



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERIA

Máster en Ingeniería Agronómica

Trabajo Fin de Máster



**"Evaluación fenotípica y fisiológica del
injerto de sandía sobre mutantes
insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*"**

Estudiante: Eduardo Fernández Mengibar

Tutores: Manuel Jamilena Quesada

Encarnación Aguado Donaire

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Agradecimientos

Almería, julio de 2019.

Antes de nada, me gustaría agradecer a aquellas personas que han hecho posible que este trabajo se haya completado con éxito.

Además, quisiera expresar mi agradecimiento a mi tutor, Manuel Jamilena, y las futuras doctoras Encarnación Aguado y Alicia García, por la dedicación y apoyo que me han prestado a lo largo de todo el proceso de elaboración del proyecto. En particular, quiero darle las gracias a Manuel, por su dirección durante la redacción y preparación de este, y a Encarnación y Alicia, por su ayuda durante el trabajo de campo, sus consejos, y la paciencia que ha tenido durante la coordinación y seguimiento del proyecto.

Me gustaría destacar que ha sido todo un placer trabajar con el grupo de investigación encabezado por Manuel Jamilena Quesada, que desde el primer día me acogieron y me ayudaron en todo lo que he necesitado durante estos dos años de proyecto, y que han despertado en mí el interés en el campo de la investigación y, en particular, en la mejora genética vegetal. Y espero y deseo que en el futuro volvamos a colaborar en proyectos de investigación.

Por último, también me gustaría poner en valor el gran trabajo que desempeña la Universidad de Almería y la Escuela Politécnica, en el presente Máster de Ingeniería Agronómica.

ÍNDICE

1. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	11
1.1. Interés del experimento:	11
1.2. Objetivos del proyecto:.....	12
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Introducción.....	14
2.1.1. Historia del cultivo:	14
2.1.2. Descripción botánica:	14
2.1.3. Clasificación taxonómica:.....	16
2.1.4. Situación del cultivo a nivel mundial:.....	16
2.1.5. Situación del cultivo a nivel nacional:	18
2.2. Tipos varietales de sandía:.....	20
2.3. Injertos en sandía:.....	24
2.3.1. La historia del injerto en sandía:.....	24
2.3.2. Tipos de injertos:.....	24
2.3.3. Tipos de portainjertos	27
2.4. Control genético de la determinación sexual en Cucurbitáceas.....	28
2.5. Regulación hormonal de la expresión sexual en Cucurbitáceas.....	29
2.6. Regulación de la síntesis de etileno durante la determinación del sexo... 	30
2.7. Mutantes insensibles a etileno:	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	35
3.1. Material vegetal empleado.....	35
3.2. Ensayo de campo.	36
3.2.1. Emplazamiento del ensayo:	37
3.3. Fases de realización y cronograma asociado:	39
3.4. Manejo del cultivo y métodos empleados:.....	40
3.4.1. Fase de germinación	40
3.4.2. Técnica de triple respuesta a etileno	40
3.4.3. Fase de injertos.	43
3.4.4. Trasplante	48
3.4.5. Evaluación del injerto:.....	50

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

3.4.6. Evaluación de la distribución de flores en el tallo principal y el fenotipo sexual.....	52
3.4.7. Seguimiento del desarrollo del fruto y evaluación de la fertilidad del injerto:	53
3.4.8. Otros caracteres evaluados:.....	53
3.5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos.....	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1. Experimento 0:	57
4.1.1. Evaluación de la viabilidad del proyecto y elección del portainjerto más adecuado a las condiciones de trabajo.....	57
4.2. Ensayo 1:.....	59
4.2.1. Evaluación del injerto.....	59
4.2.2. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre la expresión sexual en sandía.	63
4.2.3. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre el cuajado de los frutos en sandía.....	71
4.3. Ensayo 2:.....	74
4.3.1. Evaluación del injerto.....	74
4.3.2. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre la expresión sexual en sandía.	75
4.3.3. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre el cuajado de los frutos de sandía	81
5. CONCLUSIONES.....	85
6. BIBLIOGRAFÍA	86

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica <i>Citrullus lanatus</i>	16
Tabla 2. Ranking de los 15 países con mayor producción de sandías a nivel mundial (FAOSTAT, 2017).	17
Tabla 3. Ranking de los países con mayor área cosechada de sandías a nivel mundial (FAOSTAT, 2017).	17
Tabla 4. Clasificación de las comunidades autónomas españolas, de mayor a menor área cosechada (Ha), a la izquierda, y producción total (Tn), a la derecha (M.A.P.A., 2017).....	18
Tabla 5. Clasificación de las provincias andaluzas de mayor a menor área cosechada (Ha) y producción total (Tn) (Conserjería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2018).....	19
Tabla 6. Evolución por campaña del Precio Medio en Origen (Observatorio de Precios y Mercados, 2018).	19
Tabla 7. Producciones y superficies de cucurbitáceas en Almería (Conserjería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2018).	20
Tabla 8. Cronograma mensual de las fases del desarrollo experimental.....	39
Tabla 9. Nº de plántulas injertadas en marzo 2018.	45
Tabla 10. Nº de plántulas injertadas en marzo 2019.	46

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variedades de sandía con semilla más populares (Fotos extraídas del catálogo de semillas de cada casa de semillas).

Figura 2. Variedades de sandía sin semilla más populares (Fotos extraídas del catálogo de semillas de cada casa de semillas).

Figura 3. Variedades de sandía tipo Mini más populares (Fotos extraídas del catálogo de semillas de cada casa de semillas).

Figura 4. Distribución de los principales tipos de sandías comercializados. Fuente Observatorio de precios y mercados.

Figura 5. Ilustración del injerto de aproximación (Foto extraída del libro de Gázquez, 2015).

Figura 6. Ilustración del Injerto de púa en hendidura (Foto extraída del libro de Gázquez, 2015).

Figura 7. Ilustración del Injerto adosado (Foto extraída del libro de Gázquez, 2015).

Figura 8. Ilustraciones de los frutos de las principales variedades empleadas como portainjertos en sandías. (Fuente Google Imágenes).

Figura 9. Ciclo de biosíntesis del etileno (Fuente Arc et al., 2013).

Figura 10. Frutos ya cuajados de las cuatro líneas puras de sandía utilizadas (Fernández 2017, trabajo de fin de grado).

Figura 11. Fases de desarrollo de mutantes EMS a partir de la línea pura *MUC-16* de *C. pepo*.

Figura 12. Ortofoto extraída del Visor SigPac V 3.5, de la Universidad de Almería. En azul claro queda resaltado el invernadero donde se llevó a cabo el primer ensayo.

Figura 13. Fundación UAL-ANECOOP.

Figura 14. Fenotipos de triple respuesta a etileno en plántulas etioladas de la familia mutante *EIN-1* de *C. pepo*. Las plantas “WT” mostraron una triple respuesta positiva al etileno, caracterizada por una reducción en la longitud del hipocotilo y la raíz, y un hipocotilo más grueso. Las plantas insensibles al etileno “*ein*” no responden al etileno y muestran hipocotilo más largo y delgado, y raíces más largas. Ciertas plantas en la familia mostraron un fenotipo de triple respuesta intermedia (IN). Fuente García et al., 2018.

Figura 15. Identificación y segregación de las plántulas sensibles/insensibles a etileno, tras el tratamiento con etileno (Foto de elaboración propia).

Figura 16. Segregación mendeliana esperada tras la autofecundación, en una generación BC1 y BC2 heterocigota para la mutación.

Figura 17. Segregación mendeliana esperada tras el retrocruzamiento entre *MUC-16* y *EIN-4*.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Figura 18. Distribución de las plántulas en el ensayo inicial (elaboración propia).

Figura 19. Detalle de cómo logramos mantener la humedad en las cámaras de prendimiento de las instalaciones de UAL-Anecoop (fotos elaboración propia).

Figura 20. Tunelillo semillero Natural Green (foto elaboración propia).

Figura 21. Maceteros empleados en el trasplante, Volumen 5 L.

Figura 22. Distribución de las plantas en el invernadero, Ensayo 1 (elaboración propia).

Figura 23. Visión panorámica del ensayo, recién hecho el trasplante (elaboración propia).

Figura 24. Distribución de las plantas en el invernadero, Ensayo 2 (elaboración propia).

Figura 25. Dos injertos no prendidos de plantas WT sensibles (a la izquierda) y del mutante insensible (a la derecha) del injerto tipo púa en hendidura, debido a un estrangulamiento en el cuello de la raíz (fotos de elaboración propia).

Figura 26. Clasificación de las flores pistiladas de *C. lanatus* según su nivel de bisexualidad, índice de andromonoecia. (fotos elaboración propia).

Figura 27. Proceso de polinización manual (fotos propias).

Figura 28. Evaluación de la viabilidad del injerto.

Figura 29. Tasa de prendimiento, según el tipo de injerto (aproximación, púa en hendidura y adosado), a los 15 días de realización del injerto. Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de injertos ($p \leq 0,05$).

Figura 30. Porcentaje de plantas que sobreviven 10 días tras el trasplante, según el tipo de injerto (aproximación, púa en hendidura y adosado). Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de injertos ($p \leq 0,05$).

Figura 31. Detalles del experimento inicial (fotos propias).

Figura 32. Tasa de prendimiento, según el tipo de portainjerto, a los 15 días de ser injertadas. Se representa el error estándar de cada genotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos fenotipos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “S” patrón sensible y “C” patrón comercial.

Figura 33. Detalle de la plántula en la fase de soldadura de la línea P84. Se observa el estrés que sufre la planta al carecer de instalaciones adecuadas para llevar a cabo el proceso (foto propia).

Figura 34. Fenotipos florales en sandía (elaboración propia).

Figura 35. Número de flores femeninas en el tallo principal de distintos genotipos de sandía injertados sobre 3 patrones de *Cucurbita*: mutante insensible *Ein4*, plantas WT sensibles de la línea *Ein4*, y patrón comercial Shintosa Camelforce. Se han utilizado tres variedades de

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

sandía: P86 (monoica), P84 (parcialmente andromonoica) y P87 (andromonoica). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre plantas de la misma variedad de sandía injertada sobre diferentes patrones de *Cucurbita* ($p \leq 0,05$).

Figura 36. Transición floral femenina (número de nudos hasta la aparición de la primera flor femenina), en función del portainjerto empleado: *EIN-4* Insensible, *EIN-4* Sensible y Shintosa Camelforce; sobre tres variedades de sandía P86 (monoica), P84 (parcialmente andromonoica) y P87 (andromonoica). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre plantas de la misma línea de sandía injertadas sobre distintos patrones ($p \leq 0,05$).

Figura 37. Clasificación de las flores pistiladas de *C. lanatus* según su nivel de bisexualidad, o índice de andromonoecia. Siguiendo las directrices marcadas por la escala descrita por Manzano et al., 2016. I.A. = 1, para flores unisexuales femeninas, sin desarrollo de estambres. I.A. = 2, para flores bisexuales cuyas anteras no son capaces de producir polen, y con estambres de tamaño medio. I.A. = 3, flores hermafroditas, con los 3 estambres completamente desarrollados y funcionales (anteras capaces de producir polen).

Figura 38. Índice de andromonoecia (I.A.), según la escala descrita por Manzano et al., 2016. Se representa el error estándar para cada media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas de la misma línea de sandía injertada sobre diferentes pies de calabaza o calabacín ($p \leq 0,05$). Las líneas de puntos marcan los límites entre monoecia, andromonoecia parcial y andromonoecia en sandía (Manzano et al., 2016).

Figura 39. Efecto de diferentes patrones de *Cucurbita* sobre la expresión sexual de tres genotipos de sandía (P86, P84 y P87) durante los primeros 20 nudos del desarrollo de las plantas. El color de las barras indica el sexo de las flores en ese nudo para el total de plantas estudiadas, representando el porcentaje de flores de cada tipo sexual en cada uno de los nudos.

Figura 40. Porcentaje de frutos cuajados, en función del portainjerto de *Cucurbita* empleado *EIN-4* Insensible (“I”), WT Sensible (“S”) y Shintosa Camelforce (“C”); sobre tres variedades de sandía P86, P84 y P87. Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos fenotipos ($p \leq 0,05$).

Figura 41. Frutos abortados de las líneas de P87 (foto propia).

Figura 42. Tasa de prendimiento, según el tipo de portainjerto, a los 15 días de ser injertadas. Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos genotipos utilizados como portainjertos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo intermedio y “S” patrón sensible (WT).

Figura 43. Número de flores femeninas en el taño principal en función del portainjerto empleado *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*. Se representa el error estándar de cada muestra. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos injertos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo de insensibilidad a etileno intermedio y “S” patrón sensible.

Figura 44. Transición floral femenina (número de nudos hasta la aparición de la primera flor femenina), en función del portainjerto empleado: *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*. Se representa el error estándar de cada grupo. Letras diferentes indican diferencias

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

significativas entre los distintos injertos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo intermedio y “S” patrón sensible.

Figura 45. Índice de andromonoecia (I.A.), según la escala descrita por Manzano et al., (2016). Se representa el error estándar de cada tipo de injerto. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos injertos realizados ($p \leq 0,05$). “I” insensible, “INT” intermedio, “S” sensible a etileno.

Figura 46. Expresión sexual de la variedad de sandía P86 injertada sobre diferentes genotipos de calabacín sensibles e insensibles a etileno. Como control se utiliza el portainjerto WT Muc16. El color de las barras indica el sexo de las flores en ese nudo para el total de plantas estudiadas, representando el porcentaje de flores de cada tipo sexual en cada uno de los nudos.

Figura 47. Porcentaje de frutos cuajados, en función del portainjerto empleado *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4* Insensible. Se representa el error estándar de cada combinación de injertos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos injertos de la misma familia ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo intermedio y “S” patrón sensible a etileno.

Figura 48. Fotos de frutos de sandía cuajados sobre portainjertos de calabacín insensibles a etileno. **a.** Portainjerto *EIN-1* Insensible; **b.** Portainjerto *EIN-2* Insensible; **c.** Portainjerto *EIN-3* Insensible; **d.** Portainjerto *EIN-4* Insensible (fotos propias).

1. Interés y objetivos

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

1.1. Interés del experimento:

España es uno de los máximos productores de sandía en Europa. De ésta producción, el 45-50% procede de la provincia de Almería, cultivándose en todas sus comarcas con invernadero, y estando presente en los mercados desde marzo a finales de junio (Ferre, 2003).

El cultivo de sandía ocupa la segunda posición entre las especies de la familia de las cucurbitáceas en la provincia de Almería (363.909 toneladas, según datos del año 2016 de la Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural). Según el Informe del Consumo de Alimentación en España de 2017, el volumen total de sandías consumidas se eleva a un total de 383.166,52 miles de kg en el pasado año 2017, lo que supone un 0,7% de crecimiento respecto al ejercicio anterior. Además, el consumo de dicha fruta per cápita es de 8,40 kg, sufriendo un descenso del 3,1% (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2017).

Tras realizar durante la campaña 2016-2017, el proyecto de fin de grado en la fundación UAL- ANECOOP, basado en determinar la función del gen *CitACS4* en la regulación de la monoecia y otros caracteres de interés agronómico en sandía; el equipo de trabajo liderado por el catedrático Manuel Jamilena Quesada ha seguido avanzando en el tema citado. Una vez presentada mi intención, al mismo, de continuar con la misma línea de investigación durante la elaboración del Proyecto de Fin de Máster, se empezaron los trabajos a principios de 2018, nuevamente en la fundación UAL-ANECOOP. En esta ocasión, el trabajo se centró en determinar qué efecto podría causar en la expresión sexual de la sandía, emplear mutantes insensibles al etileno (*Ein1*, *Ein2*, *Ein3* y *Ein4*) de calabacín como portainjerto.

Los principios teóricos aplicados al inicio del diseño experimental fueron los siguientes:

- En primer lugar, aplicar tratamientos externos, en sandía, con etileno inducen la producción de flores masculinas (Rudich & Zamski, 1985), mientras que tratamientos llevados a cabo con inhibidores de etileno aceleran la aparición

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

de la primera flor femenina e incrementan el número de flores femeninas por planta (Manzano et al., 2014; Rudich & Zamski, 1985).

- Por otro lado, emplear portainjertos insensibles al etileno, en sandía, para ver si son capaces de generar un incremento en el número de flores femeninas por planta y, por tanto, modular la expresión sexual.

Para ello, se ha analizado como influye en el desarrollo temprano de las flores femeninas y masculinas, cuantificando la distribución de flores en el tallo principal; se ha determinado el número de flores femeninas y el índice de andromonoecia; y en último lugar, se ha evaluado si el injerto afecta a la fertilidad de la planta, evaluándose el cuajado de frutos.

1.2. Objetivos del proyecto:

El principal objetivo de este proyecto Fin de Máster es evaluar los efectos fisiológicos y fenotípicos que genera sobre sandía el portainjerto mutante insensible a etileno de calabacín. Para ello, se utilizarán cuatro (4) mutantes insensibles al etileno de *Cucurbita pepo* como portainjertos de la línea pura P86 de sandía, evaluando los siguientes parámetros:

- a) Viabilidad del injerto:
 - Tasa de prendimiento.
- b) Efecto de portainjertos mutantes insensibles a etileno de *C. pepo* sobre la expresión sexual de sandía.
 - Número de flores femeninas por genotipo
 - Distribución de flores en el tallo principal
 - Transición floral
- c) Efecto de portainjertos mutantes insensibles a etileno sobre el cuajado de los frutos de sandía.
 - Porcentaje de frutos cuajados/abortados.



2. Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introducción

2.1.1. Historia del cultivo:

Los primeros datos que se tienen de sandía son de hace aproximadamente 5000 años en Egipto, donde dicha fruta se cultivaba no sólo por su sabor, sino también por su belleza como está representado en grabados sobre muros de la época (Ferre, 2000).

Desde Egipto, las sandías se difundieron a través de los mercaderes que vendieron semillas en las rutas del Mediterráneo, introduciéndolas en Italia y Grecia (Ferre, 2000). En China, se ha cultivado aproximadamente desde el año 900 A.D. En el Nuevo Mundo fue introducida en 1500s, procedente del África tropical y subtropical, a través de las embarcaciones que transportaban esclavos (Pérez, 2015). En la actualidad, en EE. UU., la sandía es un cultivo importante, principalmente en los estados del sur del país.

A lo largo de los años, mediante la domesticación y el mejoramiento de la planta a partir de una vid de maduración tardía, con frutos pequeños de carne dura y blanca, y sabor suave o amargo; la sandía se ha transformado en una planta de maduración temprana, más compacta y grande, de carne comestible y dulce. Los avances recientes en la mejora de híbridos triploides han dado como resultado una mayor popularidad a las sandías aumentando su consumo per cápita en un 37%, desde el año 1980.

2.1.2. Descripción botánica:

La sandía pertenece a la familia de las cucurbitáceas. Su nombre científico es *Citrullus lanatus* (Mármol, 1994). Es una planta herbácea, anual, rastrera, o trepadora si se le facilita un entutorado adecuado, propia de cultivos intensivos de secano, y regadío. Gracias al cultivo forzado, y a su protección en invernadero, se

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

ha ampliado su tiempo de permanencia en el mercado, habiendo dejado de ser una fruta exclusivamente de verano.

Sus tallos son rastreros, herbáceos, pubescentes y largos, terminados en zarcillos que le permiten trepar. Las hojas son grandes, de forma ovalada, pecioladas y en forma alterna. Sus flores son unisexuales, encontrándose ambos géneros, masculino y femenino, en la misma planta. Las flores femeninas tienen ovario ínfero y dan lugar a frutos más o menos voluminosos, esféricos o alargados, y lisos. La pulpa de los frutos es azucarada y de color rosa, amarillenta o encarnada. Las semillas, alojadas en el interior de la pulpa, son aplastadas, de forma oval y color que va del blanquecino-marrón, al negro intenso, siendo, en ocasiones, moteadas (Japon, 1982).

La planta de sandía pertenece a la subdivisión de las angiospermas, es decir, tiene semilla, flores y frutos. La gran diferencia entre gimnospermas y angiospermas es que, en las angiospermas (semillas cubiertas) los megasporofilos (\equiv carpelos) crecen alrededor de los oogonios, cubriéndolos y encerrándolos. Esto lleva a la creación de una nueva estructura, el fruto (Lüttge, Kluge, & Bauer, 1997). La mayoría de las especies pertenecientes a esta subdivisión, presentan flores bisexuales con verticilos formados por sépalos, pétalos, estambres y carpelos, o flores unisexuales, es decir, flores estaminadas (masculinas) ó flores pistiladas (femeninas).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

2.1.3. Clasificación taxonómica:

Tabla 1. Clasificación taxonómica *Citrullus lanatus*.

Clasificación Científica	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Dillenidae</i>
Orden	<i>Cucurbitales</i>
Familia	<i>Cucurbitaceae</i>
Subfamilia	<i>Cucurbitoideae</i>
Tribu	<i>Benincaseae</i>
Subtribu	<i>Benincasinae</i>
Género	<i>Citrullus</i>
Especie	<i>C. lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai 1916
Nombre binomial	
<i>Citrullus lanatus</i>	

2.1.4. Situación del cultivo a nivel mundial:

A nivel de producción, el país que produce mayor número de sandías en el mundo es China, seguida de Irán, Turquía y Brasil. Como se puede ver en la **Tabla 2**, España se sitúa en decimocuarta posición con más de un millón de toneladas de sandías al año, siendo el segundo país con mayor producción en Europa.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Tabla 2. Ranking de los 15 países con mayor producción de sandías a nivel mundial (FAOSTAT, 2017).

Países	Producción (Tn)
China, Continental	79.276.300
Irán	4.059.786
Turquía	4.011.313
Brasil	2.314.700
Uzbekistán	2.030.992
Argelia	1.895.074
Estados Unidos	1.842.360
Egipto	1.709.964
Federación de Rusia	1.699.334
México	1.331.508
Kazajistán	1.281.510
Vietnam	1.121.163
España	1.113.192
Afganistán	681.829
Grecia	647.000

A nivel de área cosechada, también se encuentra en cabeza China, con más de 1.840.000 ha de cultivo. España, con 20.000 ha de área cosechada, ocupa la vigesimocuarta posición del ranking, lo que vuelve a evidenciar los grandes rendimientos que se consiguen en nuestro país, con cultivo intensivo bajo invernadero.

Tabla 3. Ranking de los países con mayor área cosechada de sandías a nivel mundial (FAOSTAT, 2017).

Ranking	País	Superficie (has)
1	China, Continental	1.848.654
2	Irán	136.190
3	Federación de Rusia	133.636
4	Brasil	105.064
5	Turquía	95.514
6	Afganistán	64.181
7	Argelia	57.343
8	Egipto	54.673
9	Kazajistán	54.589
10	Ucrania	51.300
13	Estados Unidos	43.670

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

14	México	41.422
24	España	20.026

2.1.5. Situación del cultivo a nivel nacional:

Como se puede ver en las siguientes tablas, Andalucía domina el panorama español en superficie cultivada y producción, seguido de Castilla-La Mancha, en superficie cultivada y de la Región de Murcia, en producción. (datos de la campaña 2017 proporcionados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el Anuario de Estadística 2018). En cuanto a Almería, la superficie de sandía cultivada sigue experimentando un ascenso progresivo desde la campaña 2011/2012, aproximándose a las 9.000 has en la campaña 2017/2018, lo que supone un incremento del 9% respecto al ejercicio pasado. Sin embargo, la producción ha experimentado un descenso de un 10% respecto a la campaña anterior, esta disminución se cree que se debe a las cambiantes condiciones meteorológicas sufridas en la primavera, que generaron problemas en la etapa de polinización y cuajado del fruto de las sandías tempranas, dando lugar a una reducción del rendimiento del cultivo (Observatorio de Precios y Mercados, 2018).

