



SEGREGACIÓN DE LA EXPRESIÓN SEXUAL Y LA ANDROMONOECIA EN POBLACIONES F2 Y F3 DE DIFERENTES CRUZAMIENTOS DE CALABACÍN

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

INGENIERO AGRÓNOMO

Trabajo de Investigación

Marina Marta Martos Fuentes

Almería, diciembre de 2012

Directores

Dr. Manuel Jamilena Quesada

Dña. Cecilia Martínez Martínez

A close-up photograph of a bright yellow squash flower. The center of the flower is a pale greenish-yellow, and two small black ants are visible on it. The background is dark and out of focus, showing green leaves and soil.

**SEGREGACIÓN DE LA EXPRESIÓN
SEXUAL Y LA ANDROMONOECIA EN
POBLACIONES F2 Y F3 DE
DIFERENTES CRUZAMIENTOS DE
CALABACÍN**

Alumna

Marina Marta Martos Fuentes

Directores

Dr. Manuel Jamilena Quesada

Dña. Cecilia Martínez Martínez

Antes de nada me gustaría agradecer a todas las personas que me han apoyado y han hecho posible que este trabajo saliera adelante:

A Manuel y a Cecilia por su gran ayuda, por ampliar mis conocimientos, por despertar mi interés por la Mejora Genética pero sobre todo, por confiar en mí en todo momento.

A Susana y a Zoraida por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio y ayudarme siempre que han podido.

A todos los profesores y profesoras que han sido fundamentales en mi formación académica. En especial a María del Mar Reboloso, una gran docente y una persona excepcional que me ha aportado no solo conocimientos sino valores y saber estar.

A Leti por hacer que mi primer empleo fuera inolvidable y por ser, no sólo una jefa y una trabajadora extraordinaria, sino una persona intachable.

A todas mis amigas, pero especialmente a Eva, porque siempre está ahí.

A mi familia porque siempre está cuando la necesito. Sobre todo, a mi hermana, Ana, por ser mi alegría, a mi madre, Anabel y a mi padre, Antonio, porque gracias a su esfuerzo y empeño he llegado hasta aquí.

A Juan Manuel por su ayuda incondicional, pero por encima de todo, por formar parte de mi vida y hacer que cada día a su lado sea mejor que el anterior.

ÍNDICE DE ÍNDICES

ÍNDICE	II
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS.....	X

ÍNDICE

I. INTERÉS Y OBJETIVOS 1

I.1. IMPORTANCIA ACTUAL DEL CULTIVO DEL CALABACÍN EN ESPAÑA Y ALMERÍA .3

I.2. INTERÉS DE LA INVESTIGACIÓN 4

I.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN 6

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 9

II.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DEL CALABACÍN 11

II.1.1. Origen y utilización 11

II.1.2. Taxonomía y descripción botánica 12

II.1.3. Requerimientos edafoclimáticos 19

II.1.3.1. Temperatura 19

II.1.3.2. Humedad 20

II.1.3.3. Luminosidad 21

II.1.3.4. Suelo 21

II.2. FLORACIÓN Y EXPRESIÓN SEXUAL DE LAS CUCURBITÁCEAS 22

II.2.1. Morfología floral del calabacín 22

II.2.2. Control genético, ambiental y hormonal de la determinación sexual en
Cucurbitáceas 26

III. MATERIAL Y MÉTODOS 31

III.1. EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO E INSTALACIONES 33

III.2. CONDICIONES AMBIENTALES DEL INVERNADERO Y MANEJO DEL CULTIVO...	36
III.2.1. Condiciones ambientales de la zona	36
III.2.2. Material vegetal y manejo del cultivo.....	37
III.2.2.1. Siembra	38
III.2.2.2. Plantación.....	38
III.2.2.3. Cuidados, poda y limpieza de las plantas.....	39
III.2.2.4. Tratamientos fitosanitarios.....	40
III.3. TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
III.3.1. Efecto de la poda de flores femeninas sobre la expresión sexual.....	41
III.3.2. Fenotipado de las flores.....	43
III.3.3. Crecimiento de los órganos florales.....	45
III.3.4. Comparación del crecimiento de los órganos florales en las poblaciones F2 de <i>Cavili</i> y de <i>Bog x Veg</i>	46
III.3.5. Expresión sexual de las plantas	48
III.3.6. Análisis de segregación del gen <i>CpACS2/7</i>	48
III.3.7. Análisis estadístico	52
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
IV.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN SEXUAL Y LA ANDROMONOECIA EN LAS POBLACIONES F2 DE CALABACÍN	55
IV.1.1. Efecto de la expresión sexual sobre la andromonoecia.....	56
IV.1.2. Relación entre la expresión sexual en el tallo principal y secundarios	60
IV.1.3. Efecto de la poda de flores femeninas sobre la expresión sexual de calabacín	63
IV.2. CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS FLORALES EN LOS DISTINTOS TIPOS DE FLORES	67
IV.2.1. Comparación del crecimiento del ovario y los pétalos en flores femeninas, bisexuales y masculinas.....	67

IV.2.2. Coordinación en el crecimiento de los órganos florales.....	72
IV.3. ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE LA ANDROMONOECIA EN CALABACÍN	82
IV.3.1. Control genético de la andromonoecia	82
IV.3.2. Análisis de segregación de la andromonoecia con el gen <i>CpACS2/7</i>	86
V. CONCLUSIONES	91
VI. BIBLIOGRAFÍA	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Flor femenina de calabacín.....	13
Figura 2: Morfotipos de <i>C. pepo</i> ssp. <i>pepo</i> . 1: Pumpkin, 2: Vegetable Marrow, 3: Cocoselle y 4: Zucchini (Goldman, 2004)	16
Figura 3: Morfotipos de <i>C. pepo</i> ssp. <i>ovifera</i> . 1: Scallop, 2: Acorn, 3: Crookneck y Straightneck (Goldman, 2004)	17
Figura 4: Morfología de la planta de calabacín. 1: Planta joven donde se observan las primeras hojas, 2: Flor femenina, 3: Flor masculina.	18
Figura 5: Pétalos de una flor femenina en antesis.....	24
Figura 6: Modelo ABC de control genético de la identidad de los órganos florales. A: Clase de genes determinantes de la identidad de los órganos. B: Representación esquemática de los fenotipos de los mutantes en cada una de las clases de genes homeóticos. (Azcón-Bieto y Talón, 2000)	25
Figura 7: Emplazamiento de la Finca UAL-ANECOOP. 1: Vías de acceso. 2: Invernadero del ensayo. (Fuente: Sistema de Información Geográfica de Identificación de Parcelas Agrícolas (SIGPAC)).	34
Figura 8: Sistema de riego por goteo y sustrato del invernadero.	36
Figura 9: Plántulas de calabacín.	38
Figura 10: Esquema de la plantación de las diferentes poblaciones en el invernadero.	39
Figura 11: Numerando las plantas.....	41
Figura 12: Estadios de desarrollo de las flores femeninas que fueron utilizadas en el aclareo. 1: Flor pequeña (2-4 cm de tamaño). 2: Flor en preantesis. 3: Flor en antesis.	42
Figura 13: A: Flor femenina (tipo 0). B: Flor con tendencia a la bisexualidad (tipo 1). C: Flor bisexual (tipo 2-3).....	43
Figura 14: Diferencia del ovario asociado a los distintos fenotipos florales. 1: Flor femenina. 2: Flor con tendencia bisexual. 3: Flor bisexual.....	45
Figura 15: Seguimiento del crecimiento de una flor femenina hasta su antesis.	46

Figura 16: Medida de los órganos florales en flores femeninas, bisexuales y masculinas. 1: Flores descongelándose. 2: Detalle de una flor bisexual. 3: Detalle de una flor masculina. 4: Detalle de un ovario. 5: Calibre digital.....	47
Figura 17: Programa Take3 del Software Gen 5 1.10 Epoch (Biotek).....	49
Figura 18: 1: Gene Amp PCR System 2700 donde se realizó la PCR. 2: Programa de PCR diseñado para amplificar el fragmento de interés del gen <i>CpACS2/7</i> . 3: Tubos de PCR insertos en el bloque del termociclador.	51
Figura 19: Gel de agarosa donde se cargaron las distintas muestras de ADN después de su digestión.	52
Figura 20: A: Flor femenina (tipo 0). B: Flor con tendencia a la bisexualidad (tipo 1). C: Flor bisexual (tipo 2-3).....	56
Figura 21: Correlación entre el índice de andromonoecia y el porcentaje de flores femeninas por planta en dos poblaciones F2 de calabacín. A: Población F2 de <i>Bog x Veg</i> . B: Población F2 de <i>Cavili</i>	58
Figura 22: Comparación del número de flores femeninas en plantas monoicas, intermedias y andromonoicas de dos poblaciones F2 de calabacín. A: Población F2 de <i>Bog x Veg</i> . B: Población F2 de <i>Cavili</i>	59
Figura 23: Porcentaje de flores femeninas en los tallos principales y secundarios de cada una de las 12 plantas monoicas analizadas en la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . Cada una de las plantas mostró diferentes porcentajes de flores masculinas por planta.....	60
Figura 24: Correlación entre el porcentaje de flores femeninas en el tallo principal frente al tallo secundario en 12 plantas de la población F2 de <i>Bog x Veg</i>	61
Figura 25: Precocidad de la floración femenina de los tallos principales y secundarios de las 12 plantas monoicas analizadas en la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . Se muestra el porcentaje de flores masculinas en cada una de las plantas analizadas.	62
Figura 26: Correlación entre la precocidad de la floración femenina en el tallo principal y el secundario en 12 plantas de la población F2 de <i>Bog x Veg</i>	62
Figura 27: Estadios de desarrollo de las flores femeninas que fueron utilizadas en el aclareo. 1: Flor pequeña (2-4 cm de tamaño). 2: Flor en preantesis. 3: Flor en antesis.	64

Figura 28: Efecto del aclareo de flores femeninas en la expresión sexual de la línea pura <i>Bog</i> . A: Plantas control. B: Plantas con el aclareo de flores en antesis. C: Plantas con el aclareo de flores en preantesis. D: Plantas con el aclareo de flores pequeñas. Las barras indican el porcentaje de flores femeninas (rojo), masculinas (azul) y nudos sin flor (verde) en cada uno de los nudos de la planta posteriores al tratamiento de aclareo.....	65
Figura 29: Efecto del aclareo de flores femeninas sobre el porcentaje de flores femeninas y masculinas en plantas de calabacín del genotipo <i>Bog</i>	66
Figura 30: Flores femeninas (1) y bisexuales (2) en la población F2 de <i>Cavili</i>	68
Figura 31: Comparación del crecimiento longitudinal de pétalos y ovarios en las flores femeninas y bisexuales de la población F2 de <i>Cavili</i> . El final de cada una de las curvas indica el tiempo de antesis o apertura de la flor. Nótese que las flores bisexuales tardan más tiempo que las bisexuales en alcanzar la antesis, y muchas de ellas no llegan a abrirse después de 18 días.....	70
Figura 32: Comparación del crecimiento de los pétalos en flores femeninas, bisexuales y masculinas de la población F2 de <i>Cavili</i>	71
Figura 33: Diferencia entre los pétalos de las distintas flores. 1: Flor femenina. 2: Flor masculina. 3: Flor bisexual.....	71
Figura 34: Comparación del crecimiento longitudinal de pétalos y ovario en flores femeninas y bisexuales de distintos tamaños. A: En la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . B: En la población F2 de <i>Cavili</i>	73
Figura 35: Diámetro externo y diámetro del endocarpo de un ovario de calabacín... 74	
Figura 36: Comparación del crecimiento transversal del ovario respecto a los pétalos en flores bisexuales y femeninas. A: En la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . B: En la población F2 de <i>Cavili</i>	75
Figura 37: Diferencias entre los morfotipos de los frutos de las poblaciones F2 de <i>Bog x Veg</i> y <i>Cavili</i> . F2 de <i>Cavili</i> : 1: Flor femenina, 2: Flor bisexual. F2 de <i>Bog x Veg</i> : 3: Flor bisexual, 4: Flor femenina.....	76
Figura 38: Comparación del crecimiento del diámetro del endocarpo respecto a la longitud de los pétalos en flores bisexuales y femeninas. A: En la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . B: En la población F2 de <i>Cavili</i>	77

Figura 39: Comparación del crecimiento de pétalos y estilo más estigma en flores femeninas y bisexuales de distintos tamaños. A: En la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . B: En la población F2 de <i>Cavili</i>	79
Figura 40: Diferencia entre los estambres de una flor bisexual (1) y una flor masculina (2). El círculo indica los estambres inmaduros de la flor bisexual.	80
Figura 41: Comparación de del crecimiento de los estambres frente a los pétalos en flores bisexuales y masculinas. A: En la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . B: En la población F2 de <i>Cavili</i>	81
Figura 42: Obtención de la población F2 de <i>Bog x Veg</i> . Fenotipo <i>Bog</i> , plantas muy femeninas, con más del 60% de flores femeninas. Fenotipo <i>Veg</i> , plantas muy masculinas, con menos del 30% de flores femeninas.....	83
Figura 43: Hipótesis de la segregación de dos genes en el control de la andromonoecia en calabacín. Por cada quince plantas monoicas hay una andromonoica.	85
Figura 44: A: Diana de la enzima Taq I. B: Mapa de restricción realizado al digerir con la enzima Taq I el fragmento amplificado de <i>CpACS2/7</i> sobre el ADN de la línea pura <i>Veg</i> . C: Mapa de restricción realizado al digerir con la enzima Taq I el fragmento amplificado de <i>CpACS2/7</i> sobre el ADN de la línea pura <i>Bog</i> . (Fuente: Programa NEBcutter 2.0).....	88
Figura 45: Genotipado de <i>CpACS2/7</i> en las plantas andromonoicas y monoicas de la población F2 de <i>Bog x Veg</i> y de las líneas puras <i>Bog</i> y <i>Veg</i> . En cada una de las plantas analizadas, su ADN se utilizó para amplificar un fragmento de PCR del gen <i>CpACS2/7</i> de 1500 pb (PCR). Excepto en el carril que se indica como PCR, en el resto, el producto de la PCR se digirió con Taq I para identificar el marcador CAP asociado con la mutación en el alelo de <i>Bog</i> . B, alelo de <i>Bog</i> . V, alelo de <i>Veg</i>	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Producción y superficie del cultivo del calabacín en España (Fuente: Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2010) ..3	
Tabla 2: Rendimiento en la provincia de Almería del calabacín respecto a otras hortalizas (Fuente: Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2010)	4
Tabla 3: Taxonomía del calabacín.....	14
Tabla 4: Subespecies y morfotipos de <i>Cucurbita pepo</i> (Paris, 1989; Paris, 2001)	15
Tabla 5: Temperaturas que exige el cultivo de calabacín	20
Tabla 6: Control genético del sexo en pepino por los tres genes mayores <i>M</i> , <i>F</i> y <i>A</i>	27
Tabla 7: Productos fitosanitarios utilizados en nuestro cultivo de calabacín. (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).....	40
Tabla 8: Componentes de la PCR.	50
Tabla 9: Condiciones de amplificación de la PCR.....	50
Tabla 10: Análisis de segregación fenotípica (monoecia/andromonoecia) en las poblaciones F2 de <i>Bog x Veg</i> y de <i>Cavili</i>	84
Tabla 11: Análisis de segregación fenotípica (monoecia/andromonoecia) en las poblaciones F2 de <i>Bog x Veg</i> y de <i>Cavili</i>	85
Tabla 12: Segregación del carácter monoecia/andromonoecia en las distintas poblaciones de la F3 de <i>Bog x Veg</i>	86

