

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA EL  
DESARROLLO DE UNA COLECCIÓN DE  
MUTANTES EN CALABACÍN**  
*(Cucurbita pepo)*

**Universidad de Almería  
Escuela Politécnica Superior  
Ingeniero Agrónomo**

Isabel M<sup>a</sup> Andrés Ruiz

Enero, 2012

**Directores**

Manuel Jamilena Quesada

Susana Manzano Medina

AUTORIZACIÓN MANUEL

AUTORIZACIÓN SECRETARÍA

## ÍNDICE GENERAL

1.- INTERÉS Y OBJETIVOS .....	11
1.1.- Importancia del Cultivo de Calabacín.....	12
1.2.- Interés del proyecto .....	16
1.3.- Objetivos del Proyecto .....	16
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.- Características de la Especie <i>Cucurbita pepo</i> .....	19
2.1.1.- Origen y utilización del calabacín.....	19
2.1.2.- Clasificación taxonómica .....	20
2.1.3.- Descripción morfológica .....	21
2.1.4.- Principales tipologías de <i>Cucurbita pepo</i> .....	22
2.1.5.- Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de calabacín .....	27
2.1.5.1.- Temperatura.....	27
2.1.5.2.- Humedad.....	28
2.1.5.3.- Luminosidad .....	29
2.1.5.4.- Suelo .....	29
2.2.- Colección de Mutantes .....	29
2.2.1.- Introducción.....	29
2.2.2.- Utilidad de las mutaciones y las colecciones de mutantes .....	31
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
3.1.- Ensayos Realizados y Localización .....	36
3.1.1.- Ensayo 1 .....	36
3.1.2.- Ensayo 2 .....	36
3.2.- Instalaciones.....	37
3.3.- Material Vegetal.....	37
3.4.- Manejo del Cultivo.....	38
3.4.1.- Siembra y plantación .....	38
3.4.2.- Labores culturales .....	38
3.5.- Diseño Experimental.....	38

3.5.1.- Ensayo 1 .....	39
3.5.1.1.- Caracterización y desarrollo experimental .....	39
3.5.1.2.- Toma de datos.....	40
3.5.2.- Ensayo 2 .....	42
3.5.2.1.- Caracterización y desarrollo experimental en laboratorio.	42
3.5.2.2.- Toma de datos en laboratorio .....	43
3.5.2.3.- Desarrollo experimental en campo.....	43
3.5.2.4.- Parámetros medidos en invernadero.....	48
3.6.- Tratamiento Estadístico.....	50
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
4.1.- Efecto de los Tratamientos con EMS sobre el Crecimiento Vegetativo de las Plántulas en Semillero .....	52
4.1.1.- Efecto del tratamiento con EMS sobre la germinación .....	52
4.1.1.1.- Ensayo 1 .....	52
4.1.1.2.- Ensayo 2 .....	54
4.1.2.- Efecto del tratamiento con EMS sobre la longitud del hipocotilo.....	57
4.1.2.1.- Ensayo 1 .....	57
4.1.2.2.- Ensayo 2 .....	59
4.1.3.- Efecto del tratamiento con EMS sobre el grosor del hipocotilo.....	62
4.1.3.1.- Ensayo 1 .....	62
4.1.3.2.- Ensayo 2 .....	64
4.1.4.- Efecto del tratamiento con EMS sobre el número de hojas.....	64
4.1.4.1.- Ensayo 1 .....	65
4.1.4.2.- Ensayo 2 .....	65
4.1.5.- Efecto del tratamiento con EMS sobre el peso fresco de la plántula..	67
4.1.6.- Efecto del tratamiento con EMS sobre la concentración de clorofila en plántulas.....	68
4.2.- Efecto de los Tratamientos con EMS sobre las Plantas Adultas de Calabacín.....	70
4.2.1.- Efecto del tratamiento con EMS sobre el porte de la planta .....	71
4.2.2.- Efecto del tratamiento con EMS sobre la expresión sexual .....	73

4.2.3.- Efecto del tratamiento con EMS sobre el desarrollo floral .....	77
4.2.4.- Efecto del tratamiento con EMS sobre la clorofila en plantas de calabacín .....	82
4.2.5.- Efecto del tratamiento con EMS sobre la morfología de las hojas ..	85
4.2.6.- Efecto del tratamiento con EMS sobre el cuajado de los frutos en calabacín .....	89
4.2.7.- Efecto del tratamiento con EMS sobre la fertilidad en calabacín ....	90
5.- CONCLUSIONES .....	93
6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Evolución de la superficie cultivada de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.....	12
<b>Figura 2.-</b> Evolución de la producción de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.....	12
<b>Figura 3.-</b> Evolución del valor económico de la producción de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.....	13
<b>Figura 4.-</b> Evolución de la producción y exportación de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.....	13
<b>Figura 5.-</b> Distribución de la producción de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.....	14
<b>Figura 6.-</b> Distribución de la producción de calabacín en Andalucía. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.....	14
<b>Figura 7.-</b> Distribución de la producción y del valor económico de las hortalizas producidas en Almería durante la campaña 2.009-2.010. Fuente: Anuario de Agricultura de la Provincia de Almería. 2.010. Fundación Cajamar.....	15
<b>Figura 8.-</b> Distribución de la exportación del calabacín producido en Almería. Campaña 2.009-2.010. Fuente: Anuario de Agricultura de la Provincia de Almería. 2.010. Fundación Cajamar.....	15
<b>Figura 9.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>pepo</i> . Morfotipo <i>Pumpkin</i> .....	24
<b>Figura 10.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>pepo</i> . Morfotipo <i>Marrow</i> .....	24
<b>Figura 11.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>pepo</i> . Morfotipo. <i>Zucchini</i> .....	25
<b>Figura 12.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>pepo</i> . Morfotipo <i>Cocozelle</i> .....	25
<b>Figura 13.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>texana</i> . Morfotipo <i>Scallop</i> .....	26
<b>Figura 14.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>texana</i> . Morfotipo <i>Acorn</i> .....	26
<b>Figura 15.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>texana</i> . Morfotipo <i>Crookneck</i> .....	26
<b>Figura 16.-</b> <i>Cucurbita pepo</i> subespecie <i>texana</i> . Morfotipo <i>Straightneck</i> .....	27
<b>Figura 17.-</b> Efecto del EMS sobre el ADN en las Células. Alteración en la replicación.....	31
<b>Figura 18.-</b> Proceso para desarrollar una colección de mutantes .....	32
<b>Figura 19.-</b> Invernadero en el que se realizó el ensayo situado en la Finca Experimental de la Fundación UAL-ANECOOP.....	37

<b>Figura 20.-</b> Calibre electrónico de lectura digital.....	41
<b>Figura 21.-</b> Bandeja correspondiente a una concentración del 1,5 % EMS a los ocho días desde la siembra .....	43
<b>Figura 22.-</b> Distribución de las plántulas en el invernadero.....	46
<b>Figura 23.-</b> Proceso de limpieza y conservación de las semillas .....	47
<b>Figura 24.-</b> Diferencia en el desarrollo vegetativo de las plantas en el invernadero. Control a la derecha, tratamiento a la izquierda.....	48
<b>Figura 25.-</b> Hojas con alteraciones en el color y forma. Concentración 1,5 % EMS .....	49
<b>Figura 26.-</b> Hojas con alteraciones en el color y en la forma. Concentración 2 % EMS.....	50
<b>Figura 27.-</b> Porcentajes medios de germinación de semillas tratadas con distintas concentraciones de EMS durante 12 y 24 horas.....	53
<b>Figura 28.-</b> Porcentaje medio de germinación de semillas expuestas 24 horas a diferentes concentraciones de EMS .....	54
<b>Figura 29.-</b> Comparación de la germinación de semillas de calabacín a los 14 días de la siembra. A) semillas testigo sin tratar. B) semillas tratadas con 1,5 % EMS durante 24 horas. C) semillas tratadas con 2 % EMS durante 24 horas .....	55
<b>Figura 30.-</b> Porcentaje medio de germinación de semillas expuestas 24 horas a diferentes concentraciones de EMS .....	56
<b>Figura 31.-</b> Longitud media del hipocotilo en el tratamiento de 12 y 24 horas a diferentes concentraciones de EMS .....	58
<b>Figura 32.-</b> Frecuencia en la que aparecen los diferentes grupos de longitudes de hipocotilo en cada una de las concentraciones estudiadas para un tiempo de exposición de 12 y 24 horas. 12 días desde siembra .....	59
<b>Figura 33.-</b> Longitud media del hipocotilo en plántulas de calabacín cuyas semillas han sido tratadas con EMS al 1,5 y 2 % durante 24 horas .....	60
<b>Figura 34.-</b> Diferencia de longitudes entre plántulas control (izquierda) y plántulas cuyas semillas se trataron durante 24 horas con una disolución de EMS al 1,5 % (derecha). Las plántulas se fotografiaron 14 días después de la siembra .....	60
<b>Figura 35.-</b> Frecuencia en la que aparecen los diferentes grupos de longitudes de hipocotilo en cada una de las concentraciones estudiadas para un tiempo de exposición de 24 horas. Medidas tomadas 14 días después de la siembra .....	61
<b>Figura 36.-</b> Grosor medio del hipocotilo en plántulas de calabacín cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de EMS durante 12 y 24 horas. ....	63
<b>Figura 37.-</b> Grosor medio del hipocotilo en plantas de calabacín cuyas semillas han sido tratadas con EMS 1,5 y 2 % durante 24 horas.....	64

<b>Figura 38.-</b> Plántula correspondiente al Ensayo 1 cuya semilla se expuso durante 24 horas a una disolución de EMS al 0,3 % .....	65
<b>Figura 39.-</b> Efecto de los tratamientos con EMS sobre el número de hojas por plántula. ....	66
<b>Figura 40.-</b> Efecto de los tratamientos con 1,5 % y 2 % EMS sobre el número de hojas por plántula .....	67
<b>Figura 41.-</b> Peso medio de las plántulas para las diferentes concentraciones de EMS con las que se han tratado las semillas .....	68
<b>Figura 42.-</b> Comparación de la concentración de clorofila en los cotiledones de las plantas control y plantas cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de EMS. Las medidas se tomaron a los 12 días desde la siembra. ....	69
<b>Figura 43.-</b> Comparación de la concentración de clorofila en los cotiledones de plantas control y plantas cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de EMS. Las medidas se realizaron a los 12 días desde la siembra. ....	69
<b>Figura 44.-</b> Plántula correspondiente al Ensayo 1 cuya semilla se expuso durante 24 horas a una disolución de EMS al 0,3 % .....	70
<b>Figura 45.-</b> Efecto del tratamiento con EMS sobre el vigor de las plantas en invernadero. Las plantas se fenotiparon en 6 grupos de acuerdo con su vigor.....	71
<b>Figura 46.-</b> A) Lineos del tratamiento control con un crecimiento homogéneo de las plantas B) Detalle de una planta del tratamiento control. C) Plantas más desarrolladas pertenecientes al tratamiento del 1,5 %. D) Plantas menos desarrolladas pertenecientes al tratamiento del 1,5 %. E) y F) Detalle de dos plantas derivadas de semillas tratadas con 2 % EMS.....	72
<b>Figura 47.-</b> Detalle de una planta ciega correspondiente al tratamiento del 2 % EMS.....	73
<b>Figura 48.-</b> Efecto de los tratamientos con EMS sobre el número medio de flores masculinas hasta dar la primera flor femenina.....	74
<b>Figura 49.-</b> Efecto de los tratamientos con EMS sobre el número medio de flores femeninas en los veinte primeros nudos de la planta .....	74
<b>Figura 50.-</b> Comparativa de la distribución de flores femeninas y masculinas en plantas de calabacín control y plantas de semillas tratadas con 1,5 % y 2 % EMS .....	76
<b>Figura 51.-</b> Distribución de flores femeninas y masculinas a lo largo del desarrollo de las plantas de calabacín. Se comparan las plantas control con aquellas derivadas de semillas tratadas con EMS al 1,5 % y 2 %.....	76
<b>Figura 52.-</b> Efecto de los tratamientos con EMS sobre el desarrollo de la flor masculina de calabacín. A) A la izquierda flor con un tamaño normal procedente del control y a la derecha flor de un tamaño inferior procedente de una planta tratada con EMS. B) Estambre sin polen de	



una flor tratada con EMS. C) Flor de calabacín con una corola mal formada, los pétalos no se han podido separar y la flor permanece casi cerrada. D) Estambre con polen, unido a la corola de la flor .....	78
<b>Figura 53.-</b> Efecto de los tratamientos con EMS sobre el desarrollo de los pétalos y la corola de las flores femeninas .....	79
<b>Figura 54.-</b> Efecto de los tratamientos con EMS sobre el desarrollo del estilo y el estigma en las flores femeninas de calabacín .....	81
<b>Figura 55.-</b> Concentración media de clorofilas en el ensayo 2 (24 horas de exposición y concentraciones del 1,5 y 2 % EMS). .....	82
<b>Figura 56.-</b> Hojas de calabacín con diferentes alteraciones en su coloración. Todas pertenecen a plantas procedentes de semillas tratadas con una concentración de EMS del 1,5 % .....	83
<b>Figura 57.-</b> Hojas de calabacín con diferentes alteraciones en su coloración. Todas pertenecen a plantas procedentes de semillas tratadas con una concentración de EMS del 2 % .....	84
<b>Figura 58.-</b> Comparación del porcentaje de plantas con anomalías en el color de alguna de sus hojas en los tratamientos con diferentes concentraciones de EMS. ....	85
<b>Figura 59.-</b> Efecto de los tratamientos con EMS sobre la morfología de las hojas de calabacín. Datos tomados 31 - 40 días después del transplante .....	86
<b>Figura 60.-</b> Hojas con alteraciones morfológicas en plantas cuyas semillas han sido tratadas con una concentración de EMS del 1,5 % .....	87
<b>Figura 61.-</b> Hojas con alteraciones morfológicas en plantas cuyas semillas han sido tratadas con una concentración de EMS del 2 % .....	88
<b>Figura 62.-</b> Efecto del EMS sobre el cuajado de frutos .....	89
<b>Figura 63.-</b> Porcentaje de frutos con semillas viables y porcentaje de frutos con todas las semillas vacías, entre plantas control y aquellas tratadas con 1,5 % y 2 % de EMS .....	90
<b>Figura 64.-</b> Número medio de semillas viables y semillas vacías en los frutos con semillas viables de plantas control y tratadas con EMS al 1,5 y al 2 % .....	91
<b>Figura 65.-</b> Porcentaje medio de semillas viables y vacías en los frutos en los que había semillas viables .....	92

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Distribución de las variedades locales de <i>Cucurbita pepo</i> recogidas por el COMAV .....	23
<b>Tabla 2.-</b> Número de semillas sembradas en cada una de las bandejas según la concentración y tiempo de exposición a EMS.....	40
<b>Tabla 3.-</b> Distribución de las plántulas control en el invernadero.....	44
<b>Tabla 4.-</b> Distribución de las plántulas del tratamiento 1 (concentración 1,5 %) en el invernadero .....	45
<b>Tabla 5.-</b> Distribución de las plántulas del tratamiento 2 (concentración 2 %) en el invernadero .....	45

# **INTERÉS Y OBJETIVOS**

### 1.1.- IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CALABACÍN.-

Según el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino el calabacín es una de las hortalizas que, durante los últimos veinte años, ha visto aumentar de forma muy significativa la superficie dedicada a su cultivo en España, incrementándose en más de un 139 %, tal y como se muestra en la Figura 1.

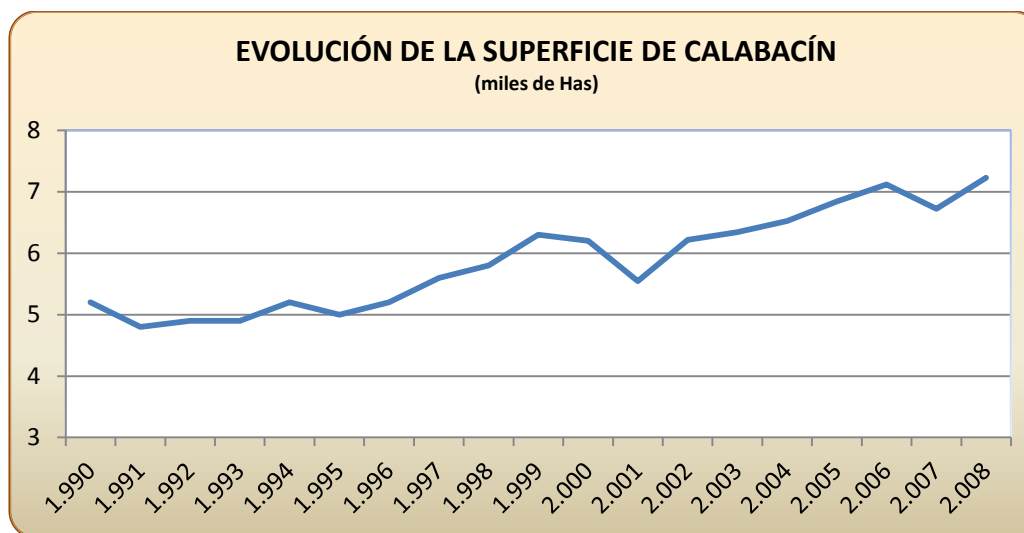


Figura 1.- Evolución de la superficie cultivada de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.

La producción, durante este mismo periodo, se ha visto aumentada un 169 % pero, el verdadero incremento en la importancia de este cultivo viene dado por el aumento en más del 300 % del valor económico de la producción (Figuras 2 y 3).

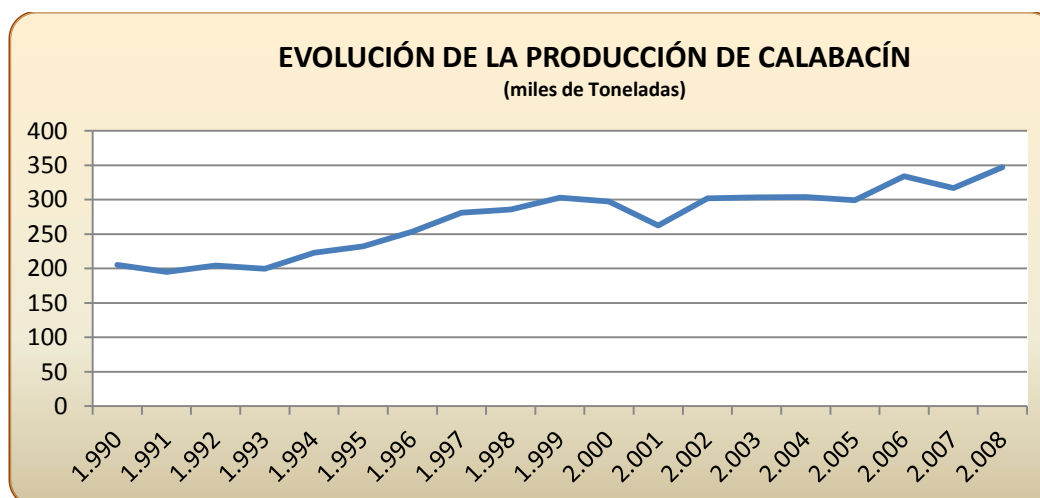


Figura 2.- Evolución de la producción de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.

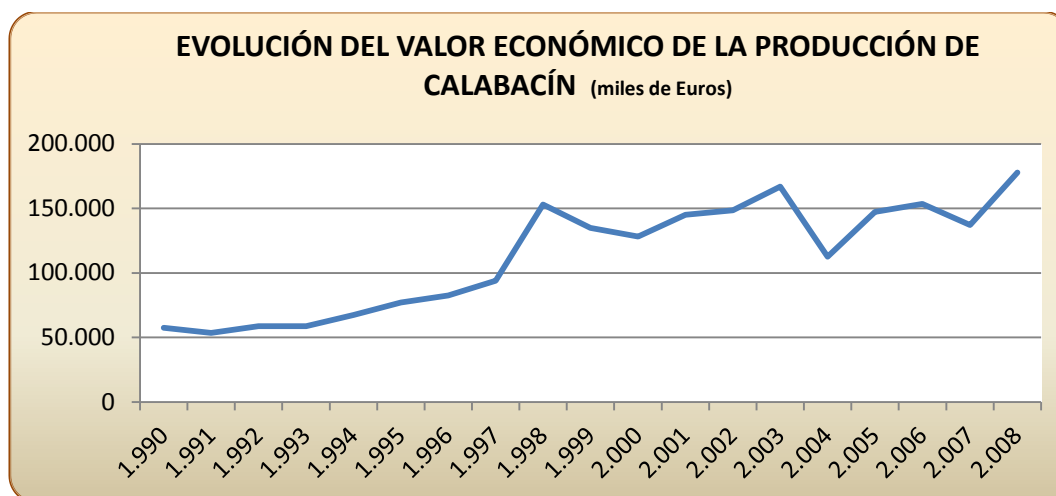


Figura 3.- Evolución del valor económico de la producción de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.

Cuando se analiza el valor económico de la producción de cualquier hortaliza es necesario tener en cuenta el papel fundamental que supone la exportación, ya que al consumo interno le resultaría imposible asumir un crecimiento en la producción tan importante. En la Figura 4 puede verse claramente como el incremento en la producción de calabacín ha ido de la mano del aumento en las exportaciones, habiendo llegado a vender en el mercado exterior más de 225.0000 toneladas en el año 2008.

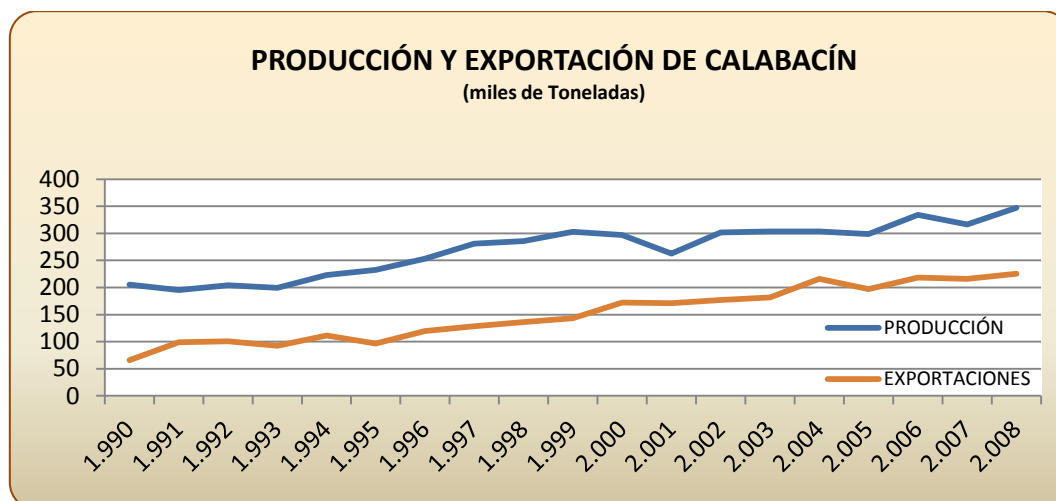


Figura 4.- Evolución de la producción y exportación de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.

Al profundizar en la distribución de la producción de calabacín dentro del territorio nacional, se puede ver como el peso de la misma recae en Andalucía, que con un 75 % de esa

producción nacional se situaba, en el año 2.008, a la cabeza de todas las comunidades autónomas en lo que a producción se refiere (Figura 5).

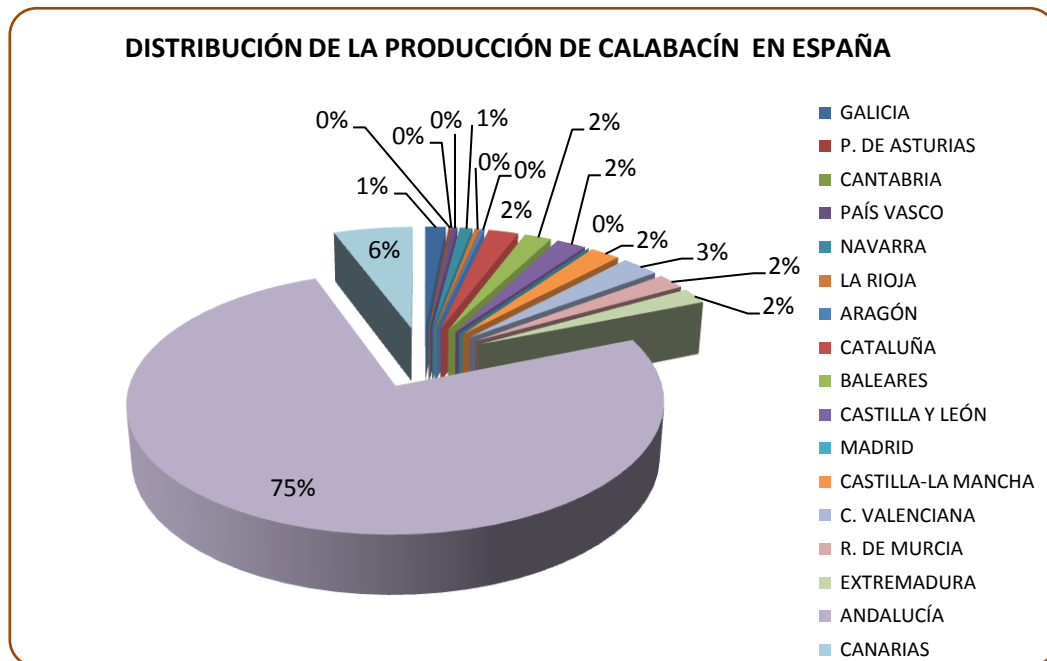


Figura 5.- Distribución de la producción de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.

Tal y como puede verse en la Figura 6, la distribución de la producción de calabacín no es homogénea en todas las provincias de Andalucía, siendo Almería la que asume el liderazgo con el 83 % de la producción andaluza.