Tabla 4. Clasificación de las comunidades autónomas españolas, de mayor a menor área cosechada (Ha), a la izquierda, y producción total (Tn), a la derecha (M.A.P.A., 2017).

Comunidades:	Superficie total (Ha)	Comunidades	Producción (Tn)
ANDALUCÍA	11.245	ANDALUCÍA	660.255
CASTILLA- LA MANCHA	2.961	R. DE MURCIA	217.199
R. DE MURCIA	2.758	CASTILLA-LA MANCHA	113.659
C. VALENCIANA	1.728	C. VALENCIANA	74.991
BALEARES	340	EXTREMADURA	12.735
CANARIAS	331	CANARIAS	11.885
EXTREMADURA	293	BALEARES	11.499
CATALUÑA	270	CATALUÑA	8.002
MADRID	30	MADRID	1.110

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Tabla 5. Clasificación de las provincias andaluzas de mayor a menor área cosechada (Ha) y producción total (Tn) (Conserjería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2018).

Provincias	Superficie total (Ha)
Almería	9.860
Sevilla	1.029
Córdoba	429
Granada	358
Huelva	190
Cádiz	167
Málaga	150
Jaén	38

Provincias	Producción (Tn)
Almería	512.742
Sevilla	61.740
Granada	16.920
Córdoba	13.600
Huelva	6.400
Cádiz	6.400
Málaga	5.780
Jaén	836

Para concluir, cabe destacar que el 40-45% de la superficie cultivada de sandía, en nuestro país, se realiza bajo algún sistema de protección; invernadero, túnel, agrotexiles, etc., y a veces en una combinación de éstos (Ferre, 2000).

En cuanto al precio medio en origen, observamos en la **Tabla 6**, como se ha incrementado en 0,12 céntimos respecto al pasado ejercicio. Esto se debió, principalmente, a las elevadas temperaturas que se registraron en Europa durante los meses de abril y mayo, estimulándose el consumo de sandía, precisamente en unas semanas donde Almería y Granada (sandías más tempranas) no disponían de abundante producción, generándose un desajuste entre la oferta y la demanda que incrementó el precio en origen considerablemente (Observatorio de Precios y Mercados, 2018).

Tabla 6. Evolución por campaña del Precio Medio en Origen (Observatorio de Precios y Mercados, 2018).

Campaña	Precio medio en origen (€/kg)
2010/2011	0,35
2011/2012	0,28
2012/2013	0,31
2013/2014	0,31
2014/2015	0,41
2015/2016	0,34
2016/2017	0,35
2017/2018	0,47

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Por último, si se compara la producción de sandía con la de otras cucurbitáceas en la provincia, vemos que es el cultivo que mayor número de toneladas genera y de mayor superficie cultivada, superando al calabacín y al pepino.

Tabla 7. Producciones y superficies de cucurbitáceas en Almería (Conserjería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2018).

Cultivos	Superficie (has)	Producciones (Tn)
Sandía	9.860	512.742
Calabacín	7.970	456.045
Pepino	5.099	445.857
Melón	2.290	91.656
Calabaza	30	390

Por tanto, se puede concluir que la sandía tiene una gran importancia económica en la producción hortofrutícola de Almería.

2.2. Tipos varietales de sandía:

Las variedades de sandía que se cultivan actualmente en la horticultura moderna son híbridos F1 buscando uniformidad y productividad. La resistencia a enfermedades en el caso de cvs de sandía no fueron los deseados y por ello para posibilitar su cultivo de modo rentable es por lo que se ha recurrido al injerto (Camacho Ferre, 2003).

Las variedades se agrupan en tres subgrupos:

- Variedades de corteza verde oscuro “tipo Sugar Baby”.
- Variedades de corteza rayada “tipo Crimson”.
- Variedades de sandía mini.

Dentro de estos grupos existen cvs con semillas y sin semillas, cvs de carne roja, amarilla o naranja (Camacho Ferre, 2003).

Las variedades con semilla, son generalmente de frutos pequeños y, aunque no sean siempre resistentes a enfermedades, algunas de ellas presentan diversos grados de tolerancia lo que, unido a una excelente calidad y alta producción, hace que estén sustituyendo a las variedades clásicas (Mármol, 1994).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- Variedades de sandías diploides, de piel verde oscura o negra, que más se cultivan en Almería son: Sweet Marvel (Syngenta), Toro (Fitó), Ricca F1 (Nunhems).
- Variedades de sandías diploides, de corteza rayada, que más se siembran en Almería son: cvs Crimson sweet, variedad que tienen diversas empresas de semillas, y Crisby de Nunhems.

Variedades con semilla



Sweet Marvel (Syngenta)



Crisby F1 (Nunhems)

Figura 1. Variedades de sandía con semilla más populares (Fotos extraídas del catálogo de semillas de cada casa de semillas).

Las variedades sin semilla, o apirenas, son frutos de buena calidad, fácilmente diferenciados exteriormente, y con producciones y calidad comparables con las variedades tradicionalmente no apirenas. Al ser estéril el polen, es necesario intercalar plantas diploides, que actúan como líneas fértiles polinizadoras (Mármol, 1994).

- Variedades de sandías triploides, de corteza rayada, que más se siembran en Almería: Reina de Corazones (Petoseed), Boston (Nunhems), Motriz, Bengala, Redjasper.
- Variedades de sandías triploides, de piel verde oscura o negras, en la actualidad, son el tipo varietal más representativo en la provincia, destacando sobre el resto el cv Fashion (triploide “tipo Sugar” de Nunhems) polinizado con la variedad Premium. El mentado cultivar, se ha labrado una enorme

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

fama a nivel mundial por su gran sabor y textura, alcanzando las 70.000 toneladas de producción (Mas, 2014). Otras variedades son las Fenway (Monsanto, distribuida por Seminis), Stellar F1 (Nunhems), Style F1 (Nunhems).

Variedades sin semilla



Reina de Corazones (Potoseed)



Fashion (Nunhems)

Figura 2. Variedades de sandía sin semilla más populares (Fotos extraídas del catálogo de semillas de cada casa de semillas).

Variedades mini: estas variedades tienen más éxito en el exterior que en el mercado nacional debido a los calibres que produce. Su peso medio no supera los 2,5-3 kg. Son extremadamente prolíficas, lo que compensa su reducido tamaño, destacando su ciclo extremadamente precoz. Entre las variedades más sembradas cabe destacar la Mini F1 (Intersemillas), Premium F1 (Nunhems), Precious Petite ó Mini Bouquet (de Syngenta comercializada por Anecoop), Tigrinho RZ F1 (Rijk Zwaan) y Gatinho RZ F1 (Rijk Zwaan). Por último, cabe destacar la variedad Kisy (Nunhems) cuya característica más representativa es su tamaño, al tratarse de una sandía diseñada para el consumo individual, con un peso medio entre 650 y 950 gramos, lo que podría considerarse como una variedad tipo “snack”.

Variedades Mini



Mini Bouquet (sin semillas)

Kisy (sin semillas, de consumo individual)

Figura 3. Variedades de sandía tipo Mini más populares (Fotos extraídas del catálogo de semillas de cada casa de semillas).

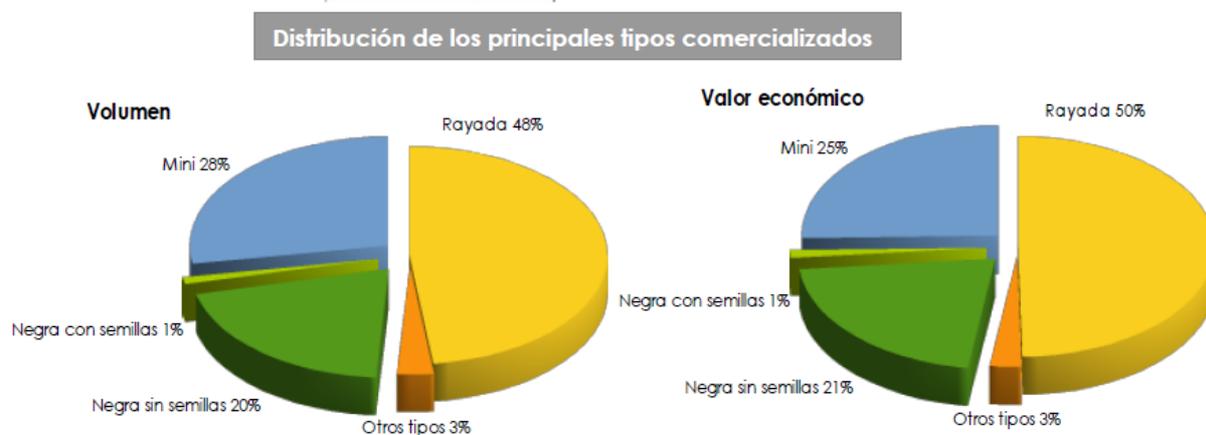


Figura 4. Distribución de los principales tipos de sandías comercializados. Fuente Observatorio de precios y mercados.

Como se puede observar en la **Figura 4**, la sandía rayada es la más comercializada y la que mayor valor económico tuvo en la pasada campaña (2018), seguida de la sandía mini, cuyo valor ha aumentado mucho en las últimas campañas, y la sandía negra sin semillas.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

2.3. Injertos en sandía:

2.3.1. La historia del injerto en sandía:

Los primeros injertos que se realizaron en sandía fueron implantados en la década de los 80, como una medida para combatir los ataques de enfermedades procedentes del suelo como *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, utilizándose como portainjerto los híbridos *Cucurbita maxima* y *Cucurbita pepo*. El injerto no solo ayudó a frenar el constante contagio de los suelos, sino que aumentó la productividad de las variedades del momento y facilitó el desarrollo en algunos aspectos del cultivo (plantas de mayor vigor, y patrones con tolerancias al frío en plantaciones tempranas). Desde este momento, prácticamente no ha habido avances en sandía en el empleo de otras especies como portainjertos (Pérez, 2015).

Otra ventaja, como método ecológico y su implantación en sandía, fue la reducción del uso de bromuro de metilo como desinfectante de suelo en la agricultura. Ya que el injerto, a diferencia del bromuro, es una técnica no contaminante para el producto final ni para el medio ambiente, y no supone ningún peligro en su manejo.

Por último, el injerto ha generado toda una industria de producción de planta hortícola (semilleros y/o viveros), cuya mano de obra especializada es esencial para alcanzar un resultado final adecuado (Gómez, 2015).

2.3.2. Tipos de injertos:

- **Injerto de aproximación:** sigue siendo uno de los más utilizados en España. Consiste en unir el patrón y la variedad mediante un corte en el hipocótilo de cada una, de manera que la “lengüeta” de la variedad se encaje en la del patrón. Una vez se haya generado la unión entre ambas, se corta el tallo por debajo del injerto, dejándose como único sistema radicular el del patrón.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”



Figura 5. Ilustración del injerto de aproximación (Foto extraída del libro de Gázquez, 2015).

La principal ventaja de este tipo de injerto es que no se requieren unas condiciones ambientales tan estrictas en periodo de soldadura entre plantas. Por contra, este injerto puede sufrir problemas de franqueo (enraizamiento del tallo de la variedad), de este modo la plántula podría seguir sufriendo enfermedades de suelo (Gómez, 2015).

- **Injerto de púa en hendidura:** consiste en eliminar el sistema radicular de la variedad, haciendo un corte por debajo de los cotiledones en forma de bisel, encajándose sobre el patrón, a la altura de los cotiledones.



Figura 6. Ilustración del Injerto de púa en hendidura (Foto extraída del libro de Gázquez, 2015).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

La principal ventaja respecto al injerto de aproximación es que no corre riesgo de franqueo después del prendimiento del injerto, además, la unión que se produce entre el injerto y la variedad es más robusta. Sin embargo, la realización de este injerto requiere un control mucho más estricto de las condiciones climáticas, temperatura y humedad, para que se produzca la soldadura (Gómez, 2015).

- **Adosado:** es el injerto que se ha implantado por completo en el sustrato español. Consiste en eliminar ambos sistemas radiculares. Además, al patrón se le corta el ápice vegetativo junto con uno de los cotiledones. Seguidamente, a la variedad se le hace un corte por debajo de los cotiledones en forma de bisel y se “pega” al patrón sujetándola mediante una pinza.



Figura 7. Ilustración del Injerto adosado (Foto extraída del libro de Gázquez, 2015).

La principal ventaja de este tipo de unión es que desde el primer momento la unión es sólida y la planta suele tener mayor vigor, además, no existe riesgo de franqueo y se puede mecanizar el proceso. Por otra parte, en este injerto se requieren unas instalaciones especializadas en la reproducción de plántulas (semilleros y/o viveros) donde se disponga de una atmósfera controlada (Gómez, 2015).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- Otros: existen otras variedades de injertos menos utilizadas como el “injerto de brote”, el “doble adosado”, “inserción”, “inserción lateral”, “dakitsugi” y “circular”.

2.3.3. Tipos de portainjertos

Los portainjertos más empleados en la actualidad son las especies de los géneros *Cucurbita*, *Legenaria*, *Benincasa*, *Citrullus* y *Praecitrullus* (*P. fistulosus*). Entre ellos destacan:

- **Híbridos de *Cucurbita***: siendo el híbrido de *C. maxima* x *C. moschata* el más utilizado actualmente. Este destaca por su resistencia al *Fusarium* y al llamado “colapso” o virus del cribado del melón (MNSV). Por el contrario, el portainjerto sí sería sensible a *Phytophthora capsici*, y por consiguiente podría surgir un nuevo problema relacionado con enfermedades de suelo. Además, este cultivar proporciona un mayor vigor y producción en comparación con el resto de los patrones empleados en la actualidad.
- ***Lagenaria sinceraria***: es el portainjerto más empleado en los países orientales. Dicho patrón destaca por ser resistente al *Fusarium*, forma especializada que afecta a las sandías, sin embargo, es sensible a la forma especializada *lagenariae* y al MNSV. Por el contrario, *L. sinceraria* es resistente a *Phytophthora* y es menos sensible al efecto de los nematodos. Respecto a sus actitudes culturales, proporciona menor vigor y, por lo tanto, se reduce la producción; además es menos tolerante al calor y a la sequía. Dicho patrón a penas se emplea en nuestro país.
- ***Citrullus lanatus***: destacan las variedades *citroides* y *colocyntis*, o el híbrido entre ellas. La principal ventaja de esta especie es que son resistentes a todas las formas especializadas conocidas del *Fusarium* de la sandía y nematodos. La productividad es similar a la que se obtiene con el patrón de *Cucurbita* (Gómez, 2015).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

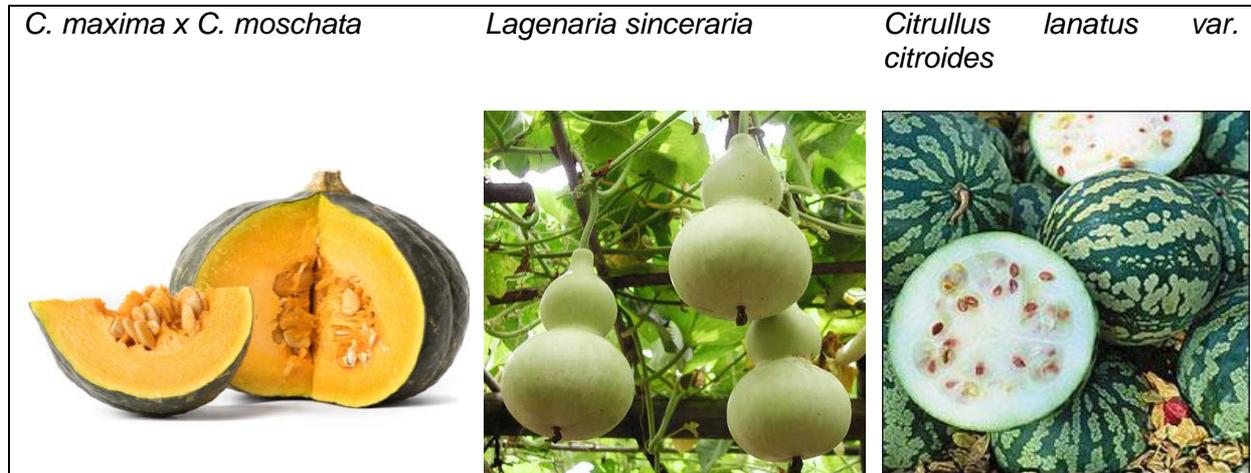


Figura 8. Ilustraciones de los frutos de las principales variedades empleadas como portainjertos en sandías. (Fuente Google Imágenes).

2.4. Control genético de la determinación sexual en Cucurbitáceas.

En esta familia, la determinación del sexo está regulada por un número variable de *loci* no ligados (Dellaporta & Calderon-Urrea, 1993). La determinación sexual en pepino está regulada por tres *loci* mayores. El *locus F* regula la ginoecia, y está modificado por otros dos *loci*: *a* (andromonoico) y *m* (monoico), y el medio ambiente (Dellaporta & Calderon-Urrea, 1993; Rosa, 1928). Por lo tanto, en pepino y también en melón, la determinación sexual está controlada por tres genes mayores independientes, que determinan los distintos fenotipos sexuales de estas especies (Perl-Treves, 1999; Pierce & Wehner, 1990).

La mayor parte de los cultivares de sandía presentan un fenotipo sexual monoico, es decir, la planta desarrolla flores unisexuales femeninas y masculinas sobre un mismo pie, ó andromonoico, donde la planta desarrolla flores unisexuales masculinas y hermafroditas en un mismo pie de planta (Rudich & Zamski, 1985). Se ha constatado que los cultivares de sandía pasan por una fase de desarrollo inicial (4-15 nudos dependiendo de la variedad), en donde la planta solo produce flores masculinas. Tras esta fase, la planta comienza a desarrollar flores pistiladas (femeninas o hermafroditas) que alternan con masculinas en unos intervalos que depende del genotipo (Salman-Minkov, Levi, Wolf, & Trebitsh, 2008). Además se ha observado grandes alteraciones en las fases de desarrollo de la flor, provocadas por

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

cambios ambientales y hormonales, y por el genotipo de la variedad considerada (Rudich & Zamski, 1985).

2.5. Regulación hormonal de la expresión sexual en Cucurbitáceas.

Las fitohormonas (hormonas vegetales) están implicadas en varios aspectos del desarrollo de los órganos reproductivos, tanto en plantas hermafroditas como en plantas monoicas y dioicas (Lebel-Hardenack & Grant, 1997). Entre los principales grupos de hormonas vegetales, el **etileno** juega un papel crucial en la determinación del sexo floral de las especies de cucurbitáceas. Por ejemplo, en el pepino (*Cucumis sativus*) se encontró que las yemas florales femeninas contenían más etileno que las yemas florales masculinas. Además, los pepinos que estaban en condiciones lumínicas de día corto, que provocan feminización, liberaban mucho más etileno que las yemas florales masculinas (Raven, Evert, & Eichhorn, 1991).

En contraposición al efecto de feminización en melón, pepino, o calabacín; en sandía el etileno favorece el desarrollo de flores masculinas (Manzano et al., 2014; Salman-Minkov et al., 2008). Por lo tanto en sandía, tratamientos externos con dicha hormona inducen la producción de flores masculinas (Rudich & Zamski, 1985), mientras que tratamientos con inhibidores de etileno acelera la aparición de la primera flor femenina e incrementa el número de flores femeninas por planta (Manzano et al., 2014; Rudich & Zamski, 1985). Sin embargo, como en otras especies de cucurbitáceas, el etileno es necesario para detener el desarrollo de los estambres durante el desarrollo normal de las flores femeninas, y la reducción de la producción o acción del etileno conduce a la transformación de flores femeninas en bisexuales y hermafroditas (Manzano et al., 2014). Se ha constatado, que el nivel de etileno en las yemas florales es esencial en la determinación del sexo y en el desarrollo de las flores femeninas (Martínez et al., 2013).

Otras hormonas vegetales o fitohormonas, implicadas en la expresión sexual en las cucurbitáceas, son las giberelinas, auxinas y los brasinosteroides. También puede verse modificada por las condiciones ambientales, tales como intensidad de luz, fotoperiodo y la temperatura (Rudich et al., 1972; Wien, 2002).

2.6. Regulación de la síntesis de etileno durante la determinación del sexo.

El etileno es una molécula orgánica compuesta por dos carbonos unidos por un doble enlace. Dicha hormona juega un importante papel en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y fenológicos en las plantas, destacando su efecto en el desarrollo de flores y frutos o su papel en la abscisión floral, entre otros (Chang et al. 2010).

El etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina en tres reacciones: Metionina → S-adenosil-metionina → ACC (1-aminociclopropano 1 carboxílico) → Etileno. La segunda reacción (S-adenosil-metionina → ACC) está catalizada por la ACC sintasa (ACS), siendo este paso limitante en la mayoría de los sistemas estudiados (Adams & Yang, 1979; Yang & Hoffman, 1984). En la última reacción, el ACC es convertido a etileno por medio de la ACC oxidasa (ACO) (Yang & Hoffman, 1984).

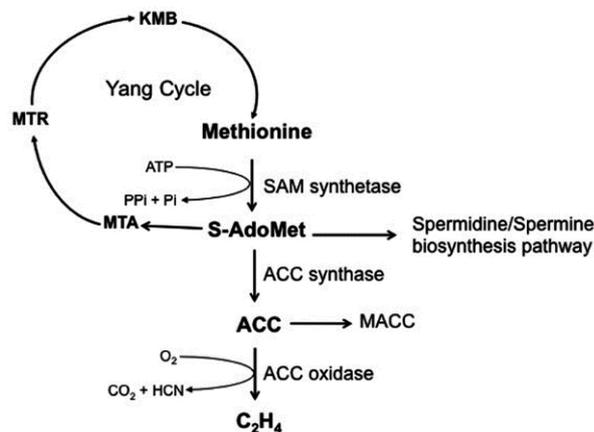


Figura 9. Ciclo de biosíntesis del etileno (Fuente Arc et al., 2013).

La **biosíntesis** de **etileno** está regulada positiva o negativamente por diversos factores, tanto exógenos como endógenos. Sucesos como la maduración de los frutos, los estreses bióticos y abióticos, o las **auxinas**, pueden inducir la síntesis de ACC y por lo tanto la formación de etileno, mediante el incremento de la actividad de las enzimas ACS y ACO (Liang, et al., 1992; Nakagawa, et al., 1991; Vogel, et al., 1998).

