



TRABAJO FIN DE GRADO

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Sensibilidad al ABA del mutante deficiente en el receptor de etileno CpETR2b de *Cucurbita pepo*

Alumna: Laura García López

Proyecto experimental - área genética
Curso académico: 2019/2020

Tutor: Manuel Jamilena Quesada

Cotutora: Jessica Iglesias Moya

Departamento de Biología y Geología

Índice

Índice.....	I
Resumen.....	II
1. Introducción.....	1
1.1. El calabacín.....	1
1.2. Hormonas vegetales.....	1
1.2.1. Ácido abscísico.....	1
1.2.1.1. Biosíntesis de ABA.....	3
1.2.1.2. Ruta de transducción de señales de ABA.....	4
1.2.1.3. Mutantes claves en la señalización de ABA.....	5
1.2.1.4. El ABA en la germinación de la semilla.....	5
1.2.2. Etileno.....	6
1.3. Interacción ABA – ETILENO.....	8
2. Objetivos.....	9
3. Material y métodos.....	9
3.1. Localización.....	9
3.2. Material vegetal.....	9
3.3. Disoluciones utilizadas.....	10
3.4. Instalaciones.....	10
3.5. Ensayos realizados.....	10
3.5.1. Optimización del método.....	10
3.5.2. Ensayos comparativos.....	11
3.6. Toma de datos.....	12
3.7. Tratamiento de datos.....	12
4. Resultados y discusión.....	13
4.1. Efecto de la dosis de ABA sobre la germinación de plantas WT y mutantes <i>etr2b</i>	13
4.2. Comparación de los efectos de los tratamientos externos con ABA en plantas WT y <i>etr2b</i>	14
4.2.1. Efecto sobre la germinación.....	14
4.2.2. Efecto sobre la longitud de la raíz.....	17
4.2.3. Efecto sobre la tasa de crecimiento de las raíces.....	19
4.2.4. Efecto sobre el peso fresco.....	21
5. Conclusiones.....	24
6. Bibliografía.....	25

Resumen

El ácido abscísico (ABA) está implicado en importantes procesos del desarrollo de las plantas. Se ha estudiado que esta hormona puede ser clave para la mejora de estreses abióticos como la sequía y la salinidad. Por ello, resulta muy interesante llegar a conocer su ruta de señalización, cuáles son las proteínas que intervienen, con qué otras hormonas interactúa y cómo lo hace.

En este Trabajo Fin de Grado se ha evaluado la interacción ABA – Etileno en calabacín (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo*). En concreto, para su estudio se ha utilizado el mutante *etr2b*, insensible a etileno, identificado por el grupo de investigación BIO293 de la UAL.

Tras la aplicación de una concentración determinada de ABA exógeno, hemos comparado el genotipo *wild – type* y mutante *etr2b* para evaluar cómo interactúan estas hormonas respecto a la germinación de las semillas, longitud radicular, tasa de crecimiento y peso de las plántulas.

Los resultados nos han revelado que las hormonas ABA y etileno interactúan especialmente durante la germinación de las semillas. Además, estas hormonas también interactúan en el desarrollo radicular. La aplicación externa de ABA provoca estrés en las plantas y su vigor se muestra disminuido frente a los tratamientos control, aunque el efecto sobre las plantas mutantes *etr2b* ha sido menor que sobre las plantas WT. Estos resultados demuestran que la mutación *ETR2b*, a pesar de afectar a un receptor de etileno, condiciona también la sensibilidad al ABA de las plantas de calabacín.

Abstract

Abscisic acid (ABA) is involved in important plant development processes. It has been studied that this hormone may be key to improving abiotic stresses such as drought and salinity. Therefore, it is very interesting to get to know your signaling path, what proteins are involved, what other hormones interact with ABA and how do it.

In this Final Degree Project, the ABA – Ethylene interaction in zucchini (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo*) has been evaluated. Specifically, the mutant *etr2b*, insensitive to ethylene, identified by the UAL BIO293 research group, has been used for its study.

Following the application of a given concentration of exogenous ABA, we have compared the *wild – type* and mutant *etr2b* genotype to asses how these hormones interact with seed germination, root length, growth rate and seedling weight.

The results have revealed to us that the hormones ABA and ethylene interact especially during seed germination. In addition, these hormones also interact in root development. The external application of ABA causes stress in plants and its vigor is diminished compared to control treatments, although the effect on mutant *etr2b* plant has been less than on WT plants. These results show that the *ETR2b* mutation, despite affecting an ethylene receptor, also conditions the ABA sensitivity of zucchini plants.

1. Introducción

1.1. El calabacín

El calabacín (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo*) pertenece a la familia de las cucurbitáceas, comprendida por casi unos 130 géneros y 800 especies. Esta familia es una de las más importantes que aportan cultivos agrícolas para consumo humano, además del calabacín se incluye la sandía, el melón, el pepino y la calabaza (Bisognin, 2002). Del género *Cucurbita*, *C. pepo* es la especie más cultivada y con mayor importancia económica.

Este cultivo tiene su origen en el continente americano (Paris, 1989), se trata de una planta herbácea anual, rastrera, de crecimiento indeterminado y vegetación compacta. Presenta flores grandes, amarillas y unisexuales, y sus frutos varían mucho en tamaño y color.

El calabacín es cultivado tradicionalmente en la zona mediterránea. El morfotipo *Zucchini* (fig. 1) es el más conocido, de color verde oscuro y alargado. Se caracteriza por ser cosechado en estado inmaduro. Como valor nutricional aporta esencialmente vitamina C y potasio. Además de ser usado como hortaliza, sus semillas y flor pueden ser usadas como aderezos.



FIGURA 1. Planta de *Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo*, morfotipo *Zucchini*.

1.2. Hormonas vegetales

Las hormonas vegetales (o fitohormonas) juegan un papel central en la integración de diversas señales ambientales con redes de señalización y programas genéticos de plantas. Comprenden un conjunto de compuestos orgánicos pequeños no relacionados estructuralmente, en el cuál incluimos a las auxinas, ácido jasmónico (JA), giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BR), citoquinas, etileno, estrigolactona (SL) y ácido salicílico (SA) (Hakoshima, 2018).

1.2.1. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) fue descubierto independientemente por varios grupos de investigadores a principios de la década de 1960.

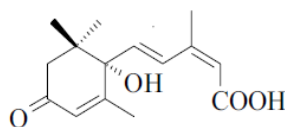


FIGURA 2. Fórmula molecular del ácido abscísico (ABA)

En un principio se creía que estaba involucrado en la abscisión de la fruta, lo nombraron abscisina II (Ohkuma et al. 1963), y, por otro lado, se vio que mantenía la latencia y lo llamaron dormina. Más tarde, se asumió que esos compuestos eran el mismo y fue denominado ácido abscísico (Conforth et al. 1965). En trabajos posteriores se hizo evidente que esta hormona vegetal es necesaria para el desarrollo de semillas, adaptación a estreses bióticos, entre otras funciones (Shwartz and Zeevaart, 2010).

El ABA es una fitohormona que regula la latencia de las semillas, la germinación y el crecimiento de brotes (Fujii and Zhu, 2009), la senescencia foliar (Liang et al. 2014) así como la adaptación a estreses abióticos ambientales, como pueden ser la sequía (Zhao et al. 2016), salinidad o frío (Matsui et al. 2008), acumulándose en las células vegetales bajo estrés hídrico donde promueve el cierre estomático y regula la expresión de genes (Leung and Giraudat, 1998).

Además, también se ha visto que la planta aumenta los niveles de ABA en presencia de estreses bióticos (Zhuolong Chan, 2012), como pueden ser heridas o patógenos.

Numerosos estudios fisiológicos y genéticos han demostrado que el ácido abscísico juega un papel importante en la regulación de la transpiración (Melotto et al. 2006). El ABA participa en la coordinación entre la conductancia estomática y el agua disponible, para evitar así la pérdida de agua por transpiración (Helander and Cutler, 2018). Los niveles de ABA aumentan en respuesta al déficit de agua (sequía), provocando el cierre del estoma, lo que a su vez reduce el crecimiento y la fijación de carbono. Esta hormona actúa a través de un módulo de señalización muy antiguo y presente en todos los genomas secuenciados de plantas terrestres (Cutler et al. 2010).

El ácido abscísico también está presente en hongos y animales (Hartung, 2010). En el musgo *Physcomitrella patens*, actúa a través de la respuesta central de ABA para controlar la tolerancia a la desecación (Khandelwal et al. 2010).

En algunos helechos la función del ácido abscísico es regular la latencia de las esporas y las relaciones sexuales de los tejidos reproductivos, lo que sugiere que esta es la función ancestral del ABA y más tarde evolucionó para controlar la transpiración y latencia en las semillas de plantas (McAdam et al. 2016).

Por los beneficios de esta hormona es requerida para mejorar el rendimiento de los cultivos durante la sequía (Helander et al. 2016). La aplicación directa de ABA en las plantas de cultivo mejora el rendimiento frente a estrés ambiental, como se ha comprobado por ejemplo en trigo (Zhang et al. 2016). Sin embargo, el ABA es fotosensible, se cataliza rápidamente y su estructura resulta compleja, lo que hace que su utilización en los cultivos no sea práctica (Wenjian et al. 2013), aunque se están estudiando compuestos sintéticos que imitan al ABA para usarse como agroquímicos (Helander et al. 2016).

1.2.1.1. Biosíntesis de ABA

El ácido abscísico es derivado de la escisión de precursores de carotenoides. Se han identificado muchas enzimas involucradas en la vía ABA, tanto de biosíntesis y catabolismo. Los carotenoides vegetales se producen por condensación de difosfato de isopentenilo (IPP), el precursor universal de todos los isoprenoides, y su isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP). En los plastidios, el IPP es formado por la vía del metileritrol fosfato (vía MEP/DOXP) a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (Seo and Marion-Poll, 2019).