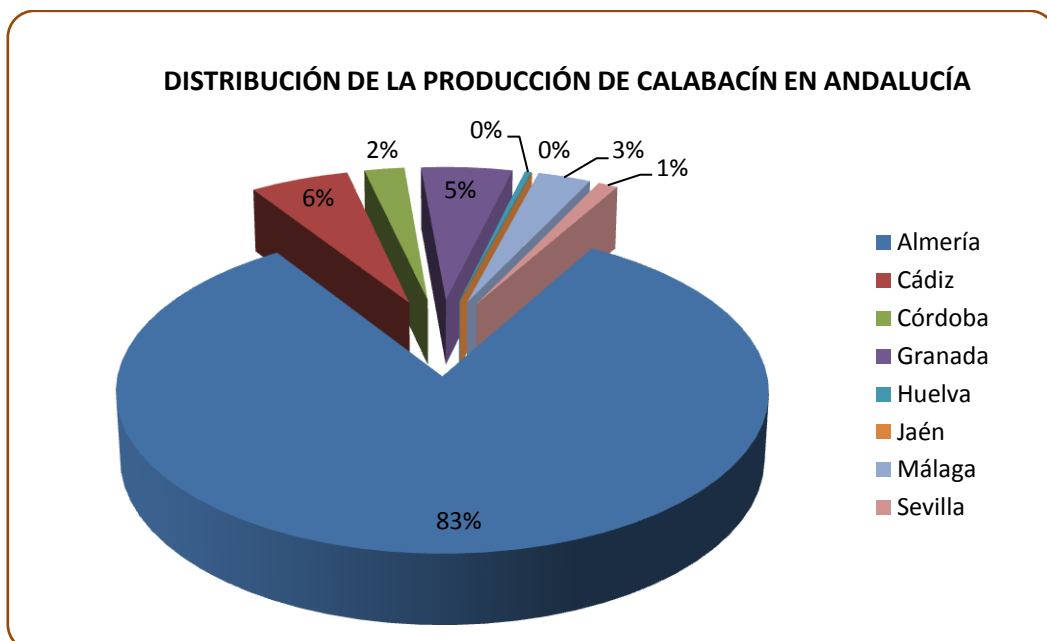


Figura 6.- Distribución de la producción de calabacín en Andalucía. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2.009.

Según el Anuario de Agricultura de la Provincia de Almería del año 2.010 la producción de calabacín en la provincia de Almería supuso casi el 11 % del total de hortalizas producidas (Figura 7). Siendo, además, con más del 12 % del valor económico de todas las hortalizas producidas en la provincia, la tercera hortaliza en importancia después del tomate y el pimiento.

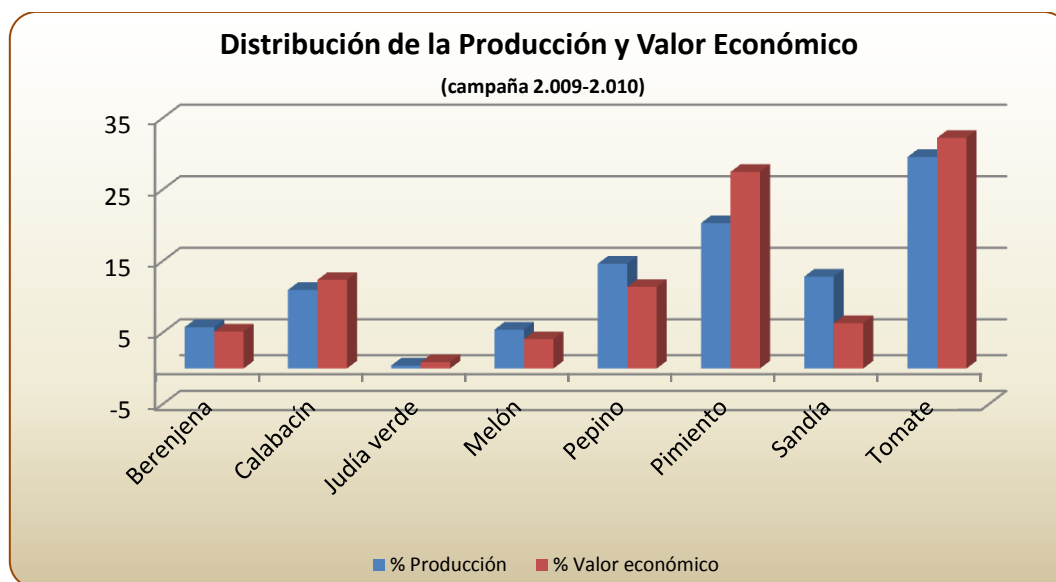


Figura 7.- Distribución de la producción y del valor económico de las hortalizas producidas en Almería durante la campaña 2.009-2.010. Fuente: Anuario de Agricultura de la Provincia de Almería. 2.010. Fundación Cajamar.

En la Figura 8 se pueden ver cuáles han sido los principales países destinatarios de la exportación de la producción almeriense de calabacín.

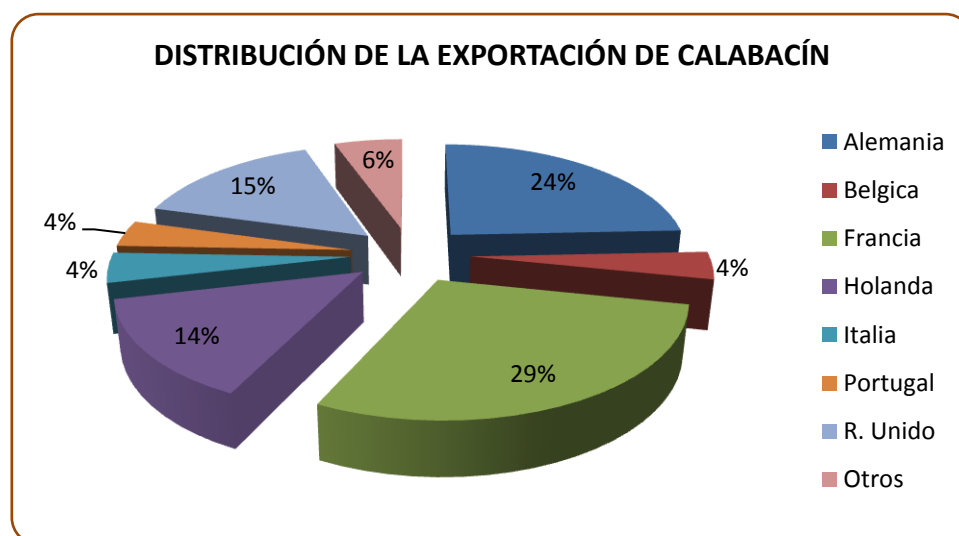


Figura 8.- Distribución de la exportación del calabacín producido en Almería. Campaña 2.009-2.010. Fuente: Anuario de Agricultura de la Provincia de Almería. 2.010. Fundación Cajamar.

A la vista de todos los datos anteriores puede afirmarse que el cultivo del calabacín ha incrementado tanto la superficie de producción como el valor económico que supone esa producción, en la provincia de Almería, y en toda España, teniendo en cuenta el considerable aumento que se ha producido en las exportaciones hasta el momento, así como el previsible incremento de las mismas que tendrá lugar cuando países de economías emergentes como Rumania, Hungría, Polonia...etc. aumenten el flujo comercial con España, resulta necesario profundizar en el estudio genético del calabacín (*Cucurbita pepo*), de manera que permita adecuar la demanda en cuanto a cantidad, calidad, temporalidad,...etc. que el mercado exterior va a solicitar, a la oferta que, desde los centros productores, van a ofrecer en cada momento.

### **1.2.- INTERÉS DEL PROYECTO.-**

A pesar del incremento en la importancia económica del cultivo de calabacín en los últimos años, tanto a nivel nacional como local, éste no se ha visto acompañado de un aumento en el desarrollo de nuevas variedades, tal y como ha ocurrido con otros cultivos hortícolas como el tomate o el pimiento.

El desarrollo de nuevas variedades de calabacín depende, en gran medida, del estudio genético de esta especie, identificando y aislando genes de interés agronómico y determinando las funciones de esos genes en los diferentes procesos fisiológicos y de desarrollo de la especie.

La obtención de una colección de mutantes en calabacín supone el primer paso para realizar estudios de genómica funcional en *Cucurbita pepo*. Los mutantes no solo serán de utilidad para asignar funciones a los genes de esta especie, sino además podrían utilizarse directamente como fuentes de caracteres agronómicos de utilidad para los programas de mejora genética de calabacín.

### **1.3.- OBJETIVOS DEL PROYECTO.-**

El principal objetivo de este proyecto es estudiar el efecto fenotípico de diferentes tratamientos con el mutágeno etil metanosulfonato (EMS) sobre semillas de calabacín,



identificando el tratamiento más adecuado para generar una colección de mutantes que sirva de base para el desarrollo de futuros programas de mejora genética en esta hortaliza.

Los objetivos específicos que se han planteado en este proyecto son los siguientes:

1. Estudiar el efecto sobre la germinación de las semillas de calabacín de diferentes tratamientos con EMS, definidos estos últimos por distintas concentraciones y tiempos de exposición.
2. Estudiar el efecto de distintos tratamientos con EMS sobre el desarrollo vegetativo de las plántulas de calabacín.
3. Identificar las posibles alteraciones morfológicas en plantas adultas, flores y frutos.
4. Autofecundación de las plantas M1 obtenidas a partir de las semillas sometidas a diferentes tratamientos con EMS y obtención de las consiguientes familias M2. Esto permitirá, además, determinar el efecto de los mencionados tratamientos sobre la fertilidad de las plantas, carácter fundamental para mantener a lo largo de las generaciones las mutaciones que se produzcan.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antes de profundizar en el desarrollo de este proyecto es indispensable hacer una revisión bibliográfica que acerque al lector al cultivo del calabacín y a las características propias del mismo. De la misma manera es necesario, tanto contextualizar el proyecto dentro de los estudios de investigación que se están llevando a cabo en otros centros, nacionales o internacionales, como aproximar la metodología de trabajo utilizada en los mismos, de manera que se pueda situar este trabajo en el conjunto de estudios genéticos que se están desarrollando actualmente en este sector.

## **2.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE *CUCURBITA PEPO*.-**

### **2.1.1.- Origen y utilización del calabacín.-**

La especie *Cucurbita pepo* parece tener su origen en América, concretamente en zonas próximas a México, donde se han encontrado rastros con una antigüedad superior a los 10.000 años A.C. En Estados Unidos los restos más antiguos hallados datan del año 4.000 A.C. Son muchos los que apuntan a que pudo ser domesticada a la vez en México y Estados Unidos, teniendo a *Cucurbita fraterna* y *Cucurbita texana* como antepasados silvestres respectivamente.

El principal uso del calabacín es el gastronómico, siendo su fruto inmaduro la parte más utilizada en la cocina, aunque su flor y sus semillas son cada día más valoradas como aderezo culinario.

El calabacín está compuesto por un gran número de aminoácidos, entre los que destacan la alanina, arginina, glicina, lisina y cisteína, responsables de las numerosas propiedades medicinales de este producto, algunas de esas propiedades son:

- Propiedades vermífugas, para lo que es necesario consumir el interior del fruto.
- Propiedades antipiréticas, diuréticas y antiespasmódicas, para lo que es necesario tomar infusiones de sus hojas.
- Mejora el sistema inmunológico (folatos).
- Tratamiento de quemaduras y anomalías en la piel para lo que se usa el fruto de manera externa.

Otro de los actuales usos del calabacín, según la Asociación Española de Acuarófilos es como alimento para una serie de especies de peces que necesitan una dieta vegetal, como los Ancistrus.

El calabacín es rico en niacina (vitamina A) y tiamina (vitamina B) pero sobre todo hay que mencionar la abundancia de ácidos entre sus componentes, sobre todo linoleico, aspártico y salicílico y que están abriendo una puerta a nuevos usos de esta especie.

### **2.1.2.- Clasificación taxonómica.-**

De manera esquemática puede resumirse la clasificación taxonómica del calabacín de la siguiente forma:

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Tracheobionta

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Dilleniidae

**Orden:** Cucurbitales

**Familia:** Cucurbitaceae

**Subfamilia:** Cucurbitoidae

**Tribu:** Cucurbiteae

**Género:** *Cucurbita*

**Especie:** *Cucurbita pepo*

### **2.1.3.- Descripción morfológica.-**

El calabacín es una planta anual, rastrera y de crecimiento indeterminado cuyas principales características morfológicas son:

#### **Raíz**

La planta de calabacín presenta una raíz axonomorfa, con una raíz principal que alcanza un gran desarrollo si se compara con las raíces secundarias que la acompañan, el desarrollo de estas últimas en el suelo está determinado por el tipo de cultivo y el aporte de agua y nutrientes que se realice.

Si el tallo entra en contacto con tierra húmeda puede desarrollar raíces adventicias en los entrenudos de los tallos.

#### **Tallo**

La planta de calabacín presenta dominancia apical, con un tallo principal con atrofia de brotaciones secundarias en la mayoría de las ocasiones. Tiene forma cilíndrica, es áspero al tacto debido a la superficie pelosa que tiene y es bastante consistente. Los entrenudos son, en general, cortos y desde ellos parten las hojas, las flores y los frutos. Debido al porte rastrero, y en función del tipo de cultivo que se esté realizando, se aconseja la realización del entutorado con el fin de optimizar el rendimiento de la cosecha tanto en cantidad como en calidad.

#### **Hojas**

El calabacín presenta grandes hojas palmeadas de color verde que parten directamente del tallo a través del peciolo de manera helicoidal y alterna. El limbo presenta una cara superior suave al tacto y cara inferior muy áspera, con pelos cortos y fuertes. El borde de la hoja es dentado y presenta cinco lóbulos.

El peciolo es largo, hueco y consistente, tiene pelos rígidos en la superficie por lo que es muy áspero al tacto.

### **Flores**

El calabacín es una planta monoica al presentar flores masculinas y femeninas en el mismo pie. Sus flores son grandes, de color amarillo intenso y con forma acampanada. Se disponen alrededor del tallo al que se unen a través de un largo pedúnculo, ya que nacen en las axilas de las hojas.

En los primeros estadios de desarrollo de la planta la mayoría de las flores son masculinas, con el paso de los días van apareciendo las flores femeninas, hasta que estas últimas acaban siendo mayoritarias en la última fase del ciclo productivo.

La apertura de la flor se produce en las primeras horas de la mañana y solo se mantiene viable varias horas, para realizar la fecundación es necesaria la intervención de colmenas, por lo que se produce una polinización cruzada.

### **Frutos**

El calabacín es un fruto carnoso, cilíndrico, alargado y sin cavidad central. En general es de color verde.

La recolección para su comercialización se lleva a cabo cuando el fruto aun esta inmaduro, atendiendo a los requerimientos del mercado en lo que a calidad se refiere, ya que el fruto maduro no tienen las características organolépticas demandadas para su comercialización: dureza, sabor, aparición de semillas...etc.

#### **2.1.4.- Principales tipologías de *Cucurbita pepo*.-**

Cuando la especie *Cucurbita pepo* llegó a Europa sufrió una importante diversificación tanto en los jardines botánicos como en los campos de cultivo, y se llevaron a cabo diferentes cruzamientos y procesos de selección, todo ello ha dado lugar a un amplio conjunto de variedades locales muy diferentes. (Ferriol, et al., 2.003).

En la actualidad *Cucurbita pepo* es considerada la especie del género *Cucurbita* con más variabilidad. El Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia (COMAV) ha recogido durante años esta diversidad y tiene una colección con más de 400 entradas, de la que 340 son variedades locales españolas.

<b>DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIEDADES LOCALES POR COMUNIDADES AUTÓNOMAS</b>	
<b>Andalucía</b>	36
<b>Aragón</b>	14
<b>Asturias</b>	22
<b>Islas Baleares</b>	6
<b>Islas Canarias</b>	78
<b>Castilla la Mancha</b>	38
<b>Castilla León</b>	5
<b>Cataluña</b>	33
<b>Extremadura</b>	13
<b>Murcia</b>	5
<b>Comunidad Valenciana</b>	7
<b>Otras</b>	83

Tabla 1.- Distribución de las variedades locales de *Cucurbita pepo* recogidas por el COMAV.

Esa variabilidad se pone de manifiesto, sobre todo, en las diferencias en cuanto a tamaño y color del fruto, donde se pueden encontrar frutos verdes, amarillos naranjas, blancos,...etc.; en el color de la pulpa, que puede ser blanca o naranja, y en cuanto a la forma, pudiendo encontrar frutos alargados, redondos, ovales, etc.

Dentro de la especie *Cucurbita pepo* se incluyen tres subespecies: *fraterna*, *pepo* y *texana*.

### ***Cucurbita pepo* subespecie *fraterna***

Es la única tipología que sólo incluye variedades silvestres por lo que a pesar de su interés en lo que a variabilidad genética se refiere en este trabajo no se van a describir sus

morfortipos.

### ***Cucurbita pepo* subespecie *pepo***

Esta subespecie la componen números morfortipos ornamentales y cuatro de uso alimentario:

- ***Pumpkin***: Es cultivado por sus frutos y por sus semillas, y se consume en estado maduro (Figura 9).



Figura 9.- *Cucurbita pepo* subespecie *pepo*. Morfortipo *Pumpkin*.

- ***Vegetable Marrow***: Cultivado por sus frutos inmaduros, es muy común en Oriente Medio y en el norte de África (Figura 10).



Figura 10.- *Cucurbita pepo* subespecie *pepo*. Morfortipo *Marrow*.

- ***Zucchini***: Cultivado por sus frutos inmaduros y consumidos como hortaliza se



corresponde con el calabacín que se consume habitualmente, y es el morfotipo de mayor importancia económica (Figura 11).

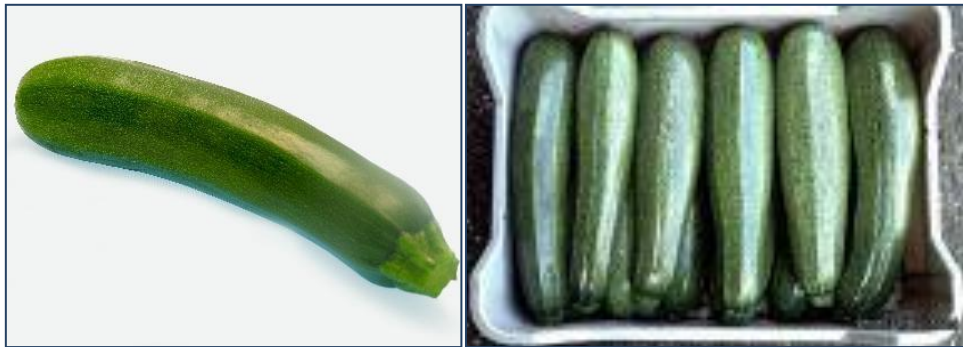


Figura 11.- *Cucurbita pepo* subespecie *pepo*. Morfotipo. *Zucchini*.

- ***Cocozelle***: Son consumidos también como hortaliza sus frutos inmaduros (Figura 12).



Figura 12.- *Cucurbita pepo* subespecie *pepo*. Morfotipo *Cocozelle*.

### ***Cucurbita pepo* subespecie *texana***

Al igual que la subespecie *pepo* cuenta con varios morfotipos ornamentales y con cuatro de utilidad culinaria, diferentes todos ellos en la forma y el tamaño de sus frutos:

- ***Scallop***: Sus frutos se consumen cuando aún no han alcanzado la madurez, tienen forma discoidal y actualmente son más apreciados los frutos de color amarillo en detrimento de los verdes y blancos (Figura 13).



Figura 13.- *Cucurbita pepo* subespecie *texana*. Morfotipo *Scallop*.

- **Acorn:** Sus frutos se consumen cuando han alcanzado la madurez, unos 40 días después de la antesis. Sus frutos son ovoides o cónicos y presentan diez surcos muy pronunciados (Figura 14).



Figura 14.- *Cucurbita pepo* subespecie *texana*. Morfotipo *Acorn*.

- **Crookneck:** Sus frutos son alargados y tienen un cuello muy largo y curvado. Se consumen antes de llegar a la madurez (Figura 15).



Figura 15.- *Cucurbita pepo* subespecie *texana*. Morfotipo *Crookneck*.

- ***Straighneck***: Sus frutos se consumen inmaduros, son cilíndricos, amarillentos y ensanchados en la parte distal (Figura 16).



Figura 16.- *Cucurbita pepo* subespecie *texana*. Morfotipo *Straightneck*.

### **2.1.5.- Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de calabacín.-**

De manera genérica puede decirse que el calabacín es una planta bien adaptada a zonas cálidas y que cuando tiene una temperatura y una humedad adecuadas su desarrollo vegetativo es muy rápido.

#### **2.1.5.1.- Temperatura.-**

Las exigencias que el cultivo del calabacín tiene en cuanto a temperatura van a depender del momento del ciclo en el que se encuentre la planta, de manera que existe un rango óptimo para cada una de sus etapas de desarrollo.

Es necesario, también, tener en cuenta tanto la temperatura del suelo como la de la atmosfera donde se desarrolla el cultivo, ya que ambas influyen en el crecimiento radicular y aéreo de la planta; la importancia de una u otra va a depende, igualmente, de la etapa en la que se encuentre el cultivo.

#### **Germinación**

Según Delgado (1.999) la temperatura del suelo óptima para la germinación es de 20° C a 25° C si bien existe un rango mayor en el que la germinación también puede llevarse a

cabo, en este caso oscila entre los 15° C y los 40° C, temperaturas inferiores o superiores respectivamente comprometen la viabilidad de la futura plántula.

### **Crecimiento Vegetativo**

El rango óptimo de temperatura para que se de un desarrollo vegetativo adecuado oscila entre los 25° C y los 35° C (Ruiz, 2001). Las plantas pueden crecer sin daños en un rango que va desde los 10° C hasta los 35° C, con temperaturas inferiores o superiores se producen daños en frutos o deshidratación en la planta por exceso de transpiración respectivamente (Reche, 1997).

### **Floración**

La temperatura ideal para la floración gira en torno a los 20 – 25°C (Ruiz, 2001), al igual que para la germinación o el crecimiento vegetativo el rango se amplía desde los 10° C hasta los 35° C, por debajo de los 10° C se produce la caída de la flor (Reche, 1997).

#### **2.1.5.2.- Humedad.-**

Al analizar los requerimientos que tiene el calabacín en lo que a humedad se refiere es necesario, al igual que se hizo con los requisitos térmicos, distinguir entre humedad en el suelo y humedad relativa del aire. En ambos casos el calabacín es un cultivo muy exigente ya que pequeñas variaciones en los rangos óptimos pueden afectar tanto a la producción como a la propia planta.

Los valores óptimos de humedad relativa oscilan entre el 65 % y el 80 %, (Ruiz, 2001) Un exceso en la humedad ambiental aumenta considerablemente las probabilidades de enfermedades en el cultivo y un descenso provoca problemas en la fecundación así como deshidratación en los tejidos, por lo que disminuye el crecimiento vegetativo, se caen las flores y como consecuencia se puede llegar a comprometer seriamente la producción (Reche, 1997).

En lo que a humedad del suelo se refiere, tal y como se ha dicho antes, el cultivo de calabacín es muy exigente requiriendo una humedad en torno al 85 – 95 % para el adecuado desarrollo de su masa foliar y, sobre todo, para la formación del fruto, ya que este tiene un contenido en agua del 95 %.

### **2.1.5.3.- Luminosidad.-**

El calabacín no es una planta demasiado exigente en lo que a luz se refiere, de manera que la duración del día no tiene una especial repercusión sobre su cultivo (Reche, 1997), sobre todo en zonas donde no es este un factor limitante, lo que lleva a que existan ciclos de cultivo que van desde el extratemprano hasta el tardío. A pesar de ello, siempre es necesario tener en cuenta el efecto positivo que la luz tiene sobre la fotosíntesis, la floración o la precocidad de los frutos, lo que sin duda repercutirá de manera directa en el incremento de la producción.

### **2.1.5.4.- Suelo.-**

A pesar de ser el calabacín un cultivo sin grandes requerimientos edáficos, en general prefiere suelos de textura franca, profundos, bien drenados y provistos de materia orgánica.

El ph óptimo para el desarrollo adecuado del cultivo oscila entre 5,6 y 6,8 según Reche (1.997), si bien es cierto que se adapta perfectamente a valores comprendidos entre 5 y 7. En suelos no enarenados alcalinos, con valores superiores a 7, pueden aparecer síntomas de carencias en determinados nutrientes (Ruiz, 2.001).

## **2.2.- COLECCIÓN DE MUTANTES.-**

### **2.2.1.- Introducción.-**

Una mutación es un cambio en el DNA que se puede producir de manera natural o inducida. La mutación natural es la base de la selección natural y la mutación inducida es considerada una forma de aumentar la propia variación natural, ya que una mutación se produce siempre de manera aleatoria. Así, resulta imposible realizar un tratamiento para inducir una mutación y conocer el resultado de la misma a priori (Cubero Salmeron, 2002).

La tasa de mutación natural es muy inferior a la que se puede dar en la mutación artificial, mientras que en la primera oscila entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  para cada gen y generación en

plantas y animales, en la segunda se puede llegar a obtener una tasa tan alta como se desee, si bien siempre hay que valorar el riesgo de que se produzcan tantas mutaciones en el organismo que pongan en riesgo la propia supervivencia del mismo. Tasas superiores a  $10^{-2}$  pueden comprometer la viabilidad de la planta.

Existe un gran número de agentes, tanto físicos como químicos, que causan mutaciones. En general se puede afirmar que todos los agentes cancerígenos causan mutaciones en los organismos. Entre los agentes físicos más destacados se encuentran tanto radiaciones ionizantes como no ionizantes.

Los agentes químicos empezaron a utilizarse buscando la mutación dirigida ya que se supuso que existiría una especificidad de acción que ayudaría a lograr el objetivo último que no era otro que salvar el obstáculo de la aleatoriedad en las mutaciones. Existe una amplia variedad de sustancias químicas con efectos mutagénicos más o menos importantes, entre ellas se pueden señalar: las mostazas nitrogenadas, agentes aquilantes, derivados de purinas o pirimidinas...etc. La acción que estos agentes tienen sobre el material genético es muy variado, a modo de ejemplo se pueden citar algunos:

- **Acido nitroso:** Actúa directamente sobre el ADN.
- **5 bromouracilo:** Es un análogo de la timina, lo que genera cambios puntuales durante el proceso de replicación del DNA.
- **Acridinas:** Actúa adicionando o eliminando bases, lo que cambia el marco de lectura del gen.
- **Mostazas nitrogenadas:** Producen roturas cromosómicas.

Una de las sustancias más utilizadas en la actualidad para inducir mutaciones en plantas para la mejora genética de una especie es el metasulfonato de etilo (EMS) debido, sobre todo, a la baja toxicidad para los operarios, a la facilidad de adquisición y a la sencillez en el manejo.

Generalmente, el tratamiento se realiza mediante imbibición de las semillas en una solución acuosa de EMS, con una concentración y tiempo de exposición que se debe poner a punto para cada especie mediante ensayos experimentales como el que nos ocupa, pero que habitualmente oscilan entre 0,3 y 1,5 % para la concentración y entre 0,5 y 12 horas para el tiempo de exposición.

En la Figura 17 se muestra un esquema que sintetiza la forma en la que actúa el EMS sobre el ADN de las células. Cuando en un organismo se produce la replicación del ADN el emparejamiento de las bases se debe producir según el criterio C=G y A=T. Al actuar el mutagénico transforma la estructura de la Guanina de manera que durante el proceso de replicación, esta, se confunde con una Adenina y se empareja con una Timina. Al llevarse a cabo una segunda replicación esta “nueva Timina” es emparejada ya con su correspondiente Adenina y la alteración en el material genético de esa planta queda consolidada.