Se ha demostrado que las mutaciones en los genes de biosíntesis del etileno *CmACS7* de melón, *CsACS2* de pepino y *CpACS27A* de calabacín, producen la conversión de flores femeninas en hermafroditas, lo que demuestra que estos genes

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

regulan el aborto del desarrollo de los estambres durante la formación de las flores femeninas en estas especies (Boualem et al., 2008; Boualem et al., 2009; Martínez et al., 2014). El gen de sandía que mayor homología muestra, con los citados anteriormente, es el gen *CitACS4* (91-93%, Manzano et al., 2016). El mismo grupo ha amplificado y secuenciado el gen *CitACS4* en los parentales empleados P84, P85, P86 y P87. Se diseñaron primers o cebadores específicos, *CitACS4gen-F1/R1* y *Fw/Rw*, para amplificar un fragmento inicial de 1332 pares de bases (pb), que codifica para una proteína de 444 aminoácidos. El gen está compuesto por tres exones de 180, 281 y 871 pb respectivamente, interrumpidos por dos intrones de 123 y 269 pb (Manzano et al., 2016).

El gen de biosíntesis de etileno *CitACS4* regula el aborto de los estambres durante el desarrollo de las flores femeninas en variedades de sandía monoicas. Una mutación en el gen *CitACS4* (alelo A) reduce la producción de etileno en flores pistiladas, promoviendo la conversión de flores femeninas en flores hermafroditas, y por consiguiente, de monoicas en andromonoicas (Manzano et al., 2016). Aunque la monoecia se había descrito como un carácter dominante en sandía (Rosa, 1928), los datos recientes indican que la monoecia es semidominante sobre la andromonoecia (Manzano et al., 2016). Es decir, se ha demostrado que la andromonoecia cosegrega con otros caracteres de interés agronómico, ya que disminuye el cuajado de frutos y reduce el número de semillas (Aguado et al. 2016). Además, se ha apreciado diferencias en otros rasgos de interés agronómico, en periodo de floración o antesis las plantas andromonoicas y sus poblaciones segregantes presentan un mayor tamaño del ovario que en plantas monoicas. Por último, en cuanto al ratio de crecimiento, los frutos monoicos han resultado mayores en las primeras etapas del desarrollo que los frutos andromonoicos (Aguado et al., 2016).

2.7. Mutantes insensibles a etileno:

Los primeros estudios realizados en plantas sobre la biosíntesis de etileno se realizaron en *Arabidopsis thaliana*, ya que fue una de las primeras plantas en conocerse su mapa genético. En este ámbito, se ensayó la respuesta de mutantes de *A. thaliana* frente a la triple respuesta a etileno (Bleecker et al. 1988). Esta técnica consiste en aplicar un tratamiento exógeno de etileno sobre plántulas en

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

condiciones de oscuridad, dando lugar a una modificación morfológica en la plántula, por un lado, se inhibe la elongación del hipocótilo y la zona radicular; y, por otro lado, se genera el engrosamiento del hipocótilo y geotropismo transversal del rizoma (Kinght & Crocker, 1913). Estos avances, dieron lugar a las cinco primeras mutaciones generadas por esta técnica y permitieron aislar los genes que codifican los receptores de etileno en *A. thaliana*: “Ethylene Receptors” 1 y 2 (ETR-1 y ETR-2); “Ethylene Insensitive” 4 (*EIN-4*); “Ethylene Response Sensors” 1 y 2 (ERS-1 y ERS-2) (Arora, 2005).

Los anteriormente citados receptores de etileno pueden fosforilar (adición de un grupo fosfato a cualquier otra molécula) a una proteína quinasa (también llamadas quinasas o cinasas) denominada “*Constitutive Triple Response*” (CTR1). Esta proteína genera cambios negativos en la ruta de señalización de respuesta a etileno (Kieber et al. 1993). Cuando se produce una ausencia de etileno, los receptores activan la proteína CTR1, provocando que no se lleve a cabo la correcta transducción de la señal de etileno. En el momento en el que existe presencia de etileno en los receptores, se produce la inutilización de CTR1 y se activa correctamente la ruta de señalización de respuesta a etileno.

CTR1 es una proteína específica de *A. thaliana*, pero se han encontrado genes homólogos *CTR* en otras especies de la familia *Cucurbitaceae*, incluyendo melón, pepino y calabacín (Alverson et al. 2010; Manzano et al. 2011).

Además, CTR1 interactúa directamente con el regulador *Ethylene Insensitive 2* (*EIN-2*) (Román et al. 1995). En ausencia de etileno, *EIN-2* se fosforila por CTR1, produciéndose su posterior degradación debido al complejo proteico proteosoma 26S. Por otro lado, cuando se detecta la presencia de etileno, CTR1 se inactiva y *EIN-2* por tanto, actuando como un “interruptor” que detiene el proceso químico, es decir, no podrá ser fosforilado. Este hecho, generará una respuesta inmediata, liberándose un péptido señal de *EIN-2* que llegará al núcleo para activar la expresión de los genes de respuesta a etileno (Ju et al. 2012). *EIN-2* no es solo vital para el etileno, sino que también participa en la iniciación de la transducción de señales de otras hormonas como son ácido abscísico (ABA), auxinas, citoquininas o ácido jasmónico (AJ) (Cary et al., 1995; Fujita & Syono, 1996; Penninchx, 1998; Ghassemiam, 2000).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

En este contexto, el grupo de investigación de Genética de Hortícolas, dirigido por el catedrático de la Universidad de Almería Manuel Jamilena Quesada, realizó un cribado o *screening* masivo a las 3800 variedades de género *Cucurbita pepo* que componen la colección de mutantes EMS (etil-metano-sulfonato: CH₃-SO₂-O-CH₂-CH₃), en busca de seleccionar variedades mutantes con cierto grado de insensibilidad a etileno. Tras aplicar la técnica de triple respuesta a etileno, se consiguieron aislar cuatro (4) mutantes insensibles: *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4* (García et al. 2015 y 2016).

En la actualidad se sabe que el gen *CpETR1* es responsable de la mutación producida en la familia *EIN-2*, y que el gen *CpETR2* es responsable de la mutación producida en la familia *EIN-3*, pero se desconoce cuál es el gen responsable de la mutación producida en la familia *EIN-1*, siendo este aspecto en lo que trabajan actualmente el grupo de investigación citado anteriormente, dirigido por el profesor Jamilena.

En este proyecto se va a evaluar el efecto sobre la expresión sexual y el desarrollo fisiológico en sandía al emplear como portainjerto los 4 mutantes insensibles a etileno de *C.pepo*.

3. Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. Material vegetal empleado.

El material empleado en este ensayo ha sido proporcionado por la empresa de semillas Nunhems Spain SA (Bayer Crop Sciences) y consta de cuatro líneas puras de *Citrullus lanatus*. Dos de ellas, denominadas P84 (tipo Crimson diploide) y P86 (tipo Crimson diploide), son de fenotipo monoico, y otra de las líneas, denominada P87 (tipo Sugar Baby diploide), que es andromonoica. Además, se emplearon las variedades comerciales de la citada casa obtentora Premium F1 (sandía mini rayada diploide) y Bengala F1 (rayada triploide). Estas líneas puras se han empleado como variedades en los injertos.

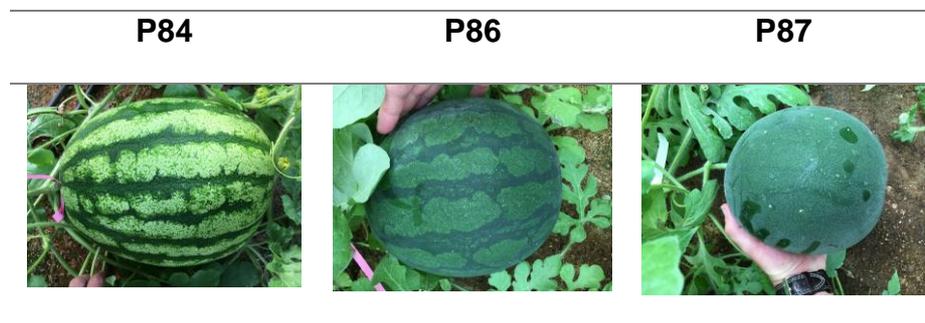


Figura 10. Frutos ya cuajados de las cuatro líneas puras de sandía utilizadas (Fernández 2017, trabajo de fin de grado).

Como **portainjertos** se emplearon, por un lado, el patrón comercial *Shintosa Camelforce* (híbrido del género *Cucurbita*); y, por otro lado, los patrones **mutantes** desarrollados por el departamento de Genética de Hortícolas a partir de la línea pura *MUC-16 (Cucurbita pepo)*. En la **figura 11** se muestra como se obtuvieron estos mutantes.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

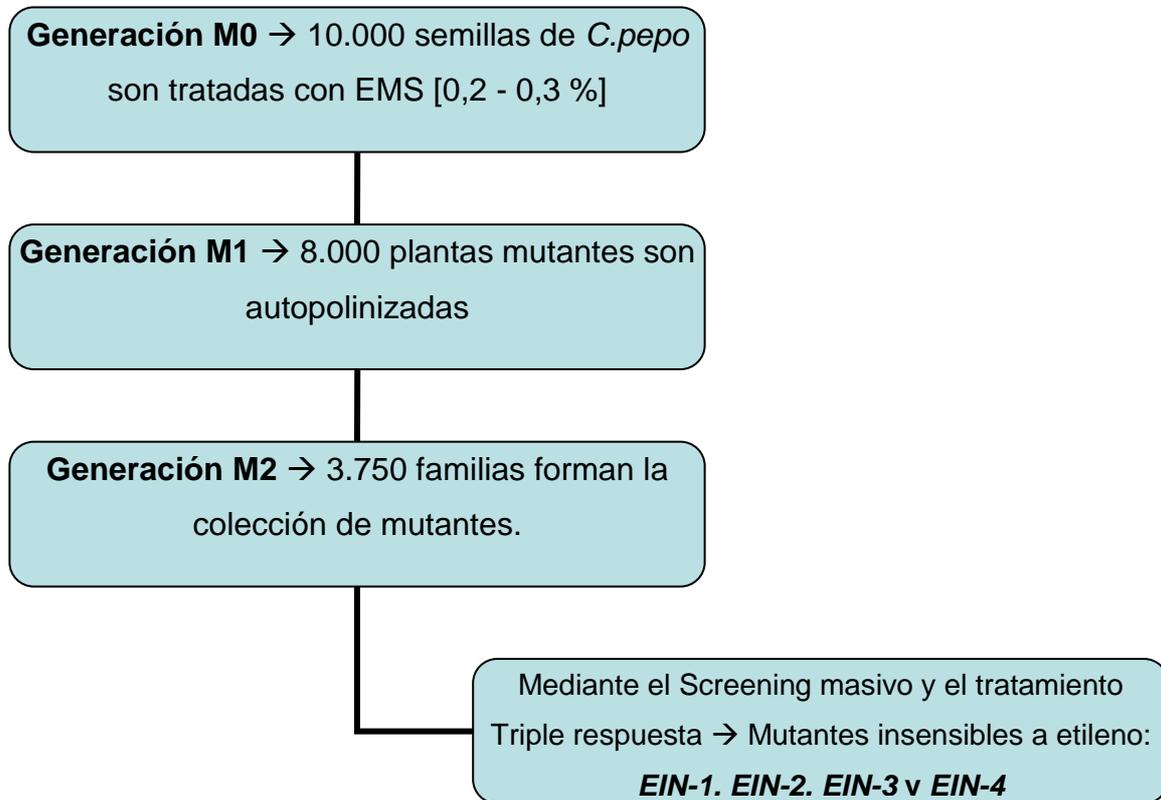


Figura 11. Fases de desarrollo de mutantes EMS a partir de la línea pura *MUC-16* de *C. pepo*.

El proceso se inicia mediante un screening masivo de la colección de mutantes con etilmetanosulfonato (EMS), mediante el empleo del método de triple respuesta (descrito por Kinght & Crocker en 1913) y puesto a punto por el grupo de investigación de Genética de Hortícolas).

3.2. Ensayo de campo.

El proyecto, ha sido dividido en tres fases:

- un primer experimento (enero 2018), donde se evaluó la viabilidad del proyecto y se dictaminó el tipo de injerto a emplear en los ensayos futuros.
- un segundo ensayo (primavera 2018), donde se realizaron pruebas con diferentes variedades (P84, P86, P87) y un mismo patrón mutante común insensible a etileno *EIN-4*.
- un tercer ensayo (primavera 2019), donde los cambios se efectuaron en el portainjerto, usándose los 4 patrones mutantes insensibles a etileno *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*, y como variedad común se empleó P86.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

3.2.1. Emplazamiento del ensayo:

El primer ensayo experimental se llevó a cabo en la finca experimental ubicada en la Universidad de Almería. El invernadero es tipo “raspa y amagado” de unos 2.000 m² de superficie aproximadamente, 3 metros de altura, ventilación pasiva cenital y lateral, riego localizado, y suelo enarenado. Localización Polígono 58, Parcela 9.000, Recinto 2.



Figura 12. Ortofoto extraída del Visor SigPac V 3.5, de la Universidad de Almería. En azul claro queda resaltado el invernadero donde se llevó a cabo el primer ensayo.

El desarrollo y selección de plántulas previa al ensayo experimental, se realizó en el semillero Vital-plant S.L., localizado en el Paraje “Balsa Seca”, en la localidad de San Isidro, perteneciente al Término Municipal de Níjar, provincia de Almería.

El segundo ensayo se llevó a cabo en la Finca Experimental UAL-ANECOOP, localizada en el Paraje “Los Goteros”, en el Término Municipal de Almería, Polígono 24 Parcela 281. La Fundación UAL-ANECOOP fue creada en el año 2004 para coordinar las actividades de investigación y experimentación, en un proyecto común de la Cooperativa Agrícola de segundo grado ANECOOP y la Universidad de Almería.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”



Figura 13. Fundación UAL-ANECOOP.

La estructura del invernadero es de tipo “multitúnel” de 1500 m², compuesto por tres capillas, ventilación pasiva tanto cenital como lateral, y dotado de pantallas de sombreado aluminizadas, sobre suelo enarenado formado por la superposición de distintos horizontes, impermeable (suelo procedente de canteras de la zona de textura variable que oscila desde arcillosa a franco-arenosa), nutritivo (constituido por estiércol y abonado mineral de fondo) y protector (consiste en una capa de arena de 7-12 cm de espesor). Este tipo de suelo es ideal para cultivos hortícolas en zonas salinas y sierras marginales (Jiménez & Lao, 2002). Sistema de riego localizado formado por goteros autocompensantes.

En este segundo ensayo, el desarrollo y selección de plántulas se realizó en el semillero Natural Green, localizado en el camino “la Maleza” s/n, en la localidad de Santa María del Águila, perteneciente al término municipal de El Ejido, provincia de Almería.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

3.3. Fases de realización y cronograma asociado:

Tabla 8. Cronograma mensual de las fases del desarrollo experimental.

Fases del proyecto:	EN	FB	MR	AB	MY	JN	JL
AÑO 2018 – Experimento previo							
1. Germinación y desarrollo de plántulas en semillero Vitalplant							
1.1. Tratamiento de triple respuesta en laboratorio a <i>EIN-4</i> , selección de plántulas sensibles/insensibles a etileno							
1.2. Realización del injerto							
2. Ensayo de campo:							
2.1. Trasplante a maceteros, y desarrollo de la plántula							
2.2. Evaluación de la viabilidad del injerto							
AÑO 2018 – Ensayo 1 (primavera 2018)							
3. Germinación y desarrollo de plántulas en semillero Vitalplant							
3.1. Tratamiento de triple respuesta en laboratorio a <i>EIN-4</i> , selección de plántulas sensibles/insensibles a etileno							
3.2. Realización del injerto							
4. Ensayo de campo:							
4.1. Trasplante a maceteros, y desarrollo de la plántula							
4.2. Conteo de flores femeninas en tallo principal y secundarios							
4.3. Polinización de frutos							
4.4. Estudio de frutos cuajados/abortados a los 15 días.							
4.5. Recolección de frutos, pequeño ensayo postcosecha							
AÑO 2019 – Ensayo 2 (primavera 2019)							
5. Germinación y desarrollo de plántulas en semillero Natural Green							
5.1. Tratamiento de triple respuesta en laboratorio a <i>EIN-1</i> , <i>EIN-2</i> , <i>EIN-3</i> y <i>EIN-4</i> selección de plántulas sensibles/insensibles a etileno							
5.2. Realización del injerto							
6. Ensayo de campo:							
6.1. Trasplante a maceteros, y desarrollo de la plántula							
6.2. Conteo de flores femeninas en tallo principal y secundarios							
6.3. Polinización de frutos							
6.4. Estudio de frutos cuajados/abortados a los 15 días.							
7. Redacción del proyecto y anteproyecto.							
8. Entrega y defensa del proyecto finalizado.							

El ensayo comenzó en enero de 2018, cuando el grupo de investigación de Genética de Hortícolas, en colaboración con la casa de semillas Nunhems, decide iniciar un proyecto de investigación para estudiar el efecto que genera el mutante insensible a etileno de calabacín si se emplea como patrón de sandía. Para ello se comenzó con un experimento previo que sirvió para determinar la viabilidad de los ensayos posteriores y saber cuál es el tipo de injerto más idóneo.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Tras determinar que el ensayo era factible, en marzo de 2018 se llevó a cabo un primer ensayo a escala real. En él, se realizó la evaluación fenotípica y fisiológica del efecto del injerto en diferentes variedades de sandía (P84, P86 y P87) sobre el mutante insensible a etileno *EIN-4* de calabacín. Las tres variedades difieren entre sí fenotípicamente en la expresión sexual, siendo P86 una variedad estable monoica, P84 más inestable y P87 andromonoica.

Por último, en marzo 2019, se decidió evaluar de nuevo el efecto del injerto en el fenotipo y en la fisiología de la planta de sandía, pero esta vez se iba a emplear una sola variedad (P86) y diferentes portainjertos mutantes insensibles al etileno (*EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*), finalizándose el ensayo en julio de 2019 con la evaluación de la fertilidad de las plántulas.

3.4. Manejo del cultivo y métodos empleados:

3.4.1. Fase de germinación

Todas las variedades de sandía fueron sembradas en semilleros especializados, en las instalaciones de “Vitalplant” (experimento previo y ensayo 1) y “Natural Green” (ensayo 2). Las semillas de sandía fueron cedidas por la empresa “Nunhems”.

Por otro lado, las semillas de los patrones fueron germinadas en las cámaras de cultivo de las instalaciones de UAL-ANECOOP, debido a la necesidad de aplicar la técnica de triple respuesta sobre las variedades mutantes, con el fin de determinar si son sensibles o insensibles a etileno en estadio de plántula.

Tanto las sandías como los patrones crecieron sobre turba en bandejas de poliestireno de cincuenta y cuatro (54) alveolos, manteniéndose en cámaras de cultivo hasta que se desarrolló por completo la radícula (2-3 días).

3.4.2. Técnica de triple respuesta a etileno

La técnica de tratamiento de triple respuesta a etileno, descrita por Kinght & Crocker en 1913 y adaptada por el grupo de investigación de Genética de Hortícolas (UAL), consiste en aplicar un tratamiento exógeno de etileno (durante 4 minutos de 50 ppm) sobre plántulas en condiciones de oscuridad, y en una cámara fitotrón

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

completamente hermética. Tras el tratamiento, la cámara se mantendrá cerrada durante cinco días. Este tratamiento nos permitirá distinguir entre plantas sensibles e insensibles en los diferentes mutantes de calabacín. Las plántulas insensibles elongarán el hipocótilo y la zona radicular; mientras que las plantas sensibles (WT o silvestres) no se elongarán y se producirá en ellas un engrosamiento del hipocótilo y geotropismo transversal del rizoma.



Figura 14. Fenotipos de triple respuesta a etileno en plántulas etioladas de la familia mutante *EIN-1* de *C. pepo*. Las plantas “WT” mostraron una triple respuesta positiva a etileno, caracterizada por una reducción en la longitud del hipocotilo y la raíz, y un hipocotilo más grueso. Las plantas insensibles al etileno “*ein*” no responden al etileno y muestran hipocotilo más largo y delgado, y raíces más largas. Ciertas plantas en la familia mostraron un fenotipo de triple respuesta intermedia (IN). Fuente García et al., 2018.



Figura 15. Identificación y segregación de las plántulas sensibles/insensibles a etileno, tras el tratamiento con etileno (Foto de elaboración propia).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

De este modo se clasificaron los patrones mutantes, dividiéndolos en **sensibles** (S o WT), **intermedias** (Int) para aquellas que presentan un fenotipo intermedio (esto ocurre en *EIN-1*, *EIN-2* y *EIN-3*), o **insensibles** a etileno (I).

Para *EIN-1*, *EIN-2* y *EIN-3* el genotipo insensible es homocigoto recesivo, por ello, se requieren 2 retrocruzamientos para obtener los cultivares con fenotipo insensible a etileno, siendo la segregación esperada tras el segundo retrocruzamiento de $\frac{1}{4}$ de plantas con fenotipo sensible, $\frac{1}{2}$ de plantas con fenotipo intermedio y $\frac{1}{4}$ de plantas con fenotipo insensible; cómo se puede observar en la **Figura 15**.

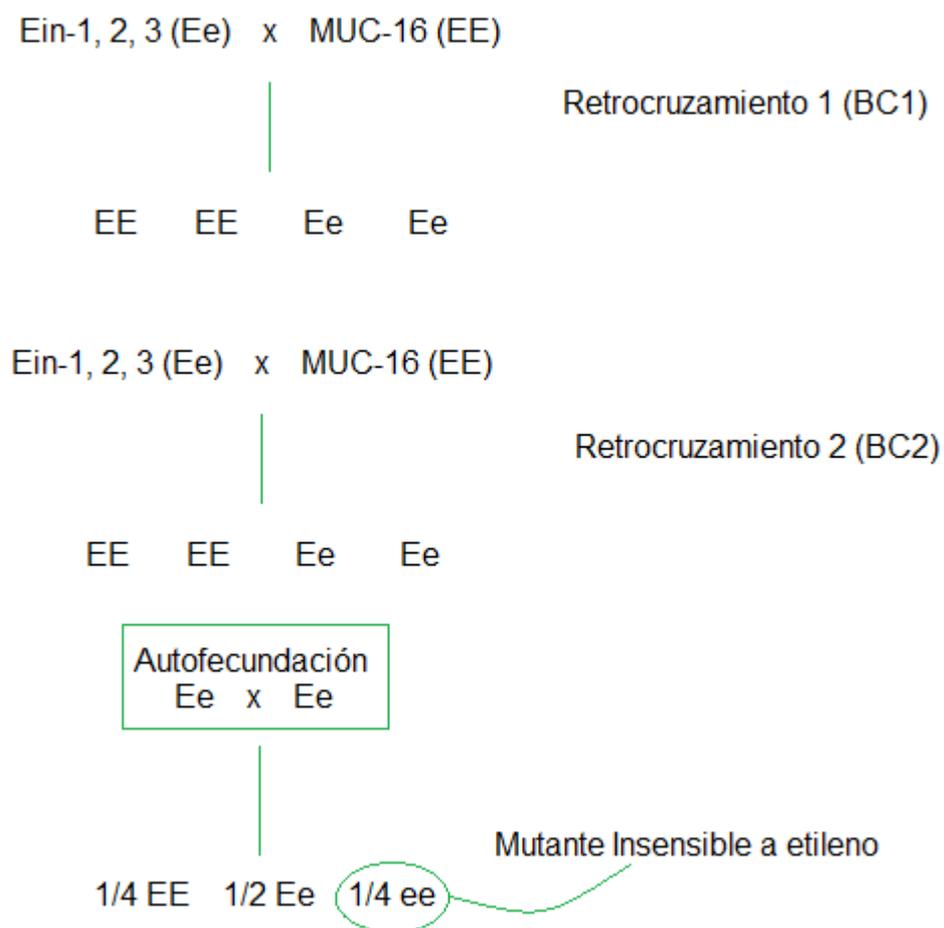


Figura 16. Segregación mendeliana esperada tras la autofecundación, en una generación BC1 y BC2 heterocigota para la mutación.

