt* de sus mismas poblaciones. Sin embargo; estas diferencias solo fueron significativas en el porcentaje de frutos comerciales obtenidos en las plantas control M5 *lox3/4* y en las plantas WT control.

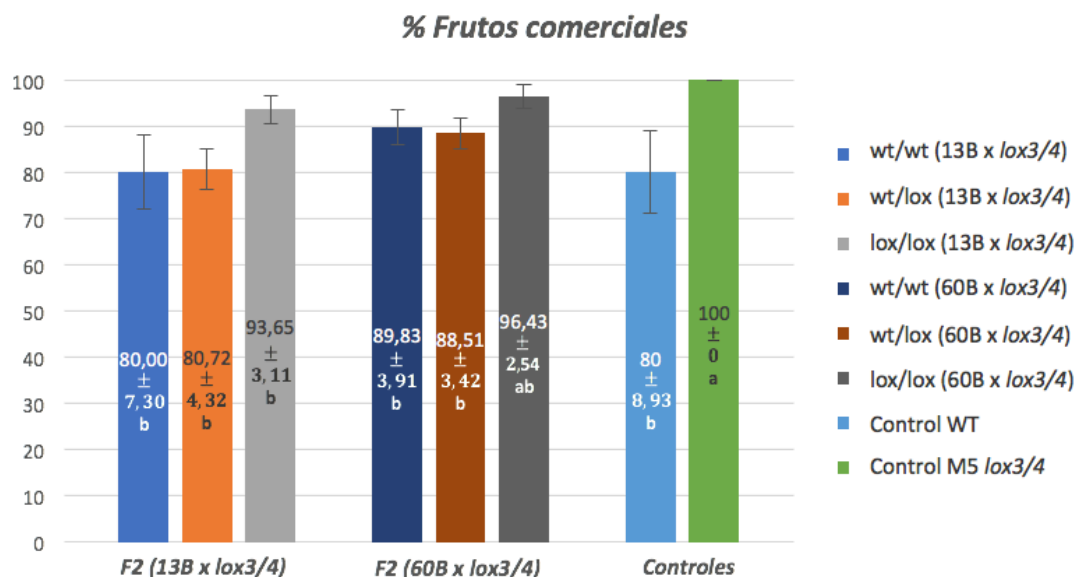


Figura 24. Porcentaje de frutos comerciales generados, para las plantas control M5 *lox3/4*, control WT y las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) agrupados por genotipo. Las distintas letras dentro de cada población indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas de la misma y con los controles, en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

El 100% de los frutos cosechados de plantas control M5 *lox3/4* mantenían su flor pegada al fruto en el momento en el que se caracterizaron los mismos (Figura 14A y 25). Este porcentaje disminuyó hasta un $79,37 \pm 5,10$ % en los frutos cosechados de plantas *lox/lox* de la población F2 (13B x *lox3/4*) y un $71,43 \pm 6$ % en los cosechados de plantas *lox/lox* de población F2 (60B x *lox3/4*) (Figura 25). Aun así, continuó siendo mucho mayor que el porcentaje de frutos con flor pegada cosechados de plantas *wt/lox* y *wt/wt* de las poblaciones en estudio, con alrededor del 15% para la población F2 (13B x *lox3/4*) y del 8% para la población F2 (60B x *lox3/4*), y que las plantas WT control, en las que ningún fruto mantuvo su flor pegada en el momento de su caracterización.

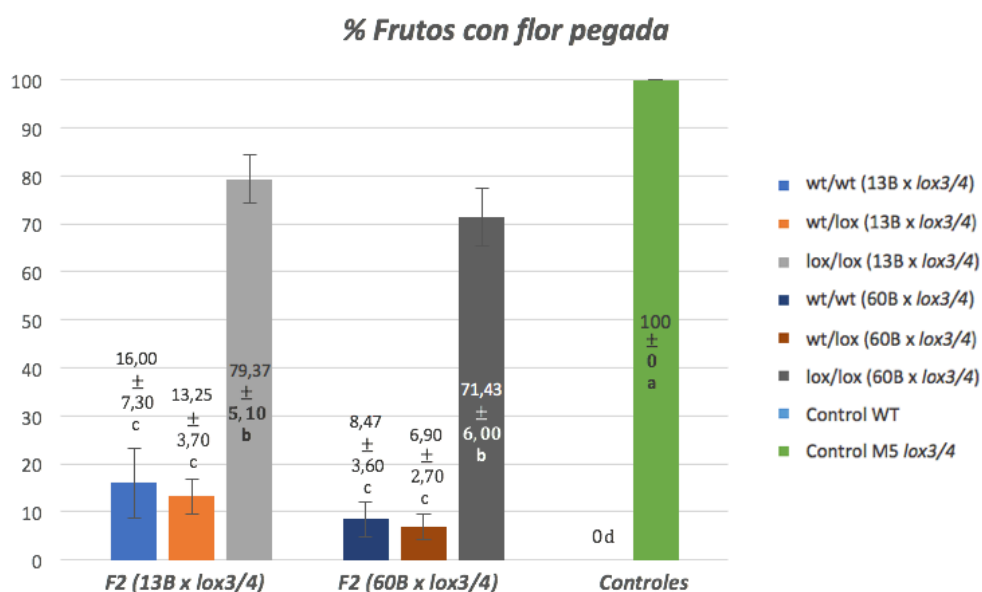


Figura 25. Porcentaje de frutos con flor pegada generados por planta y semana, para las plantas control M5 *lox3/4*, control WT y las plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) agrupados

por genotipo. Las distintas letras dentro de cada población indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas de la misma y con los controles, en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

Continuando con la caracterización de los frutos cosechados, pudimos observar que no había diferencias significativas importantes entre el peso medio de los frutos procedentes de los diferentes grupos de plantas el cual oscilo entre 180 y 240 gramos por fruto (Tablas 10 y 11). Tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a la curvatura de los frutos, con frutos casi rectos, o en la relación entre la longitud y el diámetro (L/D) (Tablas 10 y 11). Los frutos cosechados en las plantas control M5 *lox3/4* fueron más mates que los cosechados en las plantas WT control, pero estas diferencias no se mantuvieron en las poblaciones F2 cuyos frutos presentaron un brillo más cercano al de las plantas WT control (Tablas 10 y 11). A la vista de los resultados obtenidos, no pudimos relacionar la presencia de la mutación *lox3/4* con variaciones en el peso medio, curvatura, relación L/D o brillo de los frutos.