ABREVIATURAS

ACC: 1-aminociclopropano 1-carboxílico

ACO: ACC oxidasa

ACS: ACC sintasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AVG: Aminoetoxivinilglicina

cm: Centímetros

CTR1: CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1

CTR2: CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE2

EIN3: ETHYLENE INSENSITIVE3

ERS1: ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1

etc.: Etcétera

ETR1: ETHYLENE RESPONSE1

ETR2: ETHYLENE RESPONSE2

GAS: Giberelinas

ha: Hectárea

Kg/ha: Kilogramos por hectárea

Km/h: Kilómetros por hora

m.c.a.: Metro columna de agua

m: Metro

m²: Metro cuadrado

min: Minuto

mm: Milímetro

ng: Nanogramo

pb: Pares de bases

PVC: Policloruro de vinilo

s: Segundo

SAM: S-Adenosil metionina

t: Toneladas

T^a: Temperatura

°C: Grado centígrado

μl: Microlitro

INTERÉS Y OBJETIVOS



I. INTERÉS Y OBJETIVOS

I.1. IMPORTANCIA ACTUAL DEL CULTIVO DEL CALABACÍN EN ESPAÑA Y ALMERÍA

El calabacín (*Cucurbita pepo*) es una especie cultivada que dentro de su género es la más importante a nivel mundial económicamente. Además, esta especie presenta mucha variabilidad en sus frutos (tamaño, forma, color, patrón de coloración, textura, etc.) y en sus características vegetativas (habito de crecimiento, longitud y grosor de los entrenudos, tamaño de las hojas, etc).

En la agricultura intensiva almeriense actual el calabacín es una de las hortalizas más importantes. Según el anuario de estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, en 2010 la producción del calabacín en toda España se situó en 366498 toneladas, de las cuales Andalucía representó el 85% de la producción y Almería el 73% (Tabla 1).

Tabla 1: Producción y superficie del cultivo del calabacín en España (Fuente: Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2010).

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (ha)			Producción (t)	
	Secano	Regadío			Total
		Aire libre	Protegido		
CATALUÑA	–	194	–	194	7482
CANARIAS	1	240	150	391	17535
OTRAS	27	843	137	1018	30155
ALMERÍA	–	190	4830	5020	267233
ANDALUCÍA	27	827	5161	6015	311326
ESPAÑA	55	2104	5459	7618	366498

Además el calabacín, según dicho anuario, es, en la provincia de Almería, la hortaliza que más rendimiento tiene después del tomate (Tabla 2).

Tabla 2: Rendimiento en la provincia de Almería del calabacín respecto a otras hortalizas (Fuente: Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2010).

Hortaliza	Rendimiento (Kg/ha)
Tomate	135796
Calabacín	90341
Pimiento	85625
Pepino	81501

También cabe destacar que según los datos de la Dirección General de Aduanas, aportados en el análisis de la campaña hortofrutícola 2010/2011 por la Fundación Cajamar, Almería ha exportado en dicha campaña unas 200888 toneladas de calabacín, lo que representa un 6,25% más que la campaña anterior.

Por todo ello es tan importante el cultivo de esta cucurbitácea en la provincia de Almería, ya que es líder indiscutible dentro de la producción española.

I.2. INTERÉS DE LA INVESTIGACIÓN

El cultivo de calabacín en invernadero requiere la utilización de variedades en las que la abscisión floral sea rápida ya que cuando la temperatura es muy elevada, algunas de las variedades comerciales actuales tienden a sufrir un retraso en la abscisión floral, de tal forma que la flor queda pegada al fruto cosechado. Este aspecto condiciona de manera muy negativa su comercialización, ya que la flor pegada al fruto favorece la podredumbre del mismo, disminuyendo su calidad y conservación postcosecha

(Peñaranda y col., 2007). Los frutos con flor pegada están asociados con una masculinización de las flores femeninas (cuando las flores femeninas muestran estambres con distinto grado de desarrollo) y con partenocarpia, pues en estas flores se observa un crecimiento del ovario en ausencia de polinización (Gómez y col., 2004a, Peñaranda y col. 2007). Por tanto, el aumento de las temperaturas ambientales es uno de los factores que inducen la masculinización de las flores femeninas y la aparición de frutos partenocárpicos con flor pegada en algunos genotipos de calabacín.

Además, las flores que se mantienen unidas a los frutos cosechados, están aún verdes incluso cuando los frutos ya adquieren el peso comercial. Aunque los frutos estén bien desarrollados, las flores se mantienen inmaduras y la mayoría nunca llegan a antesis. Esto sugiere que el retraso en la abscisión de flores es causado por una inhibición de la maduración de la flor, en lugar de por una inhibición de los procesos de senescencia y abscisión después de la polinización (Peñaranda y col., 2007).

Las hormonas, y especialmente el etileno, juegan un papel esencial en el control de la expresión sexual del calabacín y otras Cucurbitáceas. Por tanto, la masculinización que producen las altas temperaturas puede deberse a una disminución en los niveles de etileno, una hormona que controla directamente la expresión sexual en diferentes especies de Cucurbitáceas (Rudich J.,1990; Boualem y col., 2008; 2009; Manzano y col., 2011). Los resultados del grupo de investigación “Genética de hortícolas” (BIO293) de la UAL indican que el aumento en la incidencia de flor pegada en calabacines cultivados en primavera-verano, está relacionado con una disminución en los niveles de etileno (Gómez y col., 2004b). No obstante, se desconocen los factores genéticos que puedan controlar la incidencia de flores parcialmente bisexuales y la aparición de frutos partenocárpicos con la flor pegada.

Por tanto, el interés de este estudio es determinar cómo en distintas poblaciones F2 y F3 de calabacín segregan los genes que controlan la aparición de las flores bisexuales

y la andromonoecia, además de conocer si la expresión sexual que presentan estas poblaciones de calabacín está relacionada con la andromonoecia de las mismas.

Los resultados que se obtengan en este estudio podrían utilizarse en programas de mejora encaminados a aumentar el nivel de ginoecia y la partenocarpia en esta especie, y obtener variedades muy productivas que no presenten el problema de masculinización ni retraso en la abscisión floral.

I. 3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

El grupo BIO293 de la UAL ha observado que en algunas poblaciones F2 y F3 de determinados cruzamientos aparecen plantas con una mayor incidencia de flores bisexuales, indicando que este carácter puede estar regulado genéticamente. Así ocurre en las poblaciones F2 del híbrido *Cavili* (F1), que tiene normalmente una alta incidencia de flor pegada bajo condiciones de altas temperaturas (Peñaranda y col., 2007), y en las poblaciones F2 y F3 descendientes del cruzamiento de líneas puras *Bolognese* (*Bog*) x *Vegetable Spaguetti* (*Veg*), líneas que no presentan incidencia de flor pegada bajo condiciones inductivas de altas temperaturas (Manzano y col., 2010). Este carácter está regulado por la producción de etileno en otras especies, por ello, el laboratorio de Almería ha clonado y está caracterizando un gen (*CpACS2/7*), que, dada su alta homología con los genes *CmACS7* y *CsACS2* de melón y pepino, respectivamente (Boualem y col., 2008; 2009), podría estar implicado en el arresto de los estambres de las flores femeninas, y por tanto, en el control de la inestabilidad de la monoecia observada en estas poblaciones.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar la expresión sexual, es decir la precocidad de la floración femenina y el porcentaje de flores femeninas por planta, en el tallo principal y en los tallos secundarios de las poblaciones F2 del cruzamiento *Bog x Veg*.
2. Determinar el efecto de distintos tratamientos de aclareo de flores femeninas sobre la expresión sexual de calabacín.
3. Comparar el crecimiento de los órganos en flores femeninas, masculinas y bisexuales de calabacín.
4. Evaluar la segregación de monoecia/andromonoecia en diferentes poblaciones F2 resultantes de la autofecundación de la variedad híbrida *Cavili*, así del cruzamiento *Bog x Veg*, y determinar el control genético de este carácter en las poblaciones bajo estudio.
5. Analizar la posible cosegregación de la expresión sexual y la andromonoecia con el gen *CpACS2/7* de calabacín.

A close-up photograph of several zucchini flowers. The flowers are in various stages of bloom, with some showing bright yellow petals and others appearing more green and closed. The background is a soft-focus green, suggesting a garden or field setting. The text "REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA" is overlaid in white, bold, uppercase letters across the middle of the image, with a thin horizontal line underneath it.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DEL CALABACÍN

II.1.1. Origen y utilización

El origen del calabacín (*Cucurbita pepo*) se sitúa en el suroeste del continente americano. Aunque los registros arqueológicos no han revelado el origen de las Cucurbitáceas cultivadas, si proporcionan información sobre la dispersión geográfica y la diversificación de las especies domesticadas. Se han encontrado restos arqueológicos que evidencian la domesticación de esta especie hace unos 4000 años en tres zonas ampliamente separadas en América del Norte: sur y noreste de Méjico y este de Estados Unidos (Decker, 1988). Los registros arqueológicos de *C. pepo* son los más antiguos que se conocen de especies domesticadas del género *Cucurbita*, atribuyéndoseles una antigüedad de casi 10000 años a restos de semillas y pedúnculos pertenecientes a frutos de *C. pepo* sp. *pepo* encontrados en Oaxaca (Méjico) (Smith, 1997). Además, el calabacín aparece entre las hortalizas citadas por los egipcios y existen pruebas de que también eran conocidas por los griegos y romanos. Sin embargo, fueron los árabes quienes extendieron su cultivo por las regiones mediterráneas, donde se convirtió en un alimento de consumo habitual en la Edad Media.

Las primeras referencias documentadas del género *Cucurbita* en Europa, aparecieron en descripciones e ilustraciones de herbarios 50 años después del viaje de Cristóbal Colón. Su introducción en el continente data del siglo XVI (Reche, 1997) y el uso de *C. pepo* está documentado en ilustraciones de dicho siglo, para consumo tanto de fruto como de flor (Paris y Janick, 2005). Aunque por otro lado, en zonas del norte de Europa su consumo fue más tardío y no tuvo lugar hasta la II Guerra Mundial (Sánchez, 2006).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Los registros arqueológicos apoyan la idea de que *Cucurbita pepo* fue cultivada y domesticada inicialmente para el consumo de semillas altamente nutritivas y dulces. Este uso culinario inicial provocó la selección de frutos más grandes con el objetivo de obtener más semillas y de mayor tamaño. El consumo de frutos inmaduros se ha considerado también una práctica antigua, mientras el consumo de la pulpa de frutos maduros es más reciente y exigió la selección de varios caracteres de calidad para que fueran sabrosos y comestibles, así como una piel más delgada que favoreciera la ruptura del fruto en la madurez (Paris, 2001).

C. pepo es una especie cosmopolita, cuyo éxito de su distribución se debe a su gran capacidad de adaptación a un amplio rango de condiciones ecológicas, pudiendo cultivarse desde el nivel del mar hasta altitudes elevadas y en suelos de diversa naturaleza. Además, sus frutos, semillas y flores tienen multitud de utilidades en todo el mundo. Las semillas de esta especie se consumen de múltiples maneras: tostadas, asadas o molidas en guisos. En mercados de zonas urbanas, los frutos inmaduros de *C. pepo* son más apreciados que los del resto de especies de *Cucurbita*, a este tipo pertenecen los calabacines. Igualmente sus flores son preferidas a las de *C. moschata* en algunas regiones de Méjico, debido a su menor pubescencia y su mejor digestibilidad, consumiéndose como verdura cocida o frita. Además los frutos de muchos cultivares de *C. pepo* de corteza lignificada pueden emplearse como recipientes. Adicionalmente, las plantas y frutos de esta especie se emplean en la medicina tradicional y como ornamentales.

II.1.2. Taxonomía y descripción botánica

El calabacín es una hortaliza englobada en la familia *Cucurbitaceae*, cuyos cultivares pertenecen a la especie *Cucurbita pepo* L. (Maroto, 2000). A parte de esta importante especie, dentro de la familia de las Cucurbitáceas podemos encontrar hasta

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

825 especies, agrupadas en 118 géneros (Zomlefer, 2004), las cuales están ampliamente distribuidas en países cálidos (pantropical y subtropical) y con algunas representantes en aéreas templadas y frías. Los géneros más grandes son *Cayaponia* con 60 especies, *Momordica* con 45 y *Gurania*, *Syclos* y *Trichosanthes* que cuentan con 40 especies cada uno (Jeffrey, 1990). Sin embargo, son más importantes las especies cultivadas que se encuentran en los géneros *Cucurbita*, *Cucumis* y *Citrullus*, como son el calabacín (*Cucurbita pepo*), la calabaza (*Cucurbita maxima*), el pepino (*Cucumis sativus*), el melón (*Cucumis melo*) o la sandía (*Citrullus lanatus*).