Para *EIN-4*, el genotipo insensible es dominante, y, por lo tanto, tras realizarse el retrocruzamiento, entre *MUC-16* y *EIN-4*, la segregación esperada sería de $\frac{1}{2}$ para el fenotipo sensible y $\frac{1}{2}$ para el fenotipo insensible.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

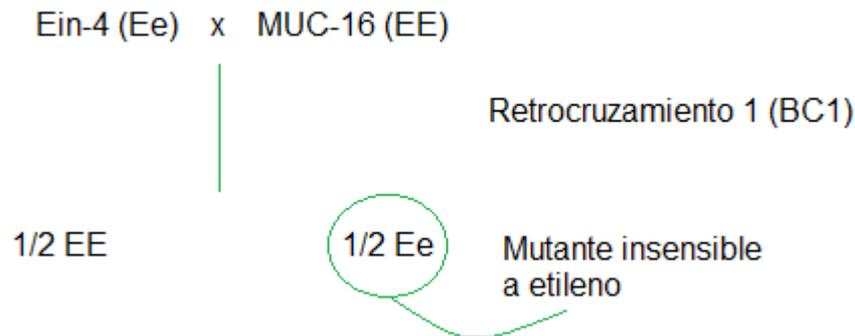


Figura 17. Segregación mendeliana esperada tras el retrocruzamiento entre *MUC-16* y *EIN-4*.

Los datos de siembra serán descritos en el análisis de prendimientos de los tres ensayos realizados.

3.4.3. Fase de injertos.

Tras realizar la clasificación de los patrones y desarrollar la plántula hasta la segunda hoja verdadera, tanto en sandía como en el calabacín, se procedió a realizar los injertos.

En el experimento que comenzó en enero de 2018, se probaron tres tipos de injertos, para ver cuál de ellos era el más adecuado a nuestras condiciones de trabajo. Los injertos seleccionados para esta prueba fueron:

- Injerto de aproximación: tanto la variedad como el patrón mantienen su sistema radicular. Este tipo de injerto fue probado porque no se requieren unas condiciones ambientales tan estrictas en periodo de soldadura entre plantas, por lo tanto, podría ser una buena opción si se quiere realizar todo el ensayo en la Universidad de Almería en vez de en un semillero especializado.
- Injerto de púa en hendidura: en este caso, se elimina el sistema radicular de la variedad, manteniéndose el del patrón. Este tipo de injerto fue probado porque reduce el riesgo de franqueo después del prendimiento del injerto, y la unión que se produce entre el injerto y la variedad es más robusta, en comparación con el de aproximación.
- Injerto adosado: en él se elimina el sistema radicular de la variedad y del patrón. Este tipo de injerto es el más empleado en la actualidad en los

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

semilleros especializados de Almería. Tanto la unión que se produce, como el vigor, es mucho mayor y no se corre riesgo de franqueo, pero requiere unas condiciones climáticas muy controladas.

Experimento 0:

Se injertaron tres bandejas de 54 alveolos cada una, con un tipo de injerto distinto en cada bandeja, como se puede observar a continuación.

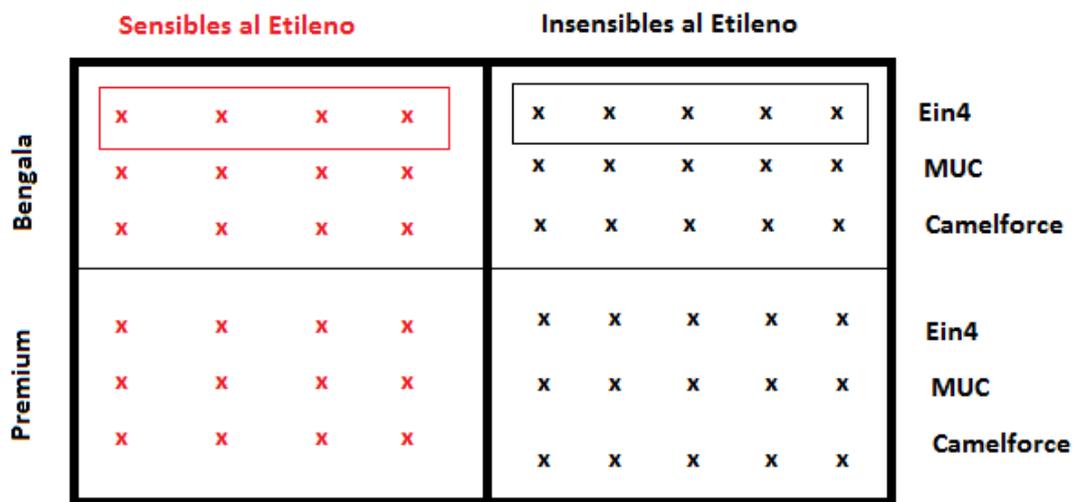


Figura 18. Distribución de las plántulas en el ensayo inicial (elaboración propia).

Cada bandeja se dividió en dos partes, la mitad de ella usaba como variedad de sandía “Bengala”, y en la otra parte “Premium” (ambas de la empresa Nunhems). Por otro lado, en el caso del portainjerto se emplearon 4 genotipos: *EIN-4* como mutante (5 plantas de sandía fueron injertadas sobre plantas mutantes Insensibles a etileno, y 4 sobre plantas WT Sensible), *MUC-16*, y *Shintosa Camelforce* (Nunhems).

Tras evaluar las diferentes ventajas y desventajas de cada uno de ellos, se constató que, aunque en nuestras condiciones perdíamos muchas plántulas con el injerto adosado, una vez se producía la soldadura, fue el que mejores resultados dio. Por ello, para el resto de los ensayos se empleó el injerto de tipo adosado.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Ensayo 1:

A finales de marzo de 2018, y tras haber evaluado inicialmente cual era la mejor opción de injerto, se procede a comenzar con el ensayo a gran escala donde se realizó la evaluación fenotípica y fisiológica del efecto del injerto en diferentes variedades de sandía (P84, P86 y P87) sobre el mutante insensible a etileno *EIN-4* de calabacín. Las tres variedades difieren entre sí fenotípicamente en la expresión sexual, siendo P86 una variedad estable monoica, P84 una variedad inestable a la monoecia, y P87 una variedad andromonoica. En este caso, todos los injertos se realizaron en las instalaciones de UAL-ANECOOP, con la ayuda de una especialista en injertos, y con la colaboración de técnicos de Nunhems.

Se injertaron tres bandejas de 150 alveolos de las diferentes combinaciones, como se puede observar en la tabla descrita a continuación.

Tabla 9. Nº de plántulas injertadas en marzo 2018.

PORTAINJERTO	VARIEDAD	Nº PLÁNTULAS
<i>EIN-4 Insensible</i>	P84	45
<i>EIN-4 Insensible</i>	P86	41
<i>EIN-4 Insensible</i>	P87	42
<i>EIN-4 Sensible</i>	P84	48
<i>EIN-4 Sensible</i>	P86	41
<i>EIN-4 Sensible</i>	P87	44
<i>S. Camelforce</i>	P84	49
<i>S. Camelforce</i>	P86	42
<i>S. Camelforce</i>	P87	49

Ensayo 2:

A finales de marzo de 2019, comienza la fase de injertos en el segundo ensayo programado. Esta vez, se decide llevar a cabo toda esta fase en un semillero especializado, “Natural Green”, ya que en el anterior ensayo se cree que se produjeron muchas marras (plantas senescentes que se producen tras el trasplante) debido a las condiciones en las que se realizaron los injertos. Además, se evaluó de nuevo el efecto del injerto en el fenotipo y en la fisiología de la planta de sandía,

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

pero esta vez se decidió emplear una sola variedad (P86) y diferentes portainjertos mutantes insensibles al etileno (*EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*).

Se injertaron 12 bandejas de 96 alveolos de las diferentes combinaciones citadas, tal y como se puede observar en la tabla descrita a continuación.

Tabla 10. Nº de plántulas injertadas en marzo 2019.

Línea	Fenotipo de triple respuesta a etileno	VARIEDAD	Nº PLÁNTULAS
<i>Ein1</i>	<i>Insensible</i>	P86	78
	<i>Intermedio</i>	P86	54
	<i>Sensible</i>	P86	70
<i>Ein2</i>	<i>Insensible</i>	P86	70
	<i>Intermedio</i>	P86	52
	<i>Sensible</i>	P86	50
<i>Ein3</i>	<i>Insensible</i>	P86	78
	<i>Intermedio</i>	P86	70
	<i>Sensible</i>	P86	49
<i>Ein4</i>	<i>Insensible</i>	P86	78
	<i>Sensible</i>	P86	82
<i>MUC-16</i>		P86	70

En los 3 ensayos realizados, los injertos se mantuvieron en las cámaras de prendimiento durante 5 días, manteniéndose unas condiciones microclimáticas de 25-26 °C, y una humedad entorno al 95%. Además, se alargó el fotoperiodo en 3-4 horas, mediante el empleo de luces led en el fitotrón.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”



Figura 19. Detalle de cómo logramos mantener la humedad en las cámaras de prendimiento de las instalaciones de UAL-Anecoop (fotos elaboración propia).

Una vez pasados los 5 días en cámara, se sacan las bandejas y se extienden en los denominados “tunelillos” como se puede observar en la **Figura 19**. Estos tunelillos permiten atenuar el impacto sobre la plántula del clima real, dotando de una mejor adaptación al microclima del invernadero.



Figura 20. Tunelillo semillero Natural Green (foto elaboración propia).

Tras tres días de adaptación, la partida esta lista para ser extendida en las instalaciones del semillero y evaluar el prendimiento de los injertos.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

3.4.4. Trasplante

Una vez la planta dispuso de 3-4 nudos por encima del injerto, se realizó su trasplante.

- **Experimento 0**: el trasplante se hizo en febrero de 2018, al invernadero experimental de la Universidad de Almería (UAL). El trasplante se realizó en maceteros de 5 L de volumen. El marco de plantación utilizado fue de 2 x 0,5 m². Se sembraron un total de seis líneas, distribuyendo al azar las plantas por el invernadero.



Figura 21. Maceteros empleados en el trasplante, Volumen 5 L.

- **Ensayo 1**: el trasplante se hizo en abril de 2018 al invernadero experimental de la UAL, en maceteros de 5 L de volumen. El marco de plantación utilizado fue de 2 x 0,5 m². Se sembraron un total de nueve líneas, distribuyendo al azar las plantas por el invernadero, como se puede ver a continuación.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

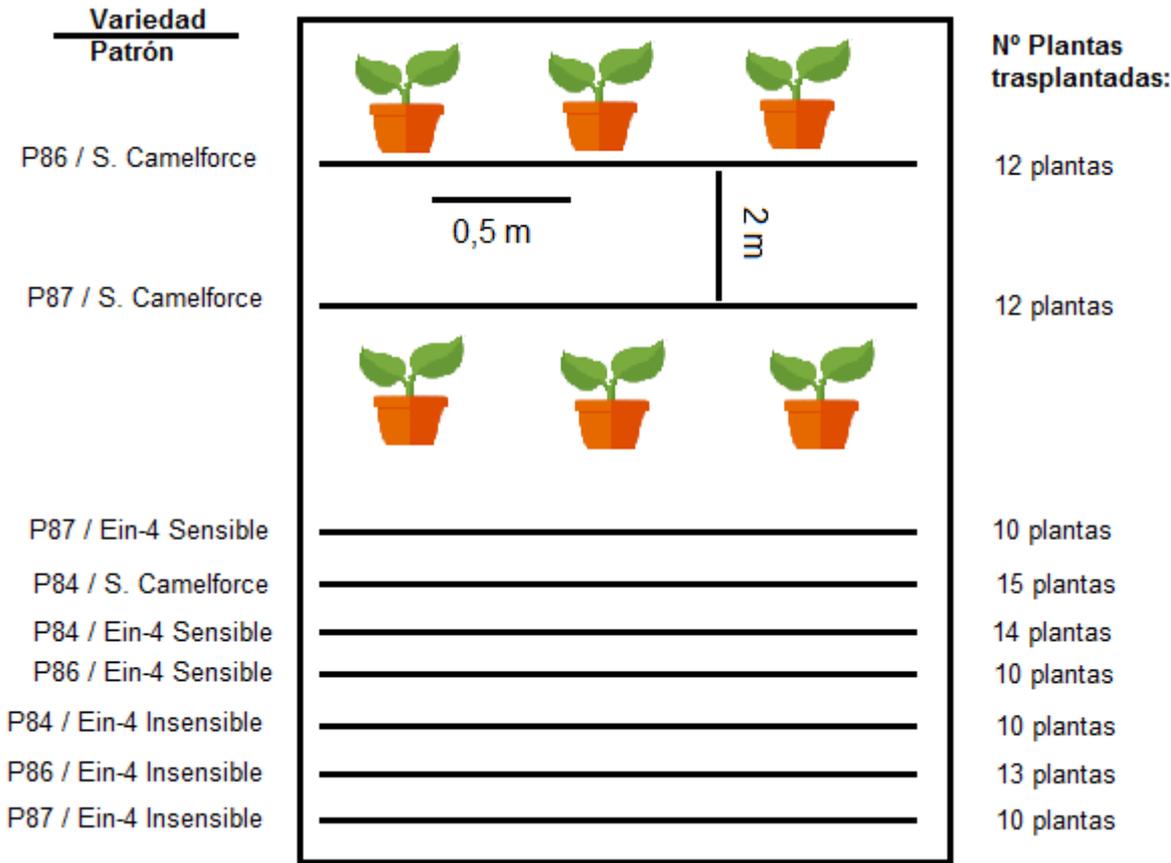


Figura 22. Distribución de las plantas en el invernadero, Ensayo 1 (elaboración propia).



Figura 23. Visión panorámica del ensayo, recién hecho el trasplante (elaboración propia).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- **Ensayo 2:** el trasplante se hizo en abril de 2019 al invernadero tipo multitunel de la finca experimental UAL-ANECOOP. En esta ocasión el trasplante se realizó en suelo enarenado. El marco de plantación utilizado fue de 2 x 0,5 m², pero en líneas pareadas y colocadas al tresbolillo. Se sembraron un total de trece líneas, distribuyendo al azar las plantas por el invernadero en dos sectores, como se puede ver a continuación.

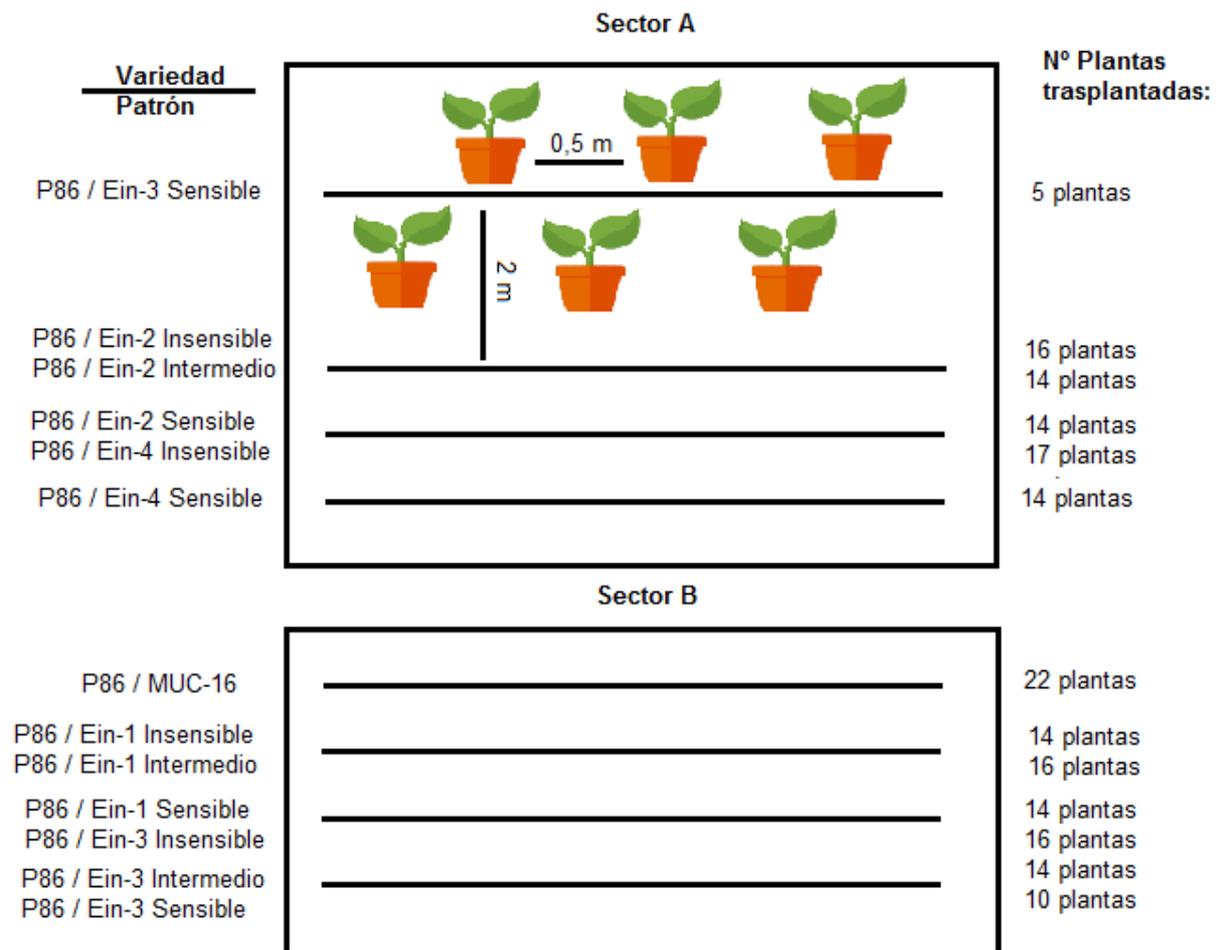


Figura 24. Distribución de las plantas en el invernadero, Ensayo 2 (elaboración propia).

3.4.5. Evaluación del injerto:

Una vez las plantas se adaptan a las condiciones del invernadero se llevó a cabo la toma de datos in situ, tal y como a continuación se detalla.

- **Experimento 0:** Para determinar cuál era el injerto que más se adecuaba a las condiciones de trabajo, se evaluó la **tasa de prendimiento** a los 15 días

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

tras ser injertadas (es decir, justo antes de realizar el trasplante a campo). Para ello, se anotó el número de plantas prendidas (“arraigar la planta en la tierra”, R.A.E.) y no prendidas. Además, se tomaron fotografías de las plantas no prendidas y se anotaron las principales causas por las cuales no se produjo la soldadura.



Figura 25. Dos injertos no prendidos de plantas WT sensibles (a la izquierda) y del mutante insensible (a la derecha) del injerto tipo púa en hendidura, debido a un estrangulamiento en el cuello de la raíz (fotos de elaboración propia).

También se evaluó su adaptación al campo, contabilizando el **número de marras** que se produjeron a los 10 días del trasplante.

Tanto en el ensayo 1, como en el ensayo 2, también se evaluó la tasa de prendimiento a los 15 días tras ser injertadas las plantas, siguiéndose el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

3.4.6. Evaluación de la distribución de flores en el tallo principal y el fenotipo sexual.

El principal objetivo de este proyecto fue evaluar si el injerto con *C. pepo* es capaz de modificar la floración en sandía. Para ello, se estudió la **distribución de flores** en el tallo principal en 30 nudos tras el injerto, anotándose para cada nudo si era vegetativo, flor masculina o flor femenina.

El fenotipo sexual en sandía puede ser monoico (cuando, sobre un mismo pie de planta, desarrolla flores unisexuales femeninas y unisexuales masculinas, o andromonoico (cuando desarrolla flores unisexuales masculinas y bisexuales, en un mismo pie de planta). Para evaluar el **nivel de andromonoecia** (I.A.) en cada injerto, se puntuó la bisexualidad siguiendo las directrices marcadas por la escala descrita por Manzano et al., 2016:

- I.A. = 1, para flores unisexuales femeninas, sin desarrollo de estambres.
- I.A. = 2, para flores bisexuales cuyas anteras no son capaces de producir polen, y con estambres de tamaño medio.
- I.A. = 3, flores hermafroditas, con los 3 estambres completamente desarrollados y funcionales (anteras capaces de producir polen).



Figura 26. Clasificación de las flores pistiladas de *C. lanatus* según su nivel de bisexualidad, índice de andromonoecia. (fotos elaboración propia).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

3.4.7. Seguimiento del desarrollo del fruto y evaluación de la fertilidad del injerto:

Una vez finalizado el conteo de flores, se empezó la segunda fase del ensayo de campo consistente en evaluar la **fertilidad** del **injerto** (esta fase no se realizó en el experimento 0).

En primer lugar, se llevaron a cabo las polinizaciones manualmente, realizándose autofecundaciones, es decir, sobre una misma planta se extrae una flor estaminada, se rompen los pétalos de la flor y se deposita el polen sobre el estigma de una flor femenina (**Figura 27**).



Figura 27. Proceso de polinización manual (fotos propias).

Tras la polinización se etiquetó cada flor, anotándose: número de planta, genotipo, autofecundación, estado de desarrollo de sus estambres en función de la escala descrita por Manzano et al. (2016) para *C.lanatus*, y la fecha.

Tras 15 días, se evaluó visualmente la fecundación, anotándose el número de frutos cuajados, el número de frutos abortados, y se fotografiaron los frutos, describiéndose las principales razones de los abortos.

3.4.8. Otros caracteres evaluados:

Además de lo expuesto anteriormente, se hicieron otros experimentos para evaluar si se generaban diferencias sustanciales entre los diferentes genotipos estudiados sobre caracteres de interés agronómico.

Ensayo 1: en el ensayo de 2018, se evaluó si existían diferencias significativas en el vigor de la planta. Para valorar este carácter se midió:

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- Altura de la planta: se tomaron dos medidas, una en el momento de entutorar la planta (10 nudos aproximadamente) y otra pocos días antes de las polinizaciones (40 nudos aproximadamente). Para ello se empleó una cinta métrica.
- Longitud de los entrenudos, tomándose 5 medidas de 5 nudos consecutivos, entre el nudo 10 y el 15. Para ello se empleó el calibre digital de vernier.
- El número de tallos secundarios desarrollados hasta el décimo nudo.