Tabla 10. Caracterización del peso medio, tamaño del cierre pistilar, curvatura, relación L/D, lustre y costillas, de los frutos producidos por las plantas de la población F2 (13B x *lox3/4*), agrupadas por genotipo, y de las plantas control WT y M5 *lox3/4*. Las distintas letras en cada parámetro indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

	CONTROL		F2 (13B x <i>lox3/4</i>)		
	Controles WT	Controles <i>lox3/4</i>	<i>wt/wt</i>	<i>wt/lox</i>	<i>lox/lox</i>
Peso medio	225,72 ± 11,22 ab	237,33 ± 9,69 a	215,01 ± 16,04 b	223,10 ± 7,84 ab	188,08 ± 6,65 ab
Tamaño cierre pistilar	3,00 ± 0,19 ab	2,55 ± 0,21 b	3,56 ± 0,30 a	3,29 ± 0,13 a	2,54 ± 0,15 b
Curvatura	1,80 ± 0,20 a	2,00 ± 0,19 a	1,88 ± 0,17 a	2,00 ± 0,10 a	2,02 ± 0,13 a
Relación L/D	4,53 ± 0,10 ab	4,24 ± 0,09 b	2,87 ± 0,19 ab	3,29 ± 0,08 ab	3,62 ± 0,11 a
Brillo	3,75 ± 0,12 a	2,90 ± 0,12 b	3,32 ± 0,21 ab	3,32 ± 0,12 ab	3,81 ± 0,12 a
Costillas	2,40 ± 0,23 ab	2,50 ± 0,17 a	2,16 ± 0,15 ab	1,84 ± 0,10 b	2,40 ± 0,10 ab

Tabla 11. Caracterización del peso medio, tamaño del cierre pistilar, curvatura, relación L/D, lustre y costillas, de los frutos producidos por las plantas de la población F2 (60B x *lox3/4*), agrupadas por genotipo, y de las plantas control WT y M5 *lox3/4*. Las distintas letras en cada parámetro indican la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de plantas en un análisis LSD ($\alpha = 0.05$).

	CONTROL		F2 (60B x <i>lox3/4</i>)		
	Controles WT	Controles <i>lox3/4</i>	<i>wt/wt</i>	<i>wt/lox</i>	<i>lox/lox</i>
Peso medio	225,72 ± 11,22 a	237,33 ± 9,69 a	207,02 ± 8,00 a	203,34 ± 7,15 a	222,19 ± 8,02 a
Tamaño cierre pistilar	3,00 ± 0,19 a	2,55 ± 0,21 ab	2,78 ± 0,12 a	3,00 ± 0,13 a	1,95 ± 0,13 b
Curvatura	1,80 ± 0,20 a	2,00 ± 0,19 a	2,14 ± 0,13 a	2,20 ± 0,11 a	1,60 ± 0,11 a
Relación L/D	4,53 ± 0,10 a	4,24 ± 0,09 a	3,49 ± 0,08 a	3,60 ± 0,09 a	3,65 ± 0,06 a
Brillo	3,75 ± 0,12 a	2,90 ± 0,12 b	3,17 ± 0,15 ab	3,37 ± 0,13 ab	3,48 ± 0,14 ab
Costillas	2,40 ± 0,23 b	2,50 ± 0,17 b	3,61 ± 0,14 a	3,46 ± 0,13 a	3,57 ± 0,13 a

En cambio, sí pareció haber una relación entre la presencia de la mutación *lox3/4* y el tamaño del cierre pistilar de los frutos. Los frutos control M5 *lox3/4* presentaron un cierre pistilar más pequeño que los frutos WT control (Tablas 10 y 11). Esta diferencia, que no fue estadísticamente significativa en el caso de los controles, se acrecentó hasta ser estadísticamente significativa entre los frutos *lox/lox* de las poblaciones F2 y los frutos *wt/wt* y *wt/lox* de estas poblaciones (Tablas 10 y 11). Finalmente, los frutos de la población F2 (60B x *lox3/4*), independientemente de la presencia de la mutación *lox3/4*, presentaron unas costillas más marcadas que los frutos de la población F2 (13B x *lox3/4*) o los frutos cosechados de las plantas control (Figura 23), esta característica muy probablemente fue heredada de la línea precomercial 60B cuyos frutos también poseen costillas marcadas (Figura 11B).

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo de fin de grado ha permitido evaluar los efectos de la mutación *lox3/4* en las líneas precomerciales de calabacín 13B y 60B. Como ya indicamos en la introducción, las líneas precomerciales 13B y 60B forman parte del programa de mejora de calabacín de la empresa “Green Breeding Biotech S.L.” (GBB), mientras que la mutación *lox3/4* ha sido detectada en la colección de mutantes EMS creada por el grupo de investigación de Genética de Hortícolas de la Universidad de Almería (UAL) (García et al., 2018). La mutación *lox3/4* consiste en un cambio puntual de una guanina (G) por un a adenina (A), dentro de un gen 13-LIPOXYGENASE, implicado en la síntesis de jasmonatos (Cebrián, comunicación personal). Este cambio genera una serie de alteraciones fenotípicas, tanto a nivel de planta como de fruto, frente a las plantas de la misma familia de la colección EMS donde esta mutación no está presente (Plantas WT). Entre estos cambios destaca la no maduración de las corolas de sus flores, lo que provoca que estas no se abran y permanezcan pegadas al fruto en el momento de su cosecha, y el alto grado de partenocarpia que presentan las plantas mutantes lo que supone un aumento notable en la productividad de las plantas y en el porcentaje de frutos comerciales que producen.