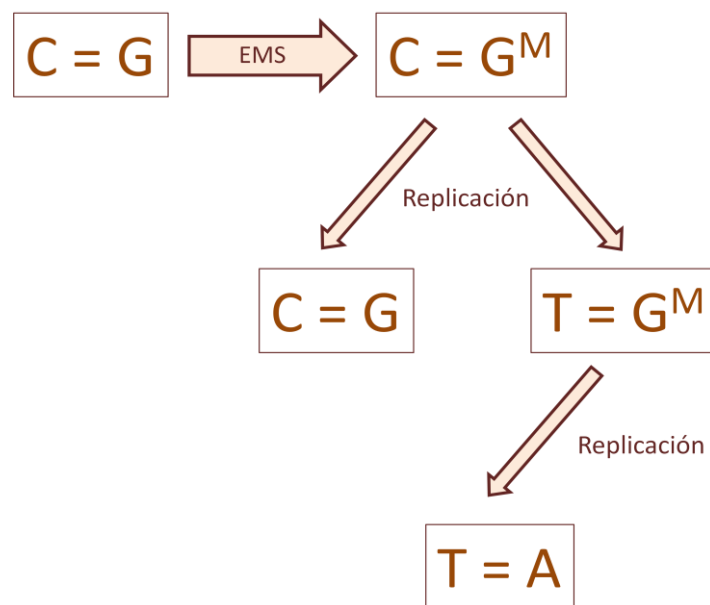


Figura 17.- Efecto del EMS sobre el ADN en las Células. Alteración en la replicación.

### 2.2.2.- Utilidad de las mutaciones y las colecciones de mutantes.-

A pesar de los avances en la Ingeniería Genética, en lo que a transferencia génica se refiere, el uso de la mutación artificial es de suma importancia en la búsqueda de variabilidad, y sobre todo en la determinación de la funcionalidad de los genes en los distintos procesos fisiológicos y de desarrollo de una especie. Es este, justamente, el papel fundamental de las colecciones de mutantes, y si bien es un campo aun muy novedoso ya se han realizado trabajos en este sentido en varias especies de hortalizas como tomate, pimiento o melón.

En la Figura 18 puede verse un esquema donde se resume de manera muy esquemática el proceso que es necesario llevar a cabo para desarrollar una colección de mutantes utilizando EMS como mutagénico.

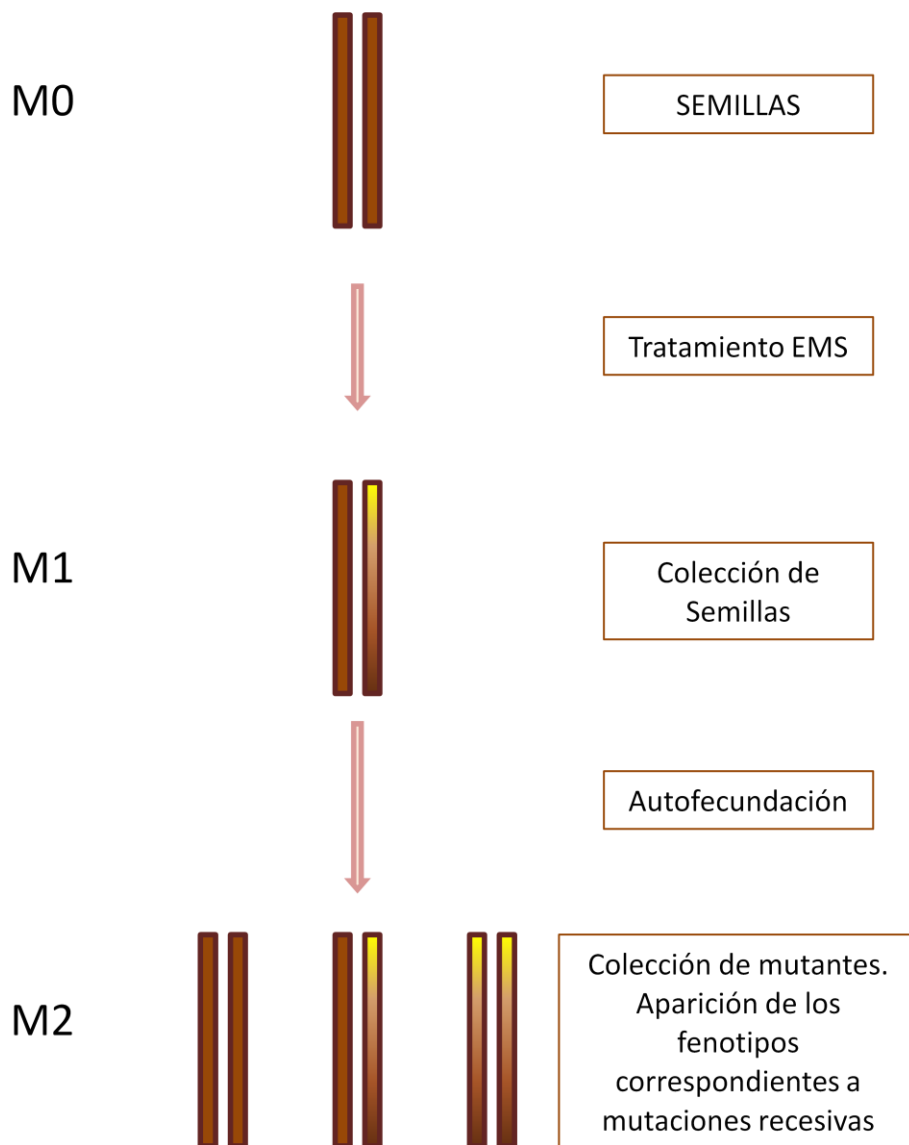


Figura 18.- Proceso para desarrollar una colección de mutantes.

El proceso se iniciaría con el tratamiento de las semillas M0 con un mutágeno, en este caso sería con EMS. Las semillas tratadas se siembran en campo para constituir la generación M1. En estas plantas las mutaciones que haya producido el EMS estarán en heterocigosis por lo que solamente las mutaciones dominantes darán lugar a un fenotipo observable. Las plantas de la generación M1 se deberán autofecundar y de los frutos que se recolecten se obtendrán



nuevas semillas que formaran la generación M2 donde ya podrán verse todos los fenotipos correspondientes a mutaciones recesivas.

Antes de poder iniciar el proceso descrito en el párrafo anterior es necesario conocer cuáles son los rangos de exposición al mutágeno adecuados para obtener mutaciones en las plantas sin comprometer sus funciones vitales tales como la fertilidad. La concentración y el tiempo de exposición al EMS son característicos de cada especie y variedad, por lo que serán parámetros que se deben de ajustar antes de iniciar un proceso masivo de mutagénesis. Este es el principal objetivo de este proyecto.

Conocer la funcionalidad de cada uno de los genes que conforman el perfil genético de las plantas cultivadas es un reto para el mundo científico, sin el cual la mejora genética hoy en día no puede concebirse. A pesar de que a nivel internacional la secuenciación del genoma en tomate o pimiento está más desarrollada que en cucurbitáceas, hay motivos para el optimismo y son numerosas las fuentes que apuntan a la próxima consecución de la secuenciación en esta familia, sobre todo en melón, pepino, sandía y calabacín según la organización Internacional Cucurbit Genomics Initiative, de la que forman parte un amplio número de centros de investigación y laboratorios de países como España, Estados Unidos, Israel, Francia, Japón o China.

Una vez que se dispone de la colección de mutantes, se pueden identificar mutantes de interés agronómico para las especies cultivadas en cuestión. A veces este screening se realiza a partir de la secuencia de genes. Cuando no se conocen los genes que pueden estar implicados en el proceso, se realiza un screening fenotípico de los mutantes en búsqueda de fenotipos de interés para la mejora. Así por ejemplo Jeong et al (2011) del Department of Plant Science, Plant Genomics and Breeding Institute and Research Institute for Agriculture and Life Sciences de la Seoul National University publicaron un trabajo basado en una colección de mutantes de *Capsicum annun* en el que mediante un sistema de alta resolución identificaban las alteraciones producidas en los alelos del gen EF4E que confiere a la planta una resistencia a virus. Minoia et al (2010) presentaron los resultados de los trabajos realizados sobre la variedad de tomate Red Setter. Trataron las semillas con dos concentraciones diferentes de EMS 0,7 % y 1 %. Usaron la tecnología tilling y crearon una base de datos con las alteraciones fenotípicas de la colección de mutantes para ponerla a disposición de la comunidad científica. Dalmais et al (2008) han desarrollado una colección de mutantes en guisante utilizando como agente mutagénico el EMS y han desarrollado una

base de datos donde se asocian la características fenotípicas con las secuencias de los genes mutantes y que está disponible online.

Menda et al (2004) del Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, and the Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem en Israel, han desarrollado todo un protocolo de trabajo con semillas de tomate de la variedad M82, las trataron con EMS al 0,5 % durante 12 horas. En este trabajo utilizaron también la radiación como agente mutagénico. Obtuvieron un total de 13.000 familias M2 sobre las que hicieron un primer fenotipado en campo y una posterior clasificación morfológica que incluye 15 categorías principales y 48 secundarias. Han catalogado más de 3.400 mutaciones, teniendo toda la información disponible online.

# **MATERIAL**

# **Y**

# **MÉTODOS**

Antes de iniciar la producción de una colección de mutantes en calabacín, o en cualquier otra especie, es necesario realizar un estudio que permita conocer el efecto que el tratamiento con el mutágeno EMS tiene sobre la germinación, la fertilidad de las plantas y otros caracteres de interés. El objetivo último es determinar la dosis necesaria para generar el mayor número de plantas posibles sin comprometer la supervivencia de las mismas, su fertilidad o la capacidad de germinación de las semillas, con ese objetivo se diseñó el presente estudio en diferentes ensayos.

### **3.1.- ENSAYOS REALIZADOS Y LOCALIZACIÓN.-**

El estudio de investigación llevado a cabo en este proyecto ha supuesto la realización de dos ensayos:

#### **3.1.1.- Ensayo 1.-**

En este primer ensayo se hicieron diez lotes de 100 semillas de calabacín cada uno y a ocho de ellos se les expuso durante 12 horas a un tratamiento con EMS a cuatro dosis diferentes. Un día más tarde se repitió el proceso pero esta vez manteniendo las semillas sumergidas en EMS durante 24 horas. Con el Ensayo 1 se pretendió hacer una primera aproximación a los rangos de trabajo con EMS, tanto en tiempo de exposición como en la concentración para, dependiendo de los resultados obtenidos, llevar a campo o repetir el ensayo con rangos más adecuados. Se llevó a cabo en el laboratorio de Genética de la Escuela Politécnica Superior.

#### **3.1.2.- Ensayo 2.-**

El ensayo 2 comenzó con una fase de semillero en la que se tomaron seis lotes de 100 semillas cada uno y a cuatro de ellos se les expuso a dos dosis diferentes de EMS durante 24 horas para, posteriormente, proceder a la siembra y el mantenimiento necesario hasta obtener plántulas aptas para ser llevadas a campo. Esta segunda fase se llevó a cabo en la Finca Experimental de la Fundación UAL – ANECOOP, situada en el paraje “Los Goterones” en el término municipal de Almería (Figura 19).

### 3.2.- INSTALACIONES.-

Parte de este estudio se realizó en el laboratorio de Genética que pertenece al Departamento de Biología Aplicada y cuenta con el equipo material necesario para realizar este ensayo.

La última fase del Ensayo 2 se realizó en un invernadero tipo raspa y amagado, con una superficie aproximada de 1.000 m<sup>2</sup>. La estructura es de acero galvanizado, el tejido horizontal es de alambre galvanizado y la cubierta está formada por film de polietileno de alta densidad.



Figura 19.- Invernadero en el que se realizó el ensayo situado en la Finca Experimental de la Fundación UAL – ANECOOP.

El sistema de riego está formado por tuberías de polietileno situadas en la superficie y que portan los goteros interlinea de laberinto que, con un caudal de 2 litros a la hora, cubren las necesidades hídricas de las plantas en el invernadero.

### 3.3.- MATERIAL VEGETAL.-

El material vegetal utilizado fueron doscientas semillas de calabacín *Cucurbita pepo* L. cv *Tosca* para cada uno de los tratamientos y repeticiones que se llevaron a cabo. En total

se usaron 2.000 semillas para el primer ensayo y 600 para el segundo.

Las plantas de la variedad Tosca tienen un vigor medio y los entrenudos cortos. Es una planta muy precoz y presenta un alto rendimiento comercial, es recomendada en siembras de cultivos de primavera y para siembras tempranas de producción en otoño. Presenta un fruto de una elevada calidad, muy uniforme y con unas características físicas en cuanto a forma, brillo y color muy apreciadas en los mercados.

### **3.4.- MANEJO DEL CULTIVO.-**

#### **3.4.1.- Siembra y plantación.-**

El proceso de siembra se realizó siempre de manera manual y atendiendo a una distribución uniforme de las semillas dentro de la bandeja.

La plantación se realizó también de manera manual y estuvo condicionada por las líneas portagotos y por los propios goteros dentro de cada ramal.

#### **3.4.2.- Labores culturales.-**

Las labores culturales que se llevaron a cabo sobre las plantas en el invernadero son las mismas que se siguen en un cultivo comercial. La única poda que se realizó durante todo el tiempo en el que las plantas de calabacín estuvieron en el invernadero fue la limpieza de frutos, en una primera instancia para que la planta no perdiera fuerza y alcanzara el vigor que se deseaba y después de la polinización para que la planta dedicara todo su potencial a sacar adelante el fruto que garantizara la continuidad del estudio.

La polinización se realizó de forma manual asegurando siempre la autofecundación de todas las plantas.

### **3.5.- DISEÑO EXPERIMENTAL.-**

Con el objetivo de acotar los tiempos de exposición al mutágeno y las concentraciones óptimas de trabajo, el proyecto se inició con un primer ensayo llevado a cabo única y

exclusivamente en su fase de semillero. Posteriormente, y con el fin de conocer el efecto de los tratamientos sobre los fenotipos de plantas adultas, especialmente sobre la fertilidad masculina y femenina, se llevo a cabo un segundo ensayo en el que las plantas tratadas con EMS se llevaron a campo.

### **3.5.1.- Ensayo 1.-**

El primer ensayo tiene como objetivo prioritario determinar las dosis de mutágeno adecuadas y los tiempos de exposición óptimos, de manera que induciéndose la mutación en la semilla, esta no vea afectadas sus funciones vitales y pueda completar su desarrollo y ciclo productivo con normalidad.

#### **3.5.1.1.- Caracterización y Desarrollo experimental.-**

El primer ensayo se inicia el día 02/02/2010 colocando 800 semillas en 8 frascos con cuatro dosis diferentes de EMS: 0,3 % - 0,5 % - 0,7 % y 1 %. De esta forma quedaron dos repeticiones por concentración con 100 semillas cada una.

Pasado el tiempo de exposición las semillas se lavaron con tiosulfato de sodio durante 30 minutos para anular los efectos del EMS y asegurar que no se iban a seguir produciendo mutaciones con posterioridad.

A este proceso de lavado se sumaron dos frascos con 100 semillas cada uno a las que no se les había dado ningún tratamiento y que actuaron como testigos del ensayo. Para finalizar el proceso, se dieron tres lavados de 15 minutos cada uno con 100 ml de agua destilada a todas las semillas.

La siembra se realizó en bandejas de poliespan de 150 alveolos cada una, similar a las usadas en los semilleros comerciales. El sustrato utilizado era una mezcla de turba y vermiculita con una proporción de 3:1. Nada más finalizar la siembra se dio el primer riego para asegurar que las condiciones físicas del sustrato eran las adecuadas para favorecer la germinación.

Se ensayaron dos tiempos de exposición al mutágeno: 12 y 24 horas. En la Tabla 2 puede verse un resumen de la situación de partida del primer estudio:

<b>N° DE SEMILLAS POR BANDEJA, CONCENTRACIÓN Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN A EMS</b>				
<b>Concentración EMS</b>	<b>Ensayo 12 horas</b>		<b>Ensayo 24 horas</b>	
	<b>Bandeja 1</b>	<b>Bandeja 2</b>	<b>Bandeja 1</b>	<b>Bandeja 2</b>
<b>Testigo</b>	100	100	100	100
<b>0,3 %</b>	100	100	100	100
<b>0,5 %</b>	100	100	100	100
<b>0,7 %</b>	100	100	100	100
<b>1 %</b>	100	100	100	100

Tabla 2.- Número de semillas sembradas en cada una de las bandejas según la concentración y tiempo de exposición a EMS.

Durante los siguientes días, se mantuvieron las bandejas en el laboratorio con la humedad necesarias para garantizar el desarrollo óptimo de las semillas y plántulas.

### 3.5.1.2.- Toma de datos.-

Pasados doce días desde la siembra de las primeras bandejas el número de semillas germinadas y el porte de las plántulas aconsejaban el estudio y análisis detallado del estado de desarrollo de las mismas.

El trabajo se inició con la toma de medidas en las bandejas correspondientes al Ensayo 12 horas y posteriormente se repitió el proceso para el Ensayo 24 horas.

Los datos que se tomaron en ambos casos fueron:

- Porcentaje de germinación
- Longitud del hipocotilo
- Grosor del hipocotilo
- Número de hojas
- Peso de las plántulas
- Concentración de clorofila en los cotiledones



### **Longitud del hipocotilo**

Las medidas se hicieron manteniendo la plántula en el cepellón y fueron tomadas desde la base misma del hipocotilo hasta la bifurcación formada por los cotiledones. Se utilizó un calibre electrónico de lectura digital.



Figura 20.- Calibre electrónico de lectura digital.

### **Grosor del hipocotico**

La medición del grosor de cada plántula se realizó con el mismo calibre electrónico que la medida anterior y se tomó justo en la base del hipocotilo.

### **Número de hojas**

Este dato se tomó basándose en una inspección visual de cada plántula y se tuvieron en cuenta, además de las hojas completamente desarrolladas, aquellas que estaban apuntando en cada una de las plantas.

### **Peso de las plántulas**

Para realizar esta medida se tomó una muestra de 20 plantas por bandeja, tanto para el Ensayo 12 horas como para el Ensayo 24 horas, y se fueron cortando justo por la base del hipocotilo, de manera que el criterio fuera uniforme en todas y cada una de plantas a pesar.

Para realizar la medición se utilizó una balanza de precisión.

### **Clorofila en los cotiledones**

La medida de la clorofila se realizó de dos formas diferentes con el fin de contrastar los resultados. La primera medición se llevo a cabo con un método no destructivo del material vegetal, sobre 20 plantas de cada una de las bandejas con un espectrógrafo de campo y se tomaron dos medidas por plántula una por cada cotiledón. Con este método se obtiene un índice o valor relativo de la clorofila.

El valor absoluto por unidad de superficie se obtuvo mediante la segunda medición que se realizó con un espectrómetro. El procedimiento hasta la obtención de la medida fue el siguiente:

Se tomaron 10 plántulas de cada bandeja y se le extrajo un bocado de cada cotiledón y se hicieron grupos con las muestras obtenidas cada dos plantas. De tal manera que se obtuvieron 5 muestras por cada una de las bandejas, con 4 bocados de cotiledón cada una de las muestras. Se pesaron y se colocaron con 1 ml de etanol en un horno de incubación en movimiento a 30° centígrados y sin luz durante 12 horas.

Para concluir se tomó 1 ml de disolución de cada una de las muestras y se llevaron al espectrógrafo, se obtuvieron medias de absorvancia a 663 nm y a 645 nm, con esta medida y la fórmula  $C_{a+b} = 20,2 * A_{645} + 8,02 * A_{663}$  se obtuvo el valor de la concentración de clorofila en  $mgL^{-1}$  correspondientes a cada una de las muestras. Para obtener la concentración de clorofila por gramo de tejido se hizo la correspondiente transformación de las unidades teniendo en cuenta el peso de los bocados y el volumen usado en la toma de muestras.

$$C \text{ (mg de clorofila por gramo de tejido fresco)} = C_{a+b} * \text{Volumen (ml)} / \text{Peso (g)} * 1000.$$

### **3.5.2.- Ensayo 2.-**

Una vez analizados los resultados del primer ensayo, tanto en 12 como en 24 horas, y teniendo en cuenta que los porcentajes de germinación de las semillas tratadas no disminuyeron mucho, se decidió realizar un segundo ensayo aumentando la dosis de EMS hasta 1,5 % y 2 %, ya que los autores que, hasta el momento, han trabajado en colecciones de mutantes para otros cultivos apuntan como parámetros óptimos de los mutágenos aquellos que dan lugar a unos porcentajes de germinación en torno al 50 %.

En este segundo ensayo se mantuvo el tiempo de exposición de las semillas al EMS en 24 horas.

#### **3.5.2.1.- Caracterización y Desarrollo experimental en laboratorio.-**

El día veintitrés de febrero se inició el nuevo estudio sumergiendo las semillas de calabacín en EMS. Se hicieron dos repeticiones por cada una de las dos concentraciones de

EMS utilizadas: 1,5 % y 2 %. En total se prepararon 4 botes con 100 semillas cada uno.

Pasadas 24 horas se lavaron las semillas con tiosulfato de sodio durante 30 minutos y posteriormente se les dio tres lavados más, esta vez con agua destilada y con una duración de 15 minutos cada uno de ellos. Como en los casos anteriores las semillas que iban a ser testigos del estudio también se sometieron a los lavados para igualar las condiciones con las semillas tratadas.

Para finalizar y una vez terminado el proceso de lavado se procedió a la siembra de las 600 semillas en bandejas de poliespan y con un sustrato mezcla de turba y vermiculita, quedando 2 bandejas control, 2 bandejas con semillas tratadas con una concentración de EMS del 1,5 % y 2 bandejas con semillas tratadas con una concentración del 2 %.

Durante los días que siguieron, y mientras las semillas iban germinando y desarrollándose los primeros estadios de las plántulas se mantuvieron las condiciones ambientales necesarias para que el desarrollo fuese el óptimo.

### 3.5.2.2.- Toma de datos en laboratorio.-

Los primeros datos que se tomaron en el laboratorio de este nuevo ensayo fueron los de germinación, así se tomaron datos a los 7, 9, 12 y 14 días desde la siembra. Posteriormente se obtuvieron medidas de longitud y grosor del hipocotilo y por último el número de hojas, de forma similar a la realizada en el primer ensayo.



Figura 21.- Bandeja correspondiente a una concentración del 1,5 % a los ocho días desde la siembra.

Para concluir el desarrollo de las plántulas y antes de pasarlas a campo se llevaron a la cámara de cultivo de la Finca Experimental de la Fundación UAL – ANECOOP.

### 3.5.2.3.- Desarrollo experimental en campo.-

Como consecuencia del irregular desarrollo de las plántulas en la fase de semillero, la plantación de todas ellas no se pudo realizar en un solo día, se fueron llevando al invernadero conforme las plántulas alcanzaban el grado óptimo de madurez.

Así, el día 16 de marzo se inició la plantación en el invernadero con las plántulas correspondientes al control, plantándose tres líneas con un total de 46 plantas. Al día siguiente comenzó el paso a campo de las primeras plántulas procedentes de los tratamientos.

Durante los siguientes veinticinco días se realizó la plantación en invernadero, hasta completar el total de plantas que habían germinado y desarrollado suficientemente. En el invernadero quedaron las plantas distribuidas de la siguiente forma:

<b>TESTIGO</b>	
<b>Nº DE LINEO</b>	<b>Nº DE PLANTAS</b>
Líneo 1	15
Líneo 2	15
Líneo 3	16

Tabla 3.- Distribución de las plántulas control en el invernadero.

En el tratamiento 1, con una concentración de 1,5 % de EMS se llevaron a campo 151 plántulas con la siguiente distribución:

<b>TRATAMIENTO 1 CONCENTRACIÓN = 1,5 %</b>	
<b>Nº DE LINEO</b>	<b>Nº DE PLANTAS</b>
Líneo 1	16
Líneo 2	16
Líneo 3	16

<b>TRATAMIENTO 1 CONCENTRACIÓN = 1,5 %</b>	
<b>Nº DE LINEO</b>	<b>Nº DE PLANTAS</b>
Líneo 4	16
Líneo 5	16
Líneo 6	15
Líneo 7	14
Líneo 8	14
Líneo 9	14
Líneo 10	14

Tabla 4.- Distribución de las plántulas del tratamiento 1 (concentración 1,5 %) en el invernadero.

En el tratamiento 2, con una concentración del 2 % de EMS se llevaron a campo 109 plántulas distribuidas como se muestra en la tabla 5:

<b>TRATAMIENTO 2 CONCENTRACIÓN = 2 %</b>	
<b>Nº DE LINEO</b>	<b>Nº DE PLANTAS</b>
Líneo 1	11
Líneo 2	11
Líneo 3	12
Líneo 4	10
Líneo 5	10
Líneo 6	8
Líneo 7	9
Líneo 8	8
Líneo 9	8
Líneo 10	7
Líneo 11	6
Líneo 12	6
Líneo 13	3

Tabla 5.- Distribución de las plántulas del tratamiento 2 (concentración 2 %) en el invernadero.

En todos los casos para determinar el marco de plantación se utilizaron las líneas portagotos existentes, alternando siempre dos líneas libres y una con plantas, plantando al tresbolillo en la línea portagotos.

En el gráfico que aparece en la Figura 22 puede verse la distribución en el invernadero de las plántulas según el tratamiento realizado:

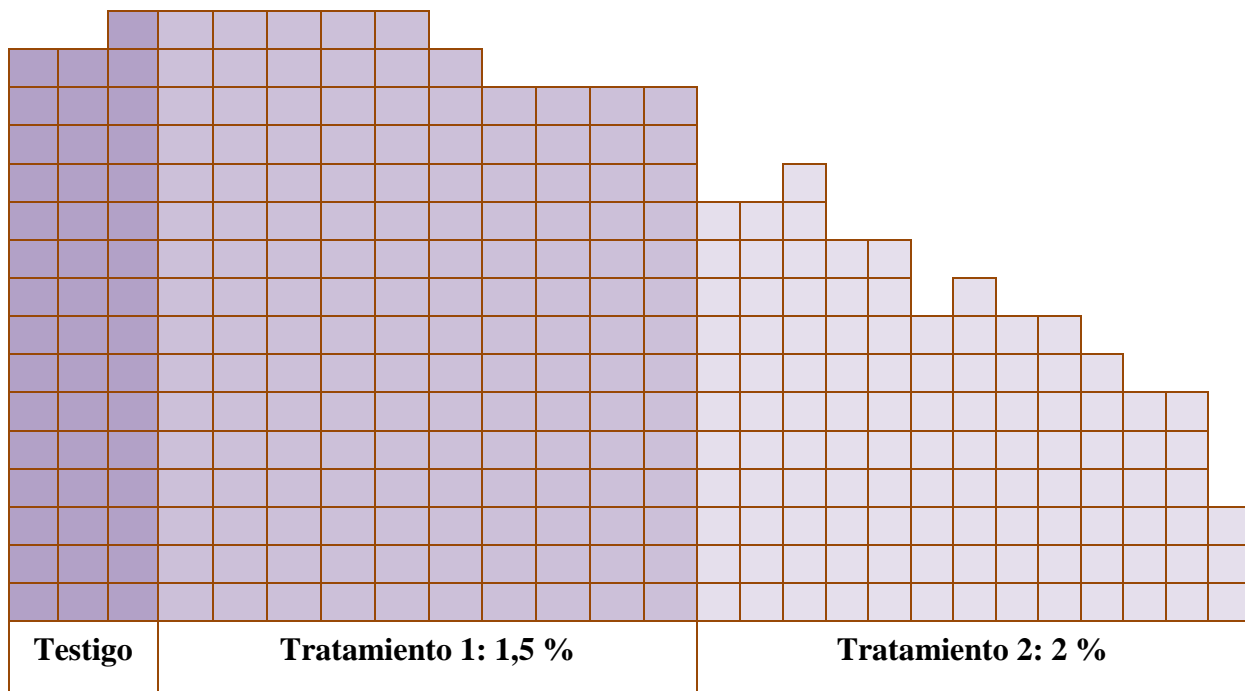


Figura 22.- Distribución de las plántulas en el invernadero.