El género *Cucurbita*, es uno de los géneros cultivados más importantes económicamente. Está compuesto por unas veintidós especies salvajes y cinco especies cultivadas (Decker, 1988). Es un género americano, caracterizado por sus hojas grandes palmeadas, por sus flores amarillo-anaranjadas (Figura 1), y por sus frutos grandes, duros, esféricos e indehiscentes. La mayoría de las especies de este género son mesófitas, con sistemas radiculares fibrosos y monoicas (Paris, 2001; Nee, 1990).



Figura 1: Flor femenina de calabacín.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

En la Tabla 3, se detalla de forma esquemática la organización taxonómica del calabacín:

Tabla 3: Taxonomía del calabacín.

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

Cucurbita pepo es la especie de las Cucurbitáceas que más variabilidad genética presenta. Se observan diferencias en el tamaño, color de fruto (verdes, amarillos, naranjas, blancos, veteados, variegados, etc.), color de la pulpa (blanco, naranja), formas (redondos, alargados, chapados, oval, con cuello, etc.), superficie (lisa, apostillados, verrugosos, etc.) (Nuez y col., 2000). A consecuencia del amplio abanico de posibilidades, la unificación de criterios a la hora de clasificarlos es muy complicada, por lo que actualmente no hay una nomenclatura correcta aceptada (Robinson y Decker, 1997). Paris (2001) clasificó los tipos cultivados comestibles de *C. pepo* en ocho morfotipos o variedades botánicas (Tabla 4). Los morfotipos Pumpkin, Vegetable Marrow, Coczelle y Zucchini pertenecen a *C. pepo* ssp. *pepo* (Figura 2), mientras que Scallop, Acorn, Crookneck y Straightneck pertenecen a la subespecie *ovifera* (Figura 3). Los frutos de los

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

morfotipos Pumpkin y Acorn se consumen en estado maduro, aproximadamente 40 días después de la antesis, mientras que los restantes morfotipos se consumen en estado inmaduro, aproximadamente 7 días después de la antesis. De todos estos morfotipos el más conocido y más importante económicamente es el Zucchini, el cual se encuentra distribuido por todo el mundo y sus frutos son los comúnmente llamados calabacines.

Tabla 4: Subespecies y morfotipos de *Cucurbita pepo* (Paris, 1989; Paris, 2001).

Subespecie	Morfotipo	Nombre científico	Descripción
<i>C. pepo</i> ssp. <i>pepo</i>	Pumpkin	<i>C. pepo</i> L. var. <i>pepo</i> Bailey	Frutos con gran diversidad de formas: esféricos, ovales, con extremos redondeados o planos, con surcos, costillas o verrugas.
	Vegetable	<i>C. pepo</i> L. var.	Frutos de corteza lignificada, ensanchados en la parte distal y alargados.
	Marrow	<i>fastigiata</i> Paris	Frutos largos, cilíndricos y bulbosos en el extremo distal con rayas longitudinales de colores.
	Cocozelle	<i>C. pepo</i> L. var. <i>longa</i> Paris	Frutos uniformes cilíndricos de color verde oscuro en su madurez.
<i>C. pepo</i> ssp. <i>ovifera</i>	Zucchini	<i>C. pepo</i> L. var. <i>cilíndrica</i> Paris	Frutos aplastados lignificados, generalmente discoidales y con márgenes festoneados. De color amarillo, blanco y verde claro.
	Scallop	<i>C. pepo</i> L. var. <i>clypeata</i> Alefeld	Frutos ovoides o cónicos, con surcos profundos, la mayoría con frutos verdes, no lignificados.
	Acorn	<i>C. pepo</i> L. var. <i>turbinata</i> Paris	Frutos alargados con un cuello curvado, largo y fino, la mayoría amarillos y verrugosos.
	Crookneck	<i>C. pepo</i> L. var. <i>torticollis</i> Alefeld	Frutos cilíndricos, amarillentos, verrugosos y ensanchados en el extremo distal, con un cuello corto y recto.
	Straightneck	<i>C. pepo</i> L. var. <i>recticollis</i> Paris	

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

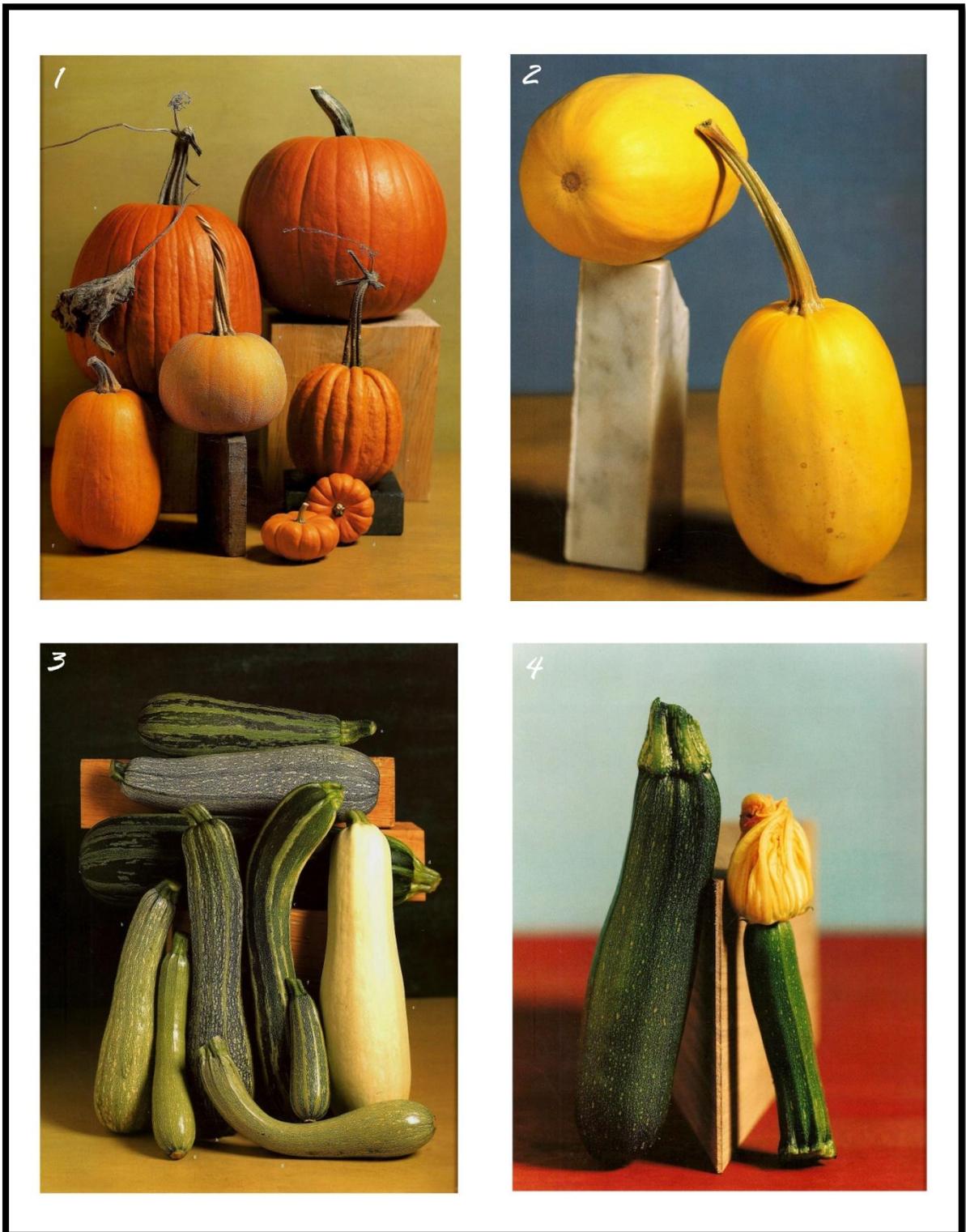


Figura 2: Morfotipos de *C. pepo* ssp. *pepo*. 1: Pumpkin, 2: Vegetable Marrow, 3: Cocozelle y 4: Zucchini (Goldman, 2004).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín



Figura 3: Morfotipos de *C. pepo* ssp. *ovifera*. 1: Scallop, 2: Acorn, 3: Crookneck y Straightneck (Goldman, 2004).

En cuanto a la descripción botánica, el calabacín es una planta anual, de crecimiento indeterminado y vegetación compacta (Camacho, 2009).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Presenta una raíz axonomorfa, alcanzando esta un gran desarrollo en relación con las raíces secundarias, las cuales se extienden superficialmente. Pueden aparecer raíces adventicias en los entrenudos de los tallos cuando se ponen en contacto con tierra húmeda (Reche, 1997).

El tallo es principal, con atrofia de brotaciones secundarias y tiene un crecimiento en forma sinuosa (Camacho, 2009), no erecto, alcanzando gran desarrollo. Es áspero al tacto, cilíndrico, hueco, de superficie pelosa, grueso, consistente, con entrenudos cortos de donde parten hojas, flores, frutos y numerosos zarcillos de 10-20 cm. de longitud, delgados y que nacen junto al pedúnculo del fruto (Reche, 1997).



Figura 4: Morfología de la planta de calabacín. 1: Planta joven donde se observan las primeras hojas, 2: Flor femenina, 3: Flor masculina.

Como se ve en la Figura 4, las hojas son grandes, están sostenidas por fuertes y alargados peciolo. Estos parten directamente del tallo, alternándose en forma helicoidal. El limbo de la hoja es grande y profundamente lobulado. Tiene el haz glabro y el envés muy áspero y recubierto de pelos cortos. El borde de las hojas es dentado con lóbulos

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

pronunciados, presentando profundas entalladuras pero sin llegar al nervio medial, y palmeada por presentar cinco grandes segmentos. El peciolo es largo, hueco, consistente, con pelos rígidos en la superficie y áspero al tacto, de cortas y finas vellosidades y pequeñas espinas distribuidas a lo largo del mismo (Reche, 1997). El color de las hojas suele ser verde oscuro, pudiéndose observar en ocasiones manchas blanquecinas (Maroto, 2000).

Las flores son grandes (Figura 4), solitarias, vistosas, axilares, de color amarillo y acampanadas. La planta de calabacín es monoica, por lo que se dan simultáneamente flores masculinas y femeninas.

Los frutos son pepónides, sin cavidad central, de forma generalmente alargada, cilíndrica, de superficie principalmente lisa, aunque existen frutos aplastados y verrugosos. El color del fruto es variable, siendo frecuentes los colores verdes y amarillos (Maroto, 2000).

Las semillas tienen un color crema uniforme que las diferencia del resto de las especies (Wien, 1997). Son, ovales, alargadas, puntiagudas, lisas, con un surco longitudinal paralelo al borde exterior, de hasta 1.5 cm de longitud, 0.6-0.7 cm de anchura y 0.1-0.2 cm de grosor (Reche, 1997).

II.1.3. Requerimientos edafoclimáticos

II.1.3.1. Temperatura

∞ De siembra

La temperatura óptima del suelo en esta etapa ha de situarse entre los 20-25°C. Con esta temperatura, las semillas pueden germinar en el transcurso de 2-5 días.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Temperaturas del suelo superiores a 40°C, o por debajo de los 15°C Puede afectar a la germinación (Delgado, 1999).

∞ Del desarrollo vegetativo

La temperatura óptima para el desarrollo vegetativo está entre los 25 y 35°C (Wien, 1997). Por encima de 35°C, se produce una gran transpiración, ocasionando daño a las plantas por deshidratación, mientras que temperaturas por debajo de 10°C afectan al crecimiento de la planta y pueden provocar deformaciones en el fruto (Reche, 1997).

∞ De la floración

Para la floración se requieren idealmente unos 20°C por la noche y alrededor de 25°C durante el día (Wien, 1997). Por debajo de 10°C se produce caída de flores y deformación de frutos (Reche, 1997).

Tabla 5: Temperaturas que exige el cultivo de calabacín.

Fases de cultivo	Tª óptima	Tª mínima	Tª máxima
Siembra (Tª del suelo)	20-25	15	40
Desarrollo vegetativo	25-30	10	35
Floración	20-25	10	35

II.1.3.2. Humedad

El calabacín es exigente en humedad relativa del aire (Wien, 1997). Los valores óptimos para el cultivo del calabacín en invernadero están entre el 65% y el 80%. Igualmente es exigente en humedad del suelo, necesaria para el desarrollo de la gran masa foliar de la planta y para la formación del fruto, cuyo contenido de agua se sitúa

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

próximo al 95%. Excesos de humedad en el suelo impiden la germinación, no obstante requiere valores de humedad del suelo entorno al 95%.

El rendimiento del cultivo de calabacín depende en gran medida de la disponibilidad de agua existente en el suelo. Si nos salimos de los rangos óptimos podemos sufrir alteraciones, que pueden perjudicar nuestro cultivo.

Con exceso de humedad ambiental, es probable que haya un aumento de las enfermedades y una deficiente fecundación, mientras que si la humedad es baja, puede producirse deshidratación de los tejidos, menor desarrollo vegetativo, caída de flores y disminución en la producción y retraso en el crecimiento (Reche, 1997).

II.1.3.3. Luminosidad

Es una planta de día neutro (Camacho, 2009). Para el calabacín no tiene excesiva repercusión la duración del día, no existiendo, en general, problemas de floración, por lo que el cultivo en invernadero puede realizarse en cualquier época (Reche, 1997).

II.1.3.4. Suelo

El calabacín es medianamente tolerante a la salinidad del suelo y del agua de riego. Se adapta igualmente a terrenos con valores de pH entre 5 y 7, pero prefiere suelos algo ácidos, con valores medios entre 5.6-6.8 (Reche, 1997).

II.2. FLORACIÓN Y EXPRESIÓN SEXUAL DE LAS CUCURBITÁCEAS

II.2.1. Morfología floral del calabacín

Las variedades de *C. pepo* son monoicas por lo que desarrollan flores unisexuales femeninas y masculinas en el mismo pie de planta. A lo largo del desarrollo de la planta se distinguen tres fases sexuales. En la primera fase, que engloba los primeros 4-8 nudos, la planta solo produce flores masculinas, y de su duración dependerá la precocidad de la planta. Tras esta fase comienza la fase productiva, que se caracteriza por una alternancia de flores masculinas y femeninas en proporciones variables; y por último una fase de desarrollo femenino en la que la planta únicamente produce flores femeninas. No obstante, este patrón de desarrollo puede verse alterado como consecuencia de cambios ambientales y hormonales y por el genotipo de la variedad que consideremos (Manzano, 2009).