Sin embargo, nuestra colección de mutantes EMS fue desarrollada a partir de semillas de MUC-16, variedad tradicional de origen valenciano ampliamente usada en trabajos de genética de calabacín (García et al. 2016, 2020a, 2020b). MUC-16 se caracteriza por tener una baja productividad y partenocarpia, lo que supone que esta variedad presente un bajo interés agronómico (Esteras et al., 2012; Martínez-Valdivieso et al., 2012; Sierra, 2016). Por este motivo, se decidió introgresar la mutación *lox3/4* en líneas de carácter precomercial para estudiar el potencial comercial de la mutación *lox3/4*, objetivo de este TFG.

Por tanto, el primer paso fue la obtención de poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*) en las cuales la mutación *lox3/4* segregara. Se cruzaron plantas de la generación F9 de ambas líneas precomerciales con plantas de la generación M5 del mutante de la colección EMS *lox3/4*. A continuación, diferentes plantas de las poblaciones F1 fueron autopolinizadas para obtener las poblaciones F2 utilizadas en este estudio. Una vez sembradas las poblaciones F2, se analizó la segregación de la mutación *lox3/4* en estas poblaciones, confirmando que la misma segregaba como una mutación puntual que afecta a un único gen (Fernández, 2014; Barrantes-Santamaría et al. 2020): 1 planta *wt/wt*: 2 plantas *wt/lox*: 1 planta *lox/lox*. Por otra parte, como ya se ha comentado varias veces en este TFG, la mutación *lox3/4* impide la maduración de la corola de las flores, obstaculizando la apertura de las mismas, siendo este el fenotipo más característico de la mutación. El estudio de la segregación de este fenotipo en las poblaciones F2 indicó que el mismo segregaba en una proporción de 3 plantas con maduración de la corola: 1 planta sin maduración de la corola, expresándose el fenotipo solo en las plantas en las cuales la mutación *lox3/4* estaba en homocigosis. Esto confirmo que la mutación *lox3/4* era una mutación recesiva, al igual que otras mutaciones que afectan a la expresión de lipoxigenasas como las descritas por Weber (2002) y Choi et al. (2021). La mutación *lox3/4*, en homocigosis, afecta de al desarrollo de la corola debido a la inhibición de la ruta de biosíntesis de los jasmonatos, los cuales están ligados a una correcta apertura de la corola durante la antesis floral (Stitz

et al., 2014). Lo que explica la falta de maduración de la corola, y la falta de apertura de las flores en las plantas *lox/lox* independientemente del fondo genético en el que esté insertada la mutación.

Los jasmonatos también juegan un papel importante en la maduración y en las características fenotípicas de los frutos de calabacín influyendo en aspectos como el color de los frutos (Rudell et al., 2005), ya que durante su maduración intervienen en las rutas de biosíntesis de pigmentos como las antocianinas (Liu, 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos en este TFG indicaron que no hay relación entre el color, el moteado y el rayado de los frutos y la presencia de la mutación *lox3/4* (Tabla 5). En la población F2 (13B x *lox3/4*), apenas hubo segregación en cuanto al color y rayado de sus frutos (Figura 17), probablemente porque los parentales *lox3/4* y 13B son similares para estas características (Figuras 11C y 11A). En cambio, en la población F2 (60B x *lox3/4*) sí existió una segregación clara para el color y algunos frutos presentaron rayado (Figura 17). Esta segregación no tiene relación directa con la presencia o ausencia de la mutación *lox3/4*, y sí con la segregación de las características de los parentales de esta familia en la F2. Los frutos de la línea precomercial 60B son blancos y ligeramente rayados, mientras que los frutos de las plantas M5 *lox3/4* son verdes sin rayar (Figuras 11B y 11C). El color blanco fue el predominante en los frutos de esta F2, el 72% de las plantas produjeron frutos blancos, debido que a la coloración blanca está controlada por una relación epistática dominante entre dos genes (Globerson, 1969). En ambas poblaciones, existió una enorme variabilidad con respecto al moteado de los frutos, pero tras su análisis tampoco parece que tenga relación con la mutación *lox3/4*.

Diferentes aspectos fenotípicos de las plantas como el porte, vigor, arquitectura o grado de ramificación afectan al crecimiento, productividad o tolerancia frente a estreses abióticos y bióticos de las mismas (Lo et al., 2017; Sun et al., 2019a; Sun et al., 2019b; Guo et al., 2020b). Por ejemplo, un porte arbustivo y la ausencia de ramificaciones facilitan el cosechado de frutos (Martínez-Valdivieso et al. 2012), o una arquitectura abierta favorece un modo de agricultura intensivo al haber una mayor aireación entre las hojas de las plantas lo que dificulta la proliferación de hongos (Tian, J. et al., 2019). Estas características están controladas por complejas redes de interacción en las que están implicadas un gran número de fitohormonas como los jasmonatos (Guo et al., 2020a). De este modo la mutación *lox3/4*, que inhibe la ruta de biosíntesis de los jasmonatos, podría afectar a estas características de las plantas. Es más, las plantas control M5 *lox3/4* presentaron una arquitectura más abierta y un menor vigor que las plantas WT control (Tablas 8 y 9). Esto concuerda con estudios recientes en los que se ha observado que la interrupción de las rutas de biosíntesis de jasmonatos debido a mutaciones en lipoxigenasas, reducen el vigor de las plantas (Kimberlin et al., 2019). Sin embargo, estas diferencias en la arquitectura y vigor de las plantas no se mantuvieron en las poblaciones F2 estudiadas (Tablas 8 y 9). Todas las plantas de estas poblaciones presentaron una arquitectura similar a las de las plantas WT control, independientemente de la presencia o no de la mutación *lox3/4*, y un vigor intermedio en comparación con las plantas control M5 *lox3/4* y WT control. En el caso de la población F2 (60B x *lox3/4*) las plantas *lox/lox* si presentaron un vigor menor que las plantas *wt/lox* y *wt/wt*, pero estas diferencias no fueron significativas estadísticamente, por lo que no podemos establecer una relación entre la mutación *lox3/4* y un menor vigor de las plantas.