Después de dar por finalizado el proceso de plantación, quedaron plántulas en las bandejas correspondientes al primer tratamiento, con una concentración de 1,5 %, y al segundo, con una concentración del 2 %, sin poder llevarse a campo, ya que el desarrollo de las mismas apenas superó la fase de germinación y de desarrollo de la primera hoja verdadera.

El riego, abonado y tratamientos fitosanitarios se llevaron a cabo de acuerdo con los parámetros aconsejados en el cultivo de calabacín. Paralelamente y hasta que las plantas alcanzaron el porte necesario para poder obtener frutos se realizaron las prácticas culturales necesarias que garantizaran el desarrollo de la planta, como la limpieza de los frutos.

El 4 de mayo de 2010 se inició el proceso de autofecundación de cada una de las plantas M1. Para ello hubo que esperar a que en una misma planta coincidieran una flor femenina y una flor masculina en estado óptimo de desarrollo. En todos los casos el trabajo se

realizó en las primeras horas de la mañana para garantizar la máxima calidad en el cuajado. La flor fecundada se señaló con una etiqueta identificativa con el número de tratamiento, línea al que pertenecía y fecha de polinización.

Durante los días que siguieron se continuó con el cuidado del cultivo hasta la recolección del fruto resultante de la autofecundación, se realizaron los riegos, tratamientos y limpieza de frutos ajenos a la autofecundación necesarios en cada momento.

La fase de recolección comenzó a finales de junio y terminó a finales de julio de 2010 manteniendo el fruto en la planta un mínimo de cuarenta días.

Para concluir, se procedió a la extracción, lavado y clasificación de las semillas obtenidas de cada planta y que servirán de base para futuros proyectos. El proceso se inició con la apertura del fruto con un instrumento afilado, a continuación se sacaron las semillas junto con la pulpa del calabacín y después de separar las semillas de la pulpa se sumergieron las primeras en una disolución al 1 % de agua con lejía con el objeto de conseguir una limpieza y desinfección óptimas que garantizaran la posterior conservación de las semillas (Figura 23).

El último paso consistió en el secado de las semillas, primero con papel de filtro y luego en unas bolsitas de malla en las que se colocaron las semillas que correspondían a cada planta. Las semillas se guardaron después en una cámara preparada para tal fin en las condiciones ambientales de humedad y temperatura necesarias para garantizar una conservación adecuada (Figura 23).



Figura 23.- Proceso de limpieza y conservación de las semillas.

### 3.5.2.4.- Parámetros medidos en invernadero.-

Durante la fase de desarrollo del cultivo en el invernadero se fueron fenotipando las plantas con el fin de caracterizar el efecto del EMS sobre el desarrollo de las plantas adultas de calabacín. Las medidas realizadas fueron las siguientes:

- Desarrollo vegetativo o porte
- Expresión sexual
- Clorofila en hojas
- Porcentaje de frutos cuajados
- Morfología de las hojas
- Fertilidad

#### Desarrollo vegetativo o porte

Un mes después de la plantación en el invernadero se realizó una clasificación visual del porte de todas las plantas, para ello se hizo una escala del 1 al 5, en la que se describía el número 1 para aquellas plantas con menor vigor y desarrollo, en las que se comprometía, incluso, la supervivencia de la planta, y el número 5 para aquellas de porte superior. Se utilizó el rango 0 para aquellas plantas que durante su desarrollo se habían quedado sin ápice de crecimiento, lo que se conoce en términos coloquiales como plantas ciegas.



Figura 24.- Diferencia en el desarrollo vegetativo de las plantas en el invernadero. Control a la derecha, tratamiento a la izquierda.

#### Expresión sexual

Para conocer el desarrollo en la expresión sexual de las plantas de calabacín se tomó una muestra de diez plantas para cada uno de los tratamientos y control, y se anotó el tipo de



flor, masculina o femenina, que había desarrollado en cada uno de los nudos. Se llevó a cabo al mes de iniciar la plantación cuando las plantas ya tenían un desarrollo que permitía la evaluación de al menos veinte nudos y antes de iniciar el proceso de fecundación.

### **Clorofila en hojas**

Unos días antes de iniciar la fecundación y cuando las plantas habían tenido la oportunidad de conseguir un desarrollo pleno se realizó una medición de los niveles de clorofila en hoja. Para ello se utilizó un espectrógrafo manual, se realizaron dos medidas de cada planta, y para unificar el criterio de medición se tomaron los datos siempre sobre la última hoja desarrollada.

En esta ocasión se descartaron las plantas con anomalías tan amplias que impedían su normal desarrollo. Se tuvieron en cuenta solo las plantas correspondientes a los portes 3, 4 y 5 descritas anteriormente.

### **Porcentaje de cuajado**

Una vez realizada la autofecundación se realizó un seguimiento diario de las flores ya fecundadas con el fin de evaluar el porcentaje de cuajado de frutos y en caso de pérdida poder realizar un nuevo intento de fecundación que garantizara la obtención de un fruto por planta y por consiguiente de las semillas necesarias para obtener una generación M2 con la que proseguir futuros estudios.

### **Morfología de las hojas**

Mediante una inspección visual se fueron tomando nota de las plantas que tenían hojas con alteraciones en el color y del número de ellas que había en cada planta. Así como de aquellas que tenían su forma natural palmeada y con cinco lóbulos alterados.



Figura 25.- Hojas con alteraciones en el color y forma. Tratamiento 1 (concentración 1,5 %).



Figura 26.- Hojas con alteraciones en el color y en la forma. Tratamiento 2 (concentración 2 %).

## **Fertilidad**

Para finalizar la toma de datos se contaron las semillas que había en cada uno de los frutos que procedían de la autofecundación de cada planta y se evaluaron las semillas que estaban vacías y que, por lo tanto, no eran fértiles

### **3.6.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.-**

Una vez obtenidos todos los datos correspondientes tanto a las fases de semillero como a la de campo, era imprescindible organizarlos y tratarlos con el fin de que sirvieran para obtener, de manera correcta, todas las conclusiones derivadas de este estudio. Se han utilizado dos programas informáticos:

- Microsoft office. Excell 2007.
- Statgraphics Plus 5.0.

Se realizó un Análisis de la Varianza que comparaba los resultados de las medias de los diferentes tratamientos para cada carácter estudiado. Con el Test de Rango Multiple se determinó las medias que eran significativamente diferentes unas de otras.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de determinar el tratamiento óptimo con EMS para producir una colección de mutantes en calabacín, se ha analizado el efecto de diferentes dosis y tiempos de tratamiento de las semillas sobre diferentes parámetros de desarrollo de plantas jóvenes y adultas de calabacín vc. *Tosca*. En primer lugar se presentan los resultados sobre el crecimiento vegetativo de las plántulas en semillero, y posteriormente los que se obtuvieron en campo.

#### **4.1.- EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON EMS SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO DE LAS PLÁTULAS EN SEMILLERO.-**

En este apartado se van a presentar los resultados que se han obtenido del tratamiento estadístico de todos los parámetros medidos en semillero tanto en el primer ensayo como en el segundo:

1. Germinación
2. Longitud del hipocotilo
3. Grosor del hipocotilo
4. Número de hojas
5. Peso de la plántula
6. Clorofila del cotiledón

##### **4.1.1.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE LA GERMINACIÓN.-**

###### **4.1.1.1.- Ensayo 1.-**

El control sobre la germinación se realizó a los 12 días desde la siembra, tanto para el tratamiento que exponía las semillas durante 12 horas como para el de 24 horas. El cultivo de calabacín en términos comerciales exige un porcentaje de germinación por encima del 90 % para hablar de una germinación adecuada si bien en los trabajos que se están realizando y que tienen como objetivo la obtención de colecciones de mutantes en diversos cultivos hortícolas, hablan de un porcentaje de germinación próximo al 50 % como el adecuado para poder obtener un número importante de mutantes sin comprometer el óptimo desarrollo fisiológico de las plantas, de manera que puedan definirse como plantas agrícolamente viables.

Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 27, donde se comparan los valores de la germinación de las concentraciones estudiadas en los dos tiempos de exposición: 12 y 24 horas.

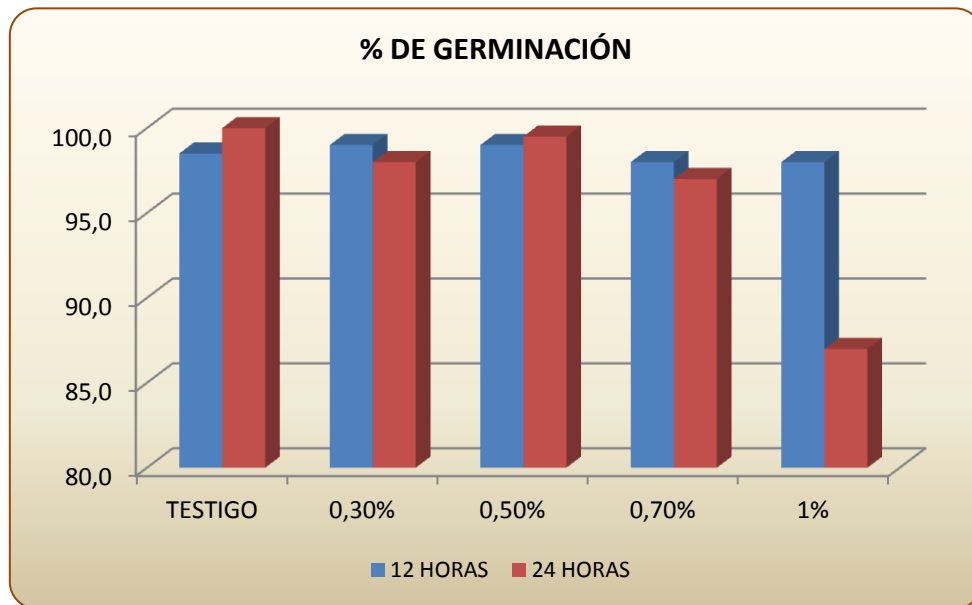


Figura 27.- Porcentajes medios de germinación de semillas tratadas con distintas concentraciones de EMS durante 12 y 24 horas.

El porcentaje de germinación de las semillas expuestas a las distintas concentraciones de EMS durante 12 horas fue en todos los casos superior al 95 %, con independencia de la concentración de EMS, no encontrándose diferencias entre los valores obtenidos para el testigo y los tratamientos.

Cuando las semillas se trataron durante 24 horas con EMS los porcentajes de germinación fueron muy similares a los mostrados en el caso anterior, salvo para la concentración superior equivalente al 1 %, donde la germinación bajó hasta el 87 % (Figura 27).

En todos los tratamientos el porcentaje de germinación fue muy superior al 50 % que se buscaba, por lo que se hizo necesario realizar un segundo ensayo tal y como se describe en los apartados anteriores y cuyos resultados se exponen a continuación.

#### 4.1.1.2.- Ensayo 2.-

El segundo ensayo se llevo a cabo aumentando las dosis significativamente a 1,5 y 2 % y se mantuvo el tiempo de exposición durante 24 horas.

En este caso la germinación se vio claramente afectada tanto en el porcentaje de semillas germinadas como en el tiempo que estas tardaron en germinar.

En el gráfico de la Figura 28 puede verse el porcentaje de semillas germinadas a los 12 días desde la siembra (mismo número de días que en el ensayo 1). El testigo alcanzó una germinación superior al 99 % mientras que el tratamiento del 2 % apenas llegó al 10 % (Figura 28). En este caso el tratamiento del 1,5 % es el que más se aproximaría al porcentaje del 50 % que se desea con un valor superior al 34 %.

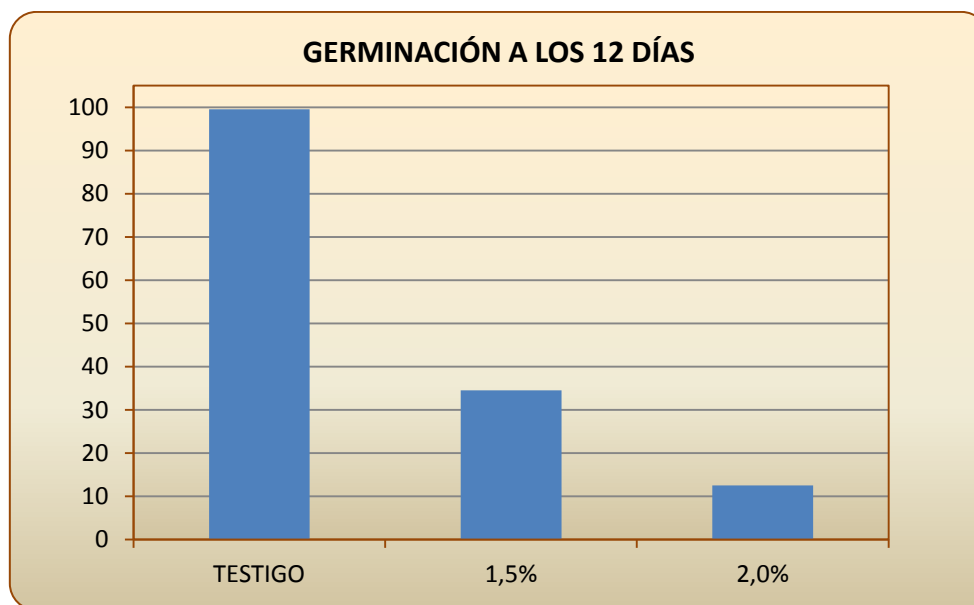


Figura 28.- Porcentaje medio de germinación de semillas expuestas 24 horas a diferentes concentraciones de EMS.

En la Figura 29 se muestran tres de las bandejas correspondientes al ensayo 2, en las que pueden verse claramente las diferencias en cuanto al porcentaje de germinación de las semillas en los diferentes tratamientos.

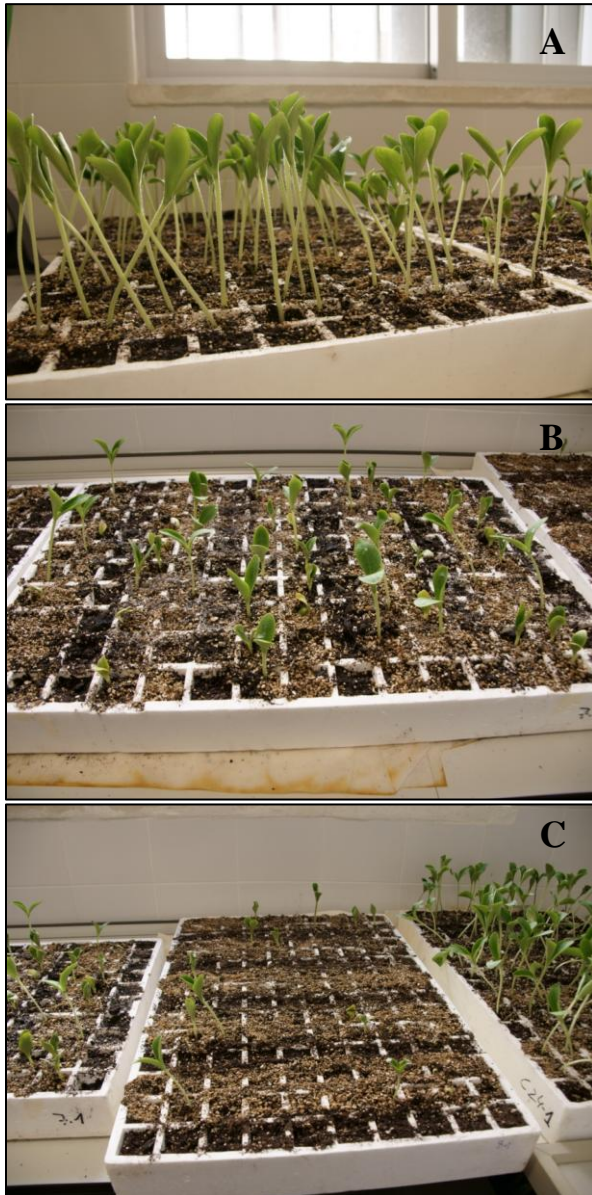


Figura 29.- Comparación de la germinación de semillas de calabacín a los 14 días de la siembra. A) semillas testigo sin tratar. B) semillas tratadas con 1,5% EMS durante 24 horas. C) semillas tratadas con 2 % EMS durante 24 horas.

Tal y como se explicó en el apartado correspondiente de Material y Métodos, las bandejas con las plántulas se mantuvieron en una cámara de cultivo, mientras tanto el número de semillas germinadas iba aumentando considerablemente, de manera que cuando se aproximó al 50 % se tomó la decisión definitiva de llevarlas a campo ya que estas parecían ser dos dosis que en primera instancia podían ser las adecuadas.

A los 21 días desde siembra los porcentajes de germinación alcanzados fueron de 77 % y 56 % para el tratamiento del 1,5 % y 2 % respectivamente tal y como puede verse en el gráfico de la Figura 30.

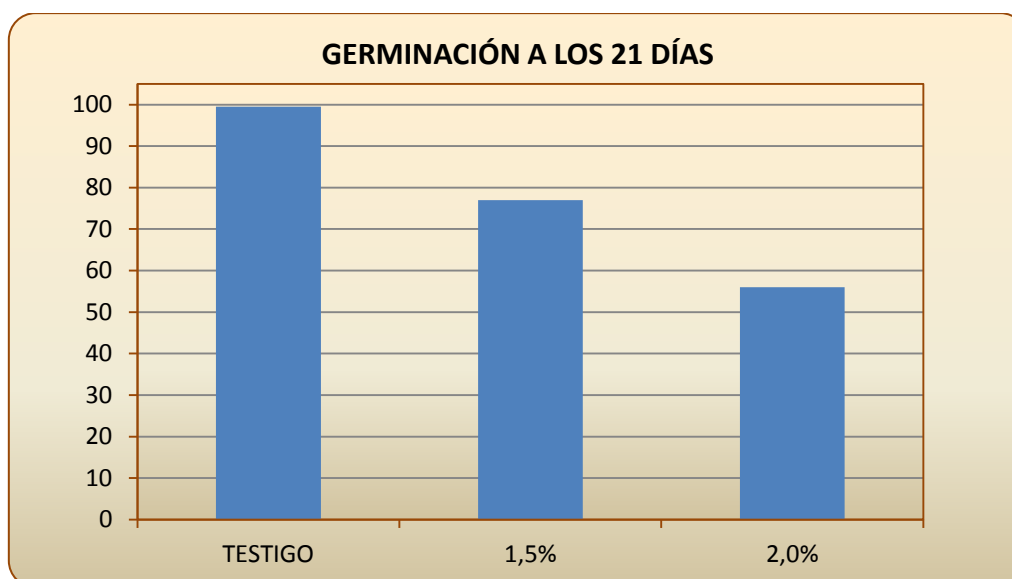


Figura 30.- Porcentaje medio de germinación de semillas expuestas 24 horas a diferentes concentraciones de EMS.

En los experimentos de mutagénesis, la dosis letal que provoca la reducción del 50% de germinación de las semillas (DL50) es un parámetro para comparar la efectividad de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de un mutágeno. En *Arabidopsis thaliana*, la dosis LD50 se ha determinado para los morfotipos *Ler* y *Col-0*, situándose en un 0,2% EMS durante 16 horas y 0.13-0.25% durante 12,5 h, respectivamente, para los dos genotipos (Jander et al. 2003). El número de mutaciones que se inducen con esta dosis es de aproximadamente 700 transiciones por genoma. En nuestro caso, los tratamientos del ensayo 1 apenas modificaron el porcentaje de germinación de las semillas, por lo que debimos aumentar la dosis de tratamiento a 1.5% y 2% de EMS durante 24 horas. Estas dosis redujeron el porcentaje de germinación por debajo del 50% a los 12 días de iniciarse la germinación (cuando las semillas control estaban 100% germinadas), lo que indicaría que los tratamientos han sido muy agresivos. No obstante, si la germinación se evalúa a los 21 días de iniciarse la germinación, la dosis de 2% EMS reducía el porcentaje de germinación hasta aproximadamente 50%, y que por tanto, la DL50 sería 2%.

Estos resultados deben, sin embargo, combinarse con los resultados de fertilidad como veremos posteriormente. De nada sirve aumentar el número de mutaciones por genoma si la fertilidad de las plantas M1 y M2 se ve tan afectada que resulte difícil mantener los mutantes generados. Este equilibrio tiene que ser optimizado para cada especie, y existe poca información disponible para determinar la concentración y la dosis letal EMS ideal para



lograr este equilibrio. Menda et al. (2004) estableció una colección de mutantes de tomate con DL15 después del tratamiento de semillas con 0,5% de EMS durante 12h.

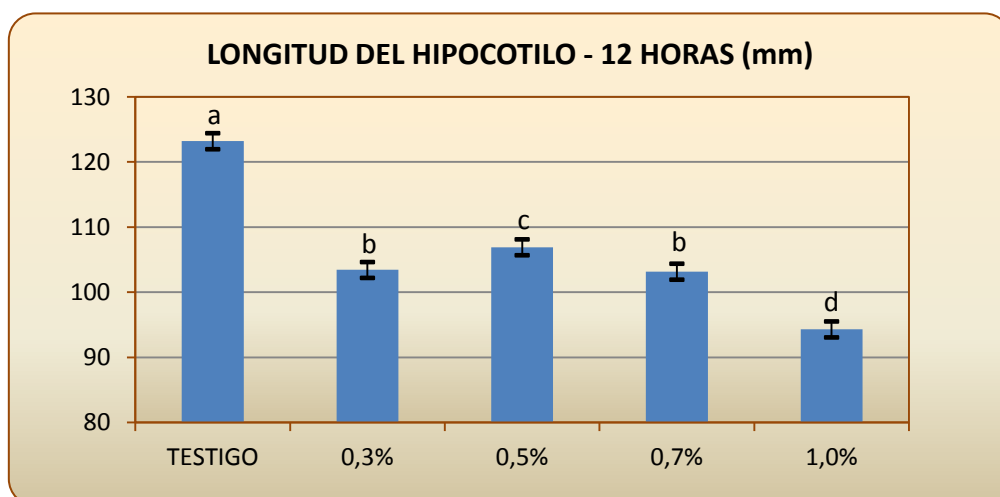
#### 4.1.2.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE LA LONGITUD DEL HIPOCOTILO.-

##### 4.1.2.1.- Ensayo 1.-

La longitud del hipocotilo es el primer indicador para conocer si la exposición de las semillas a los diferentes tratamientos con EMS altera el desarrollo vegetativo de las plantas. En este primer estadio de la vida de la planta es fundamental el nivel de desarrollo que se obtiene ya que de ello va a depender en gran medida el crecimiento y producción posterior, pero también es fundamental el tiempo que tarde en alcanzar ese desarrollo, ya que alargar o acortar los tiempos de semillero repercute directamente en la rentabilidad de cualquier cultivo.

En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos para el tiempo de exposición de las semillas de 12 y 24 horas. En el primer caso, y a pesar de ser el menor tiempo de exposición del ensayo, ya desde las concentraciones más baja aparecen diferencias con el control. Estadísticamente aparecen cuatro grupos diferentes llegando a ser la diferencia de hasta tres centímetros de longitud entre el control y la concentración del 1 %.

En las semillas cuya exposición a EMS fue de 24 horas los resultados son similares a los vistos en el tiempo de exposición de 12 horas, todos los valores medios disminuyen en las concentraciones estudiadas con respecto al control, siendo las concentraciones correspondientes al 0,7 % y al 1 % las que más se alejan del mismo. En este caso aparecen cinco grupos con diferencias estadísticas significativas (Figura 31).



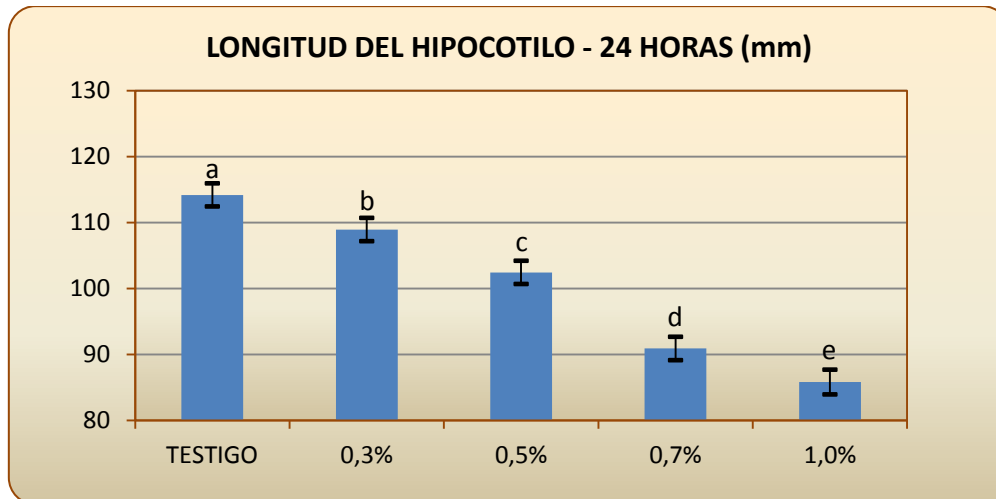


Figura 31.- Longitud media del hipocotilo en el tratamiento de 12 y 24 horas a diferentes concentraciones de EMS. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre grupos ( $p \leq 0,05$ ). Las barras de error indican el error estándar.

Además de analizar y comparar los valores medios de longitud se ha estudiado también la distribución de los valores de esas longitudes clasificándolos en cinco grupos preestablecidos que han sido:

1. Semillas que están germinando en el momento de la toma de datos.
2. Plántulas que median entre 0 y 5 cm.
3. Plántulas que median entre 5 y 10 cm.
4. Plántulas que median entre 10 y 15 cm.
5. Plántulas que median más de 15 cm.