Ensayo 2:

En el ensayo de 2019, se evaluaron otros parámetros relacionados con el poder de enraizamiento del injerto. determinándose:

- Longitud del portainjerto y longitud de la variedad, empleándose el calibre digital de vernier.
- Longitud del sistema radicular, empleándose el calibre digital de vernier.
- Peso fresco y peso seco (tras haber secado las muestras en la estufa, durante 3 días a 80 °C), utilizándose balanzas digitales de precisión.



a. Longitud del sistema radicular (primera medida)



b. Plántulas tomadas para el ensayo, genotipo P86 / WT sensible de la línea *EIN-4*

Figura 28. Evaluación de la viabilidad del injerto.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Se realizaron dos medidas, una tras 5 días de terminar el proceso del injerto (es decir, tras finalizar la fase de climatización al invernadero) y otra cuando se retiraron las plantas definitivamente del semillero (a los 15 días aproximadamente). Se evaluaron al menos 5 plantas por genotipo y medida.

Los datos de estos dos ensayos no serán discutidos en el presente trabajo, ya que serán utilizados para otros proyectos posteriores.

3.5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos a lo largo de los ensayos realizados han sido procesados mediante el software “Statistix” en su versión 8.0. Con él se realizó un **test de análisis de varianza** (ANOVA), para determinar las diferencias existentes entre las distintas líneas de trabajo y las diferentes combinaciones de injertos empleados. Una vez hecho el análisis, se realizó una comparación múltiple de los resultados a través del **test de LSD de Fisher**, para obtener las diferencias entre las medias aritméticas. Por último, se realizó una estadística descriptiva para organizar el conjunto de datos introducidos y calcular las medidas de centralización y dispersión para un uso posterior.

4. Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Experimento 0:

4.1.1. Evaluación de la viabilidad del proyecto y elección del portainjerto más adecuado a las condiciones de trabajo.

En una primera instancia, se evaluó la **tasa de prendimiento** descrita en la **Figura 29**. Como se puede observar, la tasa de prendimiento es superior en el injerto de tipo aproximación, pues solo se perdieron 2 plantas de 54 injertadas, corroborando los trabajos indicados de la revisión bibliográfica que indican que las condiciones de trabajo en la fase de injerto condicionan el prendimiento. Por ello, debido a las condiciones inestables microclimáticas del fitotrón (temperatura y humedad), se incrementó el número de plantas no prendidas en el injerto de tipo adosado (la tipología más sensible a las fluctuaciones microclimáticas en la fase de soldadura).

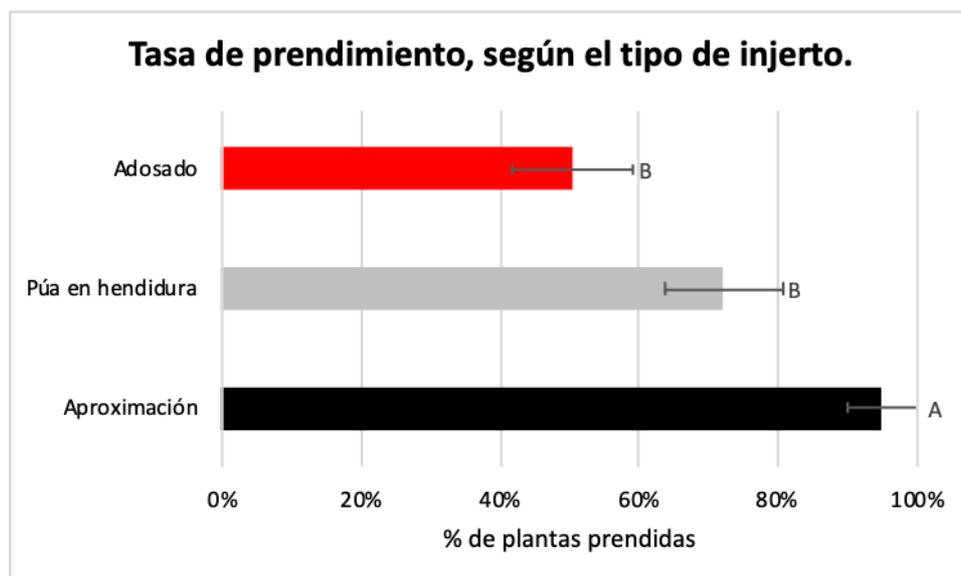


Figura 29. Tasa de prendimiento, según el tipo de injerto (aproximación, púa en hendidura y adosado), a los 15 días de realización del injerto. Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de injertos ($p \leq 0,05$).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Sin embargo, cuando se evaluó la adaptación al campo de las plantas, se observó un incremento en el número de plantas perdidas o marras debido al franqueo del injerto en la tipología de aproximación (**Figura 30**).



Figura 30. Porcentaje de plantas que sobreviven 10 días tras el trasplante, según el tipo de injerto (aproximación, púa en hendidura y adosado). Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de injertos ($p \leq 0,05$).

Este hecho, se debe principalmente a que 5 días después del trasplante a macetero y tras haberse adaptado la planta a las condiciones climáticas del invernadero, en los injertos de aproximación tuvimos que cortar el tallo de la sandía por debajo del injerto, dejándose como único sistema radicular el del patrón. Este acto generó grandes problemas de franqueo o enraizamiento del tallo de la variedad (Gómez, 2015), y solo se pudieron observar los síntomas tras el corte del tallo de la variedad. Por ello es posible que en algunos casos hayamos considerado algunos falso positivo de prendimiento, produciéndose la senescencia de la planta en los días posteriores al corte.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

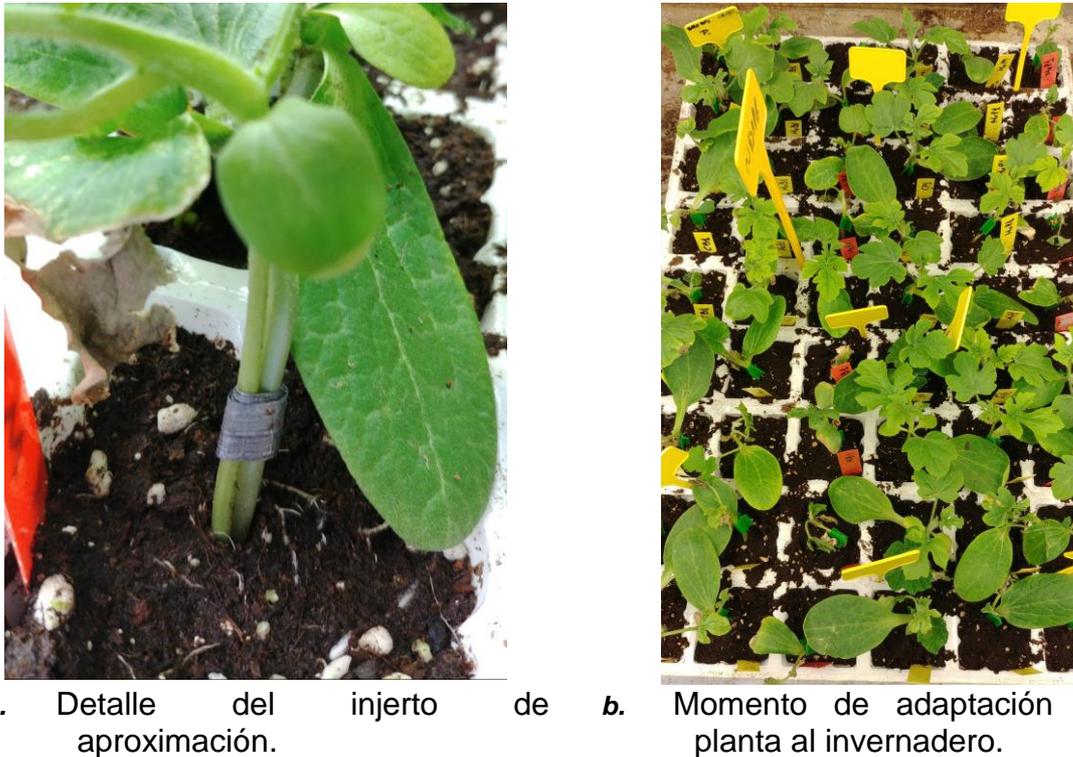


Figura 31. Detalles del experimento inicial (fotos propias).

Como resultado de estos acontecimientos se tomó la decisión de emplear para los ensayos posteriores la **tipología de injerto adosado**, ya que como se muestra en la **Figura 29**, una vez finalizada la fase de soldadura, el injerto es muy fiable y no se producen marras en el trasplante. Por consiguiente, para evadir los diferentes problemas sufridos en la fase de prendimiento debido a las condiciones de trabajo en el Ensayo 1, se decidió **aumentar** la **muestra inicial** de plantas injertadas, de manera que al menos se tuvieran 10 plantas en perfectas condiciones para trasplantar.

4.2. Ensayo 1:

4.2.1. Evaluación del injerto

En este primer ensayo, fueron injertadas tres bandejas de ciento cincuenta alveolos de cada genotipo, P86, P84 y P87. Para cada uno de los genotipos se emplearon tres tipos de portainjertos, un patrón comercial Shintosa Camelforce, el patrón mutante insensible a etileno *EIN-4* y el patrón sensible a etileno de la familia *EIN-4*.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Se injertaron un mínimo de cuarenta plantas de cada genotipo, con el objetivo de obtener al menos veinte plantas para trasplantar a invernadero.

Una vez se encuentran extendidas las plántulas en el semillero y superada la fase de adaptación al invernadero, se realizó la evaluación de la tasa de prendimiento (**Figura 32**). Los resultados obtenidos son un poco dispares. En el caso de la línea P86, se obtienen veintinueve plantas del patrón comercial, dieciocho del patrón insensible y trece del sensible, cumpliéndose el objetivo de obtener al menos veinte plantas tan solo en el patrón comercial. En P84, de nuevo se obtienen diferencias significativas entre el patrón comercial (26/49) y los dos experimentales (10/45 para el insensible y 14/48 para el sensible). Por último, en P87 se obtienen porcentajes de prendimiento muy bajos, en ninguna de las tres variables se logra el objetivo de al menos veinte plantas para el trasplante a invernadero (12/42 para el insensible, 14/44 para el sensible y 12/49 para el comercial). Destaca el hecho de que el patrón comercial haya sufrido tantos problemas en la fase de soldadura.

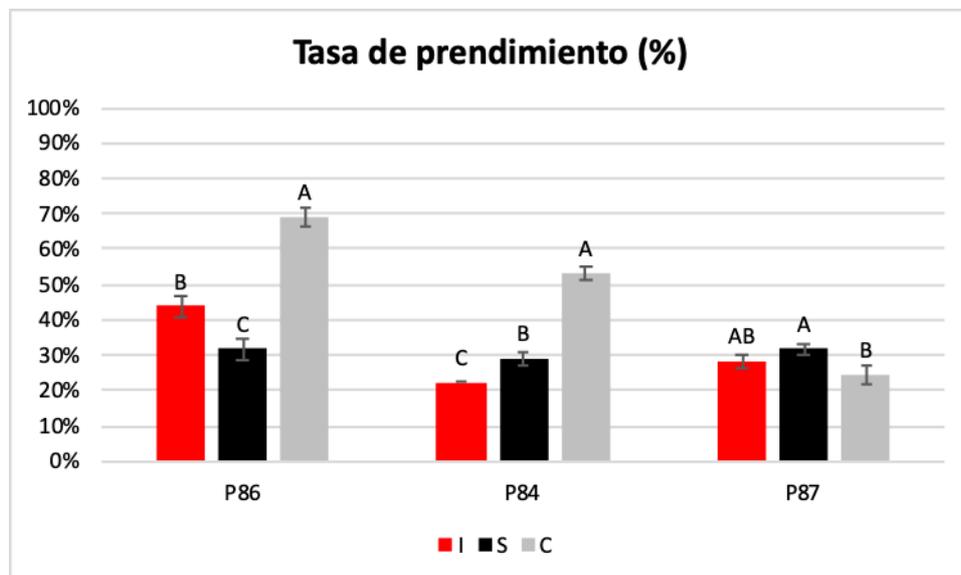


Figura 32. Tasa de prendimiento, según el tipo de portainjerto, a los 15 días de ser injertadas. Se representa el error estándar de cada genotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos fenotipos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “S” patrón sensible y “C” patrón comercial.

El éxito del injerto reside en una mayor resistencia al estrés abiótico y biótico, resistencia a patógenos, y compatibilidad de la unión del injerto en términos de formación rápida de las conexiones vasculares entre el patrón y el vástago, y la rápida renovación del crecimiento de la raíz y el dosel (Cohen et al., 2007). En las

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

plantas injertadas, la regeneración vascular se restablece mediante procesos complejos, que incluyen la diferenciación estructural del tejido parenquimatoso de ambos lados de la unión del injerto en tubos de xilema y floema (Aloni et al., 2010).

Hartmann et al. (2002) analizaron la secuencia de eventos en la formación de la unión del injerto:

“1º El tejido de corte del vástago que dispone de una actividad meristemática, se pone en contacto con el tejido del portainjerto cortado de manera similar, de manera que las regiones cambiales de ambos se juntan con el fin de interconectarse a través del callo. Una vez que los dos componentes del injerto, el portainjerto y el vástago, están en contacto, las nuevas células parenquimáticas proliferan desde ambas partes, produciéndose un tejido calloso que se entremezcla y se interbloquea, llenando los espacios entre los dos componentes conectándose entre sí.

2º Las células iniciales del cámbium se diferencian del callo recién formado, constituyendo una conexión cambial continua entre el patrón y el vástago. Antes de la unión de la cavidad vascular a través del puente del callo, se diferencian el xilema y el floema inicial. El xilema reparador de la herida es generalmente el primer tejido diferenciado que acopla la unión del injerto, seguido del floema reparador de la herida.

3º En el último paso del proceso de soldadura del injerto, la capa cambial recién formada en el puente del callo comienza una actividad cambial típica que forma nuevos tejidos vasculares. La producción de nuevo xilema y floema permite la conexión vascular entre el vástago y el patrón”.

Para la mayoría de los autores, lo descrito anteriormente se considera el requisito básico para un injerto exitoso (Moore y Walker, 1981 a y b; Yeoman, 1984; Tiedemann, 1989). Posteriormente, Dengler en 2001 en su revisión sobre la regulación del desarrollo vascular afirmó que este incluye: la formación del patrón longitudinal de las cadenas vasculares primarias, la formación del patrón radial de xilema y floema dentro de las cadenas vasculares, la diferenciación de tipos celulares especializados de xilema y precursores de floema, y la proliferación celular y la diferenciación celular dentro del cambium vascular. En este contexto, se han realizado diversos ensayos de regeneración vascular en los que las hormonas se aplicaron exógenamente a los segmentos del tallo, donde se indica que a

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

concentraciones bajas (0,1%, p/p, aplicadas en lanolina) de ácido indol-acético (IAA) se estimula la diferenciación del floema, mientras que a niveles más altos (1,0%, p / p) inducen la diferenciación del xilema (Aloni, 1980).

Se ha demostrado que otras fitohormonas, particularmente las citoquininas a una concentración de 10 g/ml, inducen la diferenciación de elementos vasculares en tallos heridos (Aloni et al., 1990). Del mismo modo, la auxina es otra sustancia importante involucrada en el desarrollo de la unión entre el vástago y el patrón, actúa liberando las cadenas vasculares del patrón y del vástago e induce la diferenciación de los tejidos vasculares, que funcionan como sustancias morfogénicas (Aloni, 1987; Mattsson et al., 2003). También se ha descubierto que la translocación de una auxina desde el vástago al patrón acelera la formación de un injerto exitoso en Cactus (Shimomura y Fujihara, 1977).

En resumen, la formación de puentes vasculares a través de la zona de injerto es una necesidad primordial para el establecimiento de injertos, pero el segundo requisito es el mantenimiento de la comunicación entre el portainjerto y el injerto (Aloni, 2010).



Figura 33. Detalle de la plántula en la fase de soldadura de la línea P84. Se observa el estrés que sufre la planta al carecer de instalaciones adecuadas para llevar a cabo el proceso (foto propia).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Al realizar los injertos en unas condiciones que no son las adecuadas y con cámaras de prendimiento que no son las requeridas para el injerto, posiblemente hayan propiciado que, en la fase más determinante, fase de soldadura, no se haya logrado una correcta comunicación vascular entre el portainjerto y el injerto, lo que ha propiciado una falta de prendimientos.

4.2.2. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre la expresión sexual en sandía.

En el presente trabajo, se estudió el fenotipo sexual de las tres líneas consanguíneas de sandía (P86, P84 y P87) sobre diferentes portainjertos (mutante *EIN-4* Insensible, plantas WT sensibles de la línea *EIN-4*, y Shintosa Camelforce). Para ello, se realizó el fenotipado de flores estaminadas y pistiladas en los 30 primeros nudos del tallo principal tras la soldadura del injerto, en al menos 10 plantas por genotipo.

a) Nº de flores femeninas

En plantas angiospermas monoicas como *C. lanatus*, han sido identificadas tres tipos de flores: estaminadas o masculinas, pistiladas o femeninas y hermafroditas o bisexuales. En este sentido, el fenotipo sexual de una planta depende directamente de la presencia o ausencia y distribución de los tipos de flores anteriormente descritos en plantas individuales (Ji et al., 2015).

En función del desarrollo de los órganos florales, los fenotipos de las flores fueron clasificadas en flor masculina, femenina, bisexual y hermafrodita (**Figura 34**). Los estudios recientes sobre la modulación de la expresión sexual en sandía mediante aplicación de etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico) indican que el etileno reduce la producción de flores femeninas/bisexuales y promueve la formación de flores masculinas (Zhang et al., 2017; Manzano et al., 2016). Si el patrón de calabacín o calabaza es capaz de modificar la sensibilidad al etileno de la variedad de sandía, los patrones mutantes insensibles a etileno deberían favorecer la producción de flores femeninas/bisexuales y reducir la formación de flores masculinas.



Figura 34. Fenotipos florales en sandía (elaboración propia).

En este contexto nace el planteamiento de este proyecto, que trata de dilucidar si el uso de portainjertos mutantes insensibles a etileno produce un efecto sobre la expresión sexual de las variedades injertadas.

Los resultados obtenidos han sido un poco ambiguos, para la línea P86 (plantas monoicas) sí se observan diferencias significativas entre el patrón sensible y el insensible a etileno (**Figura 35**), observándose un mayor número de flores femeninas en el fenotipo insensible (5,12 flores femeninas) que en el sensible (media de 3,55 flores femeninas). Incluso, el patrón insensible se asemeja estadísticamente a los valores obtenidos del patrón comercial S. Camelforce. Sin embargo, para las líneas P84 y P87 (líneas andromonoicas) no observamos diferencias significativas entre los fenotipos sensibles e insensibles. Este hecho, también se observó en el estudio de Zhang et al. de 2017, donde en las plantas andromonoicas el tratamiento con etefón no redujo significativamente el número promedio de flores bisexuales. Parece, por tanto, que la condición andromonoica es mucho más estable que la monoica, y que los cambios hormonales son capaces de modificar la expresión sexual de plantas monoicas, pero no así la de plantas andromonoicas.

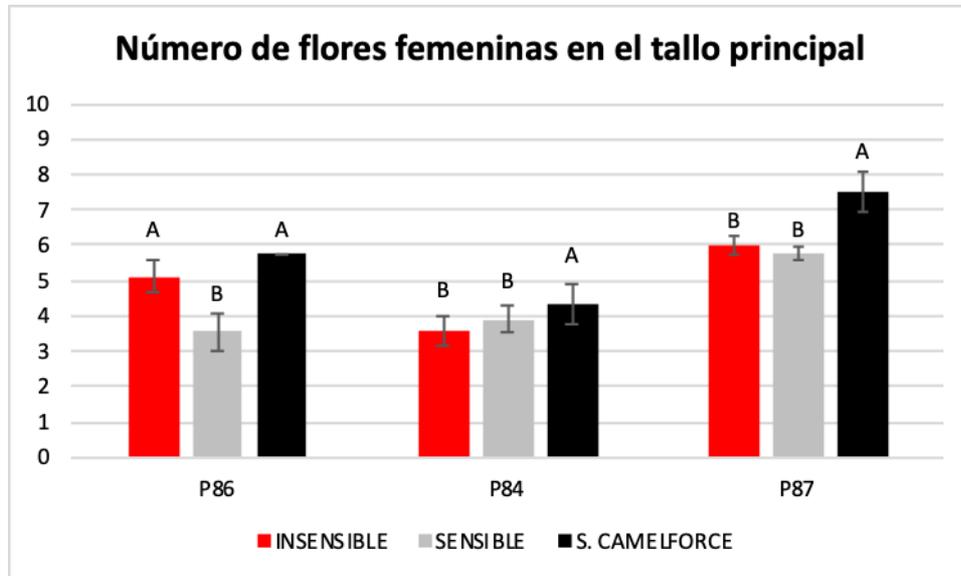


Figura 35. Número de flores femeninas en el tallo principal de distintos genotipos de sandía injertados sobre 3 patrones de *Cucurbita*: mutante insensible *Ein4*, plantas WT sensibles de la línea *Ein4*, y patrón comercial Shintosa Camelforce. Se han utilizado tres variedades de sandía: P86 (monoica), P84 (parcialmente andromonoica) y P87 (andromonoica). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre plantas de la misma variedad de sandía injertada sobre diferentes patrones de *Cucurbita* ($p \leq 0,05$).

b) Transición floral femenina

En sandía, se han hecho estudios recientes sobre el proceso de transición floral femenina. Manzano et al. (2016) reportaron que los tratamientos exógenos con inhibidores de etileno aceleran la aparición de la primera flor femenina. Por el contrario, si se aplican tratamientos exógenos con etefón, se retrasa la transición floral femenina (Manzano et al., 2014; Zhang et al., 2017).

En este contexto, el estudio ha mostrado resultados acordes a lo observado en la bibliografía. En las tres líneas de sandía estudiadas, la floración femenina se adelanta en aquellas plantas que habían sido injertadas sobre el patrón de calabacín insensible a etileno (**Figura 36**). Sin embargo, sobre el portainjerto insensible a etileno, tanto la líneas de sandía P86 (12,38 nudos de media) como la P87 (14,25 nudos de media), florecen después que las injertadas sobre el patrón comercial (9,25 nudos y 12,75 nudos, respectivamente). En el estudio de Zhang et al. (2017) se hace hincapié en que para plantas andromonoicas el retraso en la floración producido por el tratamiento exógeno con etefón era superior al mostrado por otros tipos sexuales. En nuestro estudio, sin embargo, los resultados indican que la

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

variedad más sensible al portainjerto insensible a etileno es la línea monoica (P86) y la línea parcialmente andromonoica (P84), pues la floración de la línea andromonoica P87 apenas se vio alterada por la sensibilidad al etileno del portainjerto. Estos resultados indican que la sensibilidad a etileno del genotipo de calabacín o calabaza que se utiliza como patrón puede alterar la expresión sexual de la variedad de sandía injertada, adelantando o atrasando la floración femenina y la producción.