Otra de las diferencias observadas entre las plantas control M5 *lox3/4* y las plantas WT control es que las plantas mutantes presentan un alto índice de partenocarpia, que se traduce en un importante incremento de su productividad. Este alto grado de partenocarpia, inducida por la presencia de la mutación *lox3/4*, tiene un importante potencial comercial, pudiendo ser una alternativa al uso de fitohormonas sintéticas para el cuajado de los calabacines en cultivos protegidos (Kim et al., 1992; Li et al., 2003; Fu et al., 2008; Manzano et al., 2010). Sin embargo, como ya se ha comentado al principio de esta discusión, nuestra colección de mutantes EMS fue desarrollada a partir de semillas de MUC-16, que se caracteriza por tener una baja productividad y partenocarpia. Así que es importante comprobar si la mutación *lox3/4* produce un incremento en la productividad de otras líneas de calabacín. Si comparamos la productividad, entendida como número de frutos producidos por planta y semana, entre los diferentes tipos de plantas de las poblaciones F2 (13B x *lox3/4*) y F2 (60B x *lox3/4*), vemos que las plantas *lox/lox* produjeron un número ligeramente mayor de frutos que los otros dos grupos de plantas, pero este incremento no fue estadísticamente significativo ni comparable con el incremento observado en el número de frutos producidos por las plantas control M5 *lox3/4* respecto a las plantas WT control (Figura 18). Al expresar esta producción en gramos producidos por planta y semana, estas diferencias desaparecieron en el caso de la población F2(13B x *lox3/4*) y aumentaron en el caso de la población F2 (60B x *lox3/4*), pero siguieron sin ser estadísticamente significativas.

En este punto debemos considerar que no todos los frutos producidos por las plantas estudiadas son comerciales, ya que algunos frutos no presentan un desarrollo homogéneo, quedándose “chupados” en el ápice de los mismos (Figura 14C), los cuales carecen de valor comercial (Pelaez et al., 1984; Lang & Ermini, 2009). De este modo es importante realizar una corrección de la producción teniendo en cuenta este factor. El hecho de que las plantas *lox/lox* de las diferentes poblaciones estudiadas produjeran un mayor porcentaje de frutos comerciales que las plantas *wt/lox* y *wt/wt* (Figura 24), supuso que las diferencias en la producción comercial entre las plantas *lox/lox* y las *wt/lox* y *wt/wt* fueran mayores que en el caso de la producción total llegando a ser estadísticamente significativas para la población F2 (13B x *lox3/4*) (Figura 20), pero continuaron estando muy lejos de las diferencias de producción encontradas entre las plantas control M5 *lox3/4* y WT control. También es importante señalar, que tal como se esperaba, las plantas *wt/wt* de las poblaciones F2 estudiadas fueron hasta cuatro veces más productivas que las plantas WT control. Los datos de producción obtenidos nos permiten concluir que si bien la partenocarpia inducida por la mutación *lox3/4* en homocigosis, aumenta la productividad de las plantas de calabacín, especialmente la productividad comercial, este aumento es mucho mayor en fondos genéticos cuya productividad es pequeña que en fondos genéticos que ya presentan una productividad alta debida a una selección genética previa, como es el caso de las líneas precomerciales 13B y 60B.

Como ya hemos comentado en el párrafo anterior, la partenocarpia inducida por la mutación *lox3/4* en homocigosis hizo aumentar el porcentaje de frutos comerciales tanto en las plantas control como en las poblaciones F2 (Figura 24). Otro fenotipo fuertemente ligado a la partenocarpia es el de “flor pegada” (Del Rio et al., 2016), que en el caso de la mutación *lox3/4* se vería reforzado por la falta de maduración de las corolas y la no apertura de la flor. De este modo, el 100% de los frutos cosechados de plantas control M5 *lox3/4* presentaron la flor pegada en el momento de su caracterización (Figuras

25 y 14A). Este porcentaje disminuyó hasta un $79,37 \pm 5,10$ % y un $71,43 \pm 6$ % en los frutos *lox/lox* de las poblaciones F2, pero muchos de estos frutos que no presentaban la flor pegada en el momento de su caracterización la habían perdido en el proceso de cosechado y traslado a la nave donde se procesaban. También es importante destacar que de las plantas *wt/lox* y *wt/wt* de las poblaciones F2 se cosechó un porcentaje pequeño, pero significativo en comparación con las plantas WT control, de frutos con flor pegada debido muy posiblemente a la partenocarpia parcial que ya presentan las líneas precomerciales 13B y 60B. Un problema habitualmente asociado a la flor pegada, es que al caerse o ser retirada esta suele producir un cierre pistilar de gran tamaño. Sin embargo, en el caso de la flor pegada producida por la mutación *lox3/4* esto no sucede, es más los frutos control M5 *lox3/4* presentaron un cierre pistilar más pequeño que los frutos WT control y estas diferencias se acrecentaron en las poblaciones F2 (Tablas 10 y 11), lo cual resulta beneficioso para su puesta en el mercado (Gázquez, 2018). Esto puede estar relacionado con el modo en que se produce la flor pegada en los mutantes *lox3/4*, debido a la no maduración de las corolas y la no apertura de las flores.

Para el resto de parámetros evaluados en la caracterización de los frutos de las poblaciones F2: peso medio, curvatura, relación L/D, brillo y costillas (Tablas 10 y 11) (Figuras 22 y 23), no se evidenciaron variaciones ligadas a la presencia o ausencia de la mutación *lox3/4*, siendo sus herencias independientes de la misma tal y como demuestra la propia variación existente dentro de cada parámetro y de cada población.

Los resultados obtenidos en el presente TFG han permitido comprobar que la mutación *lox3/4* mantiene un alto potencial comercial al ser introgresada en otros fondos genéticos distintos a MUC-16, por lo que podemos establecer las siguientes conclusiones.