La antesis es un término utilizado para designar el momento de expansión completa de la flor, desde el desarrollo del estigma receptivo a la fecundación (Nepi y Pacini, 1993). Este fenómeno ocurre en *C. pepo* entre las 5 y las 6 de la mañana en verano y un poco más tarde en invierno, abriendo las flores masculinas una media hora antes que las femeninas, manteniéndose este estadio fenológico de 5 a 6 horas. Las flores de *C. pepo* son más grandes que las de otras especies de la familia Cucurbitáceas cuando alcanzan la antesis debido a su naturaleza entomófila, su tamaño, color y la producción de néctar favorece este tipo de polinización (Nepi y Pacini, 1993).

La polinización puede ser entomófila (abejas principalmente) lo que propicia que la polinización cruzada. (Reche, 1997).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

En la flor femenina falta el pedúnculo largo característico de la flor masculina, ya que esta se une directamente al tallo por un reducido, corto y grueso pedúnculo de sección pentagonal o hexagonal pero irregular (Delgado, 1999).

Las flores de calabacín constan de las siguientes partes:

∞ Pedúnculo

En la flor masculina es sencillo, largo, de hasta 40 cm de longitud y hasta 1 cm de diámetro, cilíndrico, hueco y con un tálamo que se bifurca en un cáliz dialisépalo. En la flor femenina, el pedúnculo es corto, de 3 a 5 cm de longitud, duro, grueso y fuerte.

∞ Cáliz

Es el verticilo más externo. Sus sépalos son verdes, delgados y no están soldados entre sí, por lo que el cáliz es dialisépalo. Está formado por cinco piezas delgadas, puntiagudas, separadas y con una estructura semejante a las hojas ordinarias. Es actinomorfo y caedizo cuando se marchita la flor y persiste hasta el momento de la abscisión en las flores femeninas.

∞ Corola

Es el segundo verticilo del perianto, con pétalos, gamopétala, simetría actinomorfa campanulada y formada por cinco pétalos unidos por su base. Es grande, de color amarillo intenso. Los pétalos son muy delicados, erectos y abiertos en su parte superior, estos son apenas recubiertos en su base por el cáliz (Figura 5).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín



Figura 5: Pétalos de una flor femenina en antesis.

∞ Androceo

Las flores masculinas tendrán este tercer verticilo floral constituido por tres estambres visiblemente unidos, careciendo del cuarto verticilo floral.

∞ Gineceo

Las flores femeninas, por el contrario, carecen del tercer verticilo floral y cuentan con un cuarto constituido por tres carpelos fusionados en un solo ovario y prolongados en tres pistilos. El ovario de las flores femeninas es ínfero, trilocular y alargado. Los estilos, están soldados en su base y son libres a la altura de su inserción con el estigma, este ultimo dividido en 2 partes “estigmas bilobulados” (Reche, 1997).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Las flores bisexuales de angiospermas están formadas por cuatro verticilos florales (Figura 6A); los dos más externos son verticilos estériles, sin embargo los dos internos son los órganos sexuales, los estambres y carpelos. La identidad de estos órganos se debe a la acción de tres funciones génicas denominadas A, B y C, controladas por genes homeóticos (Coen y Meyerowitz, 1991). Cada uno de estos genes influye en dos verticilos adyacentes: como se muestra en la Figura 6B, los sépalos están determinados solamente por la acción de la función A, los pétalos surgen por la acción de A y B, los estambres por la acción de B y C y el carpelo sólo depende de los genes de función C.

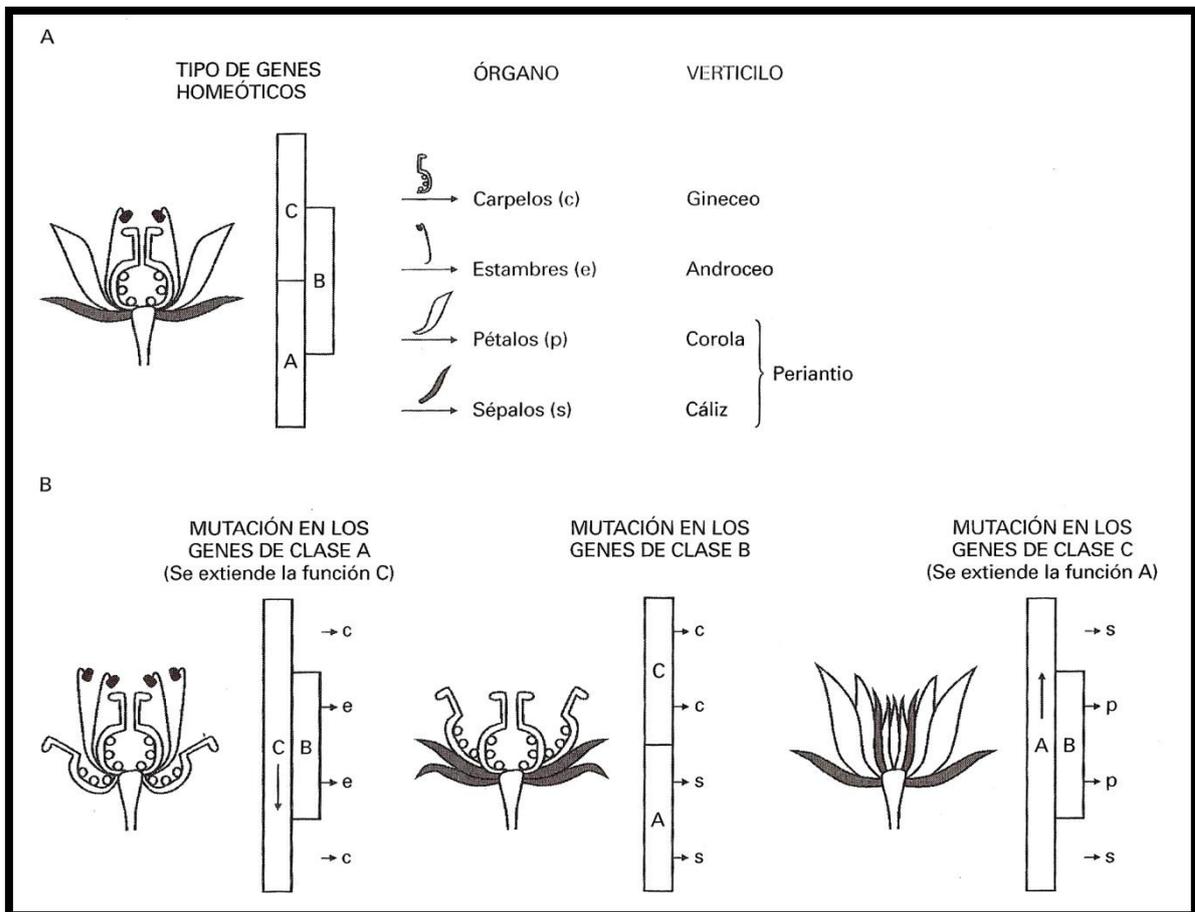


Figura 6: Modelo ABC de control genético de la identidad de los órganos florales. A: Clase de genes determinantes de la identidad de los órganos. B: Representación esquemática de los fenotipos de los mutantes en cada una de las clases de genes homeóticos. (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Estos cuatro verticilos están conservados en la evolución, pero en el caso de flores unisexuales sin embargo sólo poseen uno de los dos verticilos internos. Las etapas del desarrollo temprano de la flor presentan los dos sexos, pero es en estadios avanzados cuando se produce la detención del desarrollo de uno de ellos. El momento en el que se produce el aborto es distinto según las especies (Dellaporta y Calderón- Urrea, 1993; Bai y col., 2004).

II.2.2. Control genético, ambiental y hormonal de la determinación sexual en Cucurbitáceas

En la familia *Cucurbitaceae* el hábito de floración más común es la monoecia (una misma planta desarrolla flores unisexuales masculinas y femeninas) pero existe un amplio rango de morfotipos sexuales. La determinación del sexo está regulada por un número variable de genes que permiten establecer un número variable de tipos sexuales entre los que cabe destacar: androico, ginoico, monoico, hermafrodita y andromonoico (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993; Grant, y col., 1994).

En pepino (*Cucumis sativus*) y melón (*Cucumis melo*) han aparecido un amplio rango de tipos sexuales gracias a la selección por parte del hombre. *C. sativus* es la especie más estudiada, y en esta se pueden observar cinco tipos sexuales: ginoicos, monoicos, hermafroditas, andromonoicos y androicos. La aparición de estos tipos sexuales se debe a la interacción de tres genes mayores *F/f*, *M/m* y *A/a* (Kubicki, 1970; Pierce y Wehner, 1990) (Tabla 6). *F* es un gen parcialmente dominante que determina la feminidad de la planta a lo largo del tallo principal, mientras que *M* determina la sexualidad de las flores individuales, regulando directa o indirectamente la supresión del desarrollo de los estambres en las flores femeninas y por tanto la monoecia/andromonoecia (Yamasaki y col., 2001).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Tabla 6: Control genético del sexo en pepino por los tres genes mayores *M*, *F* y *A*.

	<i>F</i> _(<i>A/a</i>)	<i>ff</i>	
		<i>A</i> _	<i>aa</i>
<i>M</i> _	Ginoico	Monoico	Androico
<i>mm</i>	Hermafrodita	Andromonoico	Androico

En melón, el tipo comercial predominante es andromonoico, aunque existen cultivares monoicos, ginoicos, androicos y hermafroditas (Rudich, 1990). Esta especie también presenta tres genes independientes: *Andromonoecious* (*A/a*), *gynomonoecious* (*G/g*) y *gynoecious* (*M/m*), cuyas combinaciones alélicas explican los 5 fenotipos sexuales diferentes que presenta (Kenigsbuch y Coen, 1990; Pitrat, 1998).

Recientemente se ha identificado en ambas especies, pepino y melón, el gen *M* y el gen *A* respectivamente que son responsables del arresto de los estambres en las flores femeninas. Los genes ortólogos *CsACS2* y *CmACS7* de pepino y melón respectivamente, pertenecen a una familia multigénica que codifica para la enzima ACS, implicada directamente en la biosíntesis de etileno en los botones florales femeninos (Boualem y col., 2008; 2009). Además en melón ha sido identificado el gen *gynomonoecious*, *CmWIP1*, que se expresa en flores bisexuales y es epistático sobre *CmACS7*, controlando el desarrollo de los carpelos y de forma indirecta el desarrollo de los estambres al inhibir *CmACS7*. (Martín y col., 2009). El gen *CmWIP1* es un factor de transcripción del tipo *zinc finger*, cuya mutación por la inserción de un transposón en su promotor causa el fenotipo ginoico de melón. La combinación de estos dos genes permite determinar el desarrollo de flores masculinas, si se expresa *CmWIP1* que inhibe la expresión de *CmACS7*, femeninas, si no se expresa *CmWIP1* y sí *CmACS7* y bisexuales si se expresa *CmWIP1* y a la vez *CmACS7*^{A57V}, es decir, la copia del gen *CmACS7* portadora del cambio que determina su falta de función, reduciendo la expresión del gen al 50% (Martín y col., 2009).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

En calabacín aunque el tipo monoico es el más frecuente, existe variación entre cultivares en cuanto al porcentaje de flores masculinas y femeninas, pero aún no se han identificado genes que controlen la ginoecia ni la androecia. Ocurre lo mismo en sandía, porque aunque el tipo monoico es el más frecuente, existen variaciones entre cultivares e incluso se han citado cultivares andromonoicos.

Además de a nivel genético, la expresión sexual está modulada en todas las Cucurbitáceas por factores ambientales y hormonales. Entre los factores ambientales se ha comprobado en pepino y calabacín la influencia de la temperatura, la intensidad lumínica y el fotoperiodo (Wien, 1997). En pepino las condiciones de invierno caracterizadas por días cortos y temperaturas nocturnas bajas, favorecen la feminización de plantas en cultivares monoicos y las condiciones inversas favorecen la masculinización (Atsmon y Galun, 1962). Las bajas temperaturas pueden causar en calabacín una inhibición total o parcial de la floración masculina, el adelanto de la aparición de la primera flor femenina y, en consecuencia, un mayor número de flores femeninas por planta (Wien, 1997; Wien y col., 2004; Peñaranda y col. 2007). No obstante los estudios realizados hasta el momento poco pueden informar sobre la influencia de los factores ambientales en la transición de flores femeninas a bisexuales.

Los cambios en la expresión sexual promovidos por cambios ambientales pueden estar relacionados con desequilibrios hormonales. De hecho, los días cortos se han correlacionado con incrementos en los niveles internos de etileno, auxinas y ácido abscísico, mientras que los niveles de giberelinas (GAS) bajan (Wien, 1997). También se ha demostrado que las altas temperaturas causan un incremento de la concentración de GAS en los meristemas apicales de pepino (Saito y Ito, 1964).

Las hormonas juegan un papel importante en la regulación del sexo de las Cucurbitáceas. En general, el etileno y las auxinas promueven feminización, mientras que las GAS producen masculinización. El principal regulador de la expresión sexual en

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Cucurbitáceas es el etileno y en general tiene un fuerte efecto feminizante sobre pepino, melón y calabacín, aunque promueve masculinización en sandía (Rudich, 1990).

La aplicación de etileno en pepino aumenta el número de flores femeninas en variedades monoicas y de flores bisexuales en variedades andromonoicas (Perl-Treves, 1999; Yamasaki y col., 2001). El ácido indolacético, aunque menos efectivo que el etileno, también favorece la feminización en pepino y melón. Por el contrario, la aplicación de inhibidores de la biosíntesis o de la percepción de etileno tales como el nitrato de plata o el dióxido de carbono o AVG favorecen la masculinización en pepino y melón (Den Nijs y Visser, 1980; Byers y col., 1972; Owens y col., 1980), o provoca el desarrollo de estambres en flores femeninas de líneas ginoicas (Malepszy y Niemirowicz-Szczytt, 1991; Yamasaki y col., 2001). Estos fenotipos pueden producirse a consecuencia de una disminución de etileno en los meristemas florales (Yamasaki y col., 2003), por lo que el etileno sería necesario para mantener la identidad del meristemo, además de en la determinación sexual. Por otro lado, también Manzano y col. (2011) establecieron la relación entre el etileno y la morfología floral de calabacín, las flores bisexuales nacidas tras la aplicación de AVG y tiosulfato de plata (STS) tenían una relación inversa entre el tamaño de los estambres y el estilo y estigma, indicando la necesaria producción y percepción de etileno para el correcto desarrollo de los carpelos en las flores femeninas.