En la Figura 32 aparece la distribución de todas las plántulas en función de los cinco grupos anteriores tanto para el tratamiento de 12 como para el de 24 horas. En el primer caso el cuarto grupo, correspondientes a plántulas que miden entre 10 y 15 cm, y que son las mayoritarias en el grupo control, pierde fuerza en todos los tratamientos hasta que en el tratamiento correspondiente a la concentración del 1 % el más numeroso llega a ser el grupo tres, con plántulas que miden entre 5 y 10 cm.

En el análisis de frecuencias para la exposición de 24 horas y de igual forma que ocurrió en el tratamiento de 12 horas, en el control el grupo mayoritario es el correspondiente a plántulas que miden entre 10 y 15 cm, conforme se van aumentando las concentraciones de EMS este grupo va disminuyendo en favor del grupo tres, es decir de plántulas que miden

entre 5 y 10 cm, si bien en este caso y a diferencia del tiempo de exposición de las semillas de 12 horas aparece el grupo dos - plantas que miden entre 0 y 5 cm- con un número significativo de plántulas en las dos concentraciones mayores: 0,7 y 1 % (Figura 32).

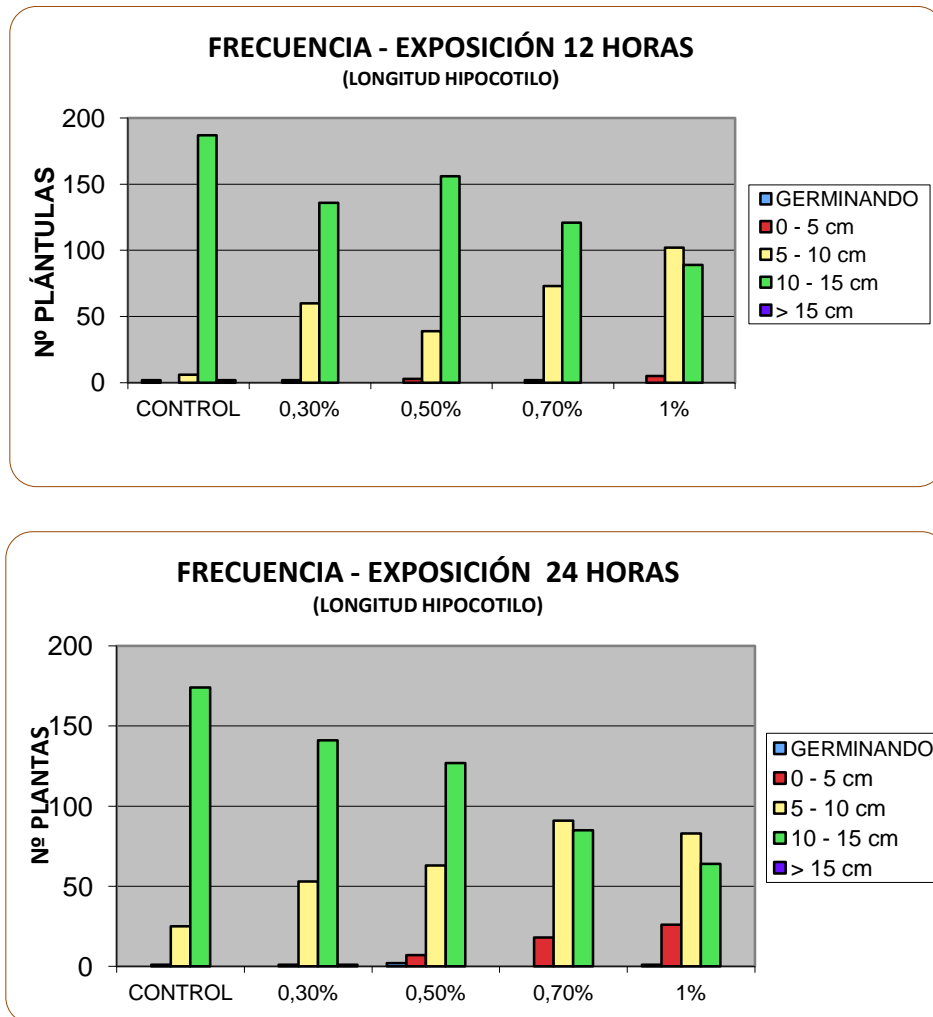


Figura 32.- Frecuencia en la que aparecen los diferentes grupos de longitudes de hipocotilo en cada una de las concentraciones estudiadas para un tiempo de exposición de 12 y 24 horas. 12 días desde siembra.

#### 4.1.2.2.- Ensayo 2.-

En la Figura 33 se muestran los resultados de los valores medios de la longitud del hipocotilo para el segundo ensayo. Las diferencias entre el control y los tratamiento son superiores a los mostrados en el ensayo 1 llegando incluso a diferencias de más de 5 cm., si bien no existe diferencia entre las dos concentraciones estudiadas obteniendo ambas resultandos muy similares: 32,9 mm y 31,5 mm para 1,5% y 2% respectivamente, es por ello que aparecen dos grupos con diferencias estadísticas significativas.

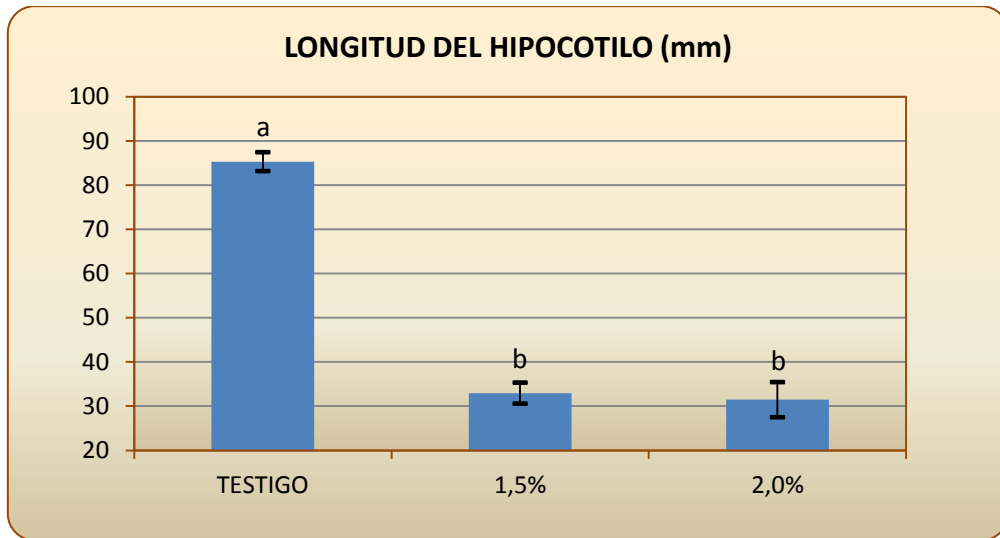


Figura 33.- Longitud media del hipocotilo en plántulas de calabacín cuyas semillas han sido tratadas con EMS al 1,5 y 2 % durante 24 horas. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre grupos.  $p \leq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.



Figura 34.- Diferencia de longitudes entre plántulas control (izquierda) y plántulas cuyas semillas se trataron durante 24 horas con una disolución de EMS al 1,5 % (derecha). Las plántulas se fotografiaron 14 días desde siembra.

Al estudiar las frecuencias con que se repetían las diferentes longitudes en este segundo ensayo se han utilizado los siguientes grupos:

1. Semillas que están germinando en el momento de la toma de datos.

2. Plántulas que median entre 0 y 5 cm.
3. Plántulas que median entre 5 y 10 cm.
4. Plántulas que median más de 10 cm.

Tal y como puede verse en la Figura 35 la distribución que se produce en las dos concentraciones estudiadas, aunque con la diferencia en el número de plántulas que ya se vio en el apartado de la germinación, la distribución en los grupos de desarrollo es muy similar, con más del 58 y del 48% de plántulas con una longitud de entre 0 y 5 cm para las concentraciones de 1,5 y 2 % respectivamente, distribución totalmente opuesta el control donde este grupo apenas supone el 5 % de sus plántulas.

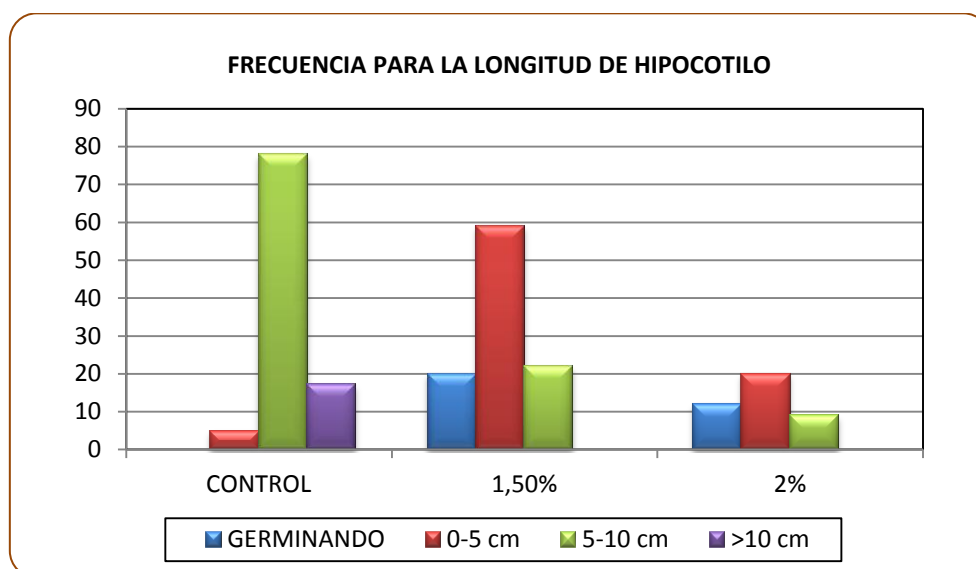


Figura 35.- Frecuencia en la que aparecen los diferentes grupos de longitudes de hipocotilo en cada uno de las concentraciones estudiadas para un tiempo de exposición de 24 horas. Medidas tomadas 14 días después de la siembra.

Como conclusión puede decirse que la longitud del hipocotilo está condicionada por el tratamiento de las semillas con EMS. Si el retraso en la germinación hubiera sido uniforme en todos los ensayos y con todas las concentraciones cabría la duda de si la diferencia en la longitud del hipocotilo se debía tan solo a un retardo en el crecimiento y sería necesario esperar a ver el desarrollo de esas plántulas como plantas adultas. Pero los valores en la germinación en los tratamientos expuestos durante 12 horas indicaban que no había diferencias estadísticamente significativas entre control y tratamientos, luego en este caso las

diferencias no son consecuencia de un retardo en la germinación y puede afirmarse que son debidas al tratamiento de las semillas con EMS.

Dado que los tratamientos con EMS han disminuido significativamente el tamaño de las plántulas de una forma dependiente de dosis, este parámetro podría ser utilizado para determinar la dosis óptima de EMS a la hora de generar una colección de mutantes en calabacín. Para ello sería necesario evaluar la fertilidad de las plantas adultas, y en base a este último parámetro determinar la longitud de la plántula óptima para que el tratamiento sature de mutaciones el genoma de *C. pepo* pero no disminuya considerablemente la fertilidad de las plantas mutantes.

#### **4.1.3.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE EL GROSOR DEL HIPOCOTILO.-**

El grosor es junto con la longitud del hipocotilo uno de los indicadores del grado de desarrollo que tiene una plántula, al concluir la fase de semillero es determinante para garantizar el éxito en campo después del transplante.

Tanto en el primer ensayo como en el segundo la medida fue tomada siempre en la base del hipocotilo. En el ensayo 1 la medida fue tomada a los 12 días desde la siembra para el tratamiento de 12 y de 24 horas y en el ensayo 2 la medida fue tomada a los 14 días desde la siembra.

##### **4.1.3.1.- Ensayo 1.-**

El grosor del hipocotilo se ve afectado por el tratamiento de las semillas con diferentes disoluciones de EMS tal y como puede verse en el gráfico de la Figura 36 para el ensayo realizado con 12 y 24 horas de tratamiento.

En el tratamiento correspondiente a 12 horas de exposición existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios del grosor en las distintas concentraciones estudiadas, de tal manera que se forman dos grupos que difieren del control. En estos dos grupos los valores medios del grosor son inferiores al obtenido por el testigo.

En el tratamiento en el que se expusieron las semillas 24 a EMS se forman también tres grupos con diferencias estadísticamente significativas si bien en este caso hay dos

concentraciones, 0,3 % y 1 % donde los resultados obtenidos no mantienen diferencias con el control.

Las concentraciones del 0,5 % y del 1 %, al igual que ocurre con el tratamiento de 12 horas tienen un valor medio del grosor del hipocotilo inferior al tratamiento control. (Figura 36).

En ambos casos el valor medio del grosor para el tratamiento control fue de 2,9 mm.

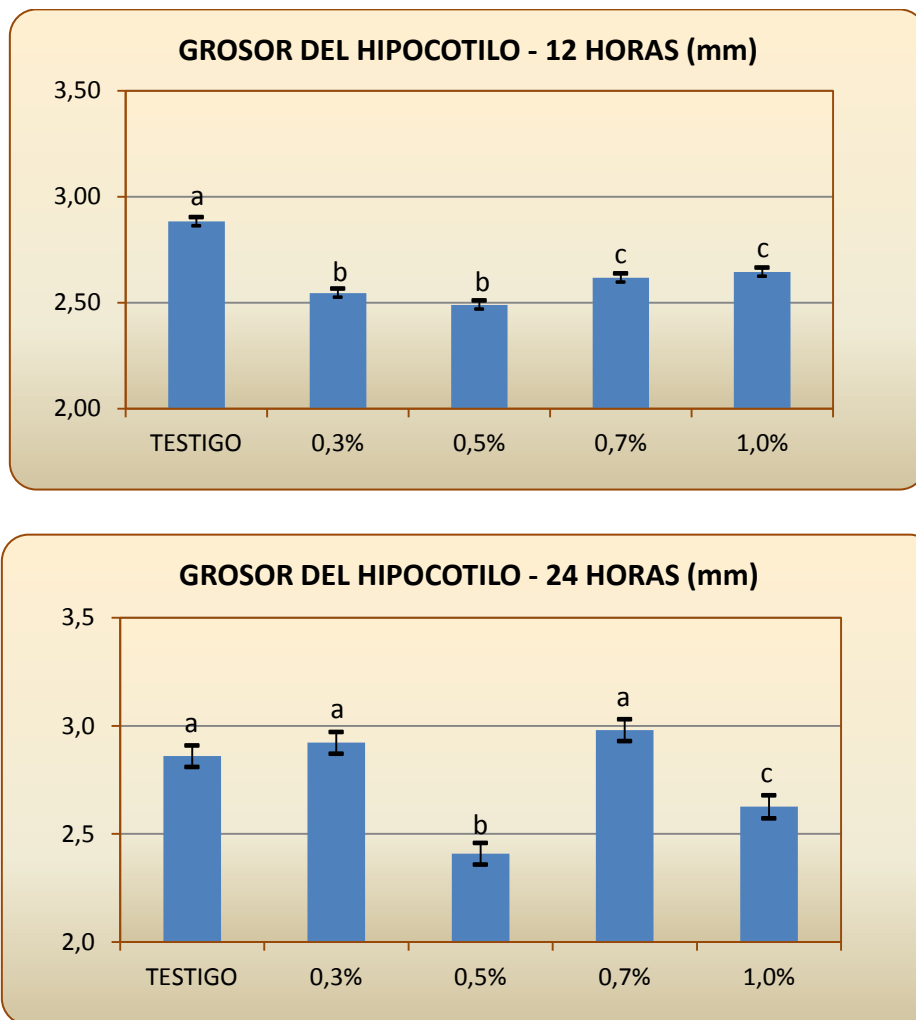


Figura 36.- Grosor medio del hipocotilo en plántulas de calabacín cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de EMS durante 12 y 24 horas. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre grupos.  $p \leq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

#### 4.1.3.2.- Ensayo 2.-

En el Ensayo 2 las dos concentraciones estudiadas, 1,5 % y 2 %, tienen unos valores medios inferiores a los obtenidos en el control y ambas forman un grupo con diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo tal y como se representa en la Figura 37.

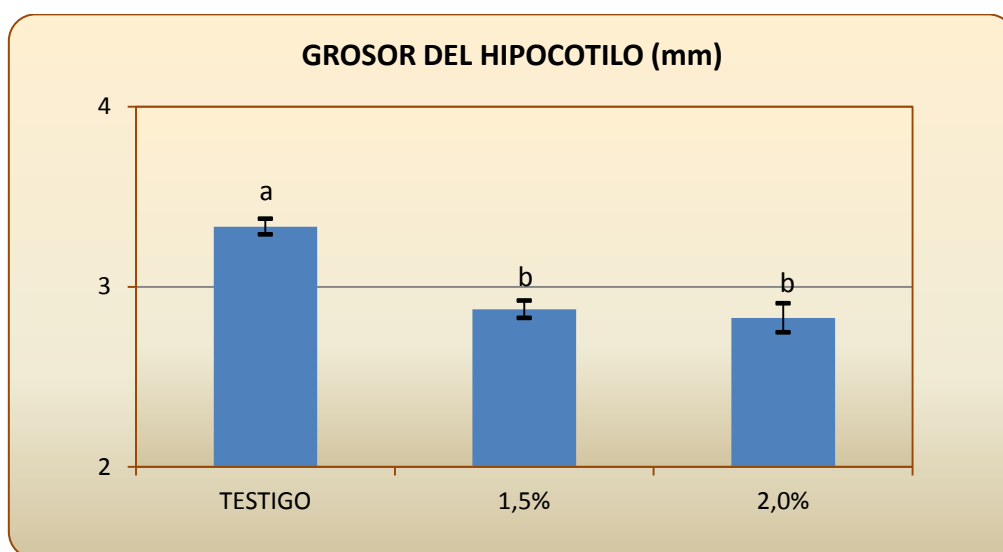


Figura 37.- Grosor medio del hipocotilo en plantas de calabacín cuyas semillas han sido tratadas con EMS 1,5 y 2 % durante 24 horas. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos.  $p \leq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

#### 4.1.4.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE EL NÚMERO DE HOJAS.-

Con este análisis se pretendía obtener una primera valoración de la evolución en el desarrollo de la plántula una vez pasados los primeros estadios de germinación y desarrollo de los cotiledones. Conocer si la exposición de las semillas a los tratamientos con EMS acelera, retarda o inhibe el inicio en el desarrollo foliar es un dato imprescindible que puede condicionar el posterior desarrollo de la planta en campo.



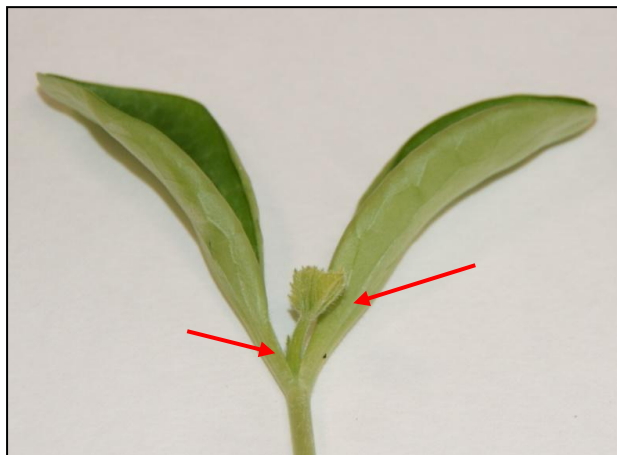


Figura 38.- Plántula correspondiente al Ensayo 1 cuya semilla se expuso durante 24 horas a una disolución de EMS al 0,3 %.

Para conocer el grado de desarrollo foliar se tomó nota del número de hojas que habían iniciado el desarrollo en cada una de las plántulas. En la Figura 38 se muestra una plántula correspondiente al ensayo 1 en la que se señalan a modo de ejemplo las dos hojas que han iniciado el desarrollo.

#### **4.1.4.1.- Ensayo 1.-**

Los valores medios en el número de hojas que han iniciado el desarrollo en el ensayo 1 son bastante homogéneos, si bien hay algunas concentraciones que mostraron diferencias significativas respecto al control (Figura 39). Los únicos tratamientos que disminuyeron significativamente el crecimiento de las plantas, y por tanto el número de hojas por planta, fueron los tratamientos con 0,5 % de EMS durante 12 y 24 horas, y el tratamiento con 1 % EMS durante 24 horas. Este último tratamiento produjo un descenso muy importante con respecto al resto de las concentraciones estudiadas. Es necesario recordar que esta concentración ha tenido valores significativamente inferiores en lo que a germinación y longitud del hipocotilo se refiere, de manera que cabía esperar un retardo en el desarrollo foliar debido al menor desarrollo de estas plántulas. El resto de los tratamientos no alteraron el número medio de hojas por plántula (Figura 39).

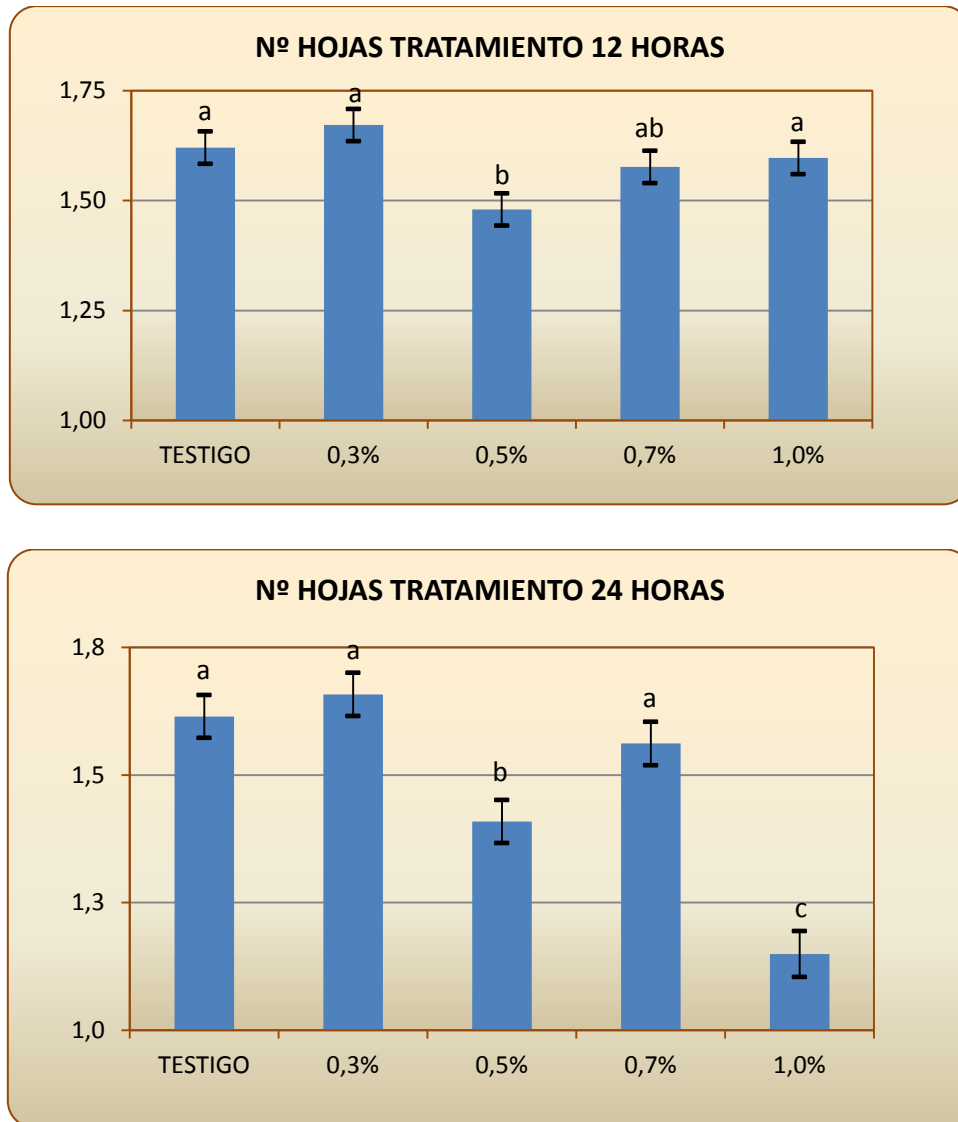


Figura 39.- Efecto de los tratamientos con EMS sobre el número de hojas por plántula. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos.  $p \leq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

#### 4.1.4.2.- Ensayo 2.-

En el Ensayo 2 aparecen dos grupos con diferencias estadísticamente significativas uno formado por el control y el otro por las dos concentraciones estudiadas. En este caso y debido al aumento en las dosis de trabajo, las dos presentan unas diferencias importantes con respecto al testigo (Figura 40). Cabe destacar que el número de plantas que aun no presentan el ápice de crecimiento de la primera hoja desarrollado es muy alto.

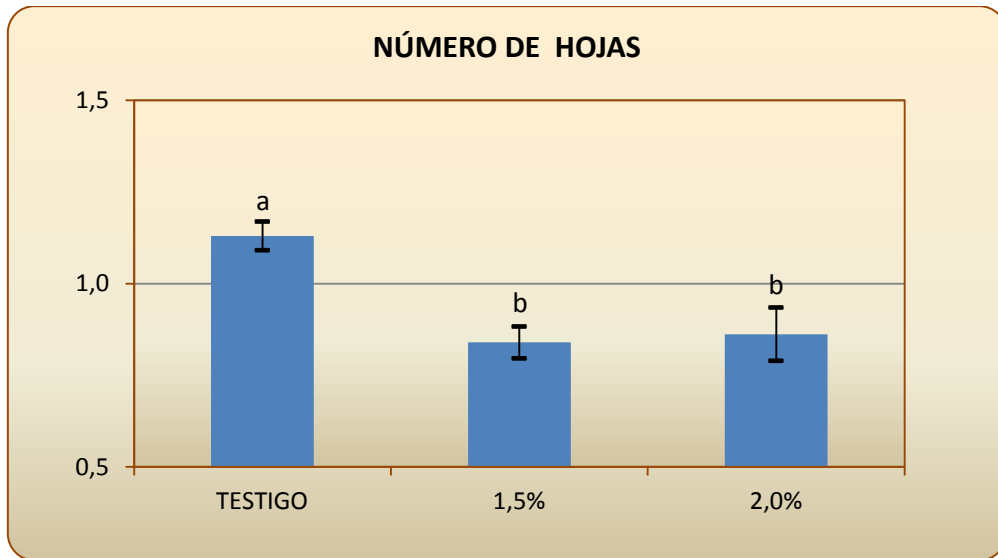
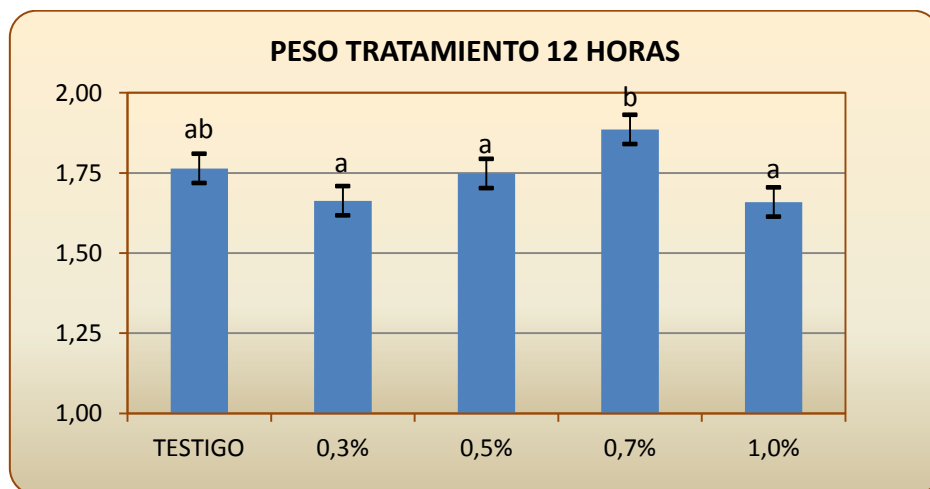


Figura 40.- Efecto de los tratamientos con 1,5 % y 2 % EMS sobre el número de hojas por plántula. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos.  $p \leq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

#### 4.1.5.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE EL PESO FRESCO DE LA PLÁNTULA.-

En la Figura 41 se muestran los resultados obtenidos para el tratamiento con EMS durante 12 y 24 horas. En el tratamiento de 12 horas aparecen dos grupos con diferencias estadísticamente significativas tal y como representan las letras en el gráfico. En el caso del tratamiento durante 24 horas no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de EMS estudiadas y el control.