6. CONCLUSIONES

1. La mutación *lox3/4* segrega en las poblaciones F2 estudiadas como una mutación simple (1 planta *wt/wt*: 2 plantas *wt/lox*: 1 planta *lox/lox*) y recesiva (3 plantas con maduración de la corola: 1 planta sin maduración de la corola), existiendo una correlación perfecta entre dicha mutación y la falta de maduración y apertura de la corola.
2. La partenocarpia inducida por la mutación *lox3/4* aumenta la productividad de las plantas de calabacín, pero este aumento es mucho mayor en fondos genéticos cuya productividad es pequeña que en fondos genéticos cuya productividad es alta.
3. La falta de maduración de la corola producida por la mutación *lox3/4* se correlaciona con un mayor porcentaje de frutos comerciales, que mantienen la flor pegada y que presentan un cierre pistilar de menor tamaño.
4. La mutación *lox3/4* no afecta a otras características de las plantas de calabacín como porte, vigor, arquitectura o grado de ramificación de las plantas, o de los frutos cosechados de las mismas: peso medio, color, moteado, rayado, curvatura, relación longitud/diámetro, brillo o presencia de costillas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agbaje, G. O., Oloyede, F. M., & Obisesan, I. O. (2012). Effects of NPK fertilizer and season on the flowering and sex expression of pumpkin (*Cucurbita pepo* Linn.). *Int. J. Agri. Sci*, 2, 291-95.

Ayala-Tafoya, F., Partida-Ruvalcaba, L., Velázquez-Alcaraz, T. J., & Díaz-Valdés, T. (2012). Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético y producción de calabacita en invernadero. *JE Guerra L., JE Cruz O., JR García Q., TP Godoy A., L. Partida R. y S. Hernández V.(Coord.). Tópicos selectos deficiencias agropecuarias. Ed. Universidad Autónoma de Sinaloa. México*, 61-78.

Barrantes-Santamaría, W., Granell, A., & Monforte, A. J. (2020). Mapeo de un gen implicado en segregación distorsionada en poblaciones interespecíficas de tomate. *Agronomía Mesoamericana*, 31(2), 419-431.

Blanca, J., Cañizares, J., Roig, C., Ziarsolo, P., Nuez, F., & Picó, B. (2011). Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *BMC genomics*, 12(1), 1-15.

Blanca, J., Esteras, C., Ziarsolo, P., Perez, D., Fernandez-Pedrosa, V., Collado, C. et al., (2012). Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. *BMC Genom* 13:280.

Blancard, D., Lecoq, H., & Pitrat, M. (1994). A colour atlas of cucurbit diseases: observation, identification and control. Manson Publishing Ltd. Halstead Press. New York, New York, USA.

Castellanos-Morales G., Ruiz-Mondragón K. Y., Hernández-Rosales H. S., Sánchez-De la Vega G., Gámez N., Aguirre-Planter E., Montes-Hernández S., Lira-Saade R. y Eguiarte L. E. (2019). Tracing back the origin of pumpkins (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo* L.) in Mexico. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 286(1908).

Cebrián, G., García, A., Iglesias-Moya, J., Romero, J., Martínez, C., Garrido, D. & Jamilena, M. (2021) a. Two induced EMS mutations conferring parthenocarpy in *Cucurbita pepo*. *XII Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*, 85.

Cebrián, G., Iglesias-Moya, J., García, A., Martínez, J., Romero, J., Regalado, J. J., ... & Jamilena, M. (2021) b. Involvement of ethylene receptors in the salt tolerance response of *Cucurbita pepo*. *Horticulture research*, 8(1), 1-14.

Choi, S. W., Kang, J. E., Lee, S. K., Ly, S., & Chung, J. I. (2021). Breeding of Black Soybean with Green Cotyledon and Four Recessive Alleles for Lipoyxygenase, Kunitz Trypsin Inhibitor, Lectin, and Stachyose. *Agronomy*, 11(2), 309

Choudhury, B., 1996. *Vegetables*. National Book Trust, New Delhi, India.

Cobbey H. C, S. Leslie and Steele W. M. (1976). *An Introduction to the Botany of Tropical Crops*. 2nd ed., Longman Inc; New York.

Cutler, H. C., & Whitaker, T. W. (1961). History and distribution of the cultivated cucurbits in the Americas. *American Antiquity*, 469-485.

- de Wilde, W. J. J. O., & Duyfjes, B. E. E. (2010). Cucurbitaceae. Flora Malesiana-Series 1, Spermatophyta, 19(1), 1-333.
- Decker, D.S. (1988). Origin (s), Evolution, and Systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Econ Bot*, 42:4-15.
- Del Rio, M., Cabrera, R., García, M. C., Pomares-Viciano, T., & Gómez, P. (2016, April). Biomarkers for selection of parthenocarpic zucchini cultivars. In III International Symposium on Organic Greenhouse Horticulture 1164 (pp. 93-100).
- Duchesne, A. N. (1786). *Essai sur l'histoire naturelle des courges*. Panckoucke.
- El Batran, S. A. E. S., El-Gengaihi, S. E., & El Shabrawy, O. A. (2006). Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 108(2), 236-242.
- El-Keblawy, A. L. I., & Lovett-Doust, J. (1996). Resource re-allocation following fruit removal in cucurbits: patterns in two varieties of squash. *New Phytologist*, 133(4), 583-593.
- Ertek, A., Şensoy, S., Küçükyumuk, C., & Gedik, I. (2004). Irrigation frequency and amount affect yield components of summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Agricultural water management*, 67(1), 63-76.
- Esquinas-Alcazar, J. T. y Gulick, P. J. (1983). *Genetic Resources of Cucurbitaceae: A Global Report*. IBPGR Secretariat, Rome.
- Esteras, C., Gómez, P., Monforte, A. J., Blanca, J., Vicente-Dólera, N., Roig, C., ... & Picó, B. (2012). High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC genomics*, 13(1), 1-21.
- FEPEX: Federación española de asociaciones de productores exportadores de frutas, hortalizas, flores y plantas vivas. (2020).
- Fernández, D. A. (2014). *Análisis de segregación de marcadores microsatélites en una población de mapeo F2 para el carácter alto oleico en girasol cultivado (Helianthus annuus var. macrocarpus)* (Doctoral dissertation, Tesis inédita de Licenciatura). Posadas, Misiones (AR): Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales).
- Ferriol, M., Pico, B., & Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(2), 271-282.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1990-2019). FAOSTAT statistics database.
- Fu, F. Q., Mao, W. H., Shi, K., Zhou, Y. H., Asami, T., & Yu, J. Q. (2008). A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. *Journal of Experimental Botany*, 59(9), 2299-2308.
- Galpaz, N., Gonda, I., Shem-Tov, D., Barad, O., Tzuri, G., Lev, S., ... & Katzir, N. (2018). Deciphering genetic factors that determine melon fruit-quality traits using RNA-Seq-based high-resolution QTL and eQTL mapping. *The Plant Journal*, 94(1), 169-191.
- García, A., Aguado, E., Parra, G., Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., ... & Jamilena, M. (2018). Phenomic and genomic characterization of a mutant platform in *Cucurbita pepo*. *Frontiers in plant science*, 9, 1049.