El etileno puede ser sintetizado en la inmensa mayoría de los tejidos de la planta durante un gran número de fases del desarrollo, estando su producción regulada en respuesta a gran variedad de señales (Wang y col., 2002). La maquinaria enzimática necesaria para la síntesis consta de 2 pasos, el primero permite la obtención de ACC a partir de SAM y está catalizado por ACS, siendo este paso limitante en la síntesis de etileno en la mayoría de las condiciones (Kende, 1993). El segundo paso consiste en la oxidación de la ACC a etileno por medio de la enzima ACO. Ambas enzimas están codificadas por una familia multigénica cuyos componentes intervienen en diferentes procesos del desarrollo y están regulados por una compleja red de señales ambientales y

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

de desarrollo que actúan en respuesta de estímulos internos y externos (Johnson y Ecker, 1998). Pero, además de la biosíntesis, la maquinaria metabólica del etileno engloba la percepción y respuesta de la hormona, lo que permite establecer otros niveles de regulación. Los receptores ETR1, ETR2 y ERS1, interaccionan con los reguladores negativos CTR1 y CTR2 para modular la respuesta a través de la activación de EIN3 (Stepanova y Alonso, 2009). Al menos algunos genes de la familia multigénica de estas enzimas ya han sido clonados en calabacín en tesis doctorales previamente presentadas en la Universidad de Almería, permitiendo un estudio a fondo de cualquier proceso en el que el etileno intervenga (Manzano, 2010; Manzano y col., 2011).

Las GAS, al igual que el nitrato de plata, promueven la masculinización de líneas ginoicas de pepino, lo que permite su mantenimiento y conservación como líneas de mejora. Producen resultados similares en melones y calabacines (Rudich, 1972; Atsmon y Tabbak, 1979).

Y por último tenemos a las auxinas que aunque no son las hormonas más importantes en la expresión sexual de las Cucurbitáceas, juegan un papel esencial en el cuajado y desarrollo del fruto tras la polinización. De hecho, el contenido en auxinas de los ovarios en las variedades partenocárpicas de pepino es mayor que en las variedades con semillas (Takeno y col., 1992). Además, las aplicaciones externas de auxinas sintéticas en la flor producen partenocarpia en el pepino (Elassar y col., 1974; Kim y col., 1992), melón (Whitaker y Prior, 1946) y calabacín (Wong, 1941; Sanz, 1995). En la actualidad, el cuajado adecuado del fruto en las variedades de invierno de calabacín para invernadero, requiere de un aporte externo de auxinas sintéticas en la flor (Sanz, 1995).

MATERIAL Y MÉTODOS



III. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de analizar el control genético de la expresión sexual en calabacín, se realizó un ciclo de cultivo de primavera, donde se evaluaron las poblaciones F2 y F3 de *Bog x Veg* y las poblaciones F2 de *Cavili* que segregan para monoecia/andromonoecia. Por otro lado, y utilizando la línea pura *Bog* se experimentó el efecto del aclareo de flores femeninas sobre la expresión sexual.

III.1. EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO E INSTALACIONES

El trabajo de investigación se realizó en la Finca Experimental de la Fundación UAL-ANECOOP. La finca está situada en el paraje de “Los Goterones” en el Termino Municipal de Almería, cuya identificación catastral es polígono 24, parcela 281. En la Figura 7 se puede observar las vías de acceso a la finca, que se encuentra entre la autovía del Mediterráneo y la carretera Nacional N-344. El invernadero donde se realizó el ensayo es el U17 y sus coordenadas aproximadas son: X = 564019 m Y = 408123 m. Es un invernadero tipo raspa y amagado que cuenta con 922 m² y tiene una orientación N-S. El aprovechamiento de la luz en este caso es menor, al existir una mayor reflexión sobre el plástico de cubierta, aunque su distribución dentro del invernadero es más uniforme. Las ventajas de esta disposición son:

- Utilización más eficaz y eficiente de la superficie disponible en la parcela.
- Durante las primeras horas del día, el sol incide con ángulo mayor sobre la cubierta, con lo que se adelanta el calentamiento del volumen interno del invernadero.
- Mejor ventilación del invernadero pues los vientos dominantes en la zona, poseen dirección Este- Oeste.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

La estructura es la tradicional, basándose en tubos de acero galvanizado que descansan sobre bloques de hormigón en la parte central del invernadero (pies derechos) y en el perímetro perfiles laminados IPN 120 mm de acero galvanizado inclinados, que van anclados al terreno mediante cabillas a 3 m de profundidad. La estructura horizontal está basada en alambre galvanizado, que forma los tejidos entre los que se introduce la cubierta plástica, un film de polietileno de alta densidad de tres campanas. Las ventanas cenitales están situadas en la cubierta del invernadero siguiendo la alineación de los pies derechos y van fijadas a las cordadas maestras.

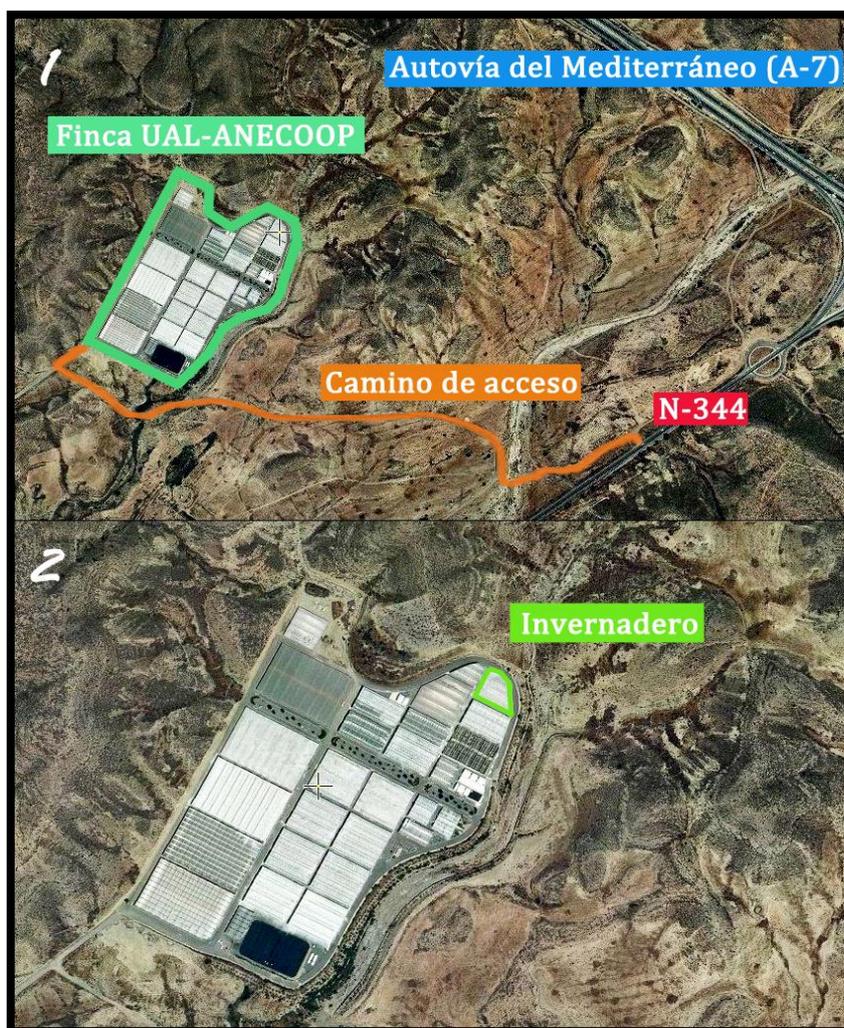


Figura 7: Emplazamiento de la Finca UAL-ANECOOP. 1: Vías de acceso. 2: Invernadero del ensayo. (Fuente: Sistema de Información Geográfica de Identificación de Parcelas Agrícolas (SIGPAC)).

Las necesidades hídricas del cultivo se satisficieron mediante el sistema de riego por goteo instalado en el invernadero. Este sistema de riego permite reducir las pérdidas de agua que se producen con otros sistemas y, además, se disminuyen las necesidades de mano de obra que requiere esta operación. La instalación del riego por goteo consta de una serie de tuberías de polietileno de baja densidad dispuestas sobre la superficie del suelo, estas portan a su vez los emisores o goteros que permiten la salida del agua al exterior en forma de goteo. El agua llega hasta el invernadero desde el cabezal de riego mediante tuberías enterradas de PVC que se conectan a la instalación de riego por goteo.

Dado que el marco de plantación de nuestro cultivo fue de 1 x 0.5 m, los ramales se separaron entre sí a 1 m y en ellos los ramales portagoteros se distanciaron 0.5 m. Los ramales portagoteros se colocaron en la misma dirección que las líneas de cultivo, y el sentido de circulación del agua en ellos es descendente para evitar que, al finalizar el riego, el agua que llena las tuberías se desplace hacia los primeros goteros de los ramales y estos reciban más agua que los últimos. Con ello se consigue que el cultivo sea más homogéneo en su desarrollo al ser también la distribución del agua más uniforme en la parcela. El tipo de gotero utilizado fue el llamado interlinea de laberinto y su caudal es de 2 litros a la hora para una presión de 10 m.c.a., que es el que comúnmente se emplea en los invernaderos de la zona y ofrece buenos resultados (Figura 8).

El suelo del invernadero tiene una pendiente de un 1% en ambos sentidos. El tipo de sustrato utilizado para el cultivo fue el enarenado y se usó arena gruesa (2-2.5 mm); tamaño ideal para el enarenado (Figura 8).



Figura 8: Sistema de riego por goteo y sustrato del invernadero.

III.2. CONDICIONES AMBIENTALES DEL INVERNADERO Y MANEJO DEL CULTIVO

III.2.1. Condiciones ambientales de la zona

Según la clasificación climática de Papadakis, la zona está en clima Mediterráneo semiárido. Los principales parámetros que caracterizan la zona son los siguientes:

- Temperatura media anual: 20°C.
- Temperatura media mínima: 13°C.
- Temperatura media máxima: 26,7°C.
- Precipitación media anual: 209,4 mm.
- Meses con mayor precipitación: octubre y diciembre.
- Meses con menor precipitación: julio y agosto.
- Meses con temperatura menor o igual de 0°C: diciembre, enero y febrero.
- ETP anual: 898 mm.

El nivel medio de insolación es de más de 2500 horas al año, resultando ser uno de los más altos de España y muy favorable para el establecimiento de cultivos extratempranos en invernadero. Las condiciones de temperaturas altas son favorables también para este ensayo ya que es una manera de que se induzca el carácter a analizar.

El régimen de vientos, de componente Este y Oeste, ronda una velocidad media de 15 Km/h, resultando beneficioso para garantizar la correcta ventilación de los invernaderos.

Todas estas características climatológicas se verán en gran medida moduladas en relación al cultivo por el efecto del invernadero tipo parral en el que se desarrolla el ensayo. Las temperaturas alcanzan valores más extremos entre el día y la noche dentro de este tipo de invernadero, cambiando las condiciones establecidas por Papadakis para el clima Mediterráneo semiárido. Las temperaturas máximas diurnas durante el periodo del ensayo (primavera-verano) fueron de 42°C, mientras que las mínimas nocturnas no superaron los 22°C. Estos saltos térmicos favorecieron las condiciones del ensayo para estudiar el carácter que se pretendía observar.

III.2.2. Material vegetal y manejo del cultivo

El material vegetal que hemos utilizado en el ensayo fue el siguiente:

- Dos líneas puras *Bog* y *Veg*. Estas dos difieren en su expresión sexual. La línea *Bog* se caracteriza por presentar un alto número de flores femeninas, y sin embargo la línea *Veg* se caracteriza por presentar un gran número de flores masculinas. Ambas variedades fueron cedidas por el Dr. Harry Paris (Newe Ya'ar Research Center Agricultural Research Organization, Israel).
- La generación F1 y dos poblaciones F2 del cruce *Bog* x *Veg*.
- Dos poblaciones F2 procedente de la autofecundación del híbrido *Cavili*.
- Diferentes familias F3 descendientes del cruzamiento inicial *Bog* x *Veg*.

III.2.2.1. Siembra

La siembra se realizó en el vivero Vitalplant. Las semillas de las distintas variedades se pusieron en varias bandejas de 96 alveolos. Las plántulas (Figura 9) se recogieron cuando tenían la primera hoja verdadera.



Figura 9: Plántulas de calabacín.

III.2.2.2. Plantación

Las plantas se trasplantaron en el invernadero colocándolas en un marco de plantación de 1 x 0.5 m.

En la Figura 10 se presenta un croquis de la disposición en el invernadero de las distintas poblaciones y líneas estudiadas.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

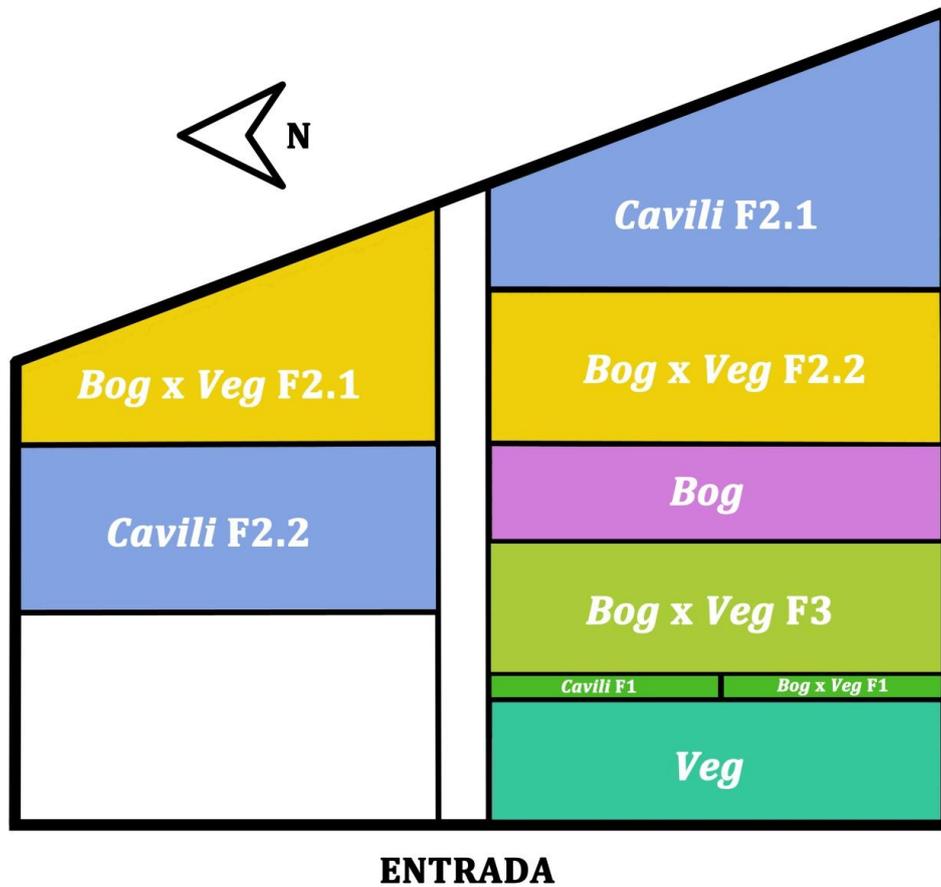


Figura 10: Esquema de la plantación de las diferentes poblaciones en el invernadero.