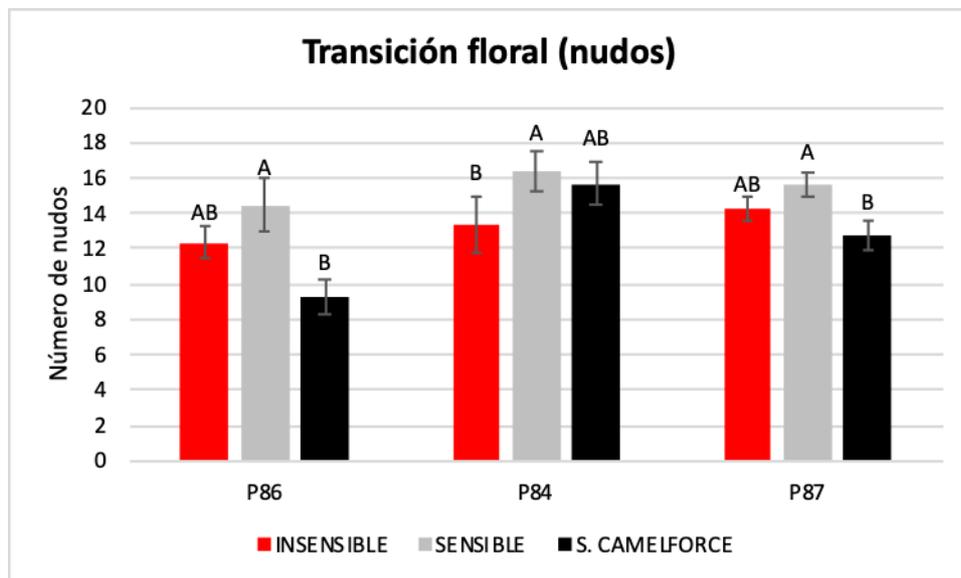


Figura 36. Transición floral femenina (número de nudos hasta la aparición de la primera flor femenina), en función del portainjerto empleado: *EIN-4* Insensible, *EIN-4* Sensible y Shintosa Camelforce; sobre tres variedades de sandía P86 (monoica), P84 (parcialmente andromonoica) y P87 (andromonoica). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre plantas de la misma línea de sandía injertadas sobre distintos patrones ($p \leq 0,05$).

c) Índice de andromonoecia y distribución de flores en el tallo principal

El índice de andromonoecia es un indicador del nivel de inestabilidad a la monoecia, y lo que muestra es el nivel de desarrollo de los estambres en las flores pistiladas (Martínez et al., 2014). Para evaluar el nivel de andromonoecia (I.A.) en cada injerto, se puntuó la bisexualidad siguiendo las directrices marcadas por la escala descrita por Manzano et al. (2016).

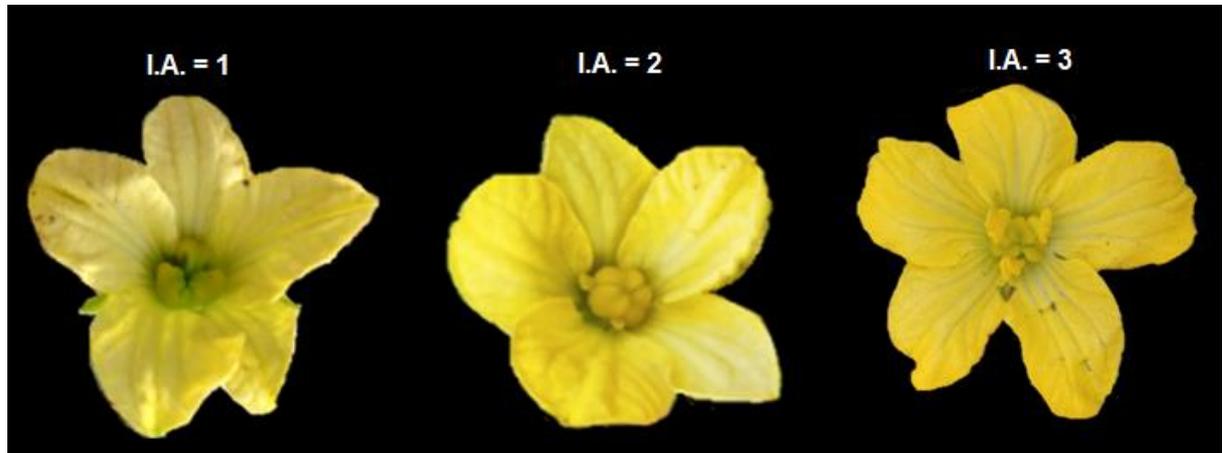


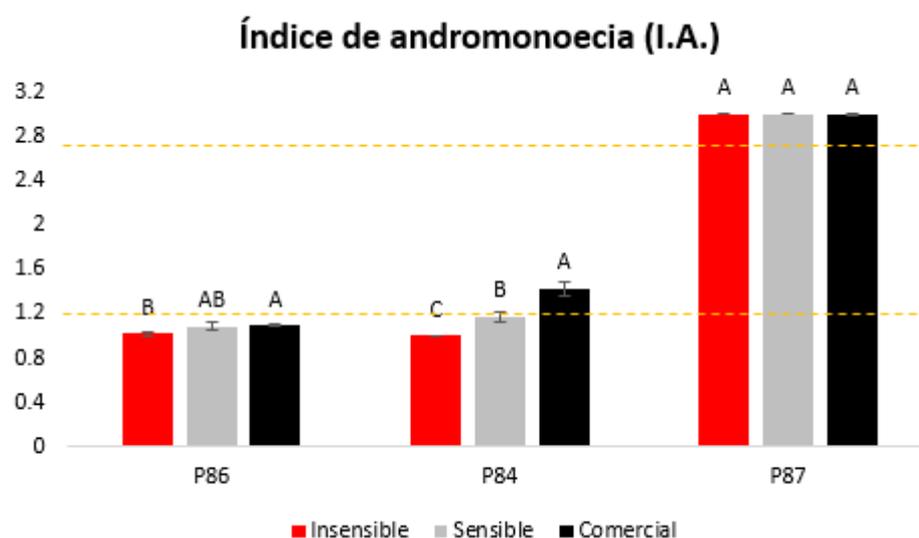
Figura 37. Clasificación de las flores pistiladas de *C. lanatus* según su nivel de bisexualidad, o índice de andromonoecia. Siguiendo las directrices marcadas por la escala descrita por Manzano et al., 2016. I.A. = 1, para flores unisexuales femeninas, sin desarrollo de estambres. I.A. = 2, para flores bisexuales cuyas anteras no son capaces de producir polen, y con estambres de tamaño medio. I.A. = 3, flores hermafroditas, con los 3 estambres completamente desarrollados y funcionales (anteras capaces de producir polen).

El nivel de andromonoecia de cada planta y genotipo se calculó como la media aritmética de un mínimo de cinco flores pistiladas en cada planta y al menos diez plantas por cada variable estudiada, puntuándose las flores en función de la clasificación de Manzano et al., 2016 (descrita en la **Figura 37** y en Materiales y métodos). Dicha escala confiere el fenotipo monoico para las plantas que muestran un IA = 1 – 1,20; aquellas con un IA = 1,20 – 2,70 se les considera parcialmente andromonoicas; y aquellas con IA \geq 2,70 se les considera andromonoicas.

En este mismo orden de ideas, solo se aprecian diferencias significativas sustanciales para el genotipo P84. La citada variedad ha sido fenotipada en diversas ocasiones por el Grupo de Investigación de Genética de Hortícolas de la Universidad de Almería, y en todas ellas, ha mostrado un fenotipo sexual parcialmente andromonoico. Sin embargo, el injerto con el patrón mutante insensible *EIN-4* ha conseguido reducir el número de flores bisexuales en la planta, dando lugar a una modificación en la expresión sexual (**Figura 38**). Estos resultados contrastan con lo esperado si el etileno es el responsable del arresto en el desarrollo de los estambres durante el desarrollo normal de las flores femeninas, pues una reducción en la producción o acción del etileno conduciría a la transformación de flores femeninas en bisexuales y hermafroditas (Manzano et al., 2014). La disminución de flores bisexuales y hermafroditas que observamos en la línea P84 injertada sobre el patrón

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

insensible a etileno podría indicar que la insensibilidad al etileno del patrón de calabacín no se transfiere directamente la variedad de sandía, sino que el patrón podría estar modificando la biosíntesis o señalización de otras hormonas o moléculas de señalización que, transferidas del patrón a la variedad, generan el fenotipo observado.



VARIEDAD	PORTAINJERTO	MEDIA	ERROR	COMPARACION MULTIPLE
P86	EIN-4 INSENSIBLE	1.0208	± 0.0208	B
P86	EIN-4 SENSIBLE	1.0866	± 0.0360	AB
P86	S. CAMELFORCE	1.0954	± 0.0132	A
P84	EIN-4 INSENSIBLE	1.0000	± 0.0000	C
P84	EIN-4 SENSIBLE	1.1703	± 0.0387	B
P84	S. CAMELFORCE	1.4232	± 0.0580	A
P87	EIN-4 INSENSIBLE	3.0000	± 0.0000	A
P87	EIN-4 SENSIBLE	3.0000	± 0.0000	A
P87	S. CAMELFORCE	2.9962	± 0.0037	A

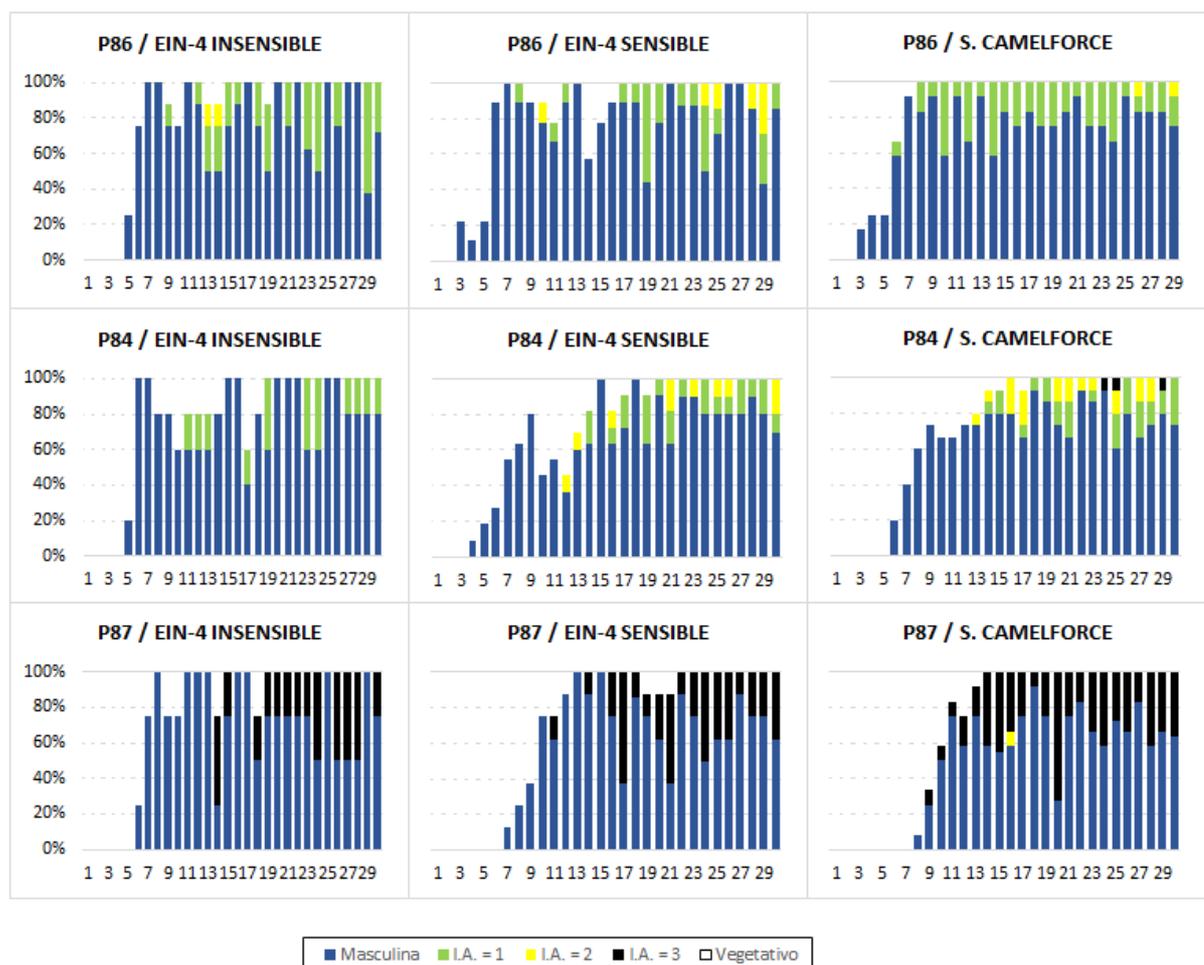
Figura 38. Índice de andromonoecia (I.A.), según la escala descrita por Manzano et al., 2016. Se representa el error estándar para cada media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas de la misma línea de sandía injertada sobre diferentes pies de calabaza o calabacín ($p \leq 0,05$). Las líneas de puntos marcan los límites entre monoecia, andromonoecia parcial y andromonoecia en sandía (Manzano et al., 2016).

En la siguiente figura se muestra la distribución de flores en el tallo principal de la planta, que permite visualizar lo observado en el estudio del índice de andromonoecia. Para P86 / EIN-4 Insensible, se observa que en el nudo 13 y 14

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

aparece una flor con fenotipo sexual parcialmente andromonoico, aunque este hecho no es representativo, ya que tan solo ocurre en una planta de 10 estudiadas. En la línea P84, se muestra el fenómeno descrito anteriormente, el patrón insensible ha generado una reducción del desarrollo de los estambres en las flores femeninas, haciendo que la línea P84 considerada como parcialmente andromonoica (IA = 1,20 – 2,70) pase a una línea con fenotipo monoico (IA = 1 – 1,20).

Por último, en la línea P87 (línea andromonoica, IA \geq 2,70), no se han encontrado diferencias significativas entre plantas injertadas sobre los tres patrones de *Cucurbita* empleados, observándose un patrón de floración muy similar en los tres casos (flores hermafroditas).



Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

Se sabe que el portainjerto influye en el desarrollo de la parte aérea de la planta de varias formas, alterando multitud de caracteres de interés agrícola como el vigor, la tolerancia a estrés, el rendimiento del cultivo o la calidad de la fruta (Lee et al., 2010; Gregory et al., 2013). El efecto de control del patrón sobre el vástago se debe a la alteración en la señalización química “root-to-shoot” y/o “shoot-to-root”, es decir, la señalización de la raíz al brote y/o del brote a la raíz (Gregory et al., 2013). En diferentes estudios, se reseña que la señalización de larga distancia a través de la unión del injerto, en sentido “root-to-shoot”, induce múltiples señales móviles como hormonas, proteínas, ribonucleoproteínas, ARN, minerales, etc., que confiere una amplia gama de efectos sobre el desarrollo de los vástagos. Este hecho ha sido contrastado en *A. thaliana*, donde los eventos de transporte de larga distancia transmisibles por injerto generan un impacto en la fisiología del vástago o en el patrón (Flaishman et al., 2008). A pesar del uso generalizado de injertos en la agricultura actual, se sabe muy poco acerca del mecanismo molecular que provoca los diferentes fenotipos en el vástago, debido a la regulación del portainjerto (Kumari et al., 2015).

Estudios recientes sobre *A. thaliana* han revelado la modificación en la expresión génica debido al injerto. En dicho ensayo, se ha detallado un aumento de factores de transcripción (TFs) de tipo B3 (involucrados en el desarrollo de la flor) y TFs NAC inducibles por estrés, implicados en la biosíntesis de Ácido abscísico (ABA), tolerancia a la sequía e inducción de cloruro de sodio (NaCl)), en los brotes florales del vástago. Además, también observo la regulación de AP2-RAP2.6 en las yemas florales, un factor de respuesta a etileno que se activa en la planta en respuesta a diferentes estreses abióticos y bióticos, a través de la vía dependiente de ABA. Todos estos resultados demuestran que el patrón puede cambiar el nivel de expresión de los genes relacionados con el etileno y el ácido giberélico en los brotes florales del vástago (Kumari et al., 2015), promoviendo así cambios fenotípicos en el desarrollo.

4.2.3. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre el cuajado de los frutos en sandía

Para analizar el efecto de los injertos mutantes a etileno en el cuajado de los frutos se realizó la polinización manual de las flores femeninas en anthesis, realizándose la evaluación a los quince días de ser polinizadas las flores. Los resultados del estudio se muestran en la **Figura 40**.

Para P86, fueron polinizados un total de treinta y dos flores de los diferentes injertos realizados, obteniéndose, tras quince días, seis frutos para el patrón insensible y el sensible, y diez frutos para el portainjerto comercial. Estos datos no muestran diferencias significativas entre el portainjerto sensible y el insensible, y destaca la elevada fertilidad de la línea comercial.

Para P84, se polinizaron un total de treinta y nueve flores con los diferentes patrones, dando lugar a tres frutos cuajados para el portainjerto insensible, y seis frutos para los patrones sensibles y comerciales. En este caso, si se aprecian diferencias significativas entre el patrón insensible a etileno y el resto de los patrones, observándose una mayor fertilidad en los fenotipos sensibles.

Por último, en la línea P87, se polinizaron un total de cuarenta y una flores donde la variedad había sido injertada sobre diferentes portas, dando lugar a dos frutos cuajados en el patrón insensible, seis en el sensible y ocho en comercial. En este último caso se muestran las diferencias más amplias entre los genotipos utilizados como portainjerto. Las plantas injertadas con el patrón insensible no son capaces de desarrollar el fruto, y los dos que se consideraban como cuajados, abortaron días posteriores a la evaluación.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

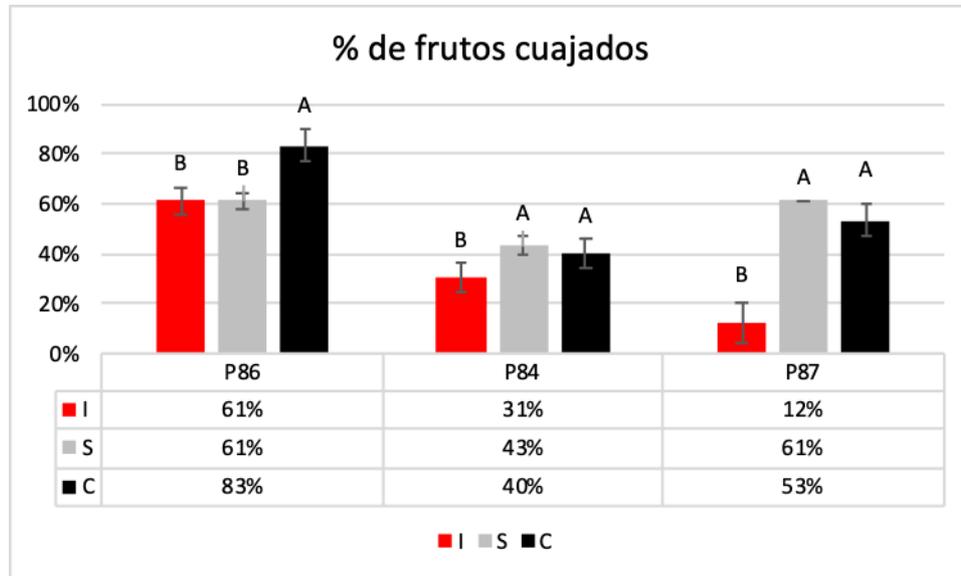


Figura 40. Porcentaje de frutos cuajados, en función del portainjerto de *Cucurbita* empleado *EIN-4* Insensible (“I”), WT Sensible (“S”) y Shintosa Camelforce (“C”); sobre tres variedades de sandía P86, P84 y P87. Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos fenotipos ($p \leq 0,05$).

Aguado et al. (2018), ha demostrado que la andromonoecia conferida por el alelo *A* del gen *CitACS4* afecta negativamente al cuajado de los frutos en sandía, lo que demuestra que el etileno está implicado en el cuajado y desarrollo temprano del fruto. Para que se lleven a cabo estos dos procesos el nivel de etileno en el ovario durante los días inmediatamente después de la antesis debe ser bajo. Sin embargo, la falta de polinización/fecundación y el aborto del fruto está relacionada con una inducción de la biosíntesis y señalización de etileno, tres días después de la antesis (Manzano et al., 2015). En calabacín, en los días posteriores a la antesis, los frutos no polinizados generaban un pico de etileno que coincide con el aborto del desarrollo del fruto. Sin embargo, en los frutos polinizados o partenocárpicos, este pico no se producía, favoreciéndose así el crecimiento normal del fruto (Martínez et al., 2013).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

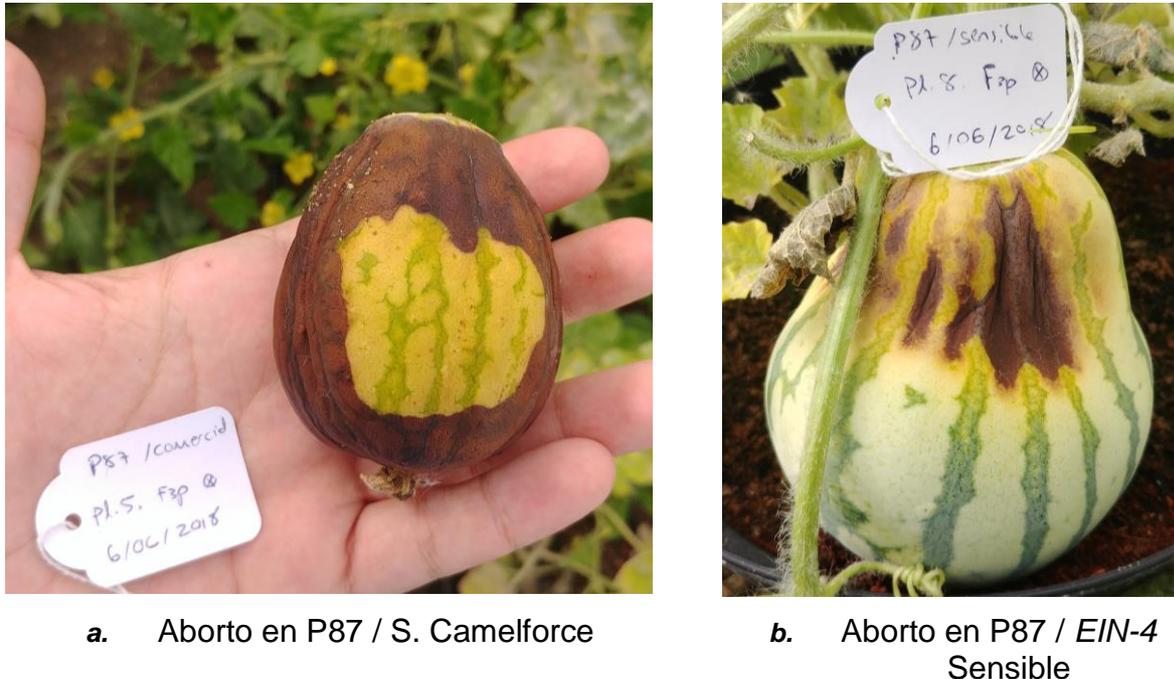


Figura 41. Frutos abortados de las líneas de P87 (foto propia).