García, A., Aguado, E., Megías, Z., Martínez, C., Garrido, D., & Jamilena, M. (2016). Isolation and characterization of three recessive andromonoecious mutants of *Cucurbita pepo*. In *Proceedings of Cucurbitaceae* (pp. 24-28).

García, A., Aguado, E., Cebrián, G., Iglesias, J., Romero, J., Martínez, C., ... & Jamilena, M. (2020) a. Effect of Ethylene-Insensitive Mutation *etr2b* on Postharvest Chilling Injury in Zucchini Fruit. *Agriculture*, 10(11), 532.

García, A., Aguado, E., Garrido, D., Martínez, C., & Jamilena, M. (2020) b. Two androecious mutations reveal the crucial role of ethylene receptors in the initiation of female flower development in *Cucurbita pepo*. *The Plant Journal*, 103(4), 1548-1560.

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

Gázquez, A. G. (2018). Evaluación agronómica y descripción de las variedades de melocotonero (*prunus persica* l.) imida-novamed: alisio 20[®], siroco 20[®], siroco 30[®], siroco 40[®], siroco 43[®], levante 40[®] y levante 45[®] (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica de Cartagena).

Globerson, D. (1969). The inheritance of white fruit and stem color in summer squash *Cucurbita pepo* L. *Euphytica*, 18(2), 249-255.

Graifenberg, A., Botrini, L., Giustiniani, L., & Lipucci Di Paola, M. (1996). Yield, growth and element content of zucchini squash grown under saline-sodic conditions. *Journal of Horticultural Science*, 71(2), 305-311.

Grosch H.D., Belitz W. (1987). *Food chemistry*. Springer-Verlag, Berlin.

Guo, W., Chen, L., Chen, H., Yang, H., You, Q., Bao, A., ... & Cao, D. (2020) a. Overexpression of *GmWRI1b* in soybean stably improves plant architecture and associated yield parameters, and increases total seed oil production under field conditions. *Plant biotechnology journal*, 18(8), 1639-1641.

Guo, W., Chen, L., Herrera-Estrella, L., Cao, D., & Tran, L. S. P. (2020) b. Altering plant architecture to improve performance and resistance. *Trends in Plant Science*, 25(11), 1154-1170.

Gur, A., Tzuri, G., Meir, A., Sa'ar, U., Portnoy, V., Katzir, N., ... & Tadmor, Y. (2017). Genome-wide linkage-disequilibrium mapping to the candidate gene level in melon (*Cucumis melo*). *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Jeffrey, C. (1990). An outline classification of the Cucurbitaceae (Appendix). In: Bates D.M., Robinson W.R. and Jeffrey C. (eds), *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 449-463.

Jorde, L. B., Carey, J. C., & Bamshad, M. J. (2020). *Genética médica*. Elsevier.

Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M. A., Gosálvez, B., Castillo, P., ... & Navas-Castillo, J. (2014). First detection of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Spain. *Plant Disease*, 98(6), 857-857.

- Kacprzak, M., & Mańka, M. (2000). Effect of soil fungi communities on the growth of damping-off pathogens in relation to incubation temperature and medium pH. *Acta Mycologica*, 35(2), 275.
- Kater, M. M., Franken, J., Carney, K. J., Colombo, L., & Angenent, G. C. (2001). Sex determination in the monoecious species cucumber is confined to specific floral whorls. *The Plant Cell*, 13(3), 481-493.
- Kim, I. S., Okubo, H., & Fujieda, K. (1992). Endogenous levels of IAA in relation to parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 52(1-2), 1-8.
- Kimberlin, A., Leiboff, S., Koo, A. J., & Hake, S. (2019). Tasselseed5 overexpresses a wound-inducible enzyme, ZmCYP94B1, that affects jasmonate catabolism, sex determination, and plant architecture in maize. *Communications biology*, 2(1), 1-11
- Lang, M. D. L. C., & Ermini, P. (2009). Ensayo comparativo de rendimiento y calidad de frutos de zapallo tipo "anco" (*Cucurbita moschata*) en la EEA Anguil de la región semiárida pampeana. *Semiárida*, 20, 51-57.
- Li, Y., Yu, J. Q., Ye, Q. J., Zhu, Z. J., & Guo, Z. J. (2003). Expression of CycD3 is transiently increased by pollination and N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea in ovaries of *Lagenaria leucantha*. *Journal of experimental botany*, 54(385), 1245-1251.
- Linné, C. V. (1753). *Species Plantarum*, vol. 2. Londres. The Ray Society.
- Liska, D., Bland, J., Lukacze, D., Jones, D. S., & Lerman, R. H. (2004). *Clinical nutrition: A functional approach* (2nd ed.). Gig Harbor, WA: Institute for Functional Medicine.
- Liu, L., Wei, J., Zhang, M., Zhang, L., Li, C., & Wang, Q. (2012). Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. *Journal of Experimental Botany*, 63(16), 5751-5761.
- Lo, S. F., Ho, T. H. D., Liu, Y. L., Jiang, M. J., Hsieh, K. T., Chen, K. T., ... & Yu, S. M. (2017). Ectopic expression of specific GA 2 oxidase mutants promotes yield and stress tolerance in rice. *Plant biotechnology journal*, 15(7), 850-864.
- López, J. (2016). Calabacín. En J. Maroto Borrego, & C. Baixauli Soria, *Cultivos hortícolas al aire libre* (págs. 595-623). Cajamar Caja Rural.
- MacNab, A. A., Sherf, A. F., & Springer, J. K. (1994). *Identifying diseases of vegetables*. Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences, University Park, Pennsylvania, USA.
- Mann, L. K., & Robinson, J. (1950). Fertilization, seed development, and fruit growth as related to fruit set in the cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *American Journal of Botany*, 37(9), 685-697.
- Manzano, S., Martínez, C., Domínguez, V., Avalos, E., Garrido, D., Gómez, P., & Jamilena, M. (2010). A major gene conferring reduced ethylene sensitivity and maleness in *Cucurbita pepo*. *Journal of plant growth regulation*, 29(1), 73-80.
- MAPAMA: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2018). *Anuario de estadística 2017*. Madrid, España.
- Maroto Borrego, J. V. (2002). *Horticultura herbácea especial*. (5 ed.)