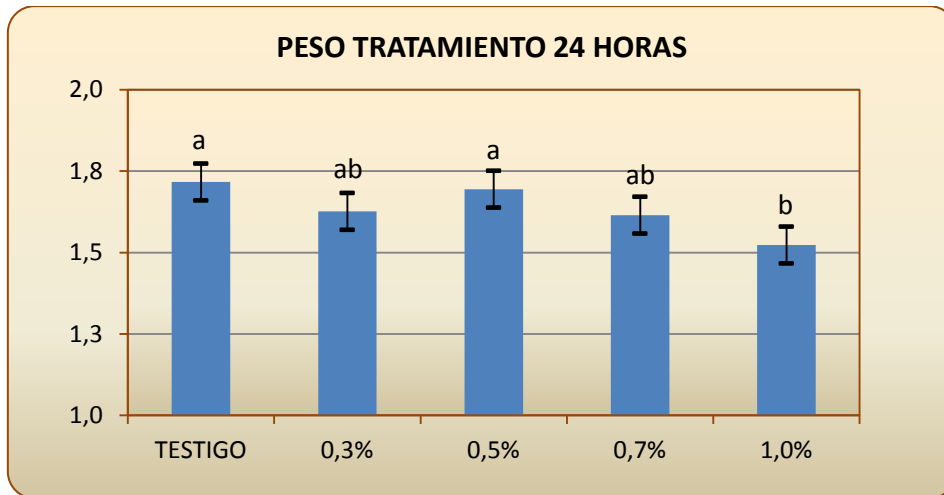


Figura 41.- Peso medio de las plántulas para las diferentes concentraciones de EMS con las que se han tratado las semillas. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD) para  $p < 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

Aunque el EMS ha reducido el crecimiento vegetativo de las plántulas, el efecto del EMS sobre el grosor del hipocotilo, el número de hojas por plántula, y el peso fresco de las plántulas no ha dependido de la dosis del mutágeno. Esto hace que estos parámetros de crecimiento no sean los ideales a la hora de determinar la dosis óptima en experimentos futuros de mutagénesis de esta especie.

#### 4.1.6.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN PLÁNTULAS.-

Tal y como se explicó en el apartado correspondiente de Material y Métodos, la medida de la clorofila en los cotiledones de las plántulas se realizó de dos formas diferentes, los resultados de la primera de ellas se muestran en la Figura 42 y corresponden a la medida que se realizó de manera manual con un espectrómetro manual de campo. Puede verse claramente como aparecen cuatro grupos diferentes con valores muy dispares, apareciendo, en este caso, valores medios superiores e inferiores al valor medio correspondiente al control (Figura 42). Esta falta de efecto de dosis indicaría que los resultados de estas medidas no son muy fiables para determinar el efecto de los tratamientos con EMS.

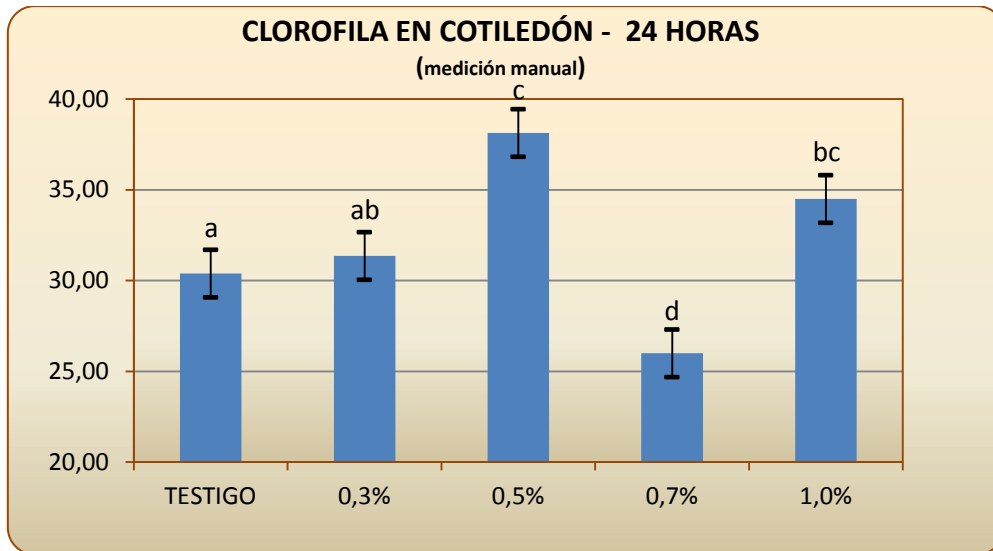


Figura 42.- Comparación de la concentración de clorofila en los cotiledones de las plantas control y plantas cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de EMS. Las medidas se tomaron a los 12 días desde la siembra. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos.  $p \leq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

La segunda medida de la clorofila se realizó con un espectrómetro automático, siguiendo el protocolo de trabajo desarrollado a tal efecto y cuyos resultados aparecen en la Figura 43. En este caso los resultados que se obtuvieron fueron homogéneos, de tal manera que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos correspondientes a cada una de las concentraciones con las que se trataron las semillas.

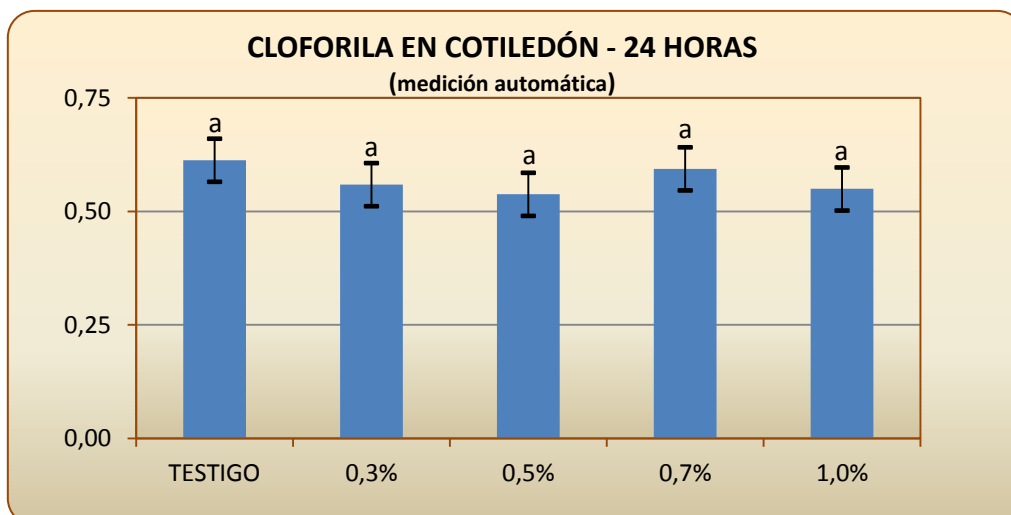


Figura 43.- Comparación de la concentración de clorofila en los cotiledones de plantas control y plantas cuyas semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de EMS. Las medidas se realizaron a los 12 días desde la siembra. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre grupos.  $p \geq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

Las discrepancias aparecidas entre estos resultados y los que se obtuvieron mediante la medida manual puede venir determinada por el sistema de medición que utiliza el propio espectrómetro manual de campo ya que da el valor de la clorofila en un punto de la hoja, o del cotiledón como es este caso, y eso puede provocar errores si la superficie que se desea medir no tiene un color homogéneo en toda la superficie. En la Figura 44 se muestra un cotiledón con una evidente distribución heterogénea de la clorofila en su superficie.

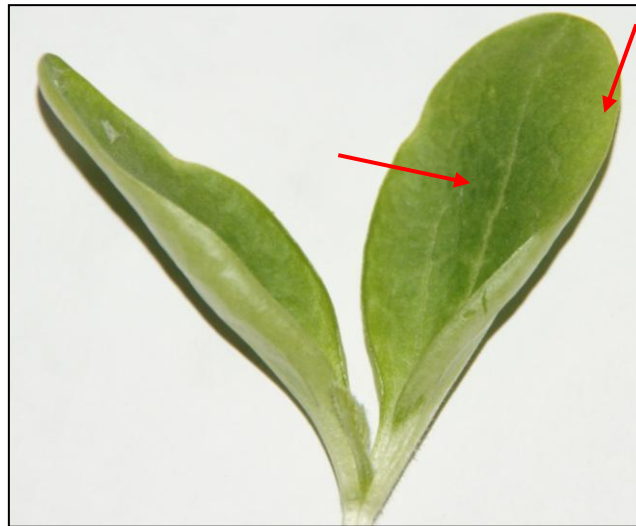


Figura 44.- Plántula correspondiente al Ensayo 1 cuya semilla se expuso durante 24 horas a una disolución de EMS al 0,3 %.

Los efectos del EMS sobre la cantidad de clorofilas vuelven a ser independientes de la dosis utilizada, lo que indicaría que este parámetro no se ve afectado en todas las plantas y que por tanto no es el más idóneo para evaluar el poder mutagénico de cada una de las dosis sobre el genoma.

#### **4.2.- EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON EMS SOBRE LAS PLANTAS ADULTAS DE CALABACÍN.-**

En este apartado se muestran todos los resultados obtenidos en las mediciones llevadas a cabo en el invernadero durante el periodo de cultivo:

1. Porte de la planta
2. Expresión sexual
3. Clorofila en hojas

4. Morfología de las hojas
5. Cuajado de frutos
6. Fertilidad

#### 4.2.1.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE EL PORTE DE LA PLANTA.-

Todas las plantas llevadas a campo fueron clasificadas de acuerdo con su vigor en cinco grupos. El grupo 5 correspondía a plantas de vigor normal, mientras que las planta de vigor 1 fueron plantas que apenas tenían vigor y cuyo crecimiento estaba bastante comprometido. El grupo de vigor 0 representa a plantas cuyo crecimiento apical se cegó una vez transplantadas al invernadero. Los resultados se muestran en la Figura 45.

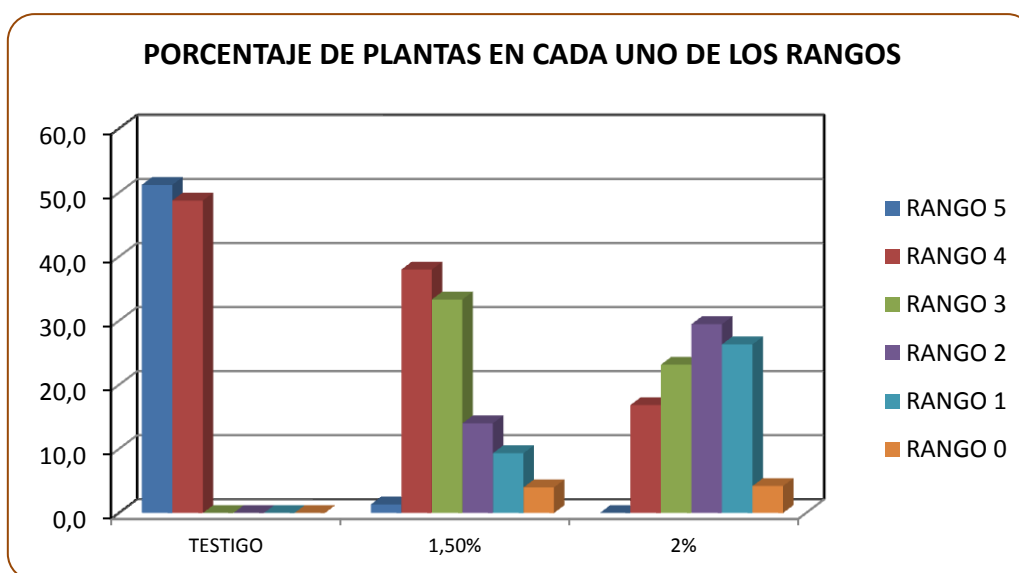


Figura 45.- Efecto del tratamiento con EMS sobre el vigor de las plantas en invernadero. Las plantas se fenotiparon en 6 grupos de acuerdo con su vigor.

En el tratamiento testigo el 100 % de las plantas se encontraban en los dos rangos de mayor desarrollo y vigor, el 4 y el 5, mientras los valores de estos rangos bajan hasta algo más del 39 % y del 16 % para el tratamiento de 1,5% y 2% respectivamente (Figura 45). En el tratamiento correspondiente al 1,5 % el grueso de la plantas, el 71,3 %, se encuentran en los niveles 3 y 4, siendo en este caso casi insignificante el porcentaje que corresponde al rango 5. Al subir la dosis de EMS se produce un descenso en el porte de las plantas de manera que en el tratamiento correspondiente al 2 % casi el 56 % de las plantas están en el rango 1 y 2. Es importante recordar que el rango 1 corresponde a plantas con el nivel de desarrollo menor, siendo, en algunos casos dudosa la viabilidad posterior de la planta.

Casi el 100% de las plantas que correspondían al tratamiento 1,5 % y que estaban en los rangos inferiores 1 y 2 se encontraban en el grupo de plantas que tuvieron una germinación muy retrasada ya que sobrepasaron los tiempos de germinación que se consideran medios para el calabacín. En la Figura 46 pueden verse algunos ejemplos de los diferentes desarrollos alcanzados por las plantas en el invernadero.



Figura 46.- A) Lineos del tratamiento control con un crecimiento homogéneo de las plantas B) Detalle de una planta del tratamiento control. C) Plantas más desarrolladas pertenecientes al tratamiento del 1,5 %. D) Plantas menos desarrolladas pertenecientes al tratamiento del 1,5 %. E) y F) Detalle de dos plantas derivadas de semillas al tratadas con 2 % EMS.



En los dos tratamientos realizados con mutágeno aparece un porcentaje similar de plantas ciegas (Figura 47), en torno al 4 %. Son plantas que iniciaron un desarrollo normal en campo, casi podría describirse como vigoroso en algún caso y que posteriormente perdieron el ápice de crecimiento.



Figura 47.- Detalle de una planta ciega correspondiente al tratamiento del 2% EMS.

Puede concluirse afirmando que el tratamiento de las semillas con las dos concentraciones de EMS estudiadas, 1,5 % y 2 % afectan tanto al desarrollo final de las plantas de calabacín como al tiempo que estas tardan en alcanzar ese desarrollo máximo.

#### **4.2.2.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE LA EXPRESIÓN SEXUAL.-**

Conseguir una variedad de calabacín en la que el mejore la precocidad y la producción de flores femeninas ha sido uno de los objetivos de los programas modernos de mejora genética de calabacín, todo ello con el fin de conseguir un aumento de la producción y la rentabilidad de los cultivos de esta hortaliza.

En este ensayo se valoraron algunos de los factores que podrían apuntar al posible efecto del EMS sobre la expresión sexual en las plantas.

El efecto del EMS sobre la precocidad y producción de flores femeninas por planta se analiza en las Figuras 48 y 49. El número de flores masculinas iniciales, antes de la aparición de la primera flor femenina, es un indicativo de la precocidad de la producción. Ninguno de los tratamientos con EMS estudiados ha variado significativamente la precocidad (Figura 48) ni la producción de flores femeninas por planta (Figura 49). Las semillas tratadas con 2 %

EMS fueron ligeramente más precoces y han producido más número de flores femeninas por planta que las plantas testigo. No obstante, esas diferencias no fueron significativas (Figura 48 y 49).

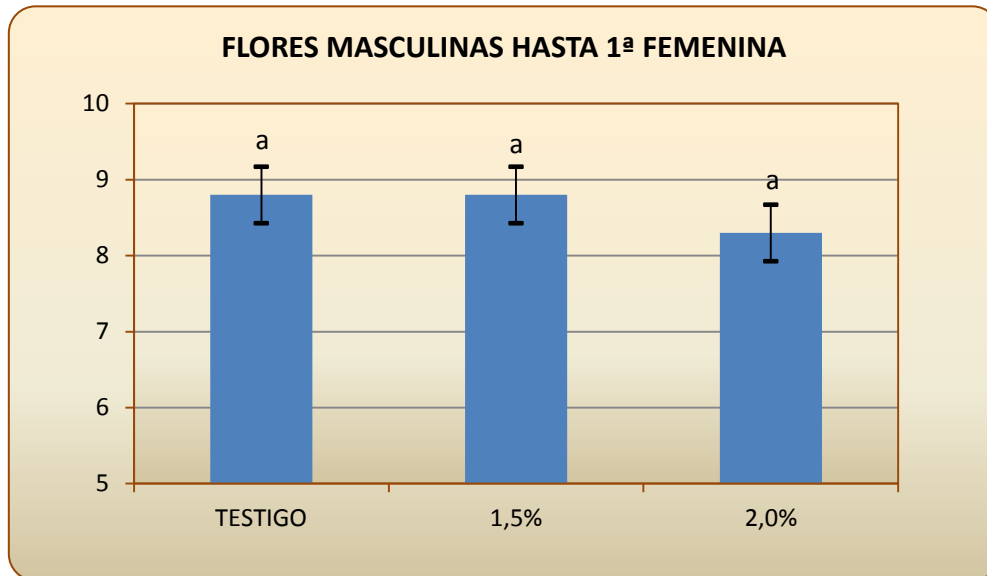


Figura 48.- Efecto de los tratamientos con EMS sobre el número medio de flores masculinas hasta dar la primera flor femenina. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre grupos.  $p \geq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

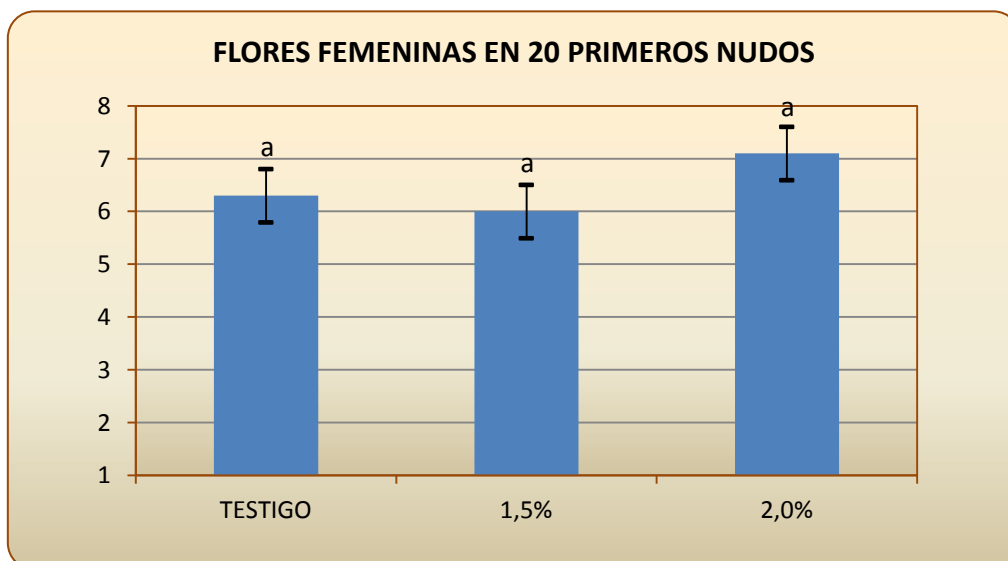
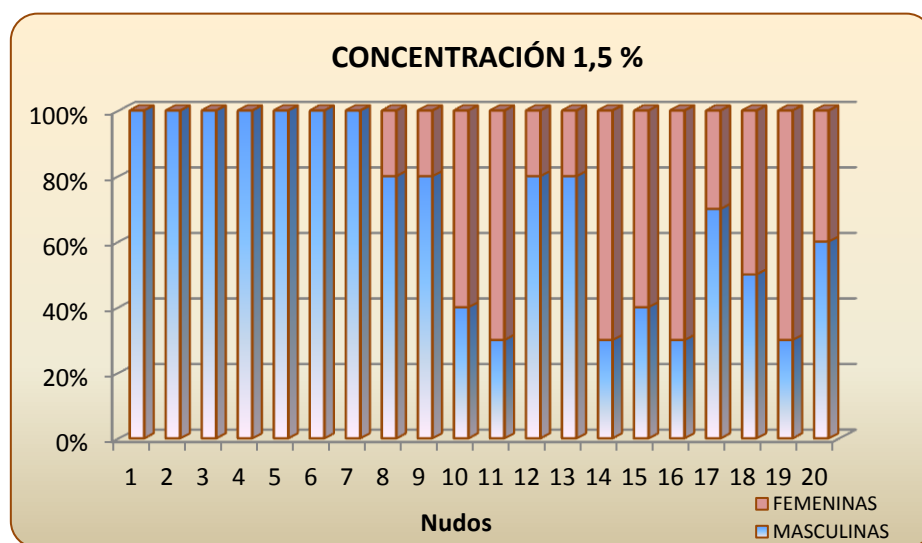
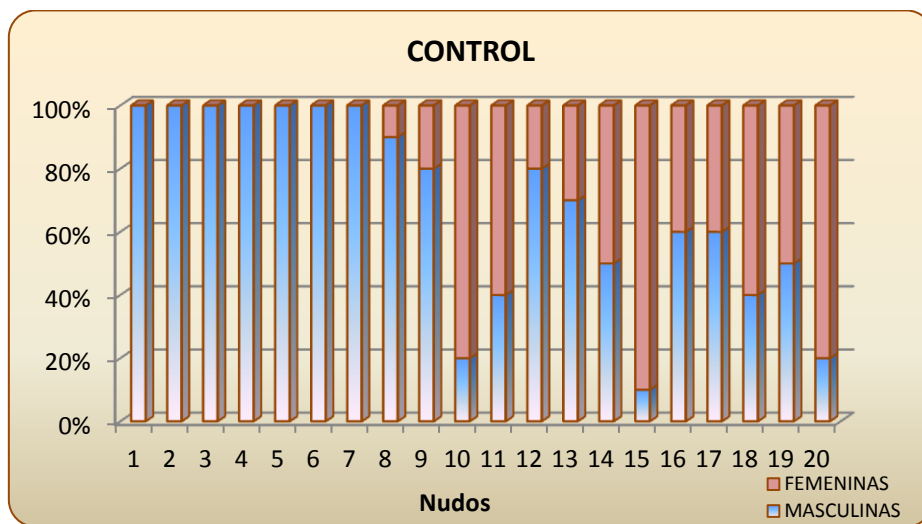


Figura 49.- Efecto de los tratamientos con EMS sobre el número medio de flores femeninas en los veinte primeros nudos de la planta. La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre grupos.  $p \geq 0,05$ . Las barras de error indican el error estándar.

Aunque estos resultados indican que el EMS no afecta a la expresión sexual de la plantas de calabacín, se analizó también la distribución de flores en los nudos del tallo principal de las plantas. Para ello se tomaron los datos de flores masculinas y femeninas que hay en cada uno de los nudos, tanto en el control como en las dos concentraciones de EMS estudiadas, 1,5 % y 2 %. Los resultados se muestran en la Figura 50. La distribución de flores femeninas y masculinas a lo largo de los nudos es muy similar en las plantas control y las plantas tratadas con EMS, lo que vuelve a indicar que el EMS no altera el patrón de expresión sexual del calabacín (Figura 50).



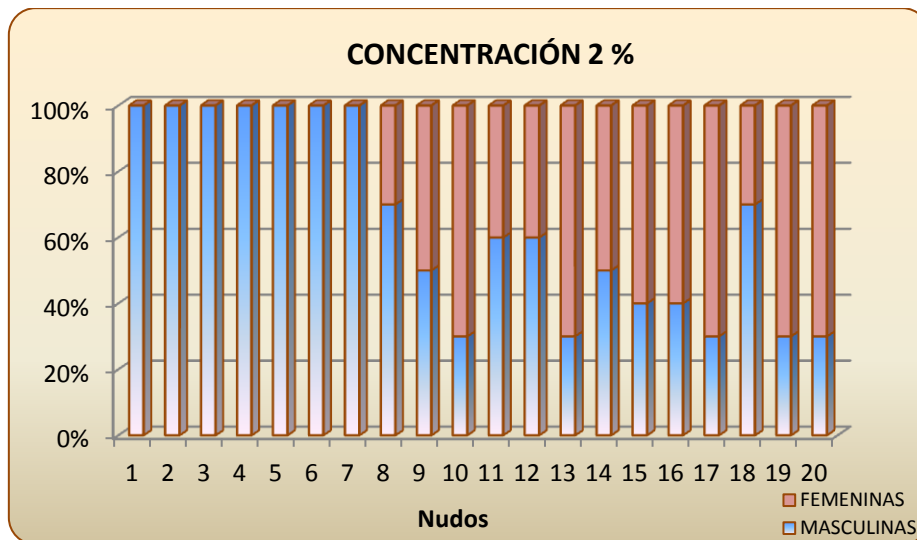


Figura 50.- Comparativa de la distribución de flores femeninas y masculinas en plantas de calabacín control y plantas de semillas tratadas con 1,5 % y 2 % EMS.

La figura 51 muestra la distribución de flores masculinas y femeninas a lo largo del cultivo de calabacín (nudos). Los resultados indican, de nuevo, que los tratamientos no han modificado significativamente la proporción de los dos tipos florales a lo largo de la evolución del cultivo.