III.2.2.3. Cuidados, poda y limpieza de las plantas

La poda que se realizó fundamentalmente fue la eliminación de tallos secundarios, ya que el material vegetal (F2) procedente del cruce *Bog x Veg* presentaba una fuerte tendencia a la proliferación de tallos secundarios. También se realizó una poda sanitaria, en la que se eliminaron hojas viejas y hojas infectadas principalmente con oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). También se arrancaron los frutos podridos.

Conforme se iban evaluando las distintas plantas de cada variedad, se fueron arrancando para que las restantes tuvieran un mejor desarrollo y se pudieran evaluar mejor. De esta manera el fenotipado de las plantas fue más escalonado y se pudo realizar

mejor. Algunas plantas se tuvieron que entutorar para facilitar el paso entre ellas para poder analizarlas y manejarlas mejor.

III.2.2.4. Tratamientos fitosanitarios

Los productos fitosanitarios que se tuvieron que utilizar en nuestro cultivo de calabacín figuran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: Productos fitosanitarios utilizados en nuestro cultivo de calabacín. (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

Nombre	Tipo	Materia activa	Elimina
Sulf 80	Fungicida	Azufre 80%	Oídio, araña roja y otros ácaros
Caddy 10 Pepite	Fungicida	Ciproconazol 10%	Oídio
Ortiva	Fungicida	Azoxystrobin 25%	Oídio
Teppeki	Insecticida	Flonicamid 50%	Pulgón
Terrasita	Insecticida	Imidacloprid 20%	Pulgón y mosca blanca

III.3. TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para poder evaluar las plantas antes de nada se numeraron y se marcaron todas con escapularios (Figura 11).



Figura 11: Numerando las plantas.

III.3.1. Efecto de la poda de flores femeninas sobre la expresión sexual

En nuestro cultivo de calabacín lo primero que se realizó fue el aclareo de flores femeninas en la línea pura *Bog*. Este aclareo se hizo con el propósito de ver cómo afectaba en el desarrollo sexual de la planta. Las plantas se sometieron a tratamientos que consistieron en el aclareo de flores femeninas en los siguientes estadios (Figura 12):

- Flores pequeñas, flores entre 2 y 4 cm de largo.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

- Flores en preantesis, flores de pétalos cerrados que amarillean, pero que todavía no habían alcanzado la antesis.
- Flores en antesis, flores totalmente desarrolladas y abiertas.

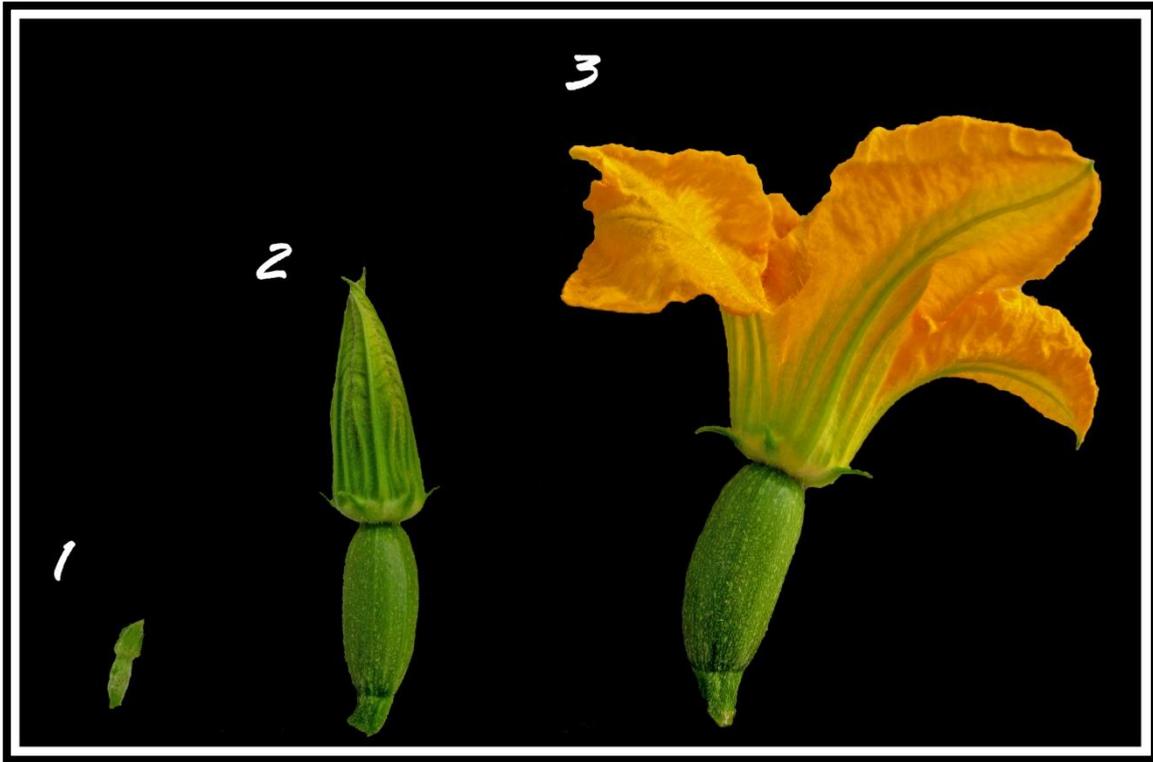


Figura 12: Estadios de desarrollo de las flores femeninas que fueron utilizadas en el aclareo. 1: Flor pequeña (2-4 cm de tamaño). 2: Flor en preantesis. 3: Flor en antesis.

Este aclareo se realizó durante 3 y 4 semanas y sobre 8 nudos dependiendo del tratamiento y el desarrollo de la planta. Cada tratamiento estaba separado en varias líneas diferentes y en cada línea había 10 plantas. Como control se utilizaron plantas donde no se procedió al aclareo de flores femeninas.

Una vez podadas las plantas de manera diferencial se procedió a evaluar su expresión sexual en el tallo principal de cada una de las plantas siguiendo la metodología que se describe en el apartado III.3.5.

III.3.2. Fenotipado de las flores

En calabacín se han observado que en determinadas condiciones climáticas (altas temperaturas) las plantas pueden presentar flores femeninas, flores con tendencia a la bisexualidad y flores bisexuales. Estos fenotipos sexuales de las flores se valoraron según el grado de desarrollo que presentaron los estambres, obteniéndose de esta manera tres grupos diferenciados (Figura 13):

- Flores femeninas o flores tipo 0: aquellas sin desarrollo de estambres.
- Flores bisexuales tipo 1: flores con un desarrollo incipiente de estambres.
- Flores bisexuales tipo 2 - 3: flores con un desarrollo completo de las anteras.

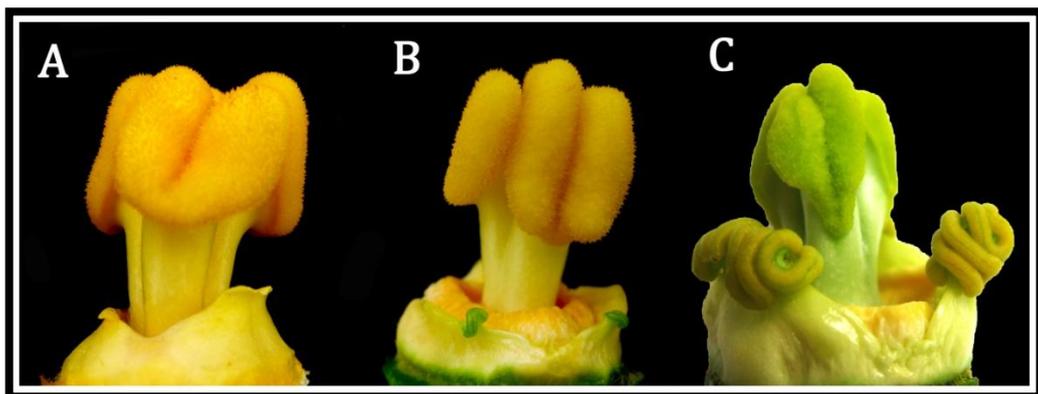


Figura 13: A: Flor femenina (tipo 0). B: Flor con tendencia a la bisexualidad (tipo 1). C: Flor bisexual (tipo 2-3).

Las flores femeninas se caracterizan por poseer un peciolo corto y engrosado, un ovario ínfero, los pétalos maduros son grandes anaranjados y los sépalos son muy pequeños.

Las flores bisexuales se diferencian de las femeninas en que estas comienzan a desarrollar un poco del tercer verticilo, androceo, es decir, aunque estos estambres no están totalmente desarrollados. Estas flores no son claramente bisexuales ya que

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

dependen mucho de las condiciones ambientales del cultivo, principalmente las altas temperaturas.

Las flores bisexuales tienen estambres claramente desarrollados a la vez que los carpelos. También tienen un desarrollo del ovario más avanzado (Figura 14) respecto a los demás órganos florales. Cuando estas flores llegan a antesis (aunque muchas de ellas no llegan a abrirse) el ovario es mucho más grande que el ovario de cualquier flor femenina en antesis.

El fenotipado de flores se realizó en las generaciones F2 y F3 de *Bog x Veg* y las poblaciones F2 de *Cavili* durante tres semanas. Según el desarrollo de cada planta, se tomaron por cada planta entre cuatro y siete flores en antesis o en preantesis en las bisexuales, ya que no llegaban a abrirse. A partir del fenotipo de las flores de cada planta, se determinó el índice de andromonoecia por planta, considerando los valores 1, 2 y 3 para flores femeninas, parcialmente bisexuales y bisexuales respectivamente. De este modo las plantas se pudieron clasificar según el índice de andromonoecia en monoicas, intermedias y andromonoicas. Siendo las monoicas las que tuvieran un índice entre 0 y 1, las intermedias entre 1 y 2 y las andromonoicas entre 2 y 3.

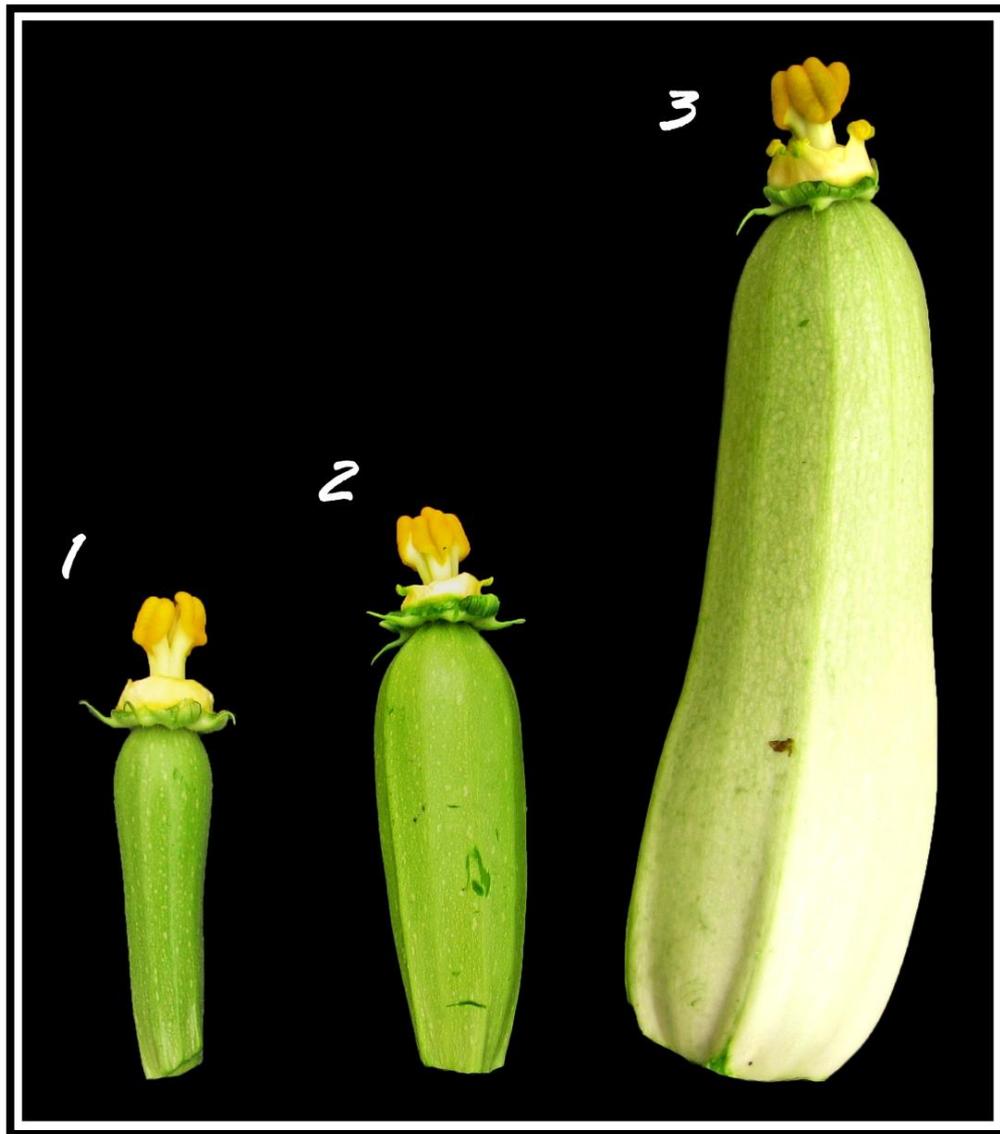


Figura 14: Diferencia del ovario asociado a los distintos fenotipos florales. 1: Flor femenina. 2: Flor con tendencia bisexual. 3: Flor bisexual.