Además del importante papel del etileno, las hormonas principales en el control del cuajado y desarrollo del fruto son las auxinas y las giberelinas. Dichas hormonas, se emplean para inducir la partenocarpia en multitud de especies vegetales. De hecho, se han hecho estudios con mutantes para determinados genes de señalización de auxinas tales como ARFs y IAA/Aux en tomate y *Arabidopsis* que inducen partenocarpia, siendo capaces de desarrollar frutos sin la necesidad de la polinización (Wang et al., 2005; Goetz et al., 2007; De Jong et al., 2009).

A pesar del nivel bajo de etileno en las flores de la línea andromonoica P87, éstas mostraron un nivel bajo de cuajado del fruto. Esto puede estar relacionado con una falta de sincronización en el desarrollo y maduración de los órganos florales, pues la maduración del pistilo parece que ocurre antes que la maduración de los pétalos (Aguado et al., 2018). Por tanto, cuando la flor llega a antesis y se abre, el estigma puede estar sobremaduro y no receptivo.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

4.3. Ensayo 2:

4.3.1. Evaluación del injerto

Debido a la baja tasa de prendimiento obtenida en los experimentos anteriores, en este segundo ensayo se decide hacer toda la fase de injerto en las instalaciones especializadas de Natural Green.

Se injertaron 12 bandejas de 96 alveolos, empleando como única variedad P86, y como portainjerto los mutantes de *Cucurbita pepo* *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*. La tasa de prendimiento en esta ocasión fue muy elevada, si la comparamos con el primer ensayo realizado. En todos los mutantes destaca el alto rendimiento obtenido en el fenotipo insensible, más del 80% de las plantas injertadas generaron un callo óptimo (**Figura 42**).

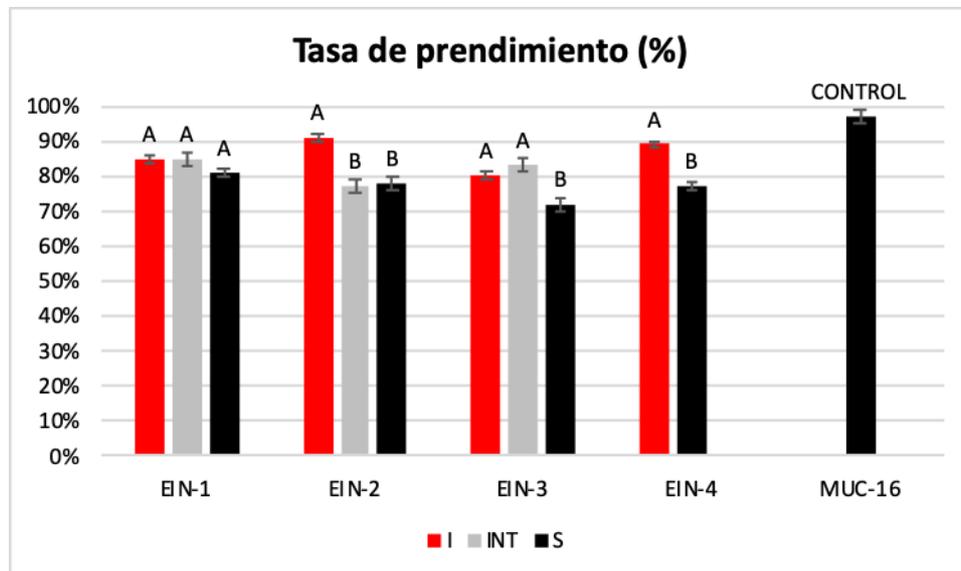


Figura 42. Tasa de prendimiento, según el tipo de portainjerto, a los 15 días de ser injertadas. Se representa el error estándar de cada fenotipo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos genotipos utilizados como portainjertos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo intermedio y “S” patrón sensible (WT).

Aloni et al. (2008), demostraron que la interrupción de las conexiones entre el patrón y el injerto por incompatibilidad entre ambos genotipos ocurre aproximadamente 25 días después del injerto. Sin embargo, estos autores propusieron que la principal causa de incompatibilidad es la aparición de desequilibrios hormonales, principalmente, de auxinas y etileno en el sistema radicular después del establecimiento de las conexiones de injerto. Nuestros resultados demuestran que la

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

sensibilidad a etileno del portainjerto afecta al prendimiento del injerto, de manera que los patrones más insensibles a etileno tienen mejores prendimientos que los patrones sensibles a etileno.

En este segundo ensayo la compatibilidad entre vástago y patrón ha sido muy buena, obteniéndose una muestra más que suficiente para el ensayo posterior del injerto en campo.

4.3.2. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre la expresión sexual en sandía.

En este segundo ensayo, se estudió el fenotipo sexual de la línea de sandía P86 sobre diferentes portainjertos obtenidos a partir de los mutantes a etileno *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*. Para ello, se realizó el fenotipado de flores estaminadas y pistiladas en los 30 primeros nudos del tallo principal tras la soldadura del injerto, en al menos 10 plantas por genotipo.

a) Nº de flores femeninas y transición floral femenina

En primer lugar, destacar que se han obtenido resultados en concordancia con lo encontrado en la revisión bibliográfica realizada para la elaboración de este proyecto. El patrón insensible a etileno produce un aumento en el número de flores femeninas en la variedad de sandía (**Figura 43**). Cuando el injerto fue el mutante homocigoto *EIN-1*, el promedio de flores femeninas fue de 8,25, mientras que el promedio de flores femeninas de P86 injertada sobre el genotipo heterocigoto o WT fue de 6,58 y 6,82, respectivamente. En *EIN-2*, el promedio de flores femeninas en el tallo principal fue de 7,45 para las plantas injertadas sobre el mutante insensible a etileno respecto a las 6,70 de las plantas injertadas sobre el genotipo intermedio y las 6,50 de aquellas que se injertaron sobre el genotipo sensible. En *EIN-3*, el promedio de flores femeninas en el tallo principal fue de 7,42 para los injertos realizados con el genotipo insensible a etileno, 6,62 para los injertos realizados con el genotipo intermedio, y 6,73 flores femeninas en las plantas injertadas sobre el genotipo sensible o WT. En *EIN-4*, el promedio de flores femeninas en el tallo principal fue de 7,80 para las plantas injertadas sobre el genotipo insensible, respecto a las 6,60 que mostraron las plantas injertadas sobre el genotipo sensible. En todos los casos, se

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

puede observar como los patrones con sensibilidad intermedia y alta a etileno tienen un promedio de flores muy similar entre sí y similar al control MUC-16.

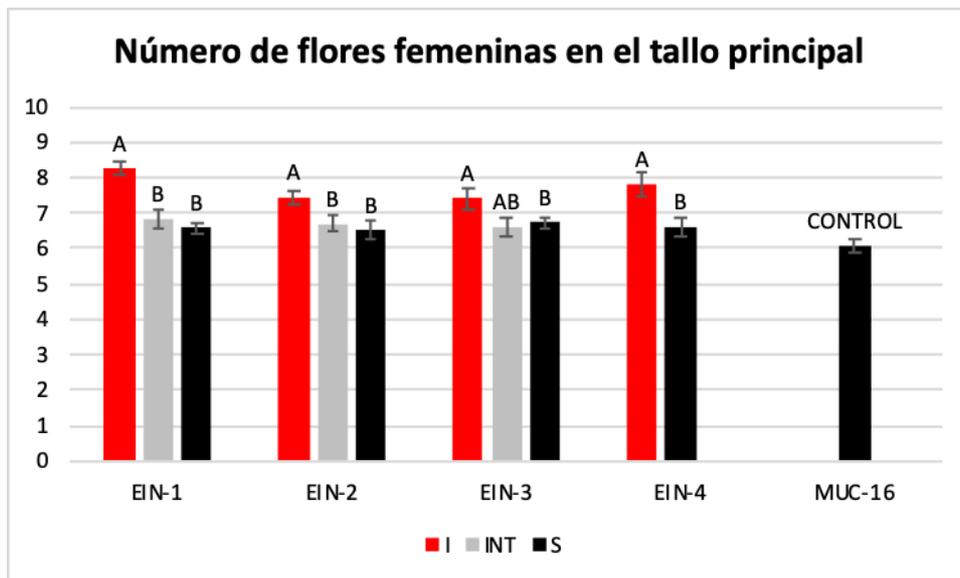


Figura 43. Número de flores femeninas en el tallo principal en función del portainjerto empleado *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*. Se representa el error estándar de cada muestra. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos injertos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo de insensibilidad a etileno intermedio y “S” patrón sensible.

La Figura 44 muestra el promedio de nudos hasta la aparición de la primera flor femenina. En este caso, los patrones insensibles a etileno redujeron el tiempo de transición floral, dando lugar a una floración temprana. Por tanto, el aumento del número de flores femeninas, como hemos visto en la gráfica anterior, se debe principalmente a este adelanto en la floración.

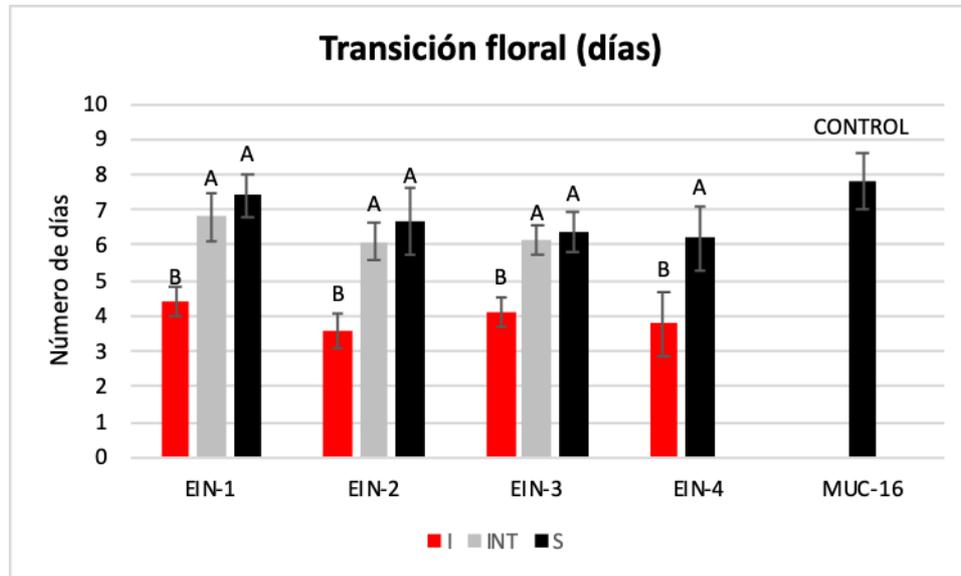


Figura 44. Transición floral femenina (número de nudos hasta la aparición de la primera flor femenina), en función del portainjerto empleado: *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*. Se representa el error estándar de cada grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos injertos ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo intermedio y “S” patrón sensible.

b) Índice de Andromonoecia y distribución de flores en el tallo principal

Para la evaluación del nivel de andromonoecia, se fenotiparon las plantas en campo muestreándose los 30 primeros nudos más las flores de los tallos secundarios, clasificándose las flores en función de la escala descrita por Manzano et al., en 2016 y empleando un número de muestra de al menos 10 flores por planta.

Los resultados obtenidos más destacables se han producido en los portainjertos *EIN-2* y *EIN-4* (mutantes más insensibles a etileno). Como se muestra en la **Figura 45**, el portainjertos mutante *EIN-2* produce un fenotipo monoico estable en la línea de sandía P86 ($IA=1,09$). Con el uso de patrones sensibles a etileno sorprendentemente se eleva el índice de andromonoecia, haciendo que la línea de sandía muestre un fenotipo parcialmente andromonoico ($IA=1,22$ para el patrón de fenotipo intermedio, y $1,27$ para el patrón WT sensible). El portainjerto insensible a etileno *EIN-4* produjo un efecto fue muy similar, haciendo que la línea de sandía fuera más monoica que cuando se injerta sobre un genotipo de *Cucurbita* sensible a etileno o WT (**Figura 45**).

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

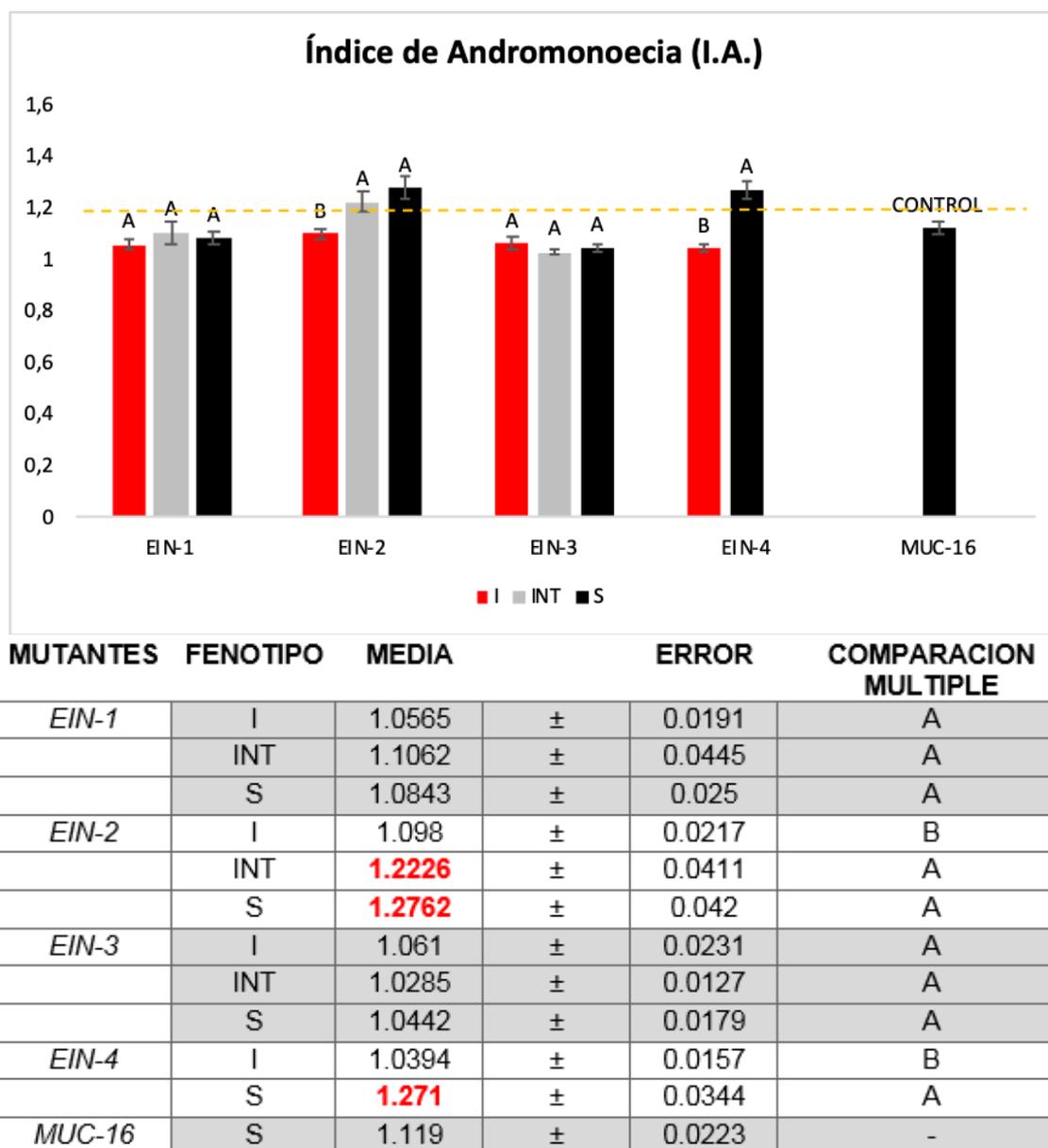


Figura 45. Índice de andromonoecia (I.A.), según la escala descrita por Manzano et al., (2016). Se representa el error estándar de cada tipo de injerto. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos injertos realizados ($p \leq 0,05$). “I” insensible, “INT” intermedio, “S” sensible a etileno.

Como ya se ha expresado anteriormente, el etileno es necesario para detener el desarrollo de los estambres durante el desarrollo normal de las flores femeninas, y la reducción de la producción o acción del etileno conduce a la transformación de flores femeninas en bisexuales y hermafroditas (Manzano et al., 2014). Sin embargo, el uso de patrones insensibles de *Cucurbita* ha mantenido el arresto del desarrollo de estambres en las flores femeninas, haciendo que la línea de sandía tenga un IA medio muy próximo a 1. Estos resultados sugieren que posiblemente no sea el

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

etileno sino otra molécula efectora que viaja de las raíces hasta el meristemo apical, la responsable de los cambios en el índice de andromonoecia de las plantas injertadas sobre diferentes patrones de calabacín. Independientemente del mecanismo molecular implicado, dado que sabemos que la estabilidad de la monoecia ($IA=1$) está asociada con una mejora del cuajado y calidad de los frutos de sandía (Aguado et al., 2018), estos caracteres podrían ser mejorados mediante el uso de portainjertos de *Cucurbita* más insensibles a etileno.

Varios estudios han investigado el efecto del injerto en la floración, particularmente en cucurbitáceas. Se ha demostrado que la formación de flores femeninas en la sandía injertada sobre calabaza de peregrino (*L. siceraria*) fue significativamente más temprana en comparación con otros portainjertos (Kurata, 1976). Sin embargo, Yamasaki et al. (1994) demostraron que la floración se retrasa en la sandía injertada sobre calabaza de peregrino. De acuerdo con un estudio posterior, Satoh (1996) mostró que en pepino cv. "Rennsei" (monoico), la formación de la flor en el tallo principal fue fuertemente inhibida cuando el pepino fue injertado sobre calabaza. En un estudio diferente, el injerto se realizó según el método de injerto de aproximación (Lee y Oda, 2003) que permite que las plantas se desarrollen con dos sistemas de raíces (plántulas de pepino injertadas con rizoma). Cuando no se eliminaron las raíces de la variedad, el efecto inhibitorio del portainjerto de calabaza fue más débil. El hecho de que la presencia de la raíz de pepino no pudiera eliminar completamente la inhibición de la floración sugiere que la inhibición de la floración se debió a la presencia de un factor inhibitorio translocado desde el portainjerto de la calabaza (Aloni et al., 2010).

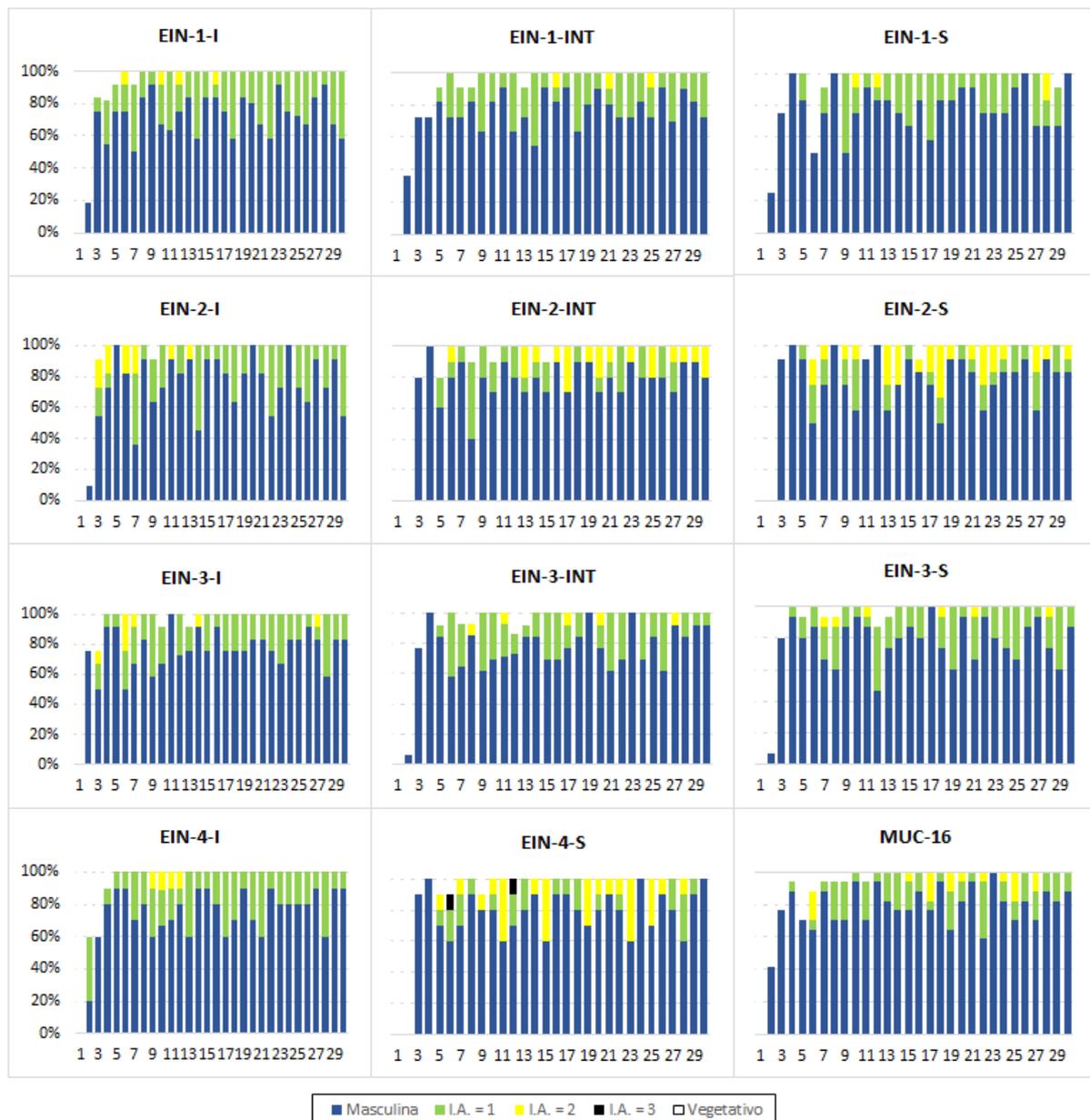
Nuestros resultados demuestran que el uso de portainjertos insensibles a etileno puede acelerar la floración femenina, aumentar el número de flores femeninas por plantas, a la vez que se genera una monoecia mucho más estable, características todas ellas relacionadas con un aumento en el cuajado y en la producción de sandía.

En cuanto a la distribución de los distintos tipos florales en el tallo principal (**Figura 46**), se observa la misma conclusión obtenida en el análisis del índice de andromonoecia realizado anteriormente. Para todos los patrones insensibles se produce una mayor variación en la expresión sexual en los primeros nudos tras el injerto, esto puede ser resultado de un estrés generado por la fase de soldadura y el

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

posterior trasplante a campo, ya que a partir del nudo quince la floración es muy estable.

En los portainjertos cuyo fenotipo es intermedio y sensible, cabría destacar de nuevo el gran número de flores bisexuales obtenidas en los primeros treinta nudos, que le confieren la andromonoecia.