La biosíntesis de ABA en plantas se realiza por la vía denominada indirecta, que proviene de la vía MEP/DOXP, al contrario que en hongos que se realiza a partir de la vía directa dependiente del ácido mevalonato (Helander and Cutler, 2018).

La biosíntesis de ABA podemos considerar que empieza con la oxidación del β -caroteno, un hidrocarburo de 40 carbonos, a zeaxantina por la enzima CHYB (β -caroteno hidroxilasa). La zeaxantina se oxida a antheroxantina y luego a violaxantina por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP), que está codificada en *Arabidopsis thaliana* por el locus ABA1 y cataliza ambas reacciones. La violaxantina puede convertirse en 9'-cis-violaxantina o trans-neoxantina, que luego se isomeriza a 9'-cis-neoxantina, y ambos productos dan lugar a la xantoxina por la enzima NCED (epoxycarotenoide dioxigenasa) (Helander and Cutler, 2018; Seo and Marion-Poll, 2019; Schwartz and Zeevaart, 2010).

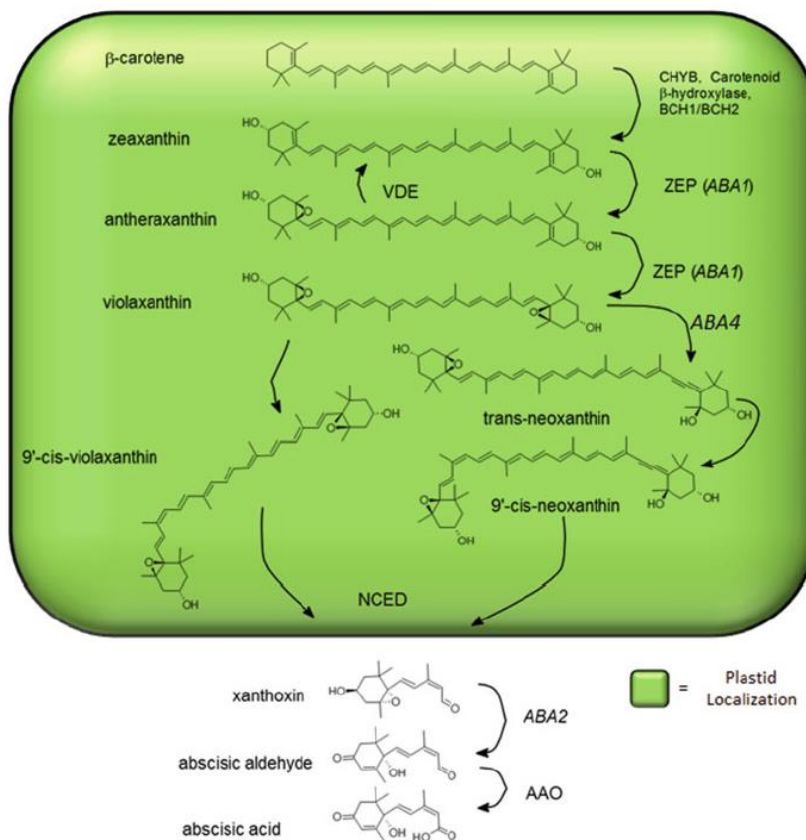


FIGURA 3. Ruta de biosíntesis de ABA. Adaptado de Helander and Cutler, 2018.

Una vez formada, la xantoxina se exporta al citosol, donde es oxidada por la enzima xantoxina deshidrogenasa (codificada en *Arabidopsis* por ABA2), para producir abscísico aldehído que finalmente será oxidado a ABA por una oxidasa dependiente de molibdeno codificada en *Arabidopsis* por la aldehído oxidasa de abscísico (AAO o ABA3) (Helander and Cutler, 2018; Seo and Marion-Poll, 2019; Schwartz and Zeevaart, 2010).

1.2.1.2. Ruta de transducción de señales de ABA

En la ruta de transducción de señales del ácido abscísico se conoce que participan los siguientes componentes: una fosfatasa (PP2C), una quinasa (SnRK2) y el receptor de ABA (PYR/PYL/RCAR) (Helander and Cutler, 2018).

Podemos diferenciar lo que ocurre en:

A. Ausencia de ABA:

La fosfatasa PP2C se une, en su dominio de activación, al extremo C' terminal de la proteína con actividad quinasa, SnRK2 (figura 4 – A). Esto hace que se produzca una desfosforilación de la quinasa y se bloquea la función de la SnRK2.

Cuando estas proteínas están unidas se inactiva el complejo, reprimiendo a dos grupos de genes, uno que dan lugar a sustratos de SnFK2, y el otro grupo son factores de transcripción de respuesta a ABA (bZIP). Los bZIP son una familia enorme de factores de transcripción, incluyen a los ARB y ABFs (factores de unión a ABA).

B. Presencia de ABA:

Actúa el receptor de ABA (PYR/PYL/RCAR). Cuando las proteínas PYR perciben el ABA, se unen a él e inmediatamente PYR se une a la fosfatasa PP2C (figura 4 – B), la secuestran e impiden que PP2C se una a SnRK2, y, por tanto, se mantiene fosforilada. La SnRK2 fosforila a factores de transcripción de respuesta a ABA (bZIP). Los bZIP son una familia enorme de factores de transcripción que incluye a ARB, ABFs y ABRE (factores de unión a ABA).

ABI5, que es un bZIP en *Arabidopsis thaliana*, se une al promotor del factor de transcripción ABRE e induce la expresión de genes dependientes de ABA. Aún no se conoce muy bien el paso que da a ABI4. ABI4 se une a CE (elemento de acoplamiento) en el promotor de ABRE (Hussain et al. 2019).

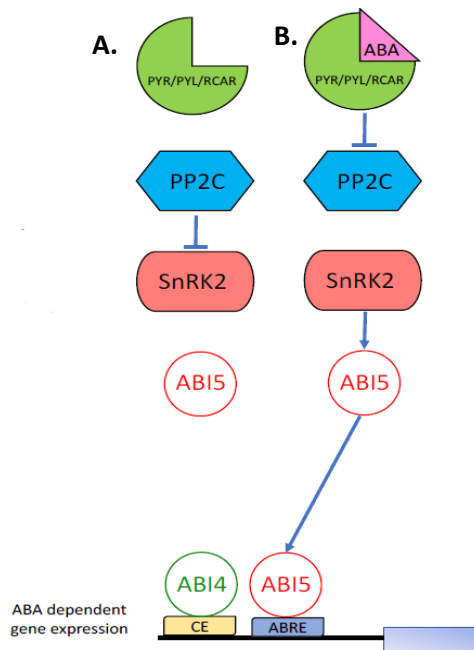


FIGURA 4. Ruta de transducción de señales de ABA. A) En ausencia de ABA. B) En presencia de ABA. Adaptado de Hussain et al. 2019

1.2.1.3. Mutantes claves en la señalización de ABA

Los componentes que participan en la señalización del ABA han sido caracterizados con mutantes de *Arabidopsis thaliana*, estos componentes han sido denominados *ABI1*, *ABI2*, *ABI3*, *ABI4*, *ABI5* y *ABI8*. Sus funciones son (Cheng et al. 2009):

- *ABI1* y *ABI2* codifican para la fosfatasa PP2C, que participa negativamente en la transducción de señales del ABA (descrita en el apartado anterior).
- *ABI3* es un factor de transcripción, ortólogo al gen *VP1* de maíz.
- Las proteínas *ABI4* y *ABI5* pertenecen a factores de transcripción con dominio *APETALA2*.
- La función de *ABI8* aún es desconocida.

Con la descripción de estos genes ya podemos entender la interacción ABA – etileno que ha sido estudiada con el uso de mutantes característicos en la inhibición de la función del gen en cuestión.

1.2.1.4. El ABA en la germinación de la semilla.

La germinación es una de las fases más críticas en el desarrollo de las plantas. Cada especie requiere unos valores específicos óptimos de temperatura, luz, pH y humedad para que el proceso se inicie con éxito. La germinación se puede definir como los procesos metabólicos y morfológicos de un embrión que resultan en una plántula, capaz de transformarse en una

planta adulta. Este proceso conlleva desde la imbibición de la semilla hasta la elongación del eje embrionario. (Bove et al. 2001).

Estos procesos metabólicos y celulares están regulados por las hormonas vegetales. Las giberelinas y brasinoesteroides promueven la germinación, mientras que el ABA mantiene la dormición. La dormición y la germinación se regulan por un balance giberelinas/ABA. Cuando hay mayor nivel de giberelinas y la semilla se expone a unos valores óptimos ambientales se inicia la germinación (Bove et al. 2001).

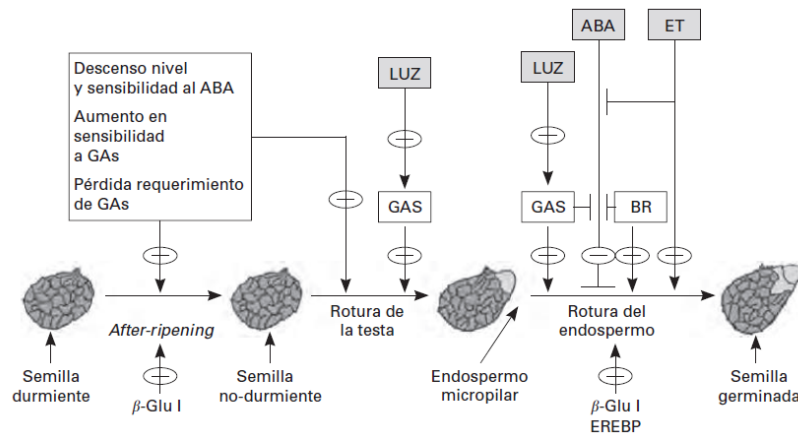


FIGURA 5. Interacciones hormonales durante la rotura de la dormición en semillas. Destacando el balance entre giberelinas (GAS) y el ácido abscísico (ABA), y la inhibición de etileno (ET) respecto al ABA. Adaptado de Matilla, 2013.