III.3.3. Crecimiento de los órganos florales

Se hizo el seguimiento del crecimiento de los órganos florales en la población F2 de *Cavili* en flores femeninas, bisexuales y masculinas. Este seguimiento se hizo después de que las plantas de esta población estuvieran clasificadas según su expresión sexual en dos grupos: andromonoicas y monoicas.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Los botones florales se marcaron (Figura 15) cuando los pétalos tenían una longitud de 4-5 mm. A partir de ahí se midieron cada dos días hasta que llegaron a antesis. Para ello se utilizó un calibre digital y una regla. Se midieron en total 15 flores de cada tipo (masculinas, femeninas y bisexuales).



Figura 15: Seguimiento del crecimiento de una flor femenina hasta su antesis.

III.3.4. Comparación del crecimiento de los órganos florales en las poblaciones F2 de *Cavili* y de *Bog x Veg*

Para comparar el crecimiento de los distintos órganos florales entre los distintos tipos de flores se tomaron en campo diferentes muestras de las F2 de *Cavili* y *Bog x Veg*. Se recogieron flores masculinas, femeninas y bisexuales en diferentes estadios de

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

desarrollo, y se congelaron para medir después detenidamente cada uno de sus órganos florales.

En las flores congeladas (Figura 16), se midieron sus órganos florales con un calibre digital y una regla. Se midió la longitud de los pétalos, sépalos, pistilo y estambres, y del ovario a parte de su longitud también se tuvo en cuenta el diámetro externo y el diámetro del endocarpo.

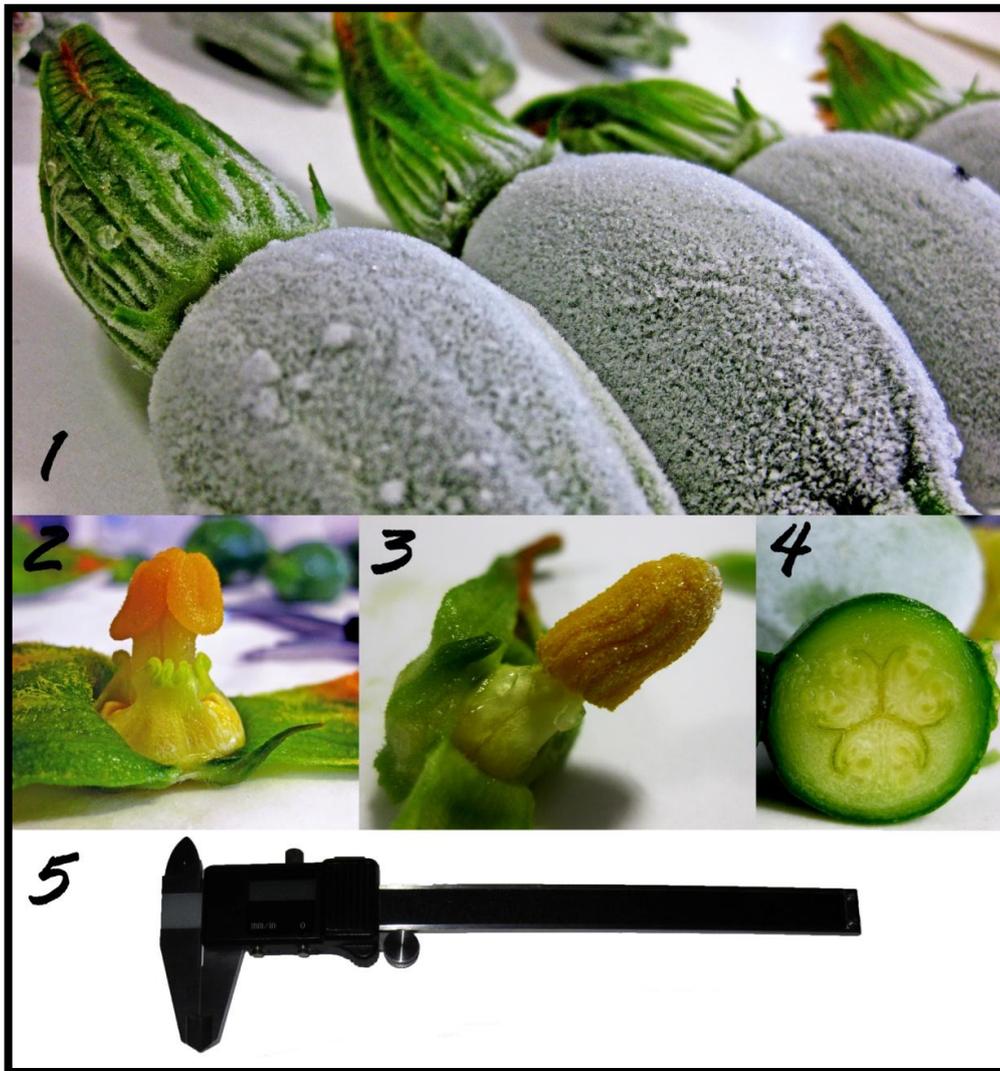


Figura 16: Medida de los órganos florales en flores femeninas, bisexuales y masculinas. 1: Flores descongelándose. 2: Detalle de una flor bisexual. 3: Detalle de una flor masculina. 4: Detalle de un ovario. 5: Calibre digital.

III.3.5. Expresión sexual de las plantas

Lo último que se hizo en el ensayo de campo fue evaluar la expresión sexual de las plantas una vez arrancadas. Para evaluar la expresión sexual se identificó en el tallo principal de cada planta, el tipo de flor (masculina, femenina o bisexual) en cada uno de los 35 primeros nudos. Este fenotipado se hizo en las poblaciones de *Bog*, y en las generaciones F2 y F3 de *Bog x Veg* y la F2 de *Cavili*, y para ello las plantas se agruparon según su índice de andromonoecia en andromonoicas y monoicas. En las plantas monoicas de la población F2 de *Bog x Veg* se evaluó también la expresión sexual en el tallo secundario.

A partir de la expresión sexual de cada nudo, se calculó el porcentaje de flores masculinas y femeninas y la precocidad de la floración femenina de cada planta.

III.3.6. Análisis de segregación del gen *CpACS2/7*

Tras secuenciar el gen *CpACS2/7* en las líneas puras *Bog* y *Veg* se detectó un cambio nucleotídico traducido a proteína que coincide con una diana para la enzima de restricción Taq I (Martínez y Jamilena, sin publicar). Esta mutación se ha utilizado para estudiar la segregación del gen *CpACS2/7* en la población F2 de *Bog x Veg*, y determinar su posible cosegregación con la andromonoecia detectada en la población F2. Para ello hemos analizado 10 plantas monoicas (índice de andromonoecia = 0) y 10 plantas andromonoicas (índice de andromonoecia ≥ 2) de la población F2 de *Bog x Veg*.

Para estudiar esta posible cosegregación, se aisló ADN de hojas jóvenes de cuatro plantas andromonoicas (cuyo índice de andromonoecia estaba entre 2 y 3) y cuatro monoicas (cuyo índice de andromonoecia era 0). Se cogieron hojas de entre 3 y 5 cm de limbo de los ápices de las plantas por ser el material del que mejor se puede extraer el

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

ADN. Este material fue congelado inmediatamente en campo en nitrógeno líquido y almacenado hasta su uso en un congelador a -80°C.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial *DNeasy® Plant Mini Kit* (QIAGEN). Tras su purificación, el ADN se cuantificó usando el programa Take3 del Software Gen 5 1.10 Epoch (Biotek) (Figura 17).



Figura 17: Programa Take3 del Software Gen 5 1.10 Epoch (Biotek).

Se utilizaron entre 15 y 35 ng de los distintos ADNs para la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), que nos permitiese amplificar el fragmento del gen *CpACS2/7* que contenía la mutación. Los componentes así como las condiciones de amplificación de la PCR se presentan en la Tabla 8 y Tabla 9, respectivamente. Los primers utilizados en la PCR tienen las siguientes secuencias:

- Primer Forward (ACS27_2FWD): GGATACAATCAACAGTTTTTCGC.
- Primer Reverse (ACS27 RT REV): GGACCGGCTCAAGAAACGATATG.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Tabla 8: Componentes de la PCR.

Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μl)/reacción
Agua miliQ			30.75
Cl ₂ Mg	25mM	2mM	4
5X Green GoTaq Flexi Buffer	5X	1X	10
Primer Forward	50 ng/μl	50 ng	1
Primer Reverse	50 ng/μl	50 ng	1
Mezcla de dNTPs	2.5mM/dNTP	200 μM /dNTP	2
ADN molde	10 ng/μl	10 ng	1
Go Taq DNA Polymerase	5 U/μl	1.25 U	0.25
Total			50

Tabla 9: Condiciones de amplificación de la PCR.

Fase PCR	Temperaturas	Tiempo	Ciclos de repetición
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	20 s	
Anillamiento	60°C	30 s	35 ciclos
Extensión	72°C	1 min	
Extensión	72°C	10 min	1 ciclo
	22°C	Infinito	

La PCR se realizó en el termociclador Gene Amp PCR System 2700 de Applied Biosystems como se ve en la Figura 18.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín



Figura 18: 1: Gene Amp PCR System 2700 donde se realizó la PCR. 2: Programa de PCR diseñado para amplificar el fragmento de interés del gen *CpACS2/7*. 3: Tubos de PCR insertos en el bloque del termociclador.

Los fragmentos amplificados se purificaron con el QIAquick PCR Purification Kit y se chequeó su concentración y tamaño en gel de agarosa al 1%. De estas purificaciones se tomaron 200 ng para su digestión con la enzima de restricción Taq I (Roche). Las reacciones de digestión se hicieron en un volumen total de 10 μ l. Con los siguientes componentes:

- 1 μ L de Buffer 10x de la enzima.
 - 0.5 μ L de enzima Taq I.
 - 200 ng de cada PCR purificada.
 - Agua.
- } 8.5 μ L

Las digestiones para cada uno de los individuos analizados se realizaron durante 1h a 65°C y posteriormente los resultados fueron analizados en gel de agarosa al 1.3% (Figura 19).



Figura 19: Gel de agarosa donde se cargaron las distintas muestras de ADN después de su digestión.

III.3.7. Análisis estadístico

Por último todos los datos obtenidos se analizaron con el programa de análisis estadístico Statgraphics Plus 4.1 donde se realizó un análisis de la varianza ($p < 0.05$) para un nivel de confianza del 95%.

En los casos necesarios, la comparación de grupos fue realizada mediante un test de mínimas diferencias de Fisher (LSD). Para ello se analizó previamente la normalidad de los datos. En caso de que la población de datos no mostrara normalidad, se realizaron transformaciones clásicas de forma previa al análisis ANOVA. Además se realizaron análisis de regresión lineal para estudiar la relación entre distintas variables obteniendo la ecuación, el valor de R^2 y el P-valor que establece la confianza del estadístico empleado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN SEXUAL Y LA ANDROMONOECIA EN LAS POBLACIONES F2 DE CALABACÍN

En las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y de *Cavili* estudiadas, observamos que la mayoría de las plantas se comportaron como monoicas, es decir, plantas con flores masculinas y femeninas en el mismo pie. Pero a su vez, hubo un porcentaje de plantas que se comportaron como andromonoicas, donde las plantas tenían flores masculinas, femeninas y bisexuales. Se ha observado que la temperatura es un factor muy influyente en la aparición de los distintos fenotipos florales, de tal manera que las altas temperaturas propiciaron la formación de flores bisexuales.

Para evaluar la andromonoecia de las distintas plantas de las poblaciones de calabacín se valoraron las flores según el grado de desarrollo que presentaron los estambres, obteniéndose de esta manera tres grupos diferenciados. (Figura 20):

- Flores femeninas o flores tipo 0: aquellas sin desarrollo de estambres.
- Flores bisexuales tipo 1: flores con un desarrollo incipiente de estambres.
- Flores bisexuales tipo 2 - 3: flores con un desarrollo completo de las anteras.

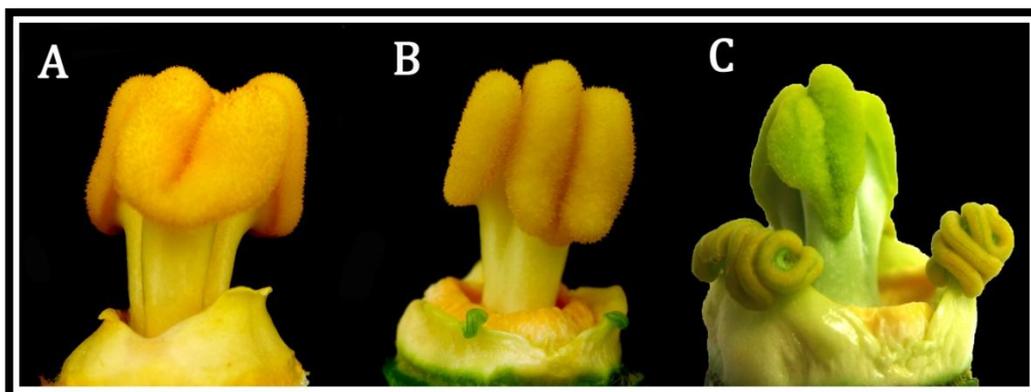


Figura 20: A: Flor femenina (tipo 0). B: Flor con tendencia a la bisexualidad (tipo 1). C: Flor bisexual (tipo 2-3).

El fenotipado de las flores se realizó en las generaciones F2 y F3 de *Bog x Veg* y las poblaciones F2 de *Cavili* durante tres semanas. A partir del fenotipo de las flores de cada planta, se determinó el índice de andromonoecia por planta, considerando los valores 0, 1, 2 y 3 para flores femeninas, parcialmente bisexuales y bisexuales respectivamente. De este modo las plantas se pudieron clasificar según el índice de andromonoecia en monoicas, intermedias y andromonoicas. Siendo las monoicas las que tuvieran un índice entre 0 y 1, las intermedias entre 1 y 2 y las andromonoicas entre 2 y 3.