4.3.3. Efecto de injertos insensibles a etileno sobre el cuajado de los frutos de sandía

Para analizar el efecto de los injertos mutantes a etileno en el cuajado de los frutos, se realizó la polinización manual de las flores femeninas en antesis, y evaluando el porcentaje de frutos cuajados a los quince días de la polinización. Los resultados del estudio se muestran en la **Figura 47**.

Para *EIN-1*, fueron polinizados un total de treinta flores para cada una de las combinaciones de injertos, obteniéndose, tras quince días, cuatro frutos de sandía en el patrón insensible, tres frutos para el patrón con fenotipo intermedio y nueve frutos para el patrón sensible. Estos datos muestran diferencias significativas entre el portainjerto sensible y el insensible, generándose un mayor porcentaje de frutos abortados en la línea insensible.

Para *EIN-2*, fueron polinizados un total de treinta y cinco flores de las diferentes variables, obteniéndose, tras quince días, dos frutos para el patrón insensible, un fruto para el patrón con fenotipo intermedio y tres frutos para el patrón sensible. Estos datos no muestran diferencias significativas entre el portainjerto sensible y el insensible como se observó en el patrón *EIN-1*. Pero, sin embargo, sí que se ha mostrado con muchos problemas para desarrollar el fruto en todas las variables estudiadas.

Para *EIN-3*, fueron polinizados un total de treinta y cuatro flores de las diferentes variables, obteniéndose, tras quince días, nueve frutos para el patrón insensible, diez frutos para el patrón con fenotipo intermedio y ocho frutos para el patrón sensible. Estos datos muestran diferencias significativas entre el portainjerto sensible (8/10) y el insensible (9/13), generándose un mayor porcentaje de frutos abortados en la línea insensible. Cabe destacar que la línea de *EIN-3*, ha sido la que mejores resultados ha dado en todos los aspectos, este hecho puede deberse a que *EIN-3* es el patrón menos insensible a etileno de los cuatro estudiados (García et al., 2018).

Para *EIN-4*, fueron polinizados un total de veintidós flores de las diferentes variables, obteniéndose, tras quince días, cinco frutos para el patrón insensible y 7 frutos para el patrón sensible. Estos datos muestran diferencias significativas entre el

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

portainjerto sensible y el insensible, generándose un mayor porcentaje de frutos abortados en la línea insensible.

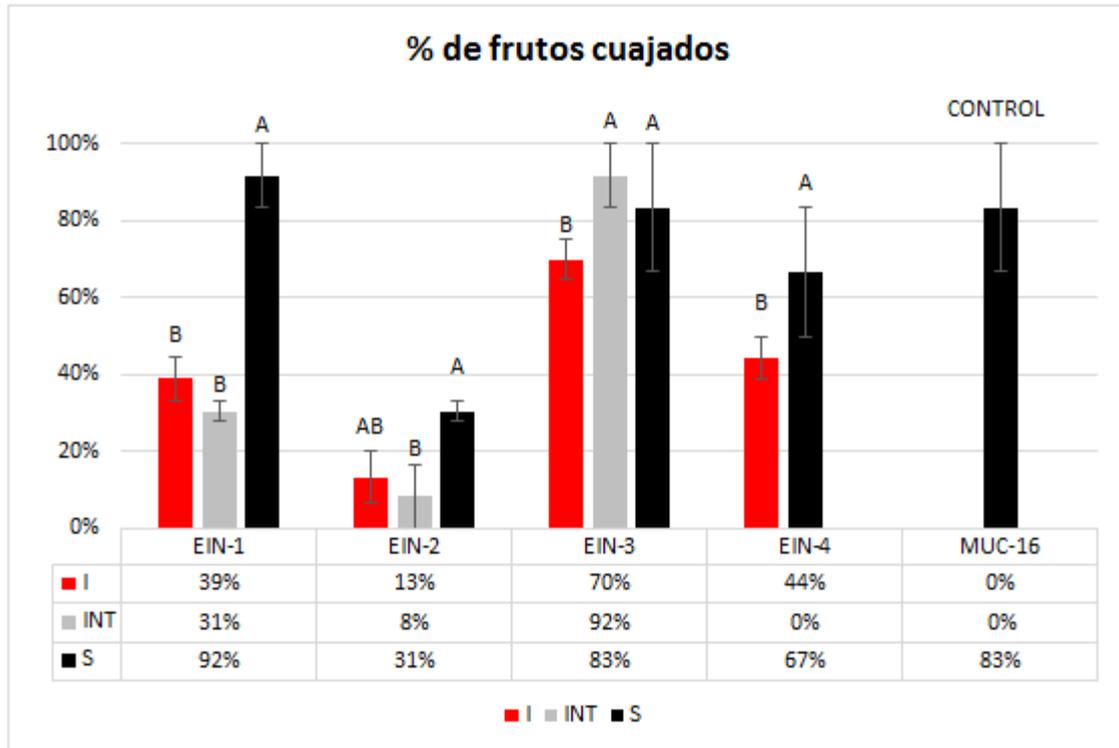


Figura 47. Porcentaje de frutos cuajados, en función del portainjerto empleado *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4* Insensible. Se representa el error estándar de cada combinación de injertos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los distintos injertos de la misma familia ($p \leq 0,05$). “I” patrón insensible, “INT” patrón con fenotipo intermedio y “S” patrón sensible a etileno.

En la **Figura 48**, se muestran algún ejemplo de frutos cuajados para las líneas que empleaban el portainjerto mutante insensible a etileno.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”



Figura 48. Fotos de frutos de sandía cuajados sobre portainjertos de calabacín insensibles a etileno. **a.** Portainjerto *EIN-1* Insensible; **b.** Portainjerto *EIN-2* Insensible; **c.** Portainjerto *EIN-3* Insensible; **d.** Portainjerto *EIN-4* Insensible (fotos propias).



5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES.

PRIMERA. – El éxito del injerto tipo adosado depende de las condiciones adecuadas de temperatura y humedad durante la fase de soldadura. En las condiciones ideales, el tipo de injerto que ha resultado más exitoso en nuestro ensayo ha sido el tipo adosado.

SEGUNDA. – Utilizados como portainjertos, los mutantes de calabacín insensibles a etileno *EIN-1*, *EIN-2*, *EIN-3* y *EIN-4*, adelantan la floración y aumentan el número de flores femeninas por planta, aunque tienen un efecto negativo sobre el cuajado y desarrollo de los frutos de sandía. Estos resultados demuestran que la falta de sensibilidad a etileno en las raíces puede afectar a la floración y el cuajado de los frutos en la parte aérea de la planta, posiblemente a través de hormonas o moléculas de señalización que se mueven desde las raíces a la parte apical del tallo.

Tercera. – Los patrones de calabacín insensibles a etileno han modificado la determinación sexual de la líneas de sandía injertadas sobre ellos. Los mutantes de etileno aumentaron la estabilidad sexual de la línea monoica P86, pero indujeron esterilidad en la línea andromonoica P87. Aunque se sabe que el etileno es el principal regulador de la determinación sexual de sandía, estos resultados demuestran que esta hormona es capaz de regular la determinación del meristemo floral a partir de señales que provienen de las raíces.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 170–174.
- Aguado, E., Manzano, S., García, A., & Jamilena, M. (2016). The andromonoecious allele of *CitACS4* reduces seed and fruit set in watermelon. *Cucurbitaceae 2016*.
- Aguado, E., García, A., Manzano, S., Valenzuela, J.L., Cuevas, J., Pinillos, V., Jamilena, M., (2018). The sex-determining gene *CitACS4* is a pleiotropic regulator of flower and fruit development in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Reproduction*, 31(4), 411-426.
- Aloni, R., (1980). Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta* 150, 255–263.
- Aloni, R., (1987). Differentiation of vascular tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 38, 179–204.
- Aloni, R., Baum, S.F., Peterson, C.A., (1990). The role of cytokinin in sieve tube regeneration and callose production in wounded *Coleus* internodes. *Plant Physiol*, 93, 982–989.
- Aloni, B., Karni, L., Deveturero, G., Levin, Z., Cohen, R., Kazir, N., Lotan-Pompan, M., Edelstein, M., Aktas, H., Turhan, E., Joel, D.M., Horev, C., Kapulnic, Y., (2008). Physiological and biochemical changes at the rootstock–scion interface in graft combinations between *Cucurbita* rootstocks and a melon scion. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 83, 777–783.
- Aloni, B., Cohen, R., Karni, L., Aktas, H., Edelstein, M. (2010). Hormonal signaling in rootstock-scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127, 119–126.
- Alverson, J. A., Wey, X., Rice, D. W., Stern, D. B., Barry, K., Palmer, J. D., (2010). Insights into the Evolution of Mitochondrial Genome Size from Complete Sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Mol Biol Evol*, 27 (6), 1436-1448.
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., Marion-Poll, A., (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 26 (2), 92-105.
- Arora, A. (2005). Ethylene receptors and molecular mechanism of ethylene sensitivity

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- in plants. *Current Science*, 89 (8).
- Balbi, V., & Lomax, T. L. (2003). Regulation of early tomato fruit development by the Diageotropica gene. *Plant Physiology*, 131(1), 186–97.
- Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C., Kende, H. (1988). Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 241 (4869), 1086-1089.
- Boualem, A., Fergany, M., Fernandez, R., Troadec, C., Martin, A., Morin, H., ... Bendahmane, A. (2008). A Conserved Mutation in an Ethylene Biosynthesis Enzyme Leads to Andromonoecy in Melons. *Science*, 321(5890), 836–838.
- Boualem, A., Troadec, C., Kovalski, I., Sari, M. A., Perl-Treves, R., & Bendahmane, A. (2009). A Conserved Ethylene Biosynthesis Enzyme Leads to Andromonoecy in Two Cucumis Species. *PLoS ONE*, 4(7).
- Camacho, F. (2000). EL Cultivo de sandía apirena injertada, bajo invernadero, en el litoral mediterráneo español. *Fundación Cajamar*, 1–316.
- Camacho, F. (2003). Tema 19: El cultivo de sandía invernada. *Técnicas de producción de cultivos protegidos. Tomo II., Caja Rural Intermediterránea, Instituto Cajamar. Ediciones Agrotécnicas, S.L*, 651–689.
- Carbonell-Bejerano, P., Urbez, C., Granell, A., Carbonell, J., & Perez-Amador, M. A. (2011). Ethylene is involved in pistil fate by modulating the onset of ovule senescence and the GA-mediated fruit set in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 11, 84.
- Cary, A.J., Liu, W. & Howell, S.H., (1995). Cytokinin Action Is Coupled to Ethylene in Its Effects on the Inhibition of Root and Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Physiology*, 107 (4), 1075–1082.
- Chang, C., Wang, B., Shi, L., Li, Y., Duo, L., Zhang, W. (2010). Alleviation of salt stress-induced inhibition of seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by ethylene and glutamate. *Journal of Plant Physiology*, 167 (14), 1152-1156.
- Conserjería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible (2018). *Avance de Superficies y Producciones 2018*. Retrieved from: <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/consejeria/sobreconsejeria/estadisticas/paginas/agrarias-superficies-producciones.html>
- Cohen, R., Burger, Y., Koern, A., Edelstein, M., (2007). Introducing Grafted Cucurbits

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- to Modern Agriculture: The Israeli Experience. *Plant Dis*, 91, 916–923.
- Dellaporta, S. L., & Calderon-Urrea, a. (1993). Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1241–51.
- De Jong, M., Mariani, C. Vriezen, W.H. (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J Exp Bot.*, 60, 1523–1532.
- Dengler, N.G., (2001). Regulation of Vascular Development. *J. Plant Growth Regul*, 20, 1–13.
- Fernández, E. (2017). Papel del gen *CitACS4* en la regulación de diferentes caracteres agronómicos regulados por el etileno en sandía. *Trabajo de fin de grado de ingeniería agrícola, Universidad de Almería*.
- Fujita, H. & Syono, K., 1996. Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 37 (8), 1094–1101.
- Flaishman, M.A., Loginovsky, K., Golobowich, S., Lev-Yadun, S. (2008). *Arabidopsis thaliana* as a model system for graft union development in homografts and heterografts. *J Plant Growth Regul*, 27, 231–239.
- García, A., Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Gázquez, J.C., Jamilena, M. (2015). Isolation and characterisation of ethylene insensitive mutants from a collection of *Cucurbita pepo* L. *ISHS Acta Horticulturae*, 1151, 151-156.
- García, A., Manzano, S., Aguado, E., Megías, Z., Martínez, C., Garrido, D., Jamilena, M. (2016). Isolation and characterization of three recessive andromonoecious mutants of *Cucurbita pepo*. *Cucurbitaceae 2016, XIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics & Breeding*, 45-49.
- García, A., Aguado, E., Parra, G., Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Cebrián, G., Romero, J., Beltrán, S., Garrido, D., Jamilena, M., (2018). Phenomic and Genomic Characterization of a Mutant Platform in *Cucurbita pepo*. *Frontiers in plant science*, 9, 1049.
- Ghassemian, M., (2000). Regulation of Abscisic Acid Signaling by the Ethylene Response Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 12 (7), 1117–1126.
- Goetz, M., Hooper, L.C., Johnson, S.D., Rodrigues, J.C.M., Vivian-Smith, A. Koltunow, A.M. (2007). Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol*, 145, 351–366.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- Gómez, A. M. (2015). Injertos y portainjertos en sandía. En J. C. Gázquez (coord.), *Técnicas de cultivo y comercialización de la sandía*, Cajamar Caja Rural, 75-96.
- Gregory, P.J., Atkinson, C.J., Bengough, A.G., Else, M.A., Fernández, F., Harrison, R.J., Schmidt, S. (2013). Contributions of roots and rootstocks to sustainable, intensified crop production. *J Exp Bot*, 64 (5), 1209–1222
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., Geneve, R.L., (2002). Plant Propagation. *Principles and Practices, seventh ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ*, ISBN 0-13-679235-9, 849.
- Japon, J. (1982). Cultivo de Melón y Sandía. *Ministerio de Agricultura y Pesca*, 23–24/81, 1–24.
- Jiménez, S., & Lao, M. T. (2002). Los suelos enarenados en el sureste español. *Vida Rural*, 42–44.
- Ji, G., Zhang, J., Gong, G., Shi, J., Zhang, H., Ren, Y., Guo, S., Gao, J., Shen, H., Xu, Y. (2015). Inheritance of sex forms in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Scientia Horticulturae*, 193, 367-373.
- Ju, C., Gyeong, M. Y., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., Garret, W. M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M. L., Cooper, B., Kieber, J. J., Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (47), 19486–19491.
- Kieber, J. J., Rothenberg M., Roman, G., Feldmann K. A., Ecker, J. R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 72 (3), 427-441.
- Knight, L.I. & Crocker, W. (1913). Toxicity of smoke. *The Botanical Gazette*, LV(55), 337–371.
- Kumari, A., Kumar, J., Kumar, A., Chaudhury, A., Singh, S.P. (2015). Grafting Triggers Differential Responses between Scion and Rootstock. *PLoS ONE* 10(4).
- Kurata, H., (1976). Studies on the sex expression of flowering by day-length and temperature in pumpkin and watermelon. *Mem. Fac. Agric., Kagawa Univ.* 29, 1–49.
- Larsen, P. B., Ashworth, E. N., Jones, M. L., & Woodson, W. R. (1995). Pollination-Induced Ethylene in Carnation (Role of Pollen Tube Growth and Sexual

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- Compatibility). *Plant Physiology*, 108(4), 1405–1412.
- Lebel-Hardenack, S., & Grant, S. R. (1997). Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science*, 2(4), 130–136.
- Lee, J.M., Kubota, C., Tsao, S.J., Bie, Z., Hoyos, P., Morra, L., Oda, M. (2010). Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae - SCI HORT-AMSTERDAM*, 127, 93-105.
- Lee, J.M., Oda, M., 2003. Grafting of herbaceous vegetable and ornamental crops. *Hortic. Rev.* 28, 61–124.
- Liang, X., Abel, S., Keller, J. a, Shen, N. F., & Theologis, a. (1992). The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 11046–11050.
- Lüttge, U., Kluge, M., & Bauer, G. (1997). *BOTANICA*. (MCGRAW-HILL, Ed.), 1-600.
- Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Gómez, P., Garrido, D., JAMILENA, M. (2011). The role of ethylene and brassinosteroids in the control of sex expression and flower development in *Cucurbita pepo*. *Plant Growth Regulation*, 65, 213-221.
- Manzano, S., Martínez, C., García, J.M., Megías, Z., JAMILENA, M. (2014). Involvement of ethylene in sex expression and female flower development in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 85, 96-104.
- Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Bautista, S., García, A., JAMILENA, M. (2015). El etileno es un regulador negativo del cuajado y desarrollo temprano del fruto en diferentes especies de Cucurbitáceas y Solanáceas. *Actas SECH Nº 71 "XIV Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas"*.
- Manzano, S., Aguado, E., Martínez, C., Megías, Z., García, A., & JAMILENA, M. (2016). The Ethylene Biosynthesis Gene *CitACS4* Regulates Monoecy/Andromonoecy in Watermelon (*Citrullus lanatus*). *PLoS ONE*, 11(5).
- Mármol, J. R. (1994). Cultivo intensivo de la sandía. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, 1–48.
- Martínez, C., Manzano, S., Megías, Z., Barrera, A., Boualem, A., Garrido, D., ... JAMILENA, M. (2014). Molecular and functional characterization of *CpACS27A* gene reveals its involvement in monoecy instability and other associated traits in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Planta*, 239(6), 1201–1215.
- Martínez, C. (2013). Involvement of ethylene biosynthesis and signaling genes in sex

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- determination and parthenocarpic fruit set development in Zucchini (*Cucurbita pepo* L.). Thesis, Universidad de Almería.
- 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, 139.
- Mas, I. (2014). La unión de empresas también hace la fuerza: la sandía Fashion. *Eldiario.es*. Retrieved from: http://www.eldiario.es/temas/sandia_fashion/.
- Mattsson, J., Ckurshumova, W., Berleth, T., (2003). Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. *Plant Physiol.* 131, 1327–1339.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2017). Informe del consumo de alimentación en España 2017, 124–130.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2017). *Anuario de Estadística 2018*. Retrieved from: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2018>
- Moore, R., Walker, D.B., (1981a). Studies on vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograph in *Sedum telephoides* (Crassulaceae). *Am. J. Bot*, 68, 820–830.
- Moore, R., Walker, D.B., (1981b). Studies on vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between *Sedum telephoides* (Crassulaceae) and *Solanum pennelli* (Solanaceae). *Am. J. Bot*, 68, 831–842.
- Nakagawa, N., Mori, H., Yamazaki, K., & Imaseki, H. (1991). Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. *Plant & Cell Physiology*, 32(8), 1153–1164.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). FAOSTAT Producción y Área cosechada, Sandías. *Base de datos estadísticos*. Retrieved from: www.fao.org/faostat/es/.
- Penninckx, I.A.M.A., (1998). Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 10 (12), 2103–2114.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- Pérez, E. (2015). Cultivo de sandía en suelo y en hidroponía. En J. C. Gázquez (coord.), *Técnicas de cultivo y comercialización de la sandía*, Cajamar Caja Rural, 28-34.
- Perl-Treves, R. (1999). Male to female conversion along the cucumber shoot: approaches to studying sex genes and floral development in *Cucumis sativus*. *Sex Determination in Plants*. (CC Ainsworth, Ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, 189-215.
- Pierce, L. K., & Wehner, T. C. (1990). Review of genes and linkage groups in cucumber. *HortScience*, 25(6), 605–615.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (1991). Capítulo 24: Regulación del crecimiento y desarrollo: las hormonas vegetales. *Biología de las plantas*. (Reverté, Ed.), 481-492.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kiesber, J. J., Rothenberg, M., Ecker, J. R. (1995). *Genetics*, 139 (3), 1393-1409.
- Rosa, J. T. (1928). The inheritance of flower types in *Cucumis* and *Citrullus*. *Hilgardia*, 3, 21.
- Rudich, J., Halevy, a H., & Kedar, N. (1972). Ethylene evolution from cucumber plants as related to sex expression. *Plant Physiology*, 49(6), 998–999.
- Rudich, J., & Zamski, E. (1985). *Citrullus lanatus*. (A. Halevy, Ed.) (Handbook o). *CRC Press, Boca Raton, FL*. 272-274.
- Salman-Minkov, A., Levi, A., Wolf, S., & Trebitsh, T. (2008). ACC synthase genes are polymorphic in watermelon (*Citrullus spp.*) and differentially expressed in flowers and in response to auxin and gibberellin. *Plant and Cell Physiology*, 49(5), 740–750.
- Satoh, S., (1996). Inhibition of flowering of cucumber grafted on rooted squash stocks. *Physiol Plant*, 97, 440–444.
- Seguí, J.M. (2011). Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. *Ed. Universidad Politécnica de Valencia*, 457.
- Shimomura, T., Fujihara, K., (1977). Physiological study of graft union formation in Cactus. II. Role of auxin on vascular connection between stock and scion I. *Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 45, 397–406.
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D. Y., Doležal, K., ... Alonso, J. M. (2008). TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”

- Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell*, 133(1), 177–191.
- Tan, J., Tao, Q., Niu, H., Zhang, Z., Li, D., Gong, Z., ... Li, Z. (2015). A novel allele of monoecious (*m*) locus is responsible for elongated fruit shape and perfect flowers in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 128(12), 2483–2493.
- Tiedemann, R., (1989). Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Curcubita ficifolia*. *J. Plant Physiol*, 134, 427–440.
- Todd C. Wehner. (n.d.). Watermelon Introduction. *Cucurbit Breeding*. Retrieved from: www.cucurbitbreeding.com/watermelon-breeding.
- Vogel, J. P., Schuerman, P., Woeste, K., Brandstatter, I., & Kieber, J. J. (1998). Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics*, 149(1), 417–427.
- Wang, S., Tiwari, S. B., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR7 restores the expression of auxin-responsive genes in mutant *Arabidopsis* leaf mesophyll protoplasts. *The Plant Cell*, 17(7), 1979–93.
- Wechter, W. P., Levi, A., Harris, K. R., Davis, A. R., Fei, Z., Katzir, N., ... Trebitsh, T. (2008). Gene expression in developing watermelon fruit. *BMC Genomics*, 9, 275–287.
- Wien, H. C. (2002). The cucurbits: cucumber, melon, squash and pumpkin. (The physiology of vegetable crops., Ed.). *CAB International*, 345-418.
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 155–189.
- Yamasaki, A., Yamashita, M., Furuya, S., (1994). Mineral concentrations and cytokinin activity in the xylem exudates of grafted watermelons as affected by rootstock and crop load. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 62, 817–826.
- Yeoman, M.M., (1984). Cellular recognition systems in grafting. *Linkskens, H.F., Heslop-Harrison, I. (Eds.), Cellular Interaction, Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series*, 17, 453–472.
- Zhang, J., Shi, J., Ji, G., Zhang, H., Gong, G., Guo, S., Ren, Y., Fan, J., Tian, S., Xu, J. (2017). Modulation of Sex Expression in Four Forms of Watermelon by Gibberellin, Ethephone and Silver Nitrate. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 91-100.

Trabajo Fin de Máster: “Evaluación fenotípica y fisiológica del injerto de sandía sobre mutantes insensibles a etileno de *Cucurbita pepo*”