- Martínez, C., Manzano, S., Megías, Z., Garrido, D., Picó, B., & Jamilena, M. (2013). Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in fruit set and early fruit development in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *BMC plant biology*, 13(1), 1-14.
- Martínez-Valdivieso, D., Gómez, P., Vicente-Dólera, N., Rubira, F., Moya, M., & Del Río Celestino, M. (2012). Obtención y caracterización de mutantes morfológicos en calabacín (*Cucurbita pepo* spp. *pepo*). XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Almería, España.
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Bombarely, A., Ziarsolo, P., Esteras, C., Martí-Gómez, C., ... & Cañizares, J. (2018). De novo assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the *Cucurbita* genus. *Plant biotechnology journal*, 16(6), 1161-1171.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4326.
- Naudin, C. (1856). *Nouvelles recherches sur les caractères spécifiques et les variétés des plantes du genre Cucurbita*. V. Masson.
- Neelam, K., Brown-Guedira, G., & Huang, L. (2013). Development and validation of a breeder-friendly KASPar marker for wheat leaf rust resistance locus Lr21. *Molecular breeding*, 31(1), 233-237.
- Noll, F. (1902). *Über Fruchtbildung ohne vorausgegangene Bestäubung (Parthenocarpie) bei der Gurke*. Universitäts-Buchdruckerei.
- París, H. S. (2001). History of the cultivar- groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Review* 25: 71-170.
- Paris, H. S. (2007). The drawings of Antoine Nicolas Duchesne for his natural history of the gourds. In: E´rard C (ed). *Museum National d’Histoire Naturelle*, Paris.
- París, H. S., Lebeda, A., Kristkova, E., Thomas, C., & Michael, H. N. (2012). Parallel Evolution Under Domestication and Phenotypic Differentiation of the Cultivated Subspecies of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). En *Economic Botany* (págs.71-90). Bronx, New York: The New York Botanical Garden Press.
- Pathak, H., Ladha, J. K., Aggarwal, P. K., Peng, S., Das, S., Singh, Y., ... & Gupta, R. K. (2003). Trends of climatic potential and on-farm yields of rice and wheat in the Indo-Gangetic Plains. *Field Crops Research*, 80(3), 223-234.
- Pelaez, J. P. R., de la Pava, C. C., & Jaramillo, J. (1984). Respuesta del calabacín (*Cucurbita pepo* L.) a fertilización con nitrógeno, fosforo, potasio y materia orgánica. *Acta Agronómica*, 34(3), 86-95.
- Peñaranda, A., Payan, M. C., Garrido, D., Gómez, P., & Jamilena, M. (2007). Production of fruits with attached flowers in zucchini squash is correlated with the arrest of maturation of female flowers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(4), 579-584.
- Reche Mármol, J. (1997). *Cultivo del calabacín en invernadero* (No. 635.6283). Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Almería.
- Renner, S. S., & Schaefer, H. (2016). Phylogeny and evolution of the *Cucurbitaceae*. In *Genetics and genomics of Cucurbitaceae* (pp. 13-23). Springer, Cham.

- Roberts, E. H. (1988). Temperature and seed germination. In *Symposia of the Society for Experimental Biology* (Vol. 42, pp. 109-132).
- Robinson, R. W., & Reiners, S. (1999). Parthenocarpy in summer squash. *HortScience*, 34(4), 715-717.
- Rojas, L., Collado, R., García, A. L., Rivero, L., Ocaña, B., Hernández, M., ... & García, L. R. (2016). Concentración óptima de Metano Sulfonato de Etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'DOR 364' para inducir variaciones fenotípicas. *Biotecnología vegetal*, 16(3).
- Roy, S. K., & Chakrabarti, A. K. (2003). *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (Second Edition). In: Caballero, B., Trugo, L. C., & Finglas, P. M. (eds).
- Rudell, D. R., Fellman, J. K., & Mattheis, J. P. (2005). Preharvest application of methyl jasmonate to 'Fuji' apples enhances red coloration and affects fruit size, splitting, and bitter pit incidence. *HortScience*, 40(6), 1760-1762.
- Schaefer, H., & Renner, S. S. (2010). A three-genome phylogeny of *Momordica* (Cucurbitaceae) suggests seven returns from dioecy to monoecy and recent long-distance dispersal to Asia. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(2), 553-560.
- Schaefer, H., & Renner, S. S. (2011). The Families and Genera of Vascular Plants. Cucurbitaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). Berlin: Springer. Vol. 10, pp. 112-174.
- Schapendonk, A. H. C. M., & Brouwer, P. (1984). Fruit growth of cucumber in relation to assimilate supply and sink activity. *Scientia Horticulturae*, 23(1), 21-33.
- Schwabe, W. W., WW, S., & JJ, M. (1981). Hormones and parthenocarpic fruit set.
- Serrano Cermeño, Z. (1973). Cultivo del calabacín. Madrid: Hojas divulgadoras. Ministerio de Agricultura.
- Sharma, A., Katoch, V., & Rana, C. (2016). Important Diseases of Cucurbitaceous Crops and Their Management. *Handbook of Cucurbits*, 301-323. doi:10.1201/b19233-26.
- Shinozaki, Y., Nicolas, P., Fernandez-Pozo, N., Ma, Q., Evanich, D. J., Shi, Y., ... & Rose, J. K. (2018). High-resolution spatiotemporal transcriptome mapping of tomato fruit development and ripening. *Nature communications*, 9(1), 1-13.
- Shnaider, Y., Mitra, D., Miller, G., Baniel, A., Doniger, T., Kuhalskaya, A., ... & Perl-Treves, R. (2018). Cucumber ovaries inhibited by dominant fruit express a dynamic developmental program, distinct from either senescence-determined or fruit-setting ovaries. *The Plant Journal*, 96(3), 651-669.
- Sierra, Z. M. M. (2016). *Genetic and molecular analysis of cold tolerance and postharvest fruit quality in zucchini (Cucurbita pepo L.) análisis genético y molecular de la tolerancia a frío y la calidad poscosecha de los frutos de calabacín, (Cucurbita pepo L.)* (Doctoral dissertation, Universidad de Almería).
- Smith, B. D. (1997) a. The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science*, 276(5314), 932-934.