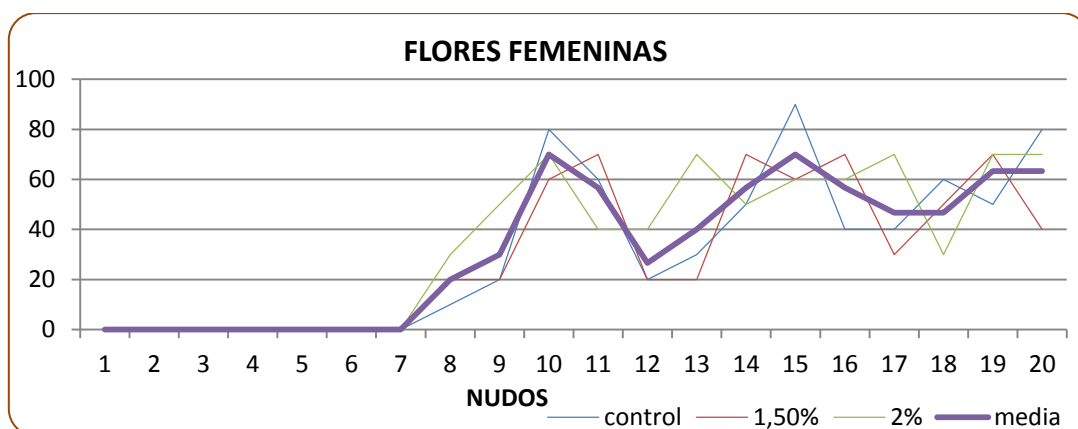
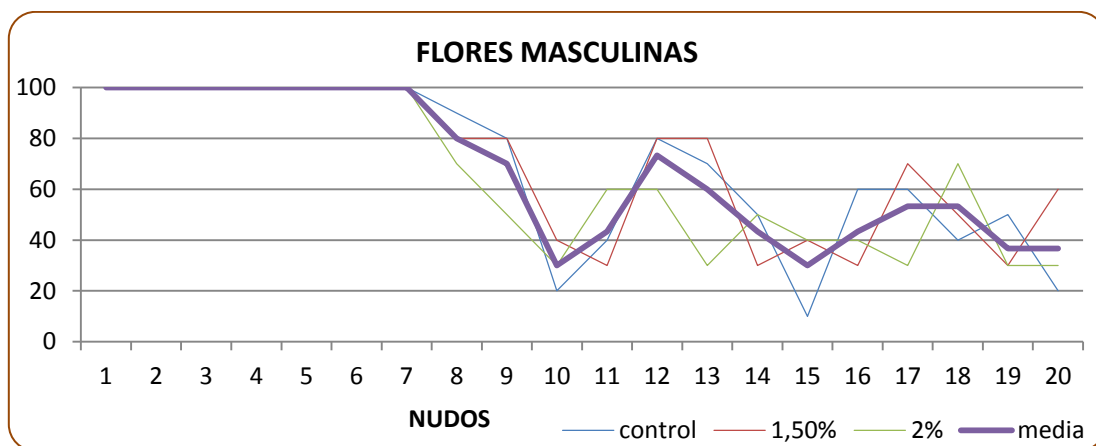


Figura 51.- Distribución de flores femeninas y masculinas a lo largo del desarrollo de las plantas de calabacín. Se comparan las plantas control con aquellas derivadas de semillas tratadas con EMS al 1,5 % y 2 %.

Los tratamientos con 1.5% y 2% EMS no han modificado la expresión sexual de calabacín. De hecho, no se han detectado alteraciones significativas ni en el número de flores femeninas por planta ni en la precocidad de la floración femenina. Tampoco se ha detectado ninguna alteración en la distribución de flores femeninas y masculinas en el tallo principal. Aunque las plantas pueden estar mutadas en alguno de los genes que regulan este carácter, sin embargo, dichas mutaciones deben de ser recesivas y no se observarán hasta la generación M2.

#### **4.2.3.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE EL DESARROLLO FLORAL.-**

En general, las flores femeninas y masculinas de las plantas control presentaron una morfología correcta. Sin embargo, muchas de las flores de las plantas procedentes de las semillas tratadas con EMS mostraron diferentes alteraciones en su desarrollo. El número de flores con alteraciones morfológicas se hacía mayor conforme la planta tenía un menor desarrollo vegetativo, es decir presentaban alteraciones en sus hojas, o tenía alguna alteración en su apariencia externa: color, forma...etc. El número de plantas que presentaron flores masculinas con anomalías fue superior en las plantas que procedían de semillas tratadas con la mayor dosis de EMS (2%), por el contrario en el control no se encontró malformación alguna en las flores masculinas.

Los tratamientos con EMS produjeron tres cambios significativos sobre la morfología de la flor masculina I) una disminución del tamaño de las flores (Figura 52A), II) una disminución significativa de la fertilidad (muchas de las flores masculinas tenían anteras con un aspecto rígido, casi endurecido y sin polen (Figura 52B), y III) un desarrollo anómalo de la corola, lo que impedía en muchos casos la propia abertura de la flor (Figura 52C y 52D).

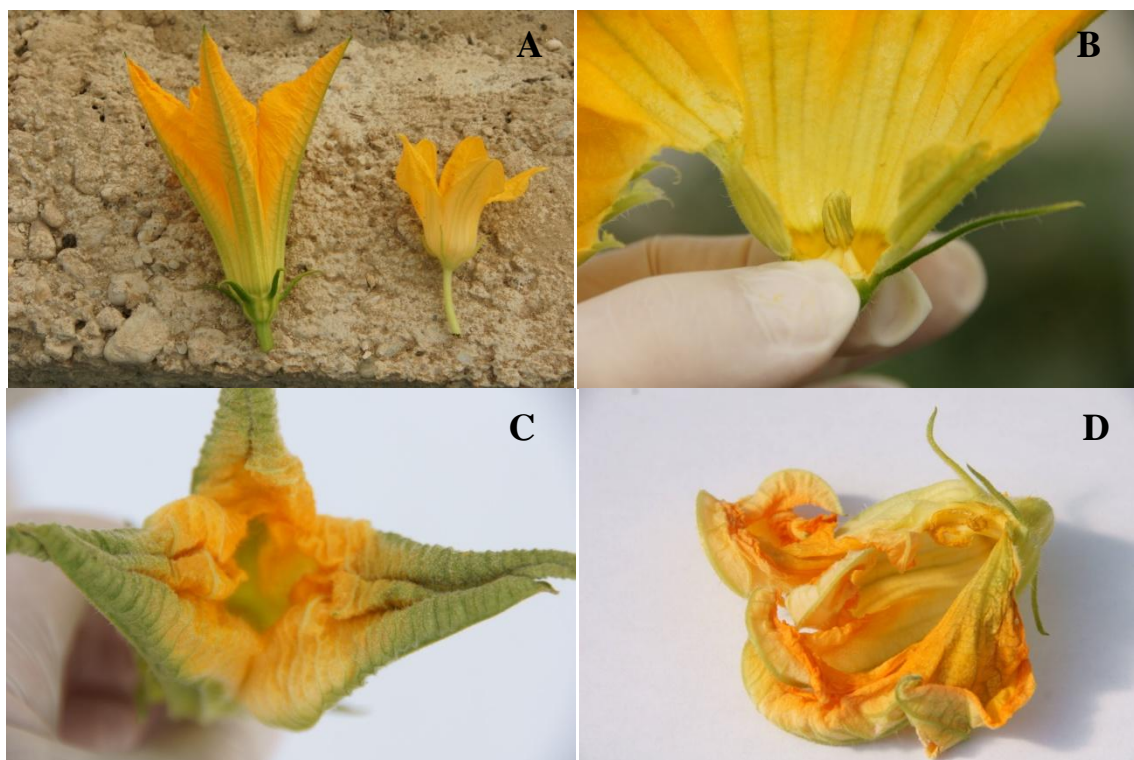


Figura 52.- Efecto de los tratamientos con EMS sobre el desarrollo de la flor masculina de calabacín. A) a la izquierda flor con un tamaño normal procedente del control y a la derecha flor de un tamaño inferior procedente de una planta tratada con EMS. B) estambre sin polen de una flor tratada con EMS. C) Flor de calabacín con una corola mal formada, los pétalos no se han podido separar y la flor permanece casi cerrada. D) estambre con polen, unido a la corola de la flor.

El desarrollo morfológico de las flores femeninas ha sido durante todo el tiempo de cultivo un aspecto más para caracterizar el desarrollo de la propia planta. En el control todas las flores femeninas fueron normales en lo que a tamaño y morfología se refiere y no aparecieron flores con deformaciones. Igual ocurrió en los tratamientos con EMS, tanto para la concentración de 1,5 % como para la de 2 %, en aquellas plantas que presentaban un mayor desarrollo vegetativo (las señaladas en el grupo 4 y 5 del apartado 4.2.1). Por el contrario, en aquellas plantas con peor desarrollo vegetativo, el número de flores femeninas con anomalías fue muy elevado, si bien lo más significativo fue el nivel o el grado de esa malformación, que en la mayoría de los casos impedía que el proceso de polinización pudiera desarrollarse con normalidad y convertían a la planta en estéril.

La corola (Figura 53), el estilo y los estigmas (Figura 54) son las partes de la flor femenina de calabacín más afectadas por los tratamientos con EMS, si bien hay que destacar que cuando las flores tienen alguna de las anomalías anteriores el ovario suele aparecer más

pequeño, piriforme, curvado, etc. En las Figuras 53 y 54 pueden verse algunos ejemplos de flores femeninas con anomalías procedentes de plantas tratadas con EMS.

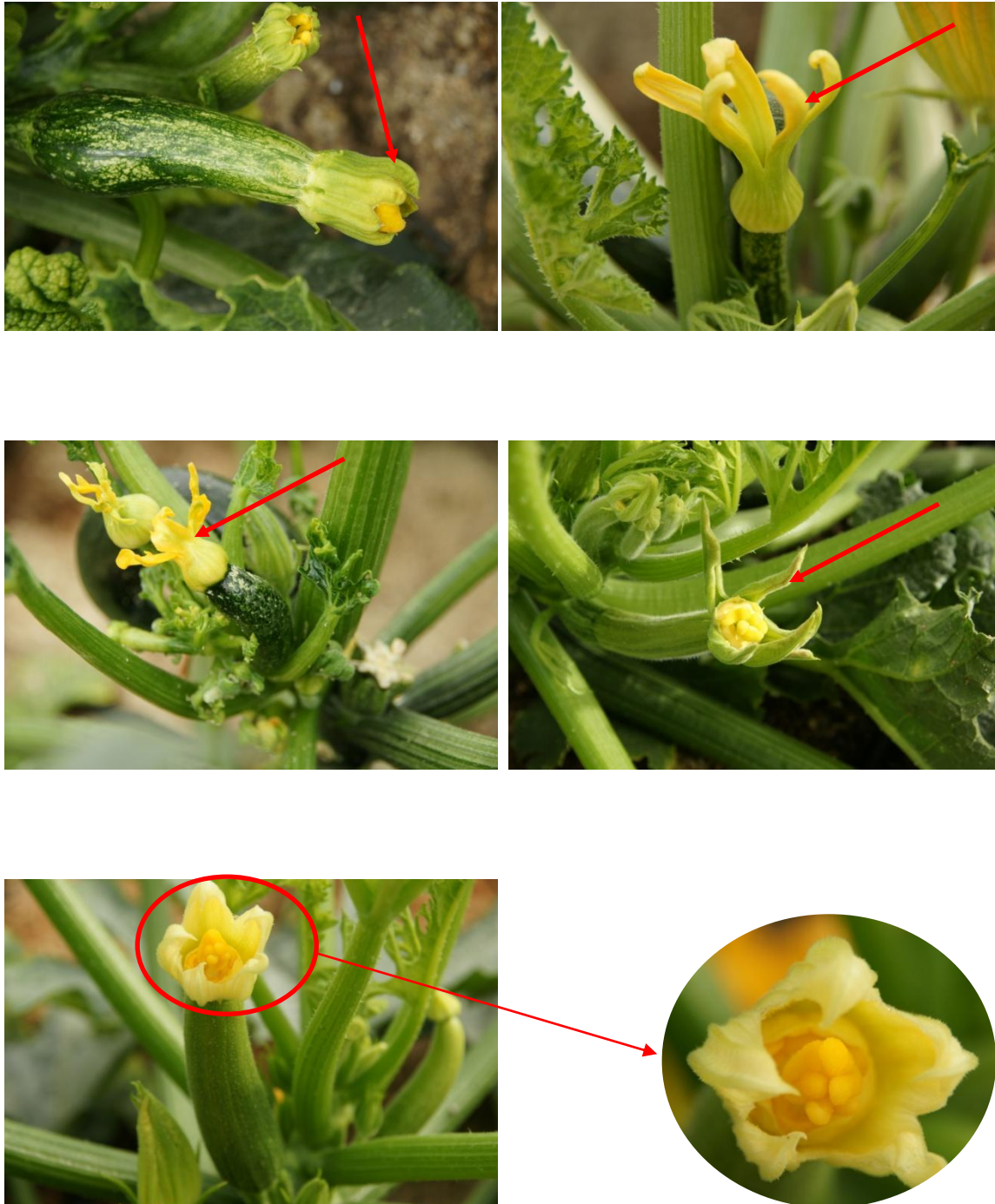
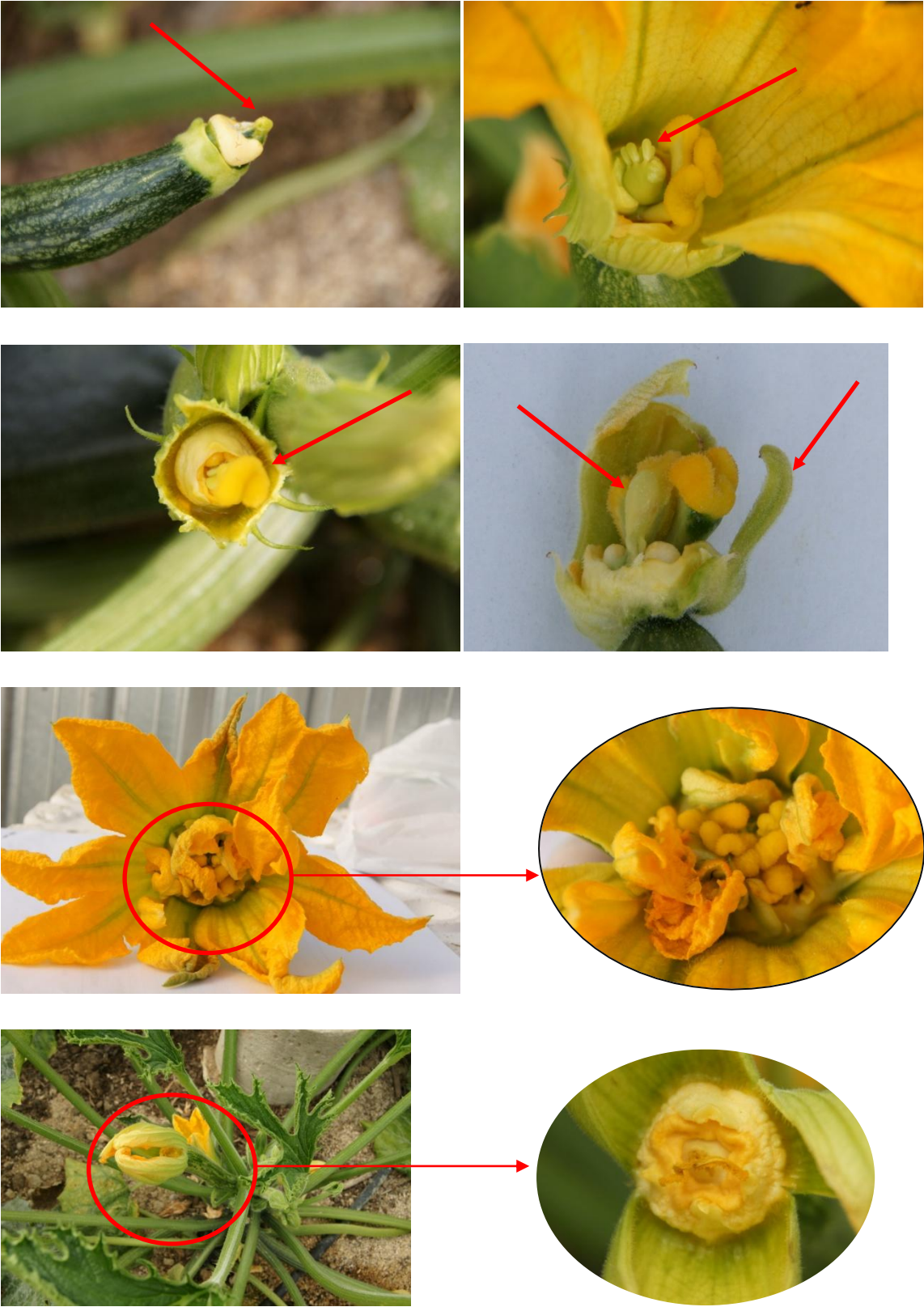


Figura 53.- Efecto de los tratamientos con EMS sobre el desarrollo de los pétalos y la corola de las flores femeninas.





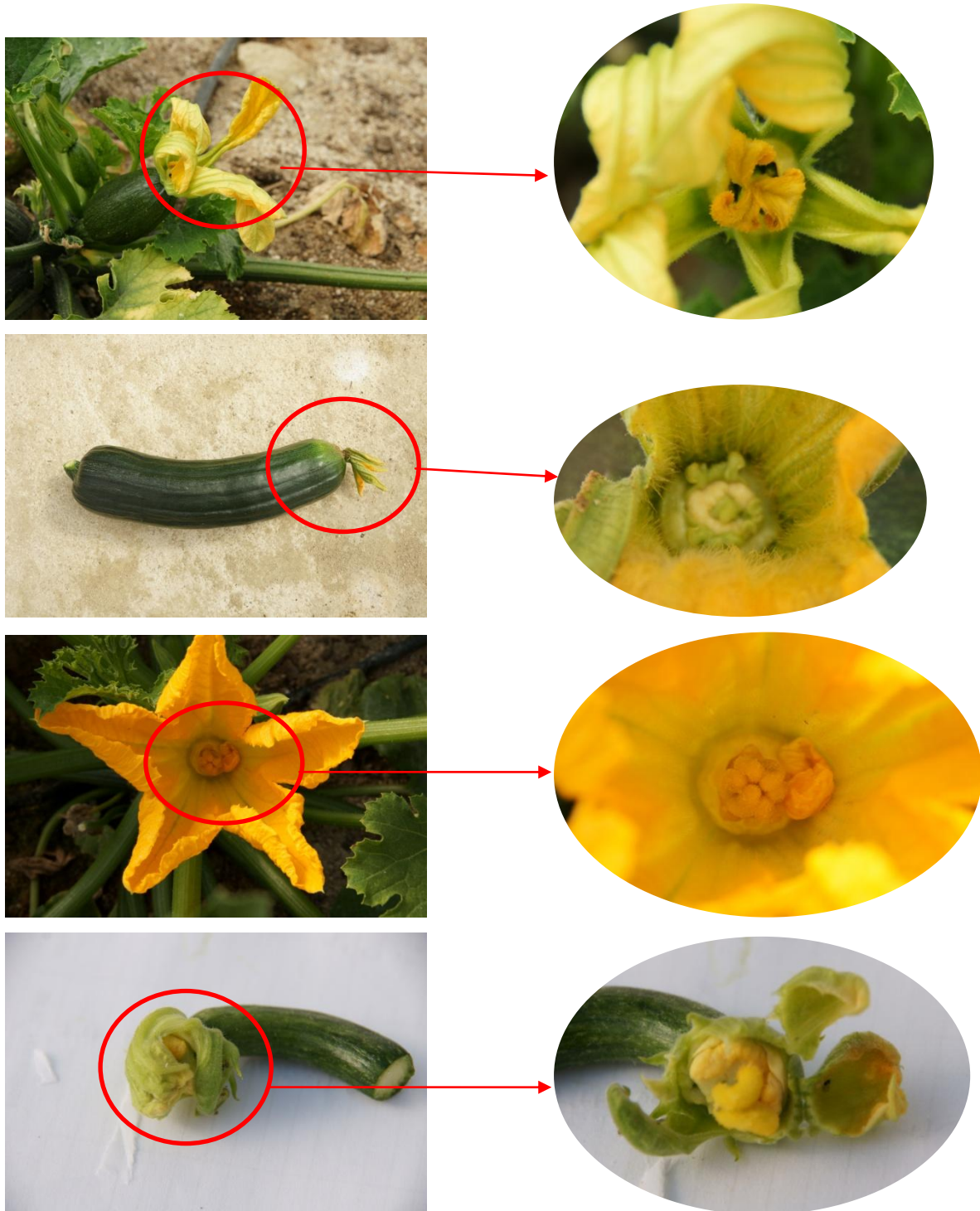


Figura 54.- Efecto de los tratamientos con EMS sobre el desarrollo del estilo y el estigma en las flores femeninas de calabacín.

#### 4.2.4.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE LA CLOROFILA EN PLANTAS DE CALABACÍN.-

Los datos referentes a los valores de clorofila en las hojas fueron tomados siempre sobre la última hoja desarrollada de cada una de las plantas, con el fin de tener un criterio uniforme. Al tratarse de una hoja nueva se evitan los errores derivados de las movilizaciones de nutrientes internos que pudieran darse en la planta y que dependerían, en todo caso, del estado nutricional de la misma.

Los tratamientos con EMS de las semillas indujeron un aumento significativo en la concentración de clorofila de las hojas (Figura 55) de hecho los valores medios de los tratamientos correspondientes a las semillas tratadas con EMS fueron en torno a un 35 % superiores a los valores medios obtenidos en las plantas control.

A priori no se observa diferencia alguna en las medidas correspondientes a las dos concentraciones de EMS 1,5 % y 2 %, siendo sus valores medios prácticamente iguales. Las letras distintas indican que hay dos grupos estadísticamente diferentes, en el primero se encuentra el grupo control y en el segundo se encuentran los dos tratamientos con EMS.

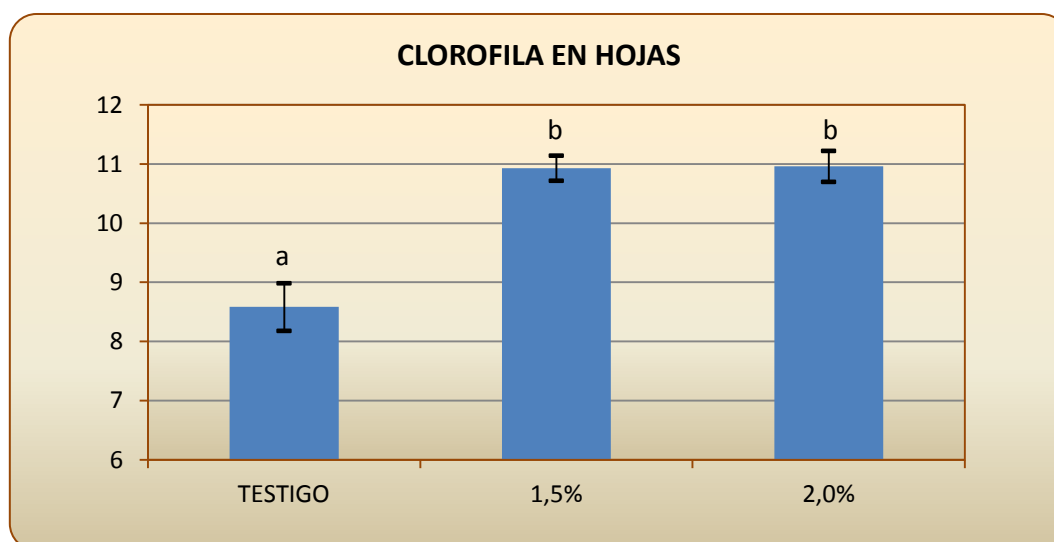


Figura 55.- Concentración media de clorofilas en el ensayo 2 (24 horas de exposición y concentraciones del 1,5 y 2 % EMS). La diferencia entre distintos tratamientos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples (LSD). Las letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre grupos,  $p \leq 0,05$ . Las barras de error corresponden al error estándar.

A pesar de esta clara modificación, en lo que a niveles de clorofila se refiere, se observaron ciertas anomalías en las hojas de algunas plantas, ya que aparecían partes claramente modificadas tal y como pueden verse en las siguientes Figuras:

**Concentración de EMS: 1,5 %**

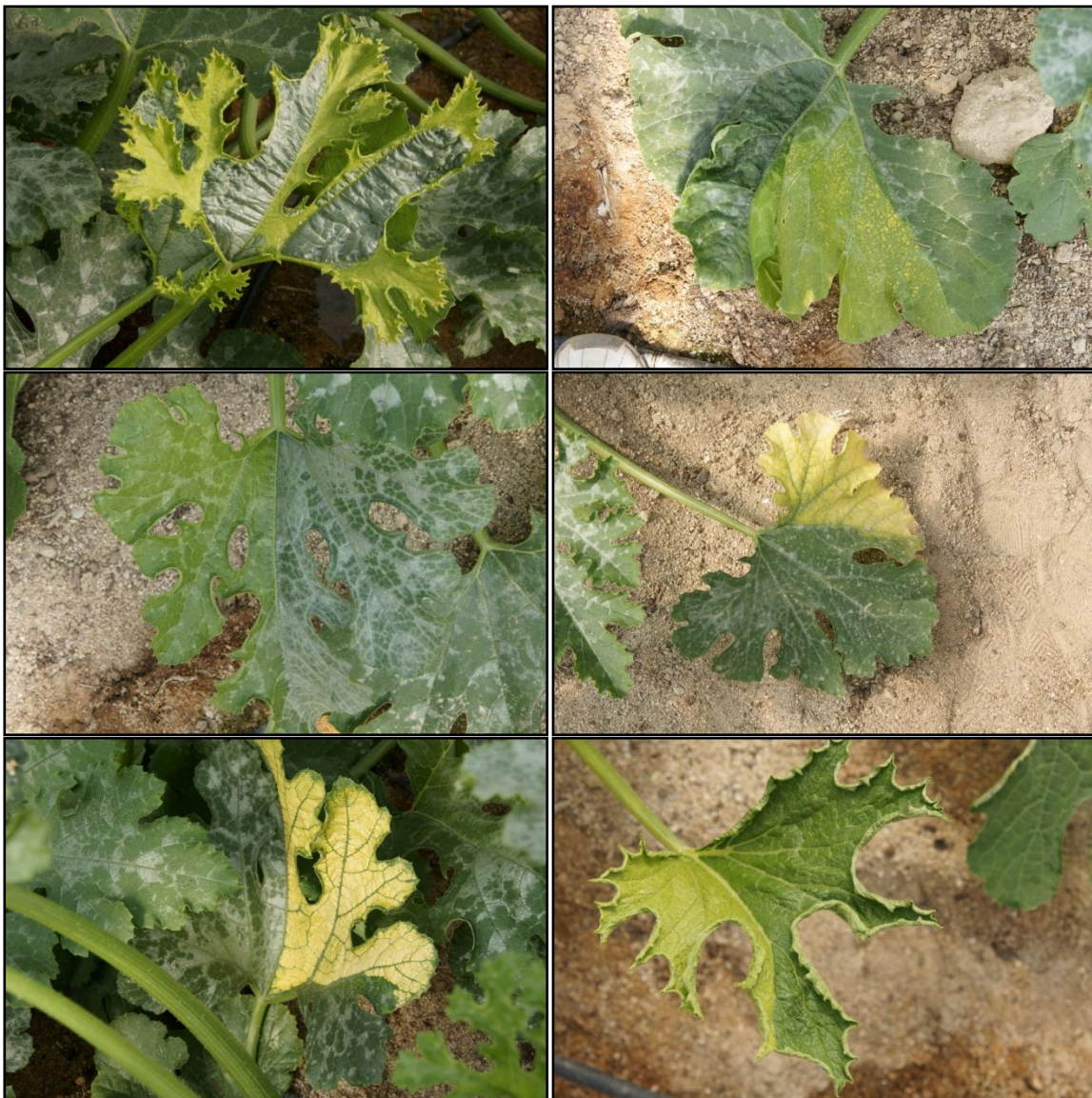


Figura 56.- Hojas de calabacín con diferentes alteraciones en su coloración. Todas pertenecen a plantas cuyas semillas fueron tratadas con una concentración de EMS del 1,5 %.