Por tanto, la absorción de agua es el requisito fundamental para el inicio de la germinación, la semilla se rehidrata y reanuda gradualmente su actividad metabólica. Este proceso es trifásico, comienza con una fase inicial (I) de rápida absorción, es decir, la imbibición, seguido de una fase de meseta (II) en la que solo se produce un aumento adicional en la absorción de agua. En la fase III se completa la germinación (con la elongación del eje embrionario) (Manz et al. 2005).

El ácido abscísico inhibe el cambio de fase II a fase III, en *Arabidopsis thaliana* se sabe que el factor *ABI5* (regulado por el ácido abscísico) es necesario para que se produzca este cambio (Manz et al. 2005).

1.2.2. Etileno.

El etileno es una fitohormona gaseosa que tiene un papel importante en la maduración de frutos climatéricos. Además, participa en la germinación de las semillas, senescencia de las plantas y en respuesta a estreses abióticos y bióticos (Matilla, 2000).

El efecto más característico del etileno en plántulas es lo que conocemos como triple respuesta, que consiste en la reducción de la elongación del hipocótilo, el incremento del desarrollo lateral y el cambio en la orientación del desarrollo, originando hipocótilos más cortos, gruesos y con gancho apical (Solano and Ecker, 1998).

Los receptores de etileno están localizados en la membrana del retículo endoplasmático. En *Arabidopsis thaliana* se han descrito cinco receptores de etileno: ETR1 y ETR2 (respuesta a etileno), ERS1 y ERS2 (sensor de etileno) y EIN4. Estos receptores se dividen en dos subfamilias, en la subfamilia 1 se incluye el ETR1 y ERS1, mientras que en la subfamilia 2 se agrupa al ETR2, ERS2 y EIN4 (Bakshi et al. 2018), dependiendo de su función.

La primera proteína que se identificó en la transducción de la señal de etileno fue el receptor ETR1, que corresponde con una proteína codificada por un gen cuya mutación provoca una completa resistencia a la acción del etileno (insensibilidad a etileno) (Bhatla, 2018).

La ruta de transducción de señales de etileno se puede describir (Bakshi et al. 2015; Bhatla, 2018; Qiao et al, 2012; Hussain et al, 2019):

A. Ausencia de etileno:

El receptor de etileno ETR1 se encuentra unido a CTR1. Esta unión hace que el extremo C' de EIN2 sea fosforilado y no se escinde.

La proteína transmembrana EIN2 es incapaz de migrar al núcleo. En el núcleo está EIN3 que no percibe la activación por parte de EIN2, y EIN3 es degradado por el proteosoma 26S.

B. Presencia de etileno:

El receptor ETR1 se une a etileno y CTR1 es incapaz de fosforilar a EIN2.

Al no fosforilarse EIN2, se produce el corte de su extremo C' terminal, se libera y migra al núcleo donde interacciona con EIN3. La interacción entre EIN2 y EIN3 forma un heterodímero que bloquea su degradación por el proteosoma (26S).

EIN3 se une a los promotores de genes factores de transcripción (ERF1) activando la respuesta hormonal de etileno.

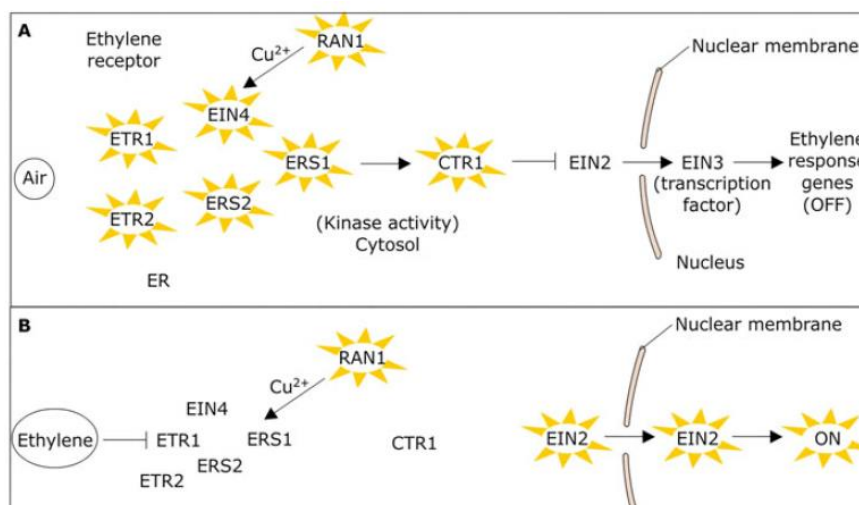


FIGURA 6. Ruta de transducción de señales de etileno. Adaptado de Bhatla, 2018.

1.3. Interacción ABA – Etileno.

Además de los antagonismos bien caracterizados entre ABA y giberelinas (GAS), citoquininas o auxinas, se han demostrado interacciones entre la señalización de ABA y etileno (Finkelstein, 2002).

Numerosos estudios aprueban que las fitohormonas ABA y etileno interaccionan de manera antagónica en la germinación de las semillas (Hussain et al. 2019). Estos descubrimientos han sido posibles gracias al uso de mutantes deficientes en los distintos genes que participan en las rutas de señalización de ambas hormonas.

En *Arabidopsis thaliana* se han estudiado los diferentes mutantes dando lugar a las siguientes conclusiones:

- El mutante *etr1* (insensible a etileno) incrementa la sensibilidad al ABA dificultando la germinación con la aplicación de ABA externo y observándose una ralentización respecto al *wild-type* (Col) (Bakshi et al. 2018; Matilla, 2000). Lo que nos sugiere que el gen *ETR1* es requerido para la regulación de la germinación de semillas bajo condiciones inhibitorias, como pueden ser la aplicación de ABA exógeno o NaCl (Bakshi et al. 2018), y es un regulador negativo de la ruta de señalización del ABA.
- Los mutantes *ein2* y *etr1* acumulan grandes cantidades de ABA en semillas y por ello la germinación se ve ralentizada (Ghassemian et al. 2000). Se cree que puede ser por la regulación positiva de la enzima NCED que participa en la biosíntesis de ABA (Cheng et al. 2009).
- El mutante *ein4* es menos sensible al ABA mientras que el mutante *etr2* es muy hipersensible, y estas diferencias indican que dependiendo del receptor de etileno la regulación es diferente (Bakshi et al. 2018).
- Se identificó un mutante con mayor sensibilidad al ABA, *era3* (enhancer response to ABA3), que posteriormente se dedujo que era un alelo del locus EIN2 (Ghassemian et al. 2000), lo que también indica que el etileno es un regulador negativo de ABA (Beaudoin et al. 2000). Además, se ha llegado a pensar que EIN2 podría ser el único enlace entre la señalización de ABA y etileno (Ghassemian et al. 2000).
- Mutantes deficientes de ABA (*abi1* y *abi2*) sobre - producen etileno, lo que nos sugiere que el ABA puede llegar a inhibir la biosíntesis de etileno (Hussain et al. 2019).
- Mutantes *etr1* y *ein2* confieren insensibilidad al ABA y al etileno (Ghassemian et al. 2000; Beaudoin et al. 2000), sin embargo, los mutantes *abi* son sólo insensibles a ABA y no a etileno. Por tanto, la regulación del etileno respecto a la señalización del ABA está a nivel del EIN2 (Ghassemian et al. 2000).

- El mutante *ctr1* presenta una aceleración de la germinación respecto al *wild-type* (Beaudoin et al. 2000) mientras que el mutante *ein2* la suprime (Cheng et al. 2009).
- Los mutantes *etr1* y *etr2* tienen comportamientos distintos respecto a la germinación. En presencia de ABA exógeno, *etr1* germina más rápido y *etr2* más lento respecto al *wild-type* (Wilson et al. 2014).

2. Objetivos

El grupo de investigación BIO293 de la UAL ha identificado varios mutantes insensibles a etileno en calabacín, todos ellos alterados en receptores de etileno. En este Trabajo Fin de Grado hemos utilizado el mutante *etr2b* para estudiar la interacción ABA-etileno en la germinación de la semilla de calabacín. Los objetivos específicos que nos propusimos fueron los siguientes:

- 1) Determinar la concentración de ABA necesaria para inhibir la germinación de las semillas de calabacín, y desarrollar un método que nos permita evaluar la sensibilidad al ABA de diferentes genotipos.
- 2) Comparar la sensibilidad al ABA de plantas WT y *etr2b* durante la germinación de la semilla de calabacín.
- 3) Analizar el crecimiento temprano de plántulas WT y *etr2b* tratadas y no tratadas con ABA.

3. Material y métodos

3.1. Localización

Los ensayos se han realizado en la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Almería, en concreto en el laboratorio del grupo de investigación “Genética de Hortícolas” (BIO293).

3.2. Material vegetal

Se han utilizado semillas de calabacín (*Cucurbita pepo*).

Las variedades utilizadas han sido MUC16, como variedad control, pues se trata del fondo genético de la mutación *etr2b*, mutante insensible a etileno, y su respectivo *wild-type*.