- Smith, D. S. (1997) b. Summer squash (*Cucurbita pepo* L.) leaf number as influenced by thermal time. *Scientia horticulturae*, 68(1-4), 219-225.
- Stitz, M., Hartl, M., Baldwin, I.T., & Gaquerel, E. (2014). Jasmonoyl-L-isoleucine coordinates metabolic networks required for anthesis and floral attractant emission in wild tobacco (*Nicotiana attenuata*). *The Plant Cell*, 26(10), 3964-3983.
- Sun, Q., Li, T. Y., Li, D. D., Wang, Z. Y., Li, S., Li, D. P., ... & Xuan, Y. H. (2019). Overexpression of loose plant architecture 1 increases planting density and resistance to sheath blight disease via activation of PIN-FORMED 1a in rice. *Plant biotechnology journal*, 17(5), 855.
- Sun, Z., Su, C., Yun, J., Jiang, Q., Wang, L., Wang, Y., ... & Li, X. (2019). Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of *GmmiR156b*. *Plant biotechnology journal*, 17(1), 50-62.
- Tian, J., Wang, C., Xia, J., Wu, L., Xu, G., Wu, W., ... & Tian, F. (2019). Teosinte ligule allele narrows plant architecture and enhances high-density maize yields. *Science*, 365(6454), 658-664.
- Valadez, L. A. (1990). Producción de hortalizas (Ed.) Limusa, México, D.F. 223 p.
- Varoquaux, F., Blanvillain, R., Delseny, M., & Gallois, P. (2000). Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends in biotechnology*, 18(6), 233-242.
- Vicente-Dolera, N., Troadec, C., Moya, M., del Rio-Celestino, M., Pomares-Viciano, T., Bendahmane, A., ... & Gómez, P. (2014). First TILLING platform in *Cucurbita pepo*: a new mutant resource for gene function and crop improvement. *PLoS One*, 9(11), e112743.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1987). Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In *Lipids: structure and function* (pp. 53-90). Academic Press.
- Vidal, M. D. G., Jong, D. D., Wien, H. C., & Morse, R. A. (2010). Pollination and fruit set in pumpkin (*Cucurbita pepo*) by honey bees. *Brazilian Journal of Botany*, 33(1), 106-113.
- Villora, G., Pulagar, G., Valenzuela, J. L., & Romero, L. (1995). THE EFFECT OF N, P AND K TREATMENT ON NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES IN TWO DIFFERENTIATED AUBERGINE (*SOLANUM MELONGERNA* cv. BONICA) FRUIT TISSUES. In I International Symposium on Solanacea for Fresh Market 412 (pp. 434-438).
- Villora, G., Pulgar, G., Moreno, D. A., & Romero, L. (1997). Effect of salinity treatments on nutrient concentration in zucchini plants (*Cucurbita pepo* L. var. *Moschata*). *Australian journal of experimental agriculture*, 37(5), 605-608.
- Volz, S. M., & Renner, S. S. (2009). Phylogeography of the ancient Eurasian medicinal plant genus *Bryonia* (*Cucurbitaceae*) inferred from nuclear and chloroplast sequences. *Taxon*, 58(2), 550-560.
- Weber, H. (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in plant science*, 7(5), 217-224.
- Whitaker, T. W., & Bemis, W. P. (1964). Evolution in the genus *Cucurbita*. *Evolution*, 553-559.
- Whitaker, T. W., & Davis, G. N. (1962). Cucurbits. Botany, cultivation, and utilization. *Cucurbits. Botany, cultivation, and utilization*.

Wien, H. C. (1997). *The cucurbits: cucumber, melon, squash and pumpkin*. New York: The physiology of vegetable crops. CABI.

Wien, H. C., Stapleton, S. C., Maynard, D. N., McClurg, C., & Riggs, D. (2004). Flowering, sex expression, and fruiting of pumpkin (*Cucurbita* sp.) cultivars under various temperatures in greenhouse and distant field trials. *HortScience*, 39(2), 239-242.

Wu, S. J., & Ng, L. T. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT-Food Science and Technology*, 41(2), 323-330.

Zhang, L. B., Simmons, M. P., Kocyan, A., & Renner, S. S. (2006). Phylogeny of the Cucurbitales based on DNA sequences of nine loci from three genomes: implications for morphological and sexual system evolution. *Molecular Phylogenetics and evolution*, 39(2), 305-322.

Zitter, T. A. (1986). *Scab of cucurbits*.

Zitter, T. A., Hopkins, D. L., & Thomas, C. E. (1996). *Compendium of cucurbit diseases* (No. 635.6 632). American Phytopathological Society.