IV.1.1. Efecto de la expresión sexual sobre la andromonoecia

Puesto que la expresión sexual de calabacín, es decir el número de flores femeninas y masculinas por planta, y la aparición de flores bisexuales en plantas andromonoicas, se producen por una disminución en la producción o sensibilidad al etileno (Manzano y col., 2010; 2011), en este proyecto hemos estudiado si las plantas andromonoicas observadas en las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y de *Cavili* están asociadas con una mayor o menor producción de flores con ovario (femeninas y bisexuales). Los resultados de ambas poblaciones no indican la existencia de correlación entre ambos caracteres (Figura 21). De hecho, aunque en las plantas andromonoicas e intermedias de la población F2 de *Bog x Veg* el número de flores femeninas era algo mayor, éste varió

entre 40 y 95%. Además, en las plantas completamente monoicas que no mostraron ninguna flor bisexual (índice andromonoecia = 0), su porcentaje de flores femeninas por plantas varió entre el 20 y el 98%. (Figura 21). Tampoco hemos detectado diferencias significativas para el número de flores femeninas entre plantas de fenotipo monoico, intermedio y andromonoico (Figura 22).

Todos estos datos demuestran que la aparición de flores bisexuales en algunas de las plantas de las poblaciones F2 estudiadas no parece depender de su expresión sexual. Manzano y col. (2010) demostraron que el número de flores femeninas y masculinas por planta en la población F2 de *Bog x Veg* dependía de la sensibilidad al etileno conferida por el gen *CpWEI* (*Cucurbita pepo* *WEAK ETHYLENE INSENSITIVE*) de tal forma que las plantas mutantes para este gen muestran un fenotipo más androico. Nuestros datos de correlación entre el índice de andromonoecia y la expresión sexual indican claramente que la aparición de flores bisexuales en las plantas más andromonoicas no depende del gen *CpWEI* en esta misma población F2 procedente del cruzamiento *Bog x Veg*. En la F2 de *Cavili*, donde la variación en el número de flores femeninas por planta fue mucho menor (Figura 21), tampoco se observa ninguna correlación con el índice de andromonoecia de las plantas.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

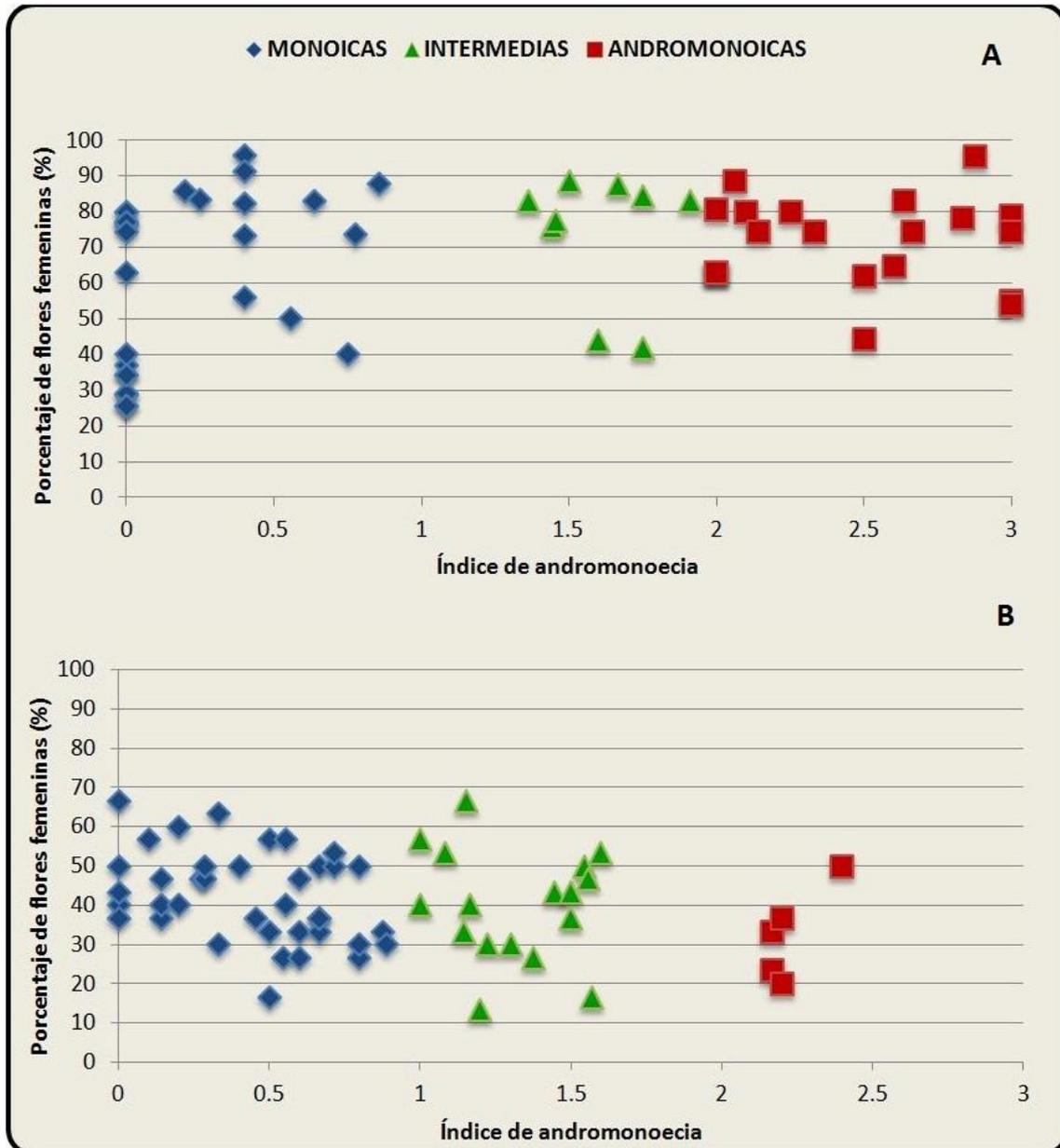


Figura 21: Correlación entre el índice de andromonoecia y el porcentaje de flores femeninas por planta en dos poblaciones F2 de calabacín. A: Población F2 de Bog x Veg. B: Población F2 de Cavili.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

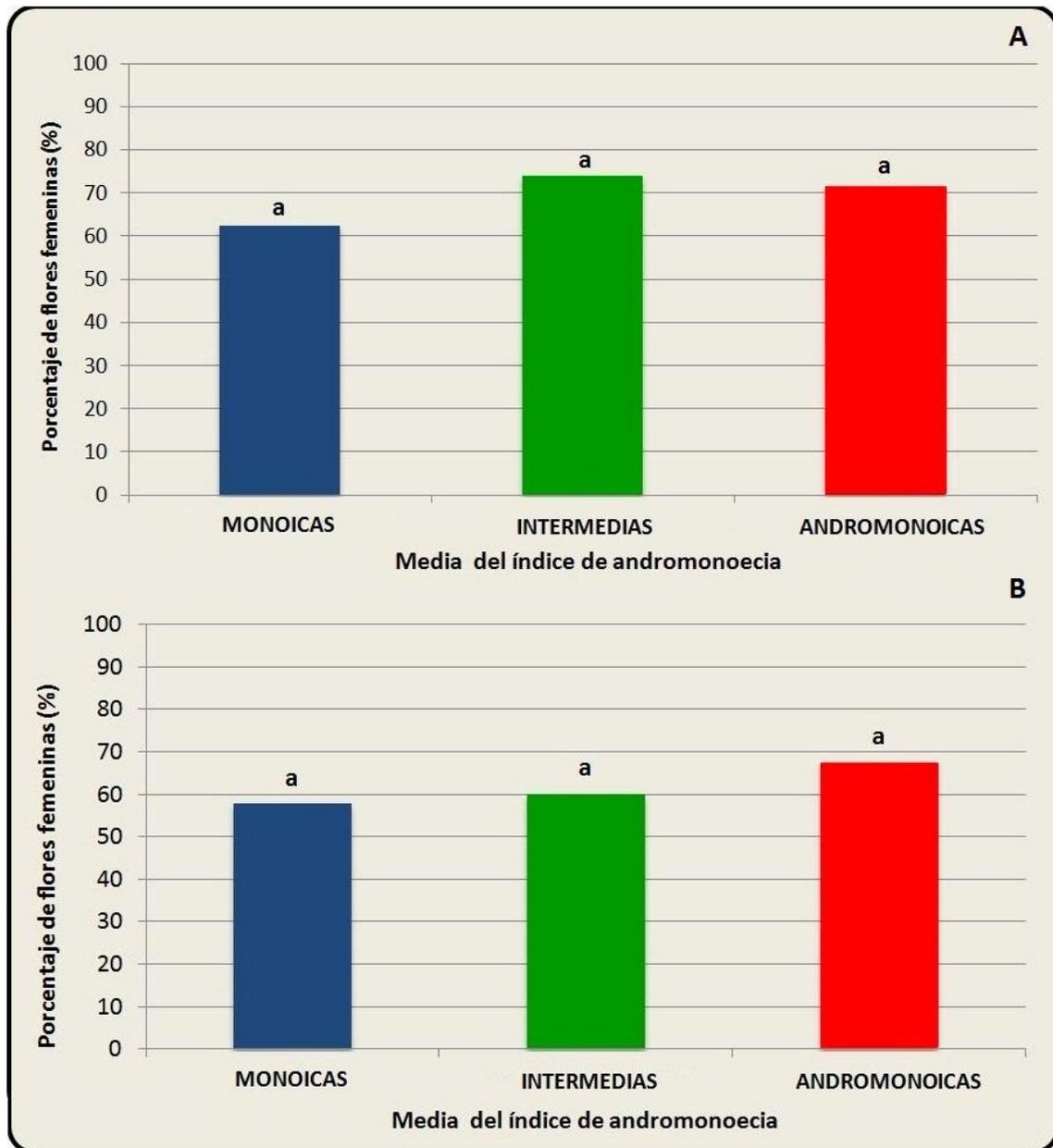


Figura 22: Comparación del número de flores femeninas en plantas monoicas, intermedias y andromonoicas de dos poblaciones F2 de calabacín. A: Población F2 de Bog x Veg. B: Población F2 de Cavili.

IV.1.2. Relación entre la expresión sexual en el tallo principal y secundarios

En la población F2 de *Bog x Veg* se evaluó la expresión sexual de las plantas tal y como se describe en el apartado III.3.5, identificando en el tallo principal de cada planta, el número de flores femeninas y masculinas que había en los 35 primeros nudos. Esta operación también se realizó en uno de los tallos secundarios de 12 plantas monoicas. Esto nos ha servido para ver la relación que existe entre la expresión sexual del tallo principal y del secundario, en cuanto al porcentaje de flores femeninas y la precocidad de la floración femenina (Figuras 23, 24 y 25).

Este análisis se ha realizado únicamente en la población F2 de *Bog x Veg* por tratarse de plantas que producen tallos secundarios. No ocurre así en los descendientes del híbrido *Cavili*, por lo que no ha sido posible estudiar esta relación en este caso.

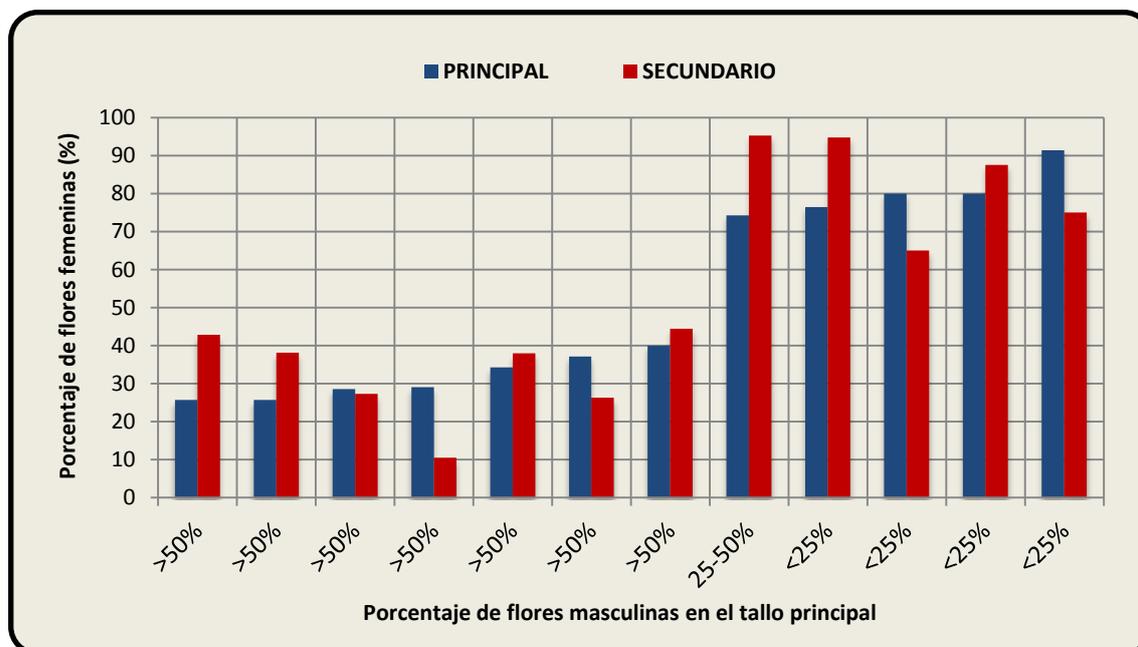


Figura 23: Porcentaje de flores femeninas en los tallos principales y secundarios de cada una de las 12 plantas monoicas analizadas en la población F2 de *Bog x Veg*. Cada una de las plantas mostró diferentes porcentajes de flores masculinas por planta.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

La Figura 24 muestra la correlación entre el porcentaje de flores femeninas en el tallo principal y el secundario de las plantas de calabacín de la población F2 de *Bog x Veg*. Como vemos el coeficiente de regresión R^2 está cerca de 0.8 y el P-valor es menor de 0.01, lo que implica una relación clara entre las dos variables analizadas. Esta información es muy recomendable tenerla en cuenta a la hora de la mejora y selección de plantas para obtener plantas muy productivas, con alto porcentaje de flores femeninas.