Este mutante fue aislado de una colección de mutantes realizado por García et al. 2018, y fue caracterizado como *ein3*. Recientemente se ha identificado el gen responsable de la mutación y se sabe que resulta homólogo al ETR2 en *Arabidopsis thaliana*, por lo que ha sido denominado CpETR2B (García et al. 2020).



FIGURA 7. Semillas de *Cucurbita pepo*

Por lo tanto, el mutante *etr2b* es deficiente en el receptor de etileno CpETR2B, mientras que su *wild-type* no lo es.

3.3. Disoluciones utilizadas

El tratamiento control se realiza con agua destilada.

Las soluciones de ácido abscísico (ABA) utilizadas han sido de 75µM y 100µM, preparadas en el laboratorio a partir de ABA y agua destilada.

3.4. Instalaciones

Se ha usado una cámara de cultivo climática con los parámetros de fotoperiodo, humedad y temperatura controlados.

Se han programado una temperatura de 24°C y humedad 80% constantes.

En las primeras 72h las semillas han germinado 100% en oscuridad, tras pasado este tiempo se ha establecido un fotoperiodo de luz-oscuridad de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

3.5. Ensayos realizados:

3.5.1. Optimización del método

Se ha procedido a la optimización del método para dar con la concentración de ABA óptima, con la cuál podemos observar diferencias significativas sin que afecte al crecimiento de la planta.

Colocamos 24 semillas de cada genotipo repartidas en 3 tubos Falcon de 45mL. En cada tubo 20mL del tratamiento correspondiente, que serán el control (agua destilada), ABA 75µM y ABA 100µM. Las semillas se dejaron en imbibición 20 horas en oscuridad a temperatura ambiente.

Tras el periodo indicado, las semillas se sembraron en placas de Petri entre dos papeles de filtro empapados en 1mL de la solución tratamiento correspondiente y fueron incubados en la cámara de cultivo a 24°C, humedad 80% y oscuridad.

A partir de las 18 horas se tomaron datos de germinación cada 2 horas.

Los datos obtenidos se han tratado con Excel para deducir cual es la concentración óptima de ABA a utilizar.

3.5.2. Ensayos comparativos

Tras elegir la concentración óptima de ABA, 100 μ M, se realizaron cinco ensayos en distintos tiempos, pero con iguales condiciones.

Estos ensayos han consistido en la comparación del *wild-type* con el mutante *etr2b*, estudiando su comportamiento frente a la germinación, tasa de crecimiento, longitud radicular y peso fresco.

En este caso se han usado 30 semillas de cada variedad repartidas en 3 réplicas para cada tratamiento, control y ABA 100 μ M. Las semillas se embebieron con 20mL de la solución del tratamiento durante 20 horas en oscuridad y a temperatura ambiente.



FIGURA 8. Preparación de los tubos Falcon con semillas para la imbibición con las preparaciones respectivas de ABA y agua destilada.

Tras pasado este tiempo, se sembraron en placas de Petri (fig. 9) con las semillas entre dos papeles de filtro empapados en 1mL de la solución tratamiento correspondiente, y se incuban en cámara de cultivo a 24°C, humedad 80% y oscuridad.



FIGURA 9. Preparación en placas de Petri etiquetadas adecuadamente.

El tiempo de germinación se estimó a partir de la siembra en placa:

- A las 18 horas se empiezan a anotar los datos de germinación cada dos horas.
- A las 48 horas se toman la medida de la radícula y se devuelven a la placa.
- A las 72 horas se vuelve a tomar la medida de la radícula y se traspasan a recipientes de cristal con 5 gramos de vermiculita y 20 mL de la solución tratamiento y se tapan con un film dejando un poco de aireación (fig. 10). Se vuelven a incubar en la cámara de cultivo, pero en este caso se activa el fotoperiodo día-noche.

- A las 192 horas se sacaron las plántulas de los botes. Se toman los datos de peso fresco y longitud de la raíz. El material vegetal se guarda congelado para posteriores ensayos.



FIGURA 10. Preparación en botes de cristal, con 5 gramos vermiculita y 20mL de la solución correspondiente.

3.6. Toma de datos:

Se toman datos manuales de la germinación anotando el número de semillas germinadas cada 2 horas. Las semillas se han considerado germinadas con al menos 2 mm de longitud, como se muestra en la figura 11.



FIGURA 11. Semillas de *Cucurbita pepo* comenzando a germinar.

La longitud de las raíces ha sido determinada con el programa "ImageJ" en el que se introducen las fotos con su escala correspondiente.

Para el peso fresco se ha usado una balanza de peso de laboratorio, separando los datos de peso de raíz y de la parte aérea.

3.7. Tratamiento de datos:

Los datos son tratados con los programas Microsoft office Excell y IBM SPSS Statitics.

Se calculó el tiempo medio de germinación mediante la fórmula descrita en González and Orozco (1996):

$$Tm = \frac{\sum(n_i * t_i)}{\sum n_i}$$

Siendo, Tm el tiempo promedio de germinación, t_i el número de horas después de la siembra en placa Petri y n_i el número de semillas germinadas a la hora i.

La tasa de crecimiento ha sido calculada en base a la media entre las diferencias de longitud de la raíz de cada semilla según el tiempo transcurrido:

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\text{Longitud raíz 2} - \text{Longitud raíz 1}}{\text{horas}}$$

Cada semilla ha sido etiquetada y se conocen sus datos individualmente, por lo que la tasa de crecimiento se calcula individual para cada una de las semillas.

Además, hemos calculado el porcentaje de reducción para cada parámetro individual de los genotipos en presencia de ABA respecto al agua siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción} = \frac{\text{valor en agua (H2O)} - \text{valor en ABA}}{\text{valor en agua (H2O)}} * 100$$

Para el análisis estadístico se ha usado IBM SPSS Statistics con el fin de realizar un análisis de varianzas (ANOVA). En primer lugar, se han tenido en cuenta las cuatro premisas para poder realizar este análisis: normalidad, homogeneidad, aleatoriedad y valores atípicos. Según el caso se ha tomado el nivel de significancia ($p > 0,05$) mediante ANOVA o *Kruskal – Wallis*. Tras obtener el resultado del análisis de varianzas se ha realizado una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para estudiar las diferencias entre las muestras.

4. Resultados y discusión

En este apartado se presentan los datos del efecto de la aplicación externa de ABA sobre la germinación, longitud de la radícula, velocidad de crecimiento y, por último, sobre el peso fresco de las plantas WT y *etr2b*.

4.1. Efecto de la dosis de ABA sobre la germinación de plantas WT y mutantes *etr2b*

En este ensayo se ha evaluado el efecto de dos concentraciones de ABA sobre la germinación de semillas MUC16 (fondo genético de las mutaciones), y semillas WT y *etr2b* de una misma población BC2S1. Incluimos a MUC16 como control, sabiendo que germina en agua a las 24 horas.

La figura 12 muestra el perfil de germinación de los tres genotipos en agua y a una concentración de ABA 75 μM y 100 μM . Aunque el número de semillas utilizado en este ensayo fue muy bajo (45 semillas), se decidió seleccionar el tratamiento de ABA 100 μM , ya que nos muestra datos más significativos para poder realizar el estudio posterior. En el tratamiento con ABA 75 μM la curva de germinación se solapa con las muestras control (fig. 12).

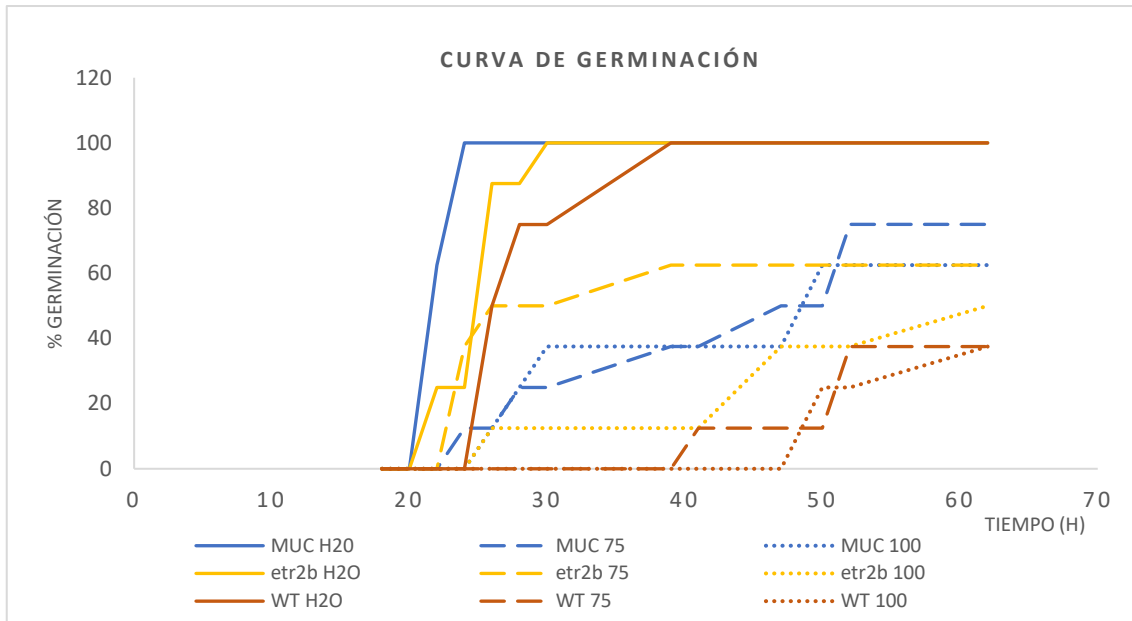


FIGURA 12. Perfil de germinación de plantas del genotipo MUC16, y WT y mutantes *etr2b* segregando en una población BC2S1, obtenida tras 2 retrocruzamientos con el fondo genético MUC16 y autofecundación.