**Concentración de EMS: 2 %**



Figura 57.- Hojas de calabacín con diferentes alteraciones en su coloración. Todas pertenecen a plantas cuyas semillas fueron tratadas con una concentración de EMS del 2 %.

Entre los días 31 y 40 después del inicio de la plantación en el invernadero se tomó una muestra de plantas de los tratamientos con EMS y del control y se inspeccionaron todas las hojas de las mismas. Es importante destacar que en la muestra sólo se incluyeron plantas con un nivel de desarrollo óptimo y adecuado a los días de plantación, se tuvieron en cuenta las plantas correspondientes a los portes 3, 4 y 5, y se sacaron del muestreo aquellas en las que, tal y como se dijo en su momento, la viabilidad de la planta no podía estar asegurada, portes 1 y 2.

En el tratamiento control todas las hojas presentaban una coloración uniforme y adecuada, mientras que en las plantas que provenían de semillas tratadas con EMS el porcentaje de plantas que tenía alguna hoja con anomalías en el color superaba el 30 %, tanto para la concentración del 1,5 % como para la del 2 % (Figura 58).

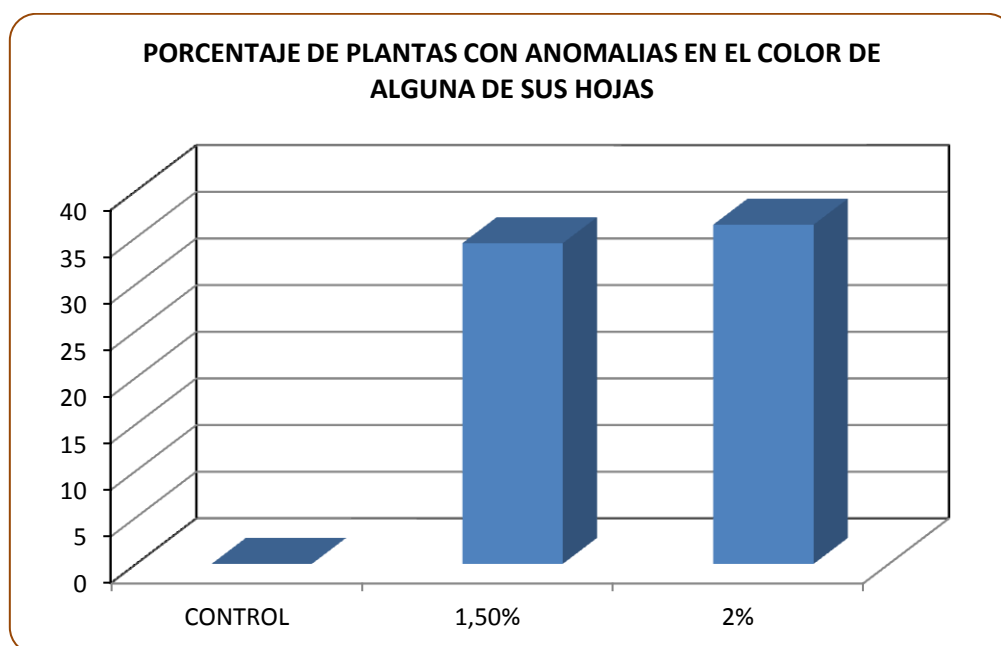


Figura 58.- Comparación del porcentaje de plantas con anomalías en el color de alguna de sus hojas en el tratamiento control en los tratamientos con diferentes concentraciones de EMS.

#### 4.2.5.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS HOJAS.-

En el mismo momento en que se realizó el control en el color de las hojas en las plantas expuesto en el apartado anterior, se realizó otro control visual sobre la forma de las

hojas y su simetría. Solo se tuvieron en cuenta las plantas pertenecientes a los portes 3, 4 y 5 tal y como se explicó en el apartado 4.2.3.

En todas las plantas seleccionadas se hizo un recuento de las hojas que tenían una forma anómala o bien hojas que habían perdido la simetría que caracteriza las hojas de calabacín. Los resultados se muestran en la Figura 59, Las plantas control presentaron todas las hojas con una forma uniforme y simétrica. Sin embargo, el 9 % de las plantas de semillas tratadas con 1,5 % EMS mostraron alguna anomalía en la forma de sus hojas, pero el dato realmente relevante aparece en las plantas cuyas semillas se trataron con una concentración de EMS del 2 % donde prácticamente el 100 % de las plantas tenían alguna de sus hojas deformadas (Figura 59).

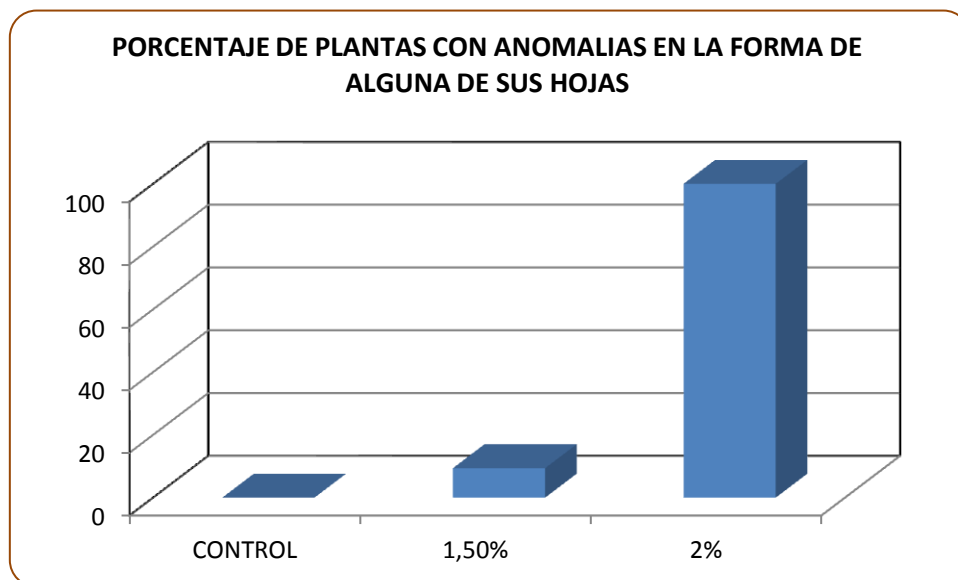


Figura 59.- Efecto de los tratamientos con EMS sobre la morfología de las hojas de calabacín. Datos tomados 31 - 40 días después del transplante.

Las anomalías detectadas en las plantas tratadas con EMS se muestran en las Figuras 60 y 61 y consisten, sobre todo, en I) pérdida de la simetría propia de la hoja de calabacín, II) rizado de los bordes de la misma y, III) disminución de la superficie foliar.

**Concentración: 1,5 %**



Figura 60.- Hojas con alteraciones morfológicas en plantas cuyas semillas han sido tratadas con una concentración de EMS del 1,5 %.

**Concentración 2 %**



Figura 61.- Hojas con alteraciones morfológicas en plantas cuyas semillas han sido tratadas con una concentración de EMS del 2 %.



#### 4.2.6.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE EL CUAJADO DE LOS FRUTOS EN CALABACÍN.-

El día 4 de mayo comenzaron las polinizaciones y se prolongaron durante un mes por la necesidad de encontrar la flor femenina y la masculina en la misma planta y ambas en el momento óptimo para la fecundación. Se intentó cuajar un solo fruto por planta para garantizar su desarrollo. Los tratamientos alteraron la textura y color de los frutos (Figura 62)

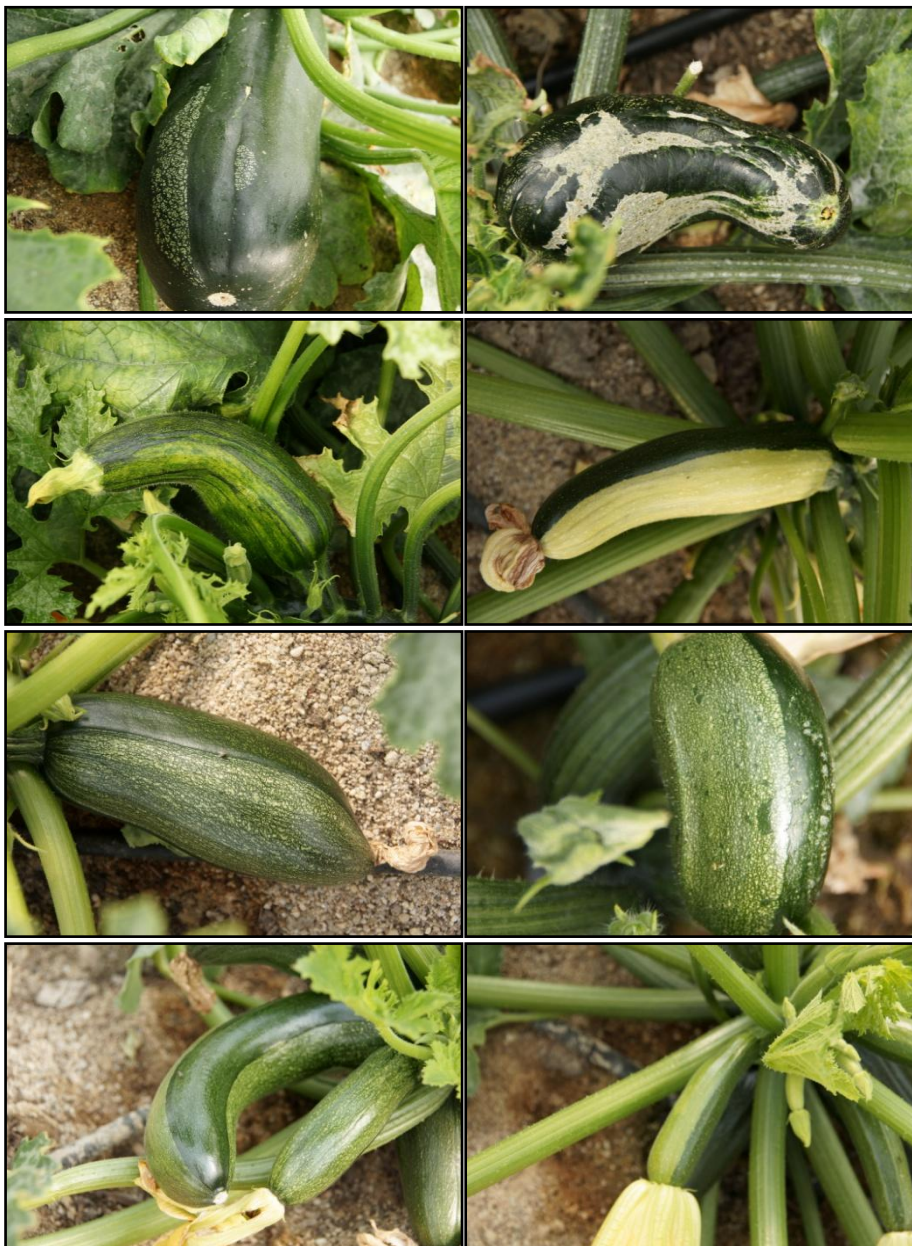


Figura 62.-

#### 4.2.7.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EMS SOBRE LA FERTILIDAD EN CALABACÍN.-

Para conocer la fertilidad real de cada una de las plantas cultivadas en este estudio, los frutos obtenidos de cada una de las plantas se han clasificado de acuerdo con su número de semillas viables (Figura 63). En azul y rojo se muestran respectivamente los porcentajes de frutos que tienen semillas viables y semillas vacías para cada uno de los tratamientos. Los datos son muy distintos para el control y para las plantas que han sido tratadas con EMS. En el control el 95 % de los frutos contienen semillas viables mientras que en el tratamiento con la concentración del 1,5 % apenas llega al 30 %, descendiendo este número a la mitad, en torno al 15 %, para el tratamiento con la concentración del 2 %.

Estos resultados indican claramente que los tratamientos realizados disminuyen drásticamente la fertilidad de las plantas de calabacín. Aunque los porcentajes de germinación observados con estas dosis de mutágeno pueden ser los adecuados para ser utilizados en la obtención de una colección de mutantes en calabacín, los datos de fertilidad desaconsejan totalmente el uso de estas dosis, pues sería totalmente imposible mantener a los mutantes mediante semillas.

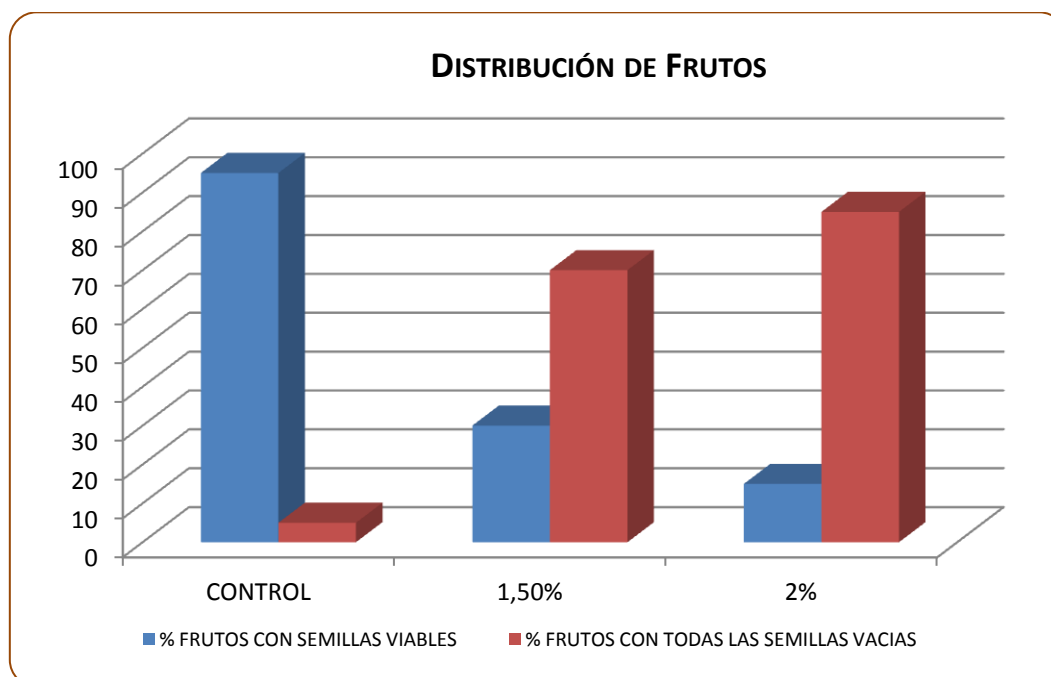


Figura 63.- Porcentaje de frutos con semillas viables y porcentaje de frutos con todas las semillas vacías, entre plantas control y aquellas tratadas con 1,5 % y 2 % de EMS.

El número de semillas por fruto también se vio alterado por los tratamientos con EMS (Figura 64). Ambos tratamientos disminuyeron enormemente el número de semillas viables por fruto. Además. El tratamiento con 2% EMS aumentó significativamente el número de semillas vacías. Estos resultados desaconsejan el uso de estas dosis de mutágeno para la producción de una población de mutantes en calabacín. De hecho, los tratamientos no solo han reducido el número de frutos con semilla viable sino que en aquellos en que producen semilla viable el número de semillas por fruto es inferior a 50 (Figura 64). Más aún, mientras que en los frutos control el porcentaje medio de semillas viables en cada fruto supera el 91 %, este número desciende hasta algo más del 74 % en el tratamiento con una concentración de 1,5 % de EMS y hasta el 42 % en el correspondiente al 2 % (Figura 65).

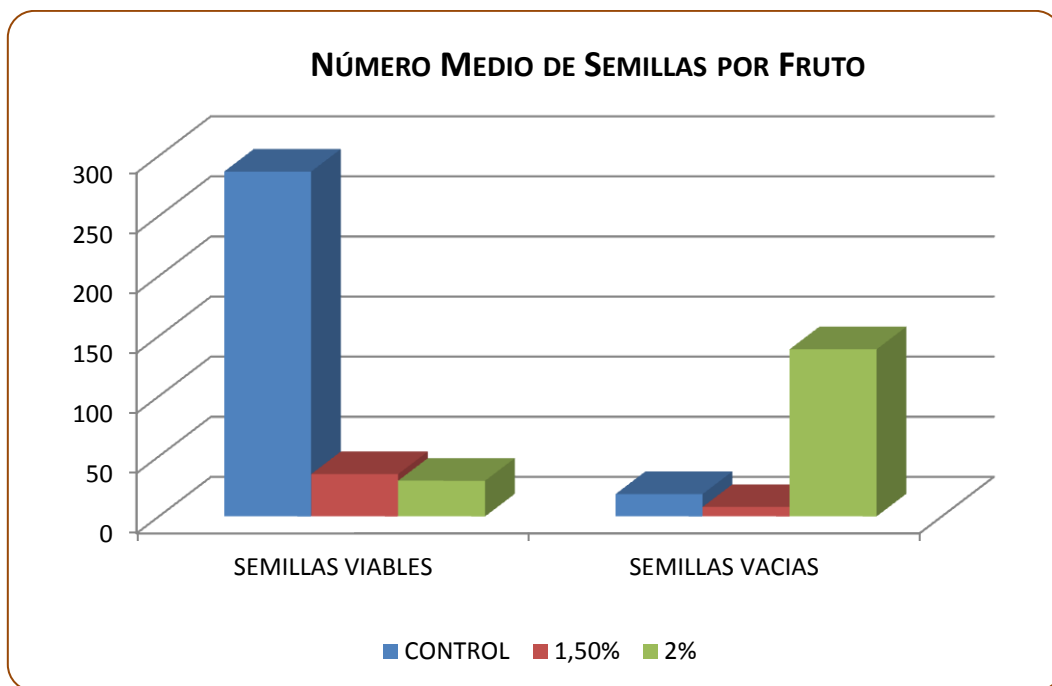


Figura 64.- Número medio de semillas viables y semillas vacías en los frutos con semillas viables de plantas control y tratadas con EMS al 1,5 y al 2 %.

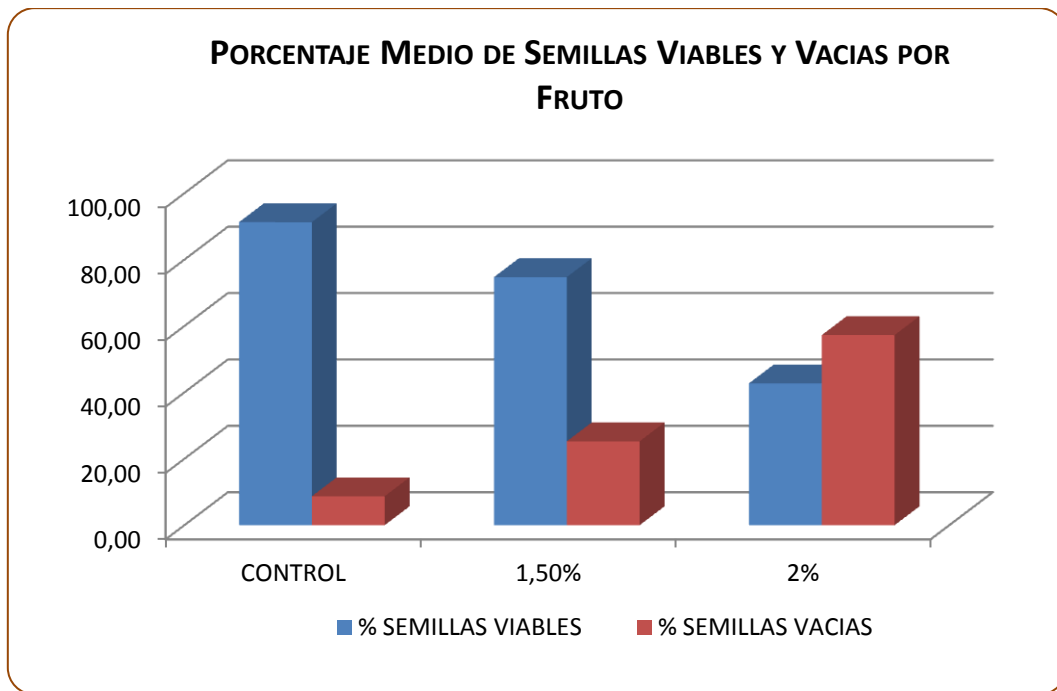


Figura 65.- Porcentaje medio de semillas viables y vacías en los frutos en los que había semillas viables.

En los frutos que se corresponden con el control el porcentaje medio de semillas viables en cada fruto supera el 91 %, este número desciende hasta algo más del 74 % en el tratamiento con una concentración de 1,5 % de EMS y hasta el 42 % en el correspondiente al 2 %. Hay que recordar la figura anterior en la que puede verse que el número de semillas en estos frutos es muy superior al número de semillas en la concentración correspondiente al 1,5 %.

Puede concluirse diciendo que el tratamiento de semillas con EMS afecta al número de frutos con semillas viables, al número de semillas que hay en cada fruto con semillas viables y al porcentaje de semillas viables sobre el total en cada uno de los frutos.

# CONCLUSIONES

**PRIMERA.-** El efecto de los tratamientos mutagénicos con EMS sobre la germinación de las semillas de calabacín cv. Tosca han demostrado que este parámetro no es muy útil para determinar la dosis óptima en un programa de mutagénesis en calabacín. De hecho, la dosis letal al 50 % (DL50), que es la que se aconseja normalmente, se ha obtenido en los tratamientos del 1,5 % y 2 % de EMS. No obstante en estos tratamientos la fertilidad de las plantas M1 se ha visto enormemente reducida.

**SEGUNDA.-** Los tratamientos con EMS han tenido un efecto dosis dependiente sobre la longitud de las plántulas de calabacín. Por tanto, este parámetro podría ser utilizado para optimizar la dosis de mutágeno ideal en la construcción de una colección de mutantes EMS de calabacín. Los resultados para otros parámetros de crecimiento vegetativo de las plántulas, sin embargo, no han sido dependientes de dosis EMS.

**TERCERA.-** Los tratamientos con 1,5 y 2 % EMS han reducido el crecimiento vegetativo de las plantas adultas y han alterado la morfología y el color de las hojas. El aumento significativo en el contenido en clorofilas de las hojas adultas puede estar asociado a una menor tasa de crecimiento de las hojas mutantes.

**CUARTA.-** Los tratamientos con 1,5 y 2 % EMS no han alterado la cantidad de flores femeninas y masculinas por planta, ni la distribución de éstas a lo largo del tallo principal de cada una de las plantas. No obstante, el desarrollo de las flores femeninas y masculinas se ha visto enormemente modificado, especialmente en lo que respecta al desarrollo de los órganos reproductivos masculinos y femeninos, reduciendo la fertilidad de las plantas.

**QUINTA.-** Los tratamientos con 1,5 % y 2 % EMS han reducido significativamente la fertilidad de las plantas. De hecho, dichos tratamientos redujeron el número de

frutos con semillas al 30 % y 15 %, lo que compromete la obtención de familias M2. Por tanto, aunque estos tratamientos son los que más se acercan a una dosis de letalidad del 50 %, reducen mucho la fertilidad de las plantas como para poderse utilizar como concentraciones óptimas para la producción de una población de mutagénesis artificial en calabacín.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Anuario de estadística 2.009. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.
- Anuario de Agricultura de la Provincia de Almería. 2.010. Fundación Cajamar.
- Camacho, F. (2002). Material didáctico de Horticultura Intensiva- 3<sup>a</sup> I.T.A. (Hortofruticultura y Jardinería) 2002/2003. Universidad de Almería.
- Camacho, F. (2003). Técnicas de producción en cultivos protegidos. Tomo 2. Instituto Cajamar. Ediciones Aerotécnicas S.L. Almería.
- Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia (COMAV)
- Cubero Salmeron. 2002. Introducción a la mejora genética vegetal.
- Dalmaís M., Schmidt-Julien, C., Moussy F., Burstin J., Savoís V., Brunaud V., De Oliveira Y., Guichard C., Thompson R. y Bendahmane A. 2008. UTILdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool.
- Delgado González, J., 1999. El cultivo de calabacín en el Levante de Almería. Técnicas de producción de frutas y hortalizas en los cultivos protegidos. Instituto la Rural 3, 55-98.
- Eyal Emmanuel and Avraham A Levy, 2002, Tomato mutants as tools for functional genomics.
- García-Mas J., Current genomic resources in melon and other cucurbits.
- Hee Jin Jeong, Jin Kyung Kwon Devendra pandeya, et al. 2011. A survey of natural and ethyl methane sulfonate-induced variations of eIF4E using high-resolution melting analysis in *Capsicum*.
- Hohmann U., Jacobs G. y Jung C., 2005. An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants.
- Jander, G., Baerson, S.R., Hudak, J.A., Gonzalez, K.A., Gruys, K.J., Last, R.L. 2003. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology*, 131:139-146

Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D. 2004. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J* 38:861-872.

Minoia S., Petrozza A., D'Onofrio O., Piron F., Mosca G., Sozio G., Cellini F., Bendahmane A., Carriero F. 2010. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology

Orejas Suarez, M.L. Tesis doctoral Genética de *Phycomyces Blakesleeanus*. Mutagenesis con Metil Sulfonato de Etilo (EMS) y relaciones de ligamento entre 29 marcadores.

Picó B., Ferriol M., Sifres A., Nuez F. 2003. El análisis de semillas como herramienta para el manejo de colecciones de germoplasma de *Cucurbita* spp.

Reche Mármol, J., 1997. Cultivo de calabacín en invernadero. Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Almería. pp. 213.

<http://zamir.sgn.cornell.edu/mutants/>

<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/misc/project.cgi>

<http://www.irta.cat/es-es/RIT/Projectes/paginas/ProjectDisplayPage.aspx?UrlCode=871>