4.2. Comparación de los efectos de los tratamientos externos con ABA en plantas WT y *etr2b*

Tras elegir como concentración óptima 100 μM de ABA, procedemos a comparar el efecto del tratamiento con ABA sobre la germinación de semillas WT y *etr2b*, y sobre diferentes parámetros de crecimiento como la longitud de la radícula, tasa de crecimiento y peso fresco de las plántulas. Se realizaron cinco repeticiones de 60 semillas para cada uno de los genotipos y tratamientos.

4.2.1. Efecto sobre la germinación

Para estimar el efecto de la interacción de las hormonas ABA y etileno sobre la germinación de las semillas se ha evaluado la curva de germinación, el tiempo promedio de germinación y los índices G50 y G100.



FIGURA 13. Semillas WT y *etr2b* a las 48 h de tratamiento con ABA 100 μM . Mientras que en el mutante ya han germinado el 86,66% de las semillas, en el WT solo habían germinado el 46,66%. El retraso que produce el ABA en la germinación de las semillas WT es mucho mayor que el retraso que produce en las semillas *etr2b*.

La aplicación externa de ABA en semillas produjo un retraso en la germinación de los genotipos WT y mutante (fig. 13), con una disminución en la velocidad de germinación cuando éstos se ven afectados por la aplicación de ABA (fig. 14).

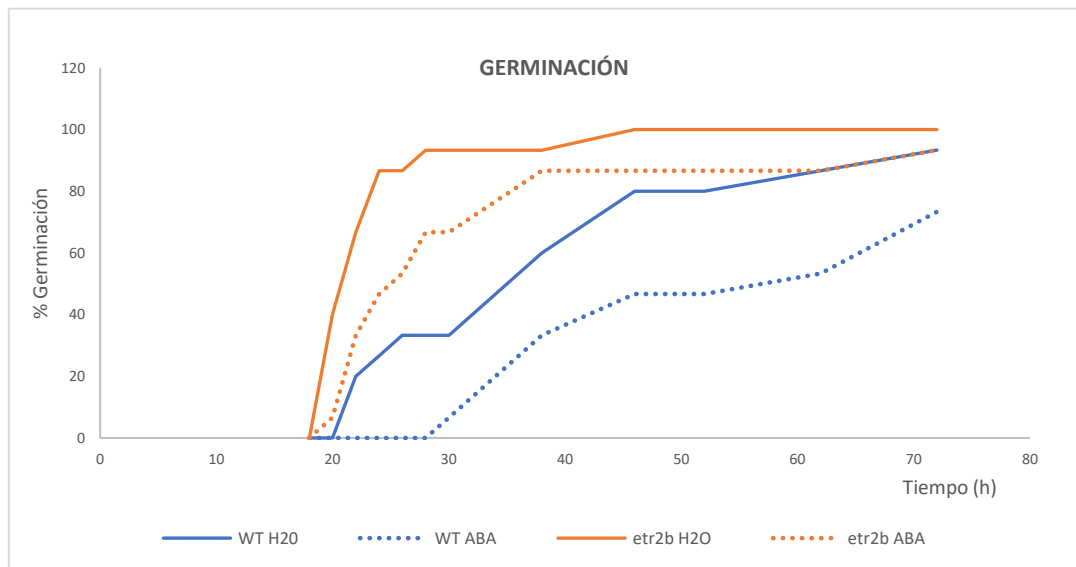


FIGURA 14. Comparación de las tasas de germinación de los genotipos WT y *etr2b* en presencia o ausencia de ABA.

En agua, la semilla WT y mutante mostró el mismo tiempo medio de germinación (fig. 15). Sin embargo, tras la aplicación de ABA, el mutante *etr2b* presentó un tiempo promedio de germinación de aproximadamente 34 horas, mientras que el genotipo WT mostró un tiempo medio de aproximadamente 54 horas (fig. 15). La semilla del mutante respondió menos al ABA que la semilla del WT, indicando que la mutación *etr2b* hace que la semilla se vuelva más insensible al tratamiento exógeno con ABA.

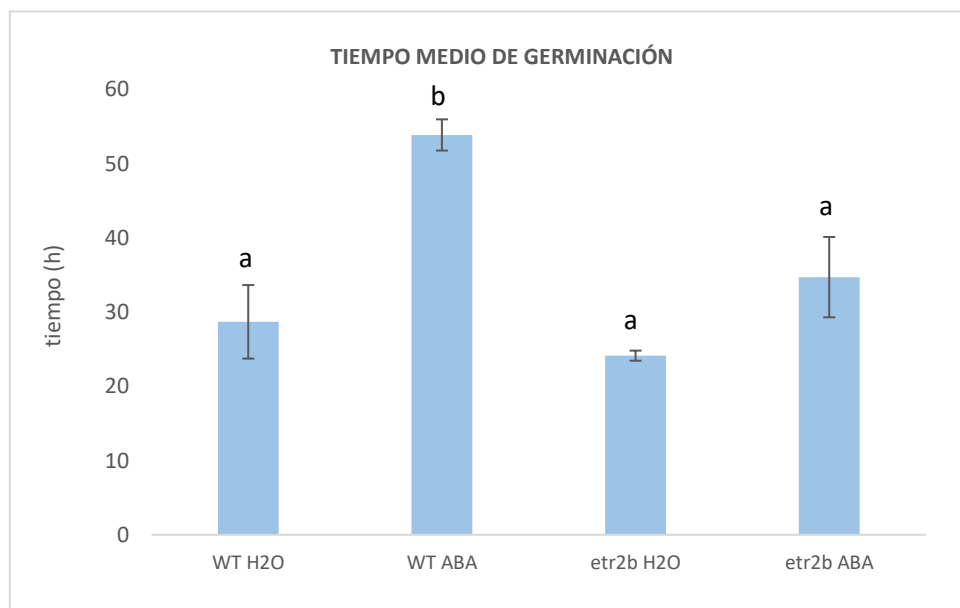


FIGURA 15. Comparación del tiempo medio de germinación de plantas WT y mutantes *etr2b* en agua y en presencia de 100 μ M de ABA. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

El resultado lo podemos confirmar también estudiando el momento en el que han germinado el 50% de las semillas y el 100%, es decir, con los índices G50 y G100 (fig. 16). No observamos diferencias significativas para el tiempo G50 de semillas WT y *etr2b* en agua o en ABA (fig. 16). En agua, las semillas WT y mutantes mostraron también el mismo tiempo de germinación G100. Sin embargo, en presencia de ABA, el genotipo WT mostró un tiempo G100 significativamente más alto que el genotipo *etr2b* (fig. 16), lo que demuestra que la mutación hace que las semillas de calabacín se vuelvan insensibles al ABA. De hecho, muchas de las semillas WT no fueron capaces de germinar en presencia de 100 μ M de ABA mientras que las semillas *etr2b* tratadas con ABA germinaron.

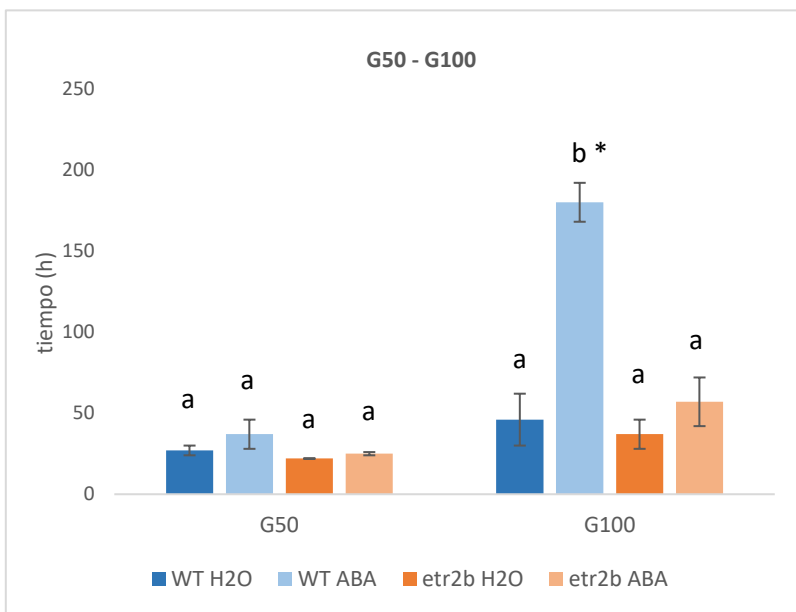


FIGURA 16. Índices G50 y G100. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Las barras de error representan el error estándar. * No se ha alcanzado el 100% de la germinación en alguno de los ensayos.

Para estimar la sensibilidad al ABA de los genotipos WT y *etr2b* hemos calculado el porcentaje de reducción en el tiempo medio de germinación, y en los índices de germinación G50 y G100 de semillas germinadas en presencia de 100 μ M de ABA respecto de las semillas del mismo genotipo germinadas en agua (Tabla 1). En todos los casos la sensibilidad al ABA de las semillas WT fue mucho mayor que las semillas *etr2b*, aunque para el parámetro G50 no se encontraron diferencias significativas en la sensibilidad al ABA de ambos genotipos (Tabla 1).

TABLA 1. Comparación de la sensibilidad al ABA entre plantas WT y *etr2b* utilizando el % de reducción en el tiempo medio de germinación y en los índices G50 y G100 de semillas germinadas en presencia de ABA respecto de semillas germinadas en agua. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

		Tiempo medio de germinación		G50		G100	
Genotipo	N	% reducción	Rango	% reducción	Rango	% reducción	Rango
WT	3	87,76 ^b	75-100	37,04 ^a	4-70	291,3 ^b	265-317
<i>etr2b</i>	3	36,26 ^a	17-65	13,63 ^a	9-18	54,05 ^a	13-94

El genotipo WT es el que más afectado resulta tras la aplicación de ABA 100 μ M, mientras que *etr2b* se muestra más insensible al ABA. Estos resultados nos sugieren que el receptor de etileno CpETR2B de *Cucurbita pepo* puede estar conectado con la señalización del ABA durante la germinación de las semillas favoreciendo la dormición. Los mutantes insensibles a etileno de *Arabidopsis* también muestran alteraciones en la producción y sensibilidad al ABA (Ghassemian et al. 2000; Beaudoin et al. 2000). El mutante deficiente en el receptor ETR1 se muestra más insensible al ABA durante la germinación de las semillas, lo que no ocurre en el caso del mutante deficiente en el receptor ETR2 (Bakshi et al. 2018; Wilson et al. 2014). Además, también se ha visto que otros receptores como EIN4 en *Arabidopsis thaliana* actúan de igual manera que ETR1, y en los mutantes la germinación se ve favorecida (Hussain et al. 2019; Cheng et al. 2009).

4.2.2. Efecto sobre la longitud de la raíz

Con el fin de conocer si existen diferencias respecto a la longitud radicular y el desarrollo de la planta se han dejado crecer las semillas en botes de cristal hasta el estado de plántula (fig. 17).



FIGURA 17. Estado de las semillas y plántulas de los genotipos WT y *etr2b* a los distintos tiempos en los que se ha evaluado la longitud radicular.

La aplicación externa de ABA en las semillas afectó al crecimiento radicular inhibiendo el correcto desarrollo de la plántula, ambos genotipos se vieron afectados (fig. 18). El análisis estadístico nos revela, sin embargo, que las raíces del mutante se ven menos afectadas por el tratamiento de ABA, lo que vuelve a confirmar que el mutante *etr2b* es más insensible a ABA que el WT.

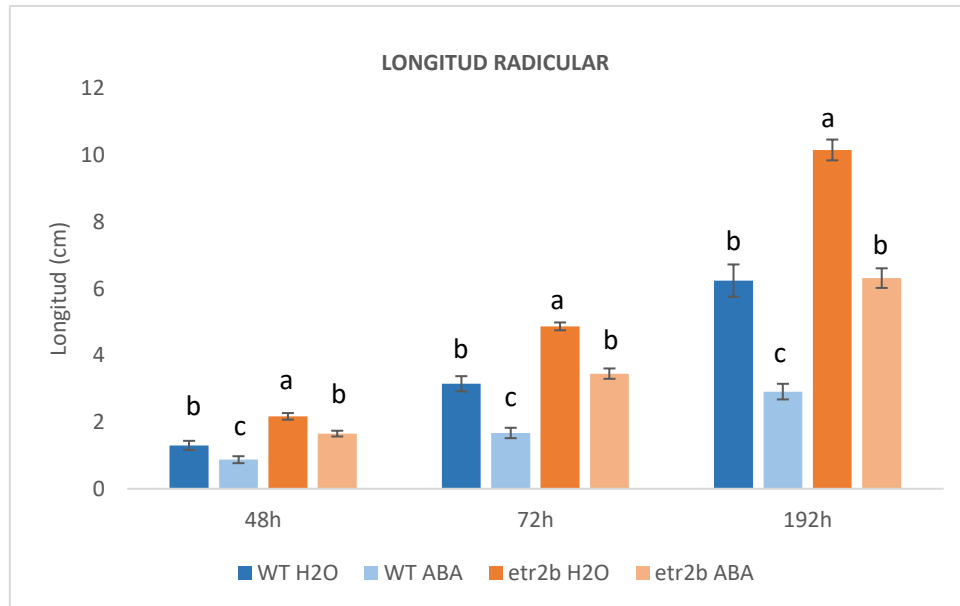


FIGURA 18. Comparación de la longitud radicular a las 48, 72 y 192 horas de plantas WT y *etr2b* control y tratadas con ABA. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Para estudiar las diferencias tras la aplicación de ABA en los genotipos WT y *etr2b*, se ha analizado el porcentaje de sensibilidad al ABA para la longitud de las radículas a las 48, 72 y 192 horas (fig. 17). La longitud radicular aumenta en el genotipo *etr2b* mostrando un menor porcentaje de sensibilidad al ABA (Tabla 2).

TABLA 2. Comparación de la sensibilidad al ABA entre plantas WT y *etr2b* utilizando el % de reducción de la longitud radicular para las 48, 72 y 192 h en presencia de ABA respecto al tratamiento en agua. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Genotipo	N	Longitud 48h		Longitud 72h		Longitud 192h	
		% reducción	Rango	% reducción	Rango	% reducción	Rango
WT	27	33 ^a	43-85	46,8 ^b	9-97	53,3 ^b	4-94
<i>etr2b</i>	29	23,8 ^a	(-7)-65	29,1 ^a	8-96	37,8 ^a	(-13)-63

Las hormonas ABA y etileno participan sinérgicamente en la inhibición del desarrollo de la raíz (Ghassemian et al. 2000; Hussain et al. 2019). Se ha comprobado que los mutantes insensibles a etileno en *Arabidopsis thaliana* reducen la respuesta de las raíces al ABA (Beaudoin et al. 2000), y, por tanto, no resulta inhibido su crecimiento. En el caso de este ensayo con *Cucurbita pepo* el crecimiento de la raíz se ve disminuido en el tratamiento con ABA, pero la reducción en el desarrollo radicular fue mayor en el WT que en el mutante *etr2b*.

4.2.3. Efecto sobre la tasa de crecimiento de las raíces

La tasa de crecimiento ha sido determinada teniendo en cuenta la longitud de la raíz a diferentes tiempos, siguiendo la fórmula indicada en material y métodos.

En el primer periodo evaluado, crecimiento desde las 48 a las 72 horas, el mutante *etr2b* en tratamiento control presenta mayor tasa de crecimiento que el resto de las muestras, encontrando diferencias con el genotipo WT control (fig. 19). Además, las diferencias entre los tratamientos con ABA para ambos genotipos también son notorias, se observa como en este caso la tasa de crecimiento disminuye. En el caso del segundo periodo, de las 72 a las 192 horas, el genotipo *etr2b* en agua sigue siendo mayor, pero el resto de genotipos se ven estabilizados (fig. 19).

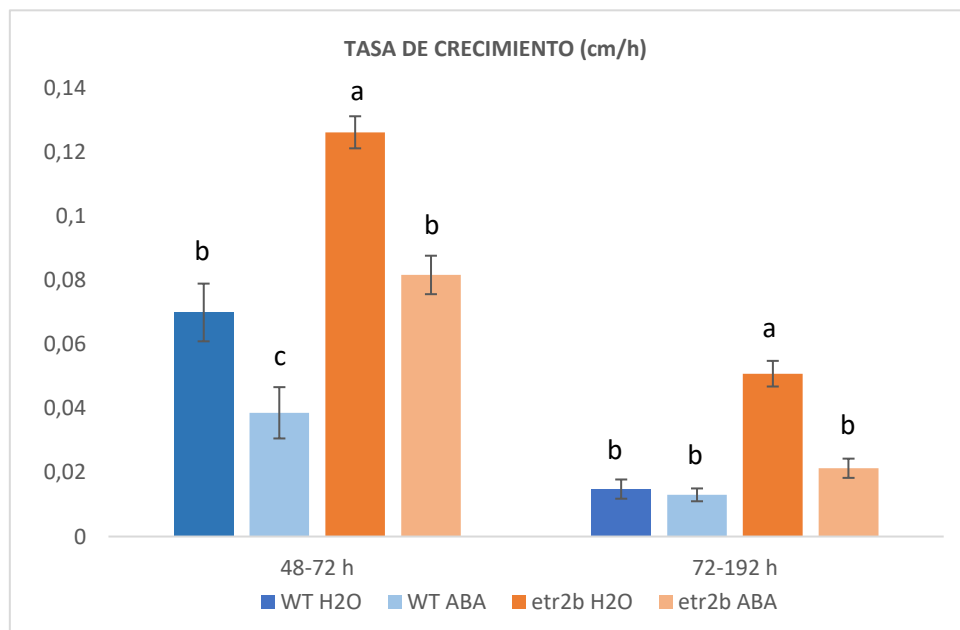


FIGURA 19. Tasa de crecimiento en dos periodos, para los distintos genotipos y tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

El genotipo WT en tratamiento control y *etr2b* en tratamiento ABA casi presentan la misma tasa de crecimiento, aún estando *etr2b* afectado por el ABA (fig. 20). Estos datos indican que, aunque el ABA es capaz de disminuir la tasa de crecimiento de las raíces en las plantas WT y mutantes, la velocidad de crecimiento de la raíz en el mutante es mucho mayor que la del WT.

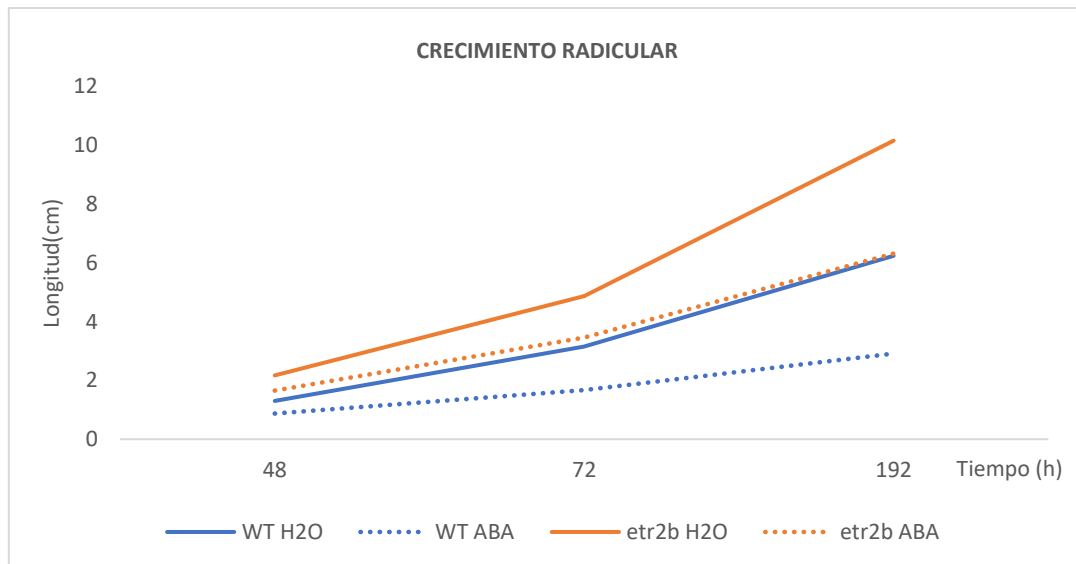


FIGURA 20. Variación radicular de los genotipos WT y *etr2b* en los distintos tratamientos.

Para la tasa de crecimiento el grado de sensibilidad al ABA del genotipo *etr2b* es mucho mayor que el WT (Tabla 3) en el segundo periodo, donde se estabilizan todas las muestras salvo la del *etr2b* sin tratamiento que continúa creciendo. A pesar de que finalmente las plántulas *etr2b* consiguen mayor longitud radicular que las plántulas WT, como comprobamos en el apartado anterior (fig. 18), el genotipo *etr2b* resulta más afectado por el tratamiento con ABA, respecto a la tasa de crecimiento, comparándolo con su control. En el primer periodo, de las 48 a las 72 horas, no hay diferencias significativas (Tabla 3).

TABLA 3. Comparación de la sensibilidad al ABA entre plantas WT y *etr2b* utilizando el % de reducción para la tasa de crecimiento en plántulas con tratamiento ABA respecto al agua. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

		48 – 72 h		72 – 192 h	
Genotipo	N	% reducción	Rango	% reducción	Rango
WT	12	44,82 ^a	(-1)-95	12,43 ^a	(-117)-100
<i>etr2b</i>	14	35,26 ^a	15-94	58,07 ^b	20-97

4.2.4. Efecto sobre el peso fresco

El peso fresco ha sido evaluado en el estado de plántula (fig. 21), pasadas 192 horas desde la siembra en placa Petri. Se tomó el peso de la biomasa total, y, por separado, el de la raíz y el de la parte aérea de cada plántula.

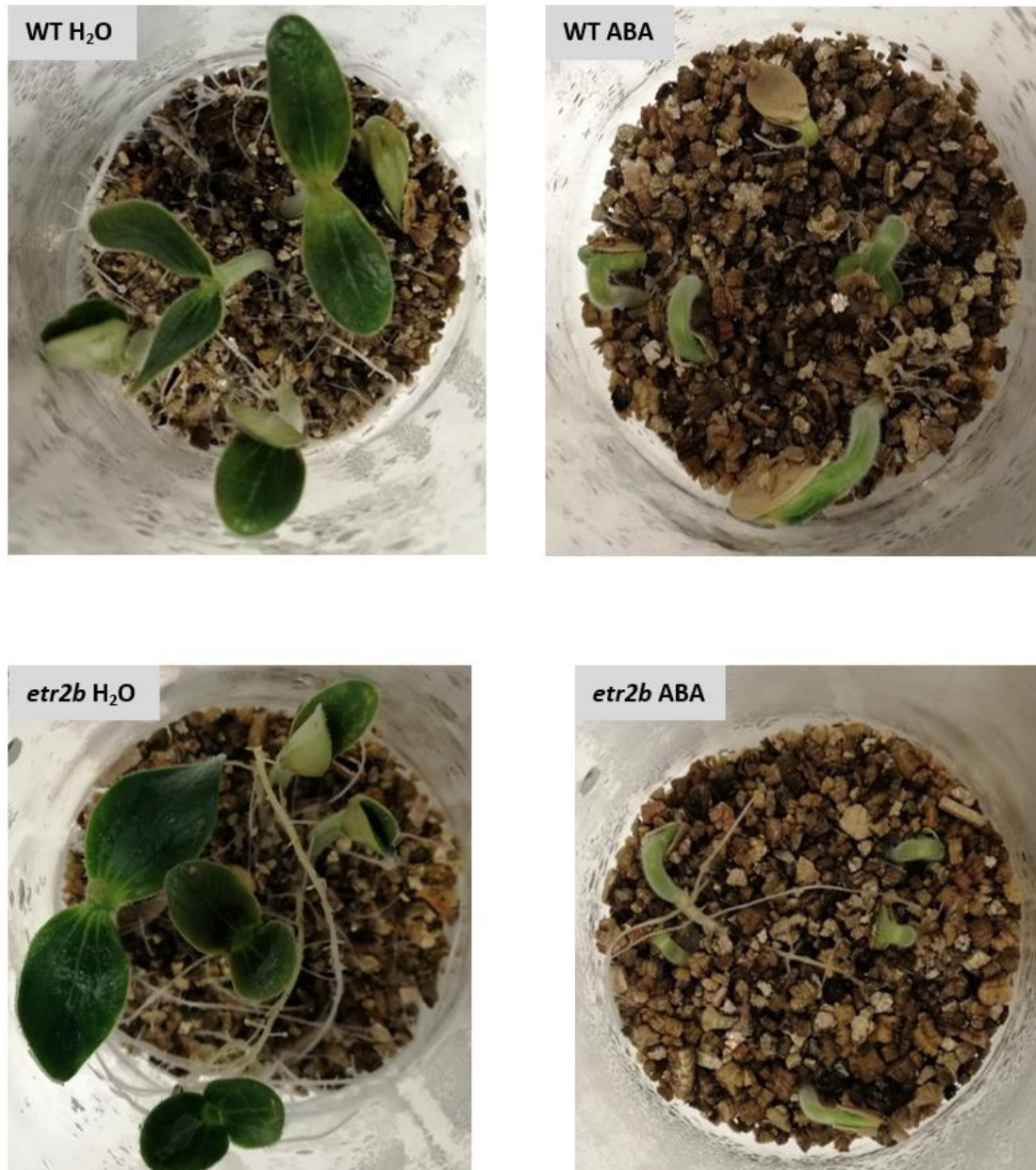


FIGURA 21. Apariencia de algunas de las plántulas en el momento que se evaluó el peso fresco para los genotipos WT y *etr2b*, en tratamiento control (H₂O) y ABA 100 μ M. Se puede ver como las plántulas mutantes *etr2b* presentan mayor raíz que las plantas WT.

El peso fresco de la biomasa total se muestra más o menos uniforme en todas las muestras, salvo en el caso del genotipo *etr2b* en tratamiento control que presentó significativamente mayor peso (fig. 22).

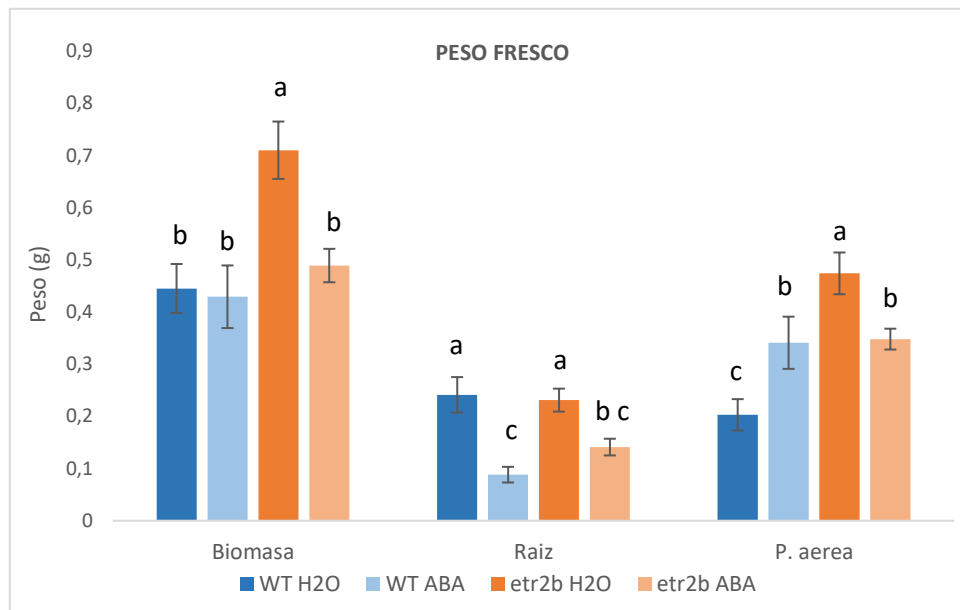


FIGURA 22. Representación del peso fresco de la biomasa, raíz y parte aérea de las plántulas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Si analizamos el peso de la raíz, podemos observar como el genotipo *etr2b* presenta un comportamiento similar tanto en tratamiento con ABA 100 μ M como en control (fig. 22). El genotipo *wild – type* si muestra diferencias entre los tratamientos, viéndose más afectado en tratamiento con ABA, como pudimos comprobar al analizar la longitud radicular.

En el caso de la parte aérea de la plántula, el resultado ha sido resaltante en el caso del genotipo WT en el que podemos ver que, aunque presenta menor raíz, su parte aérea presenta mayor peso (fig. 22) respecto al tratamiento control. El genotipo *etr2b* disminuye en este caso la parte aérea en el tratamiento ABA comparado con su control en agua, pero su peso es similar al del genotipo WT en agua (fig. 22).

Estudiamos el índice de sensibilidad al ABA de cada genotipo para estos tres parámetros (Tabla 4), y comprobamos que el genotipo *etr2b* muestra menor sensibilidad en el caso de la raíz como vimos en el apartado anterior (Tabla 2). La parte aérea del genotipo WT se muestra menos sensible al tratamiento con ABA, viéndose favorecida. En el caso de la biomasa global no encontramos diferencias en ambos genotipos.

TABLA 4. Comparación de la sensibilidad al ABA entre plantas WT y *etr2b* utilizando el % de reducción para la tasa de crecimiento en plántulas con tratamiento ABA respecto al agua. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

		Biomasa		Raíz		Parte aérea	
Genotipo	N	% reducción	Rango	% reducción	Rango	% reducción	Rango
WT	25	3,5 ^a	(-103)-99	63,4 ^b	(-10)-99	-82,5 ^a	(-252)-65
<i>etr2b</i>	29	31 ^a	(-20)-86	38,9 ^a	(-58)-96	26,4 ^b	(-20)-82

5. Conclusiones

PRIMERA: El receptor de etileno CpETR2b de *Cucurbita pepo* parece interactuar en la ruta de señalización del ABA durante la germinación favoreciendo la dormición de las semillas. Como consecuencia, el mutante deficiente en este receptor es menos sensible al ABA que el genotipo WT durante la germinación de la semilla.

SEGUNDA: El mutante *etr2b* de calabacín se ve favorecido respecto al genotipo WT durante el desarrollo radicular, aumentando su tasa de crecimiento. Los tratamientos con ABA indican que este mutante insensible a etileno *etr2b* es también más insensible a ABA para el desarrollo radicular.

TERCERA: La aplicación exógena de ABA afecta notablemente al crecimiento y vigor de las plántulas. El mutante insensible a etileno *etr2b* es más insensible a ABA en el desarrollo radicular, pero el ABA afectó por igual al crecimiento aéreo y a la biomasa total de plantas WT y mutantes.

6. Bibliografía

Bakshi, A., Piya, S., Fernandez, J., Chervin, C., Hewezi, T. & Brinder, B. (2018). Ethylene Receptors Signal via a Noncanonical Pathway to Regulate Abscisic Acid Responses. *Plant Physiology*. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01321>

Bove, J., Jullien, M. & Grappin, P. (2001). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3, reviews1002.1. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews1002>

Leung, J. & Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Plant Physiology*. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.199>.

Manz, B., Müller, K., Kucera, B., Volke, F. & Leubner-Metzger, G. (2005). Water Uptake and Distribution in Germinating Tobacco Seeds Investigated in Vivo by Nuclear Magnetic Resonance Imaging. *Plant physiology*. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.105.061663>.

Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., Hu, Y., You, J., Shi, H., Zhu, Y., Gong, Y., Mu, Z., Wang, H., Deng, X., Wang, P., Bressan, R. & Zhu, J. (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *PNAS*. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1522840113>.

Bakshi, A., Shemansky, J.M., Chang, C. & Binder, B. (2015) History of Research on the Plant Hormone Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*. DOI: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00344-015-9522-9>.

Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti F. & Giraudat J. (2000). Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.12.7.1103>.

Bhatla, S. & Lal, M. (2018). *Plant Physiology, Development and Metabolism*. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>.

Bisognin (2002). Origin and evolution of cultivated cucurbits. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000400028>.

Cheng, W., Chiang, M., Hwang, S. & Lin, P. (2009). Antagonism between abscisic acid and ethylene in Arabidopsis acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Molecular Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9509-7>.

Conforth, J., Milborrow, B., Ryback, G. & Wareing, P. (1965). Chemistry and Physiology of 'Dormins' In Sycamore: Identity of Sycamore 'Dormin' with Abscisin II. *Nature* 205. DOI: <https://doi.org/10.1038/2051269b0>.

Cutler, S., Rodriguez, P., Finkelstein R. & Abrams, S. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Plant Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>.

Finkelstein, R. and Rock C. (2002). Abscisic acid biosynthesis and response. DOI: <https://doi.org/10.1199/tab.0058>.

Fujii, H. and Zhu, J. (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *PNAS*. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0903144106>.

Matilla, A. (2013). Desarrollo y germinación de las semillas. En Azcón-Bieto, J. (Ed.) and Talón M. (Ed.), *Fundamentos de fisiología vegetal*. Editorial McGRAW-HILL.

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. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01049>.

García, A., Aguado, E., Martínez, C., Loska, D., Beltrán, S., Valenzuela J., Garrido, D. & Jamilena, M. (2020). The ethylene receptors CpETR1A and CpETR2B cooperate in the control of sex determination in Cucurbita pepo. *Journal of Experimental Botany*. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erz417>.

Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y. & McCourt, P. (2000). Regulation of Abscisic Acid Signaling by the Ethylene Response Pathway in Arabidopsis. *American Society of Plant Physiologists*. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.12.7.1117>.

González, L. & Orozco, A. (1996). Methods far seed germination data analysis. An example: Manfreda Brachystachya. *Botanical Sciences*. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1484>.

Hartung, W. (2010). The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. *Functional Plant Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1071/FP10058>.

Helander, J. & Cutler, S. (2018). Abscisic Acid Signaling and Biosynthesis: Protein Structures and Molecular Problems. *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_8.

Helander, J., Vaidya, A. & Cutler, S. (2016). Chemical manipulation of plant water use. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.11.010>.

Hussain, S., Gomes, M., Yano, K. & Nambara, E. (2019). Interactions between abscisic acid and other hormones. *Advances in Botanical Research*. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.001>.

Khandelwal, A., Cho, S., Marella, H., Sakata, Y., Perroud, P., Pan, A. & Quatrano, R. (2010). Role of ABA and ABI3 in Desiccation Tolerance. *Science*. DOI: 10.1126/science.1183672.

Chengzhen Liang, Yiqin Wang, Yana Zhu, Jiuyou Tang, Bin Hu, Linchuan Liu, Shujun Ou, Hongkai Wu, Xiaohong Sun, Jinfang Chu, & Chengcai Chu. (2014). OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence – associated genes in rice. *PNAS*. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1321568111>.

López – Molina L., Mongrand S. & Chua, N. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *PNAS*. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.081594298>.

Matilla, A. (2000). Ethylene in seed formation and germination. Cambridge University Press. DOI: <https://doi.org/10.1017/S096025850000012X>.

Matsui, A., Ishida J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki K. & Seki, M. (2008). Arabidopsis Transcriptome Analysis under Drought, Cold, High-Salinity and ABA Treatment Conditions using a Tiling Array. *Plant and Cell Physiology*. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn101>.

Scott A. M. McAdam, Timothy J. Brodribb, Jo Ann Banks, Rainer Hedrich, Nadia M. Atallah, Chao Cai, Michael A. Geringer, Christof Lind, David S. Nichols, Kye Stachowski, Dietmar Geiger, & Frances C. Sussmilch (2016). Abscisic acid controlled sex before transpiration in vascular plants. *PNAS*. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1606614113>.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. & Yang, S. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell Press Journal*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>.

Ohkuma, K., Lyon, J., Addicott, F. & Smith, O. (1963). Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science*. DOI: 10.1126/science.142.3599.1592.

Paris, H. (1989). Historical Records, Origins, and Development of the Edible Cultivar Groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02935916>.

Qiao, H., Shen, Z., Huang, S., Schmitz, R., Urich, M., Briggs, S. & Ecker, J. (2012). Processing and Subcellular Trafficking of ER-Tethered EIN2 Control Response to Ethylene Gas. *Science*. DOI: 10.1126/science.1225974.

Seo, M. & Marion – Poll, A. (2019). Abscisic acid metabolism and transport. *Advances in Botanical Research*. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.04.004>.

Schwartz, S. & Zeevaart, J. (2010). Abscisic Acid Biosynthesis and Metabolism. *Plant Hormones*. DOI: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2686-7_7.

Solano, R. & Ecker, J. (1998). Ethylene gas: perception, signaling and response. *Current Opinion in Plant Biology*. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80262-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80262-8).

Wenjian, L. Xiaoqiang H., Yumei, X., Jinlong, F., Yuanzhi, Z., Huizhe, L., Mingan, W. & Zhaohai, Q. (2013). Synthesis, photostability and bioactivity of 2,3-cyclopropanated abscisic acid. *Phytochemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.029>.

Wilson, R., Kim, H., Bakshi, A. & Binder, B. (2014). The Ethylene Receptors ETHYLENE RESPONSE1 and ETHYLENE RESPONSE2 Have Contrasting Roles in Seed Germination of *Arabidopsis* during Salt Stress. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.114.241695>.

Zhang, X., Zhang, X, Liu, X., Shao, X., Sun, H. & Chen, S. (2016). Improving Winter Wheat Performance by Foliar Spray of ABA and FA Under Water Deficit Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9509-6>.

Zhuolong Chan. (2012). Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. Genomics. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.06.004>.

Hakoshima, T. (2018). Overview of Proteins in Plant Hormone Signaling. Plant Structural Biology: Hormonal Regulations. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_1.

Finkelstein, R., Gampala, S. & Rock, C. (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. The Plant Cell. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.010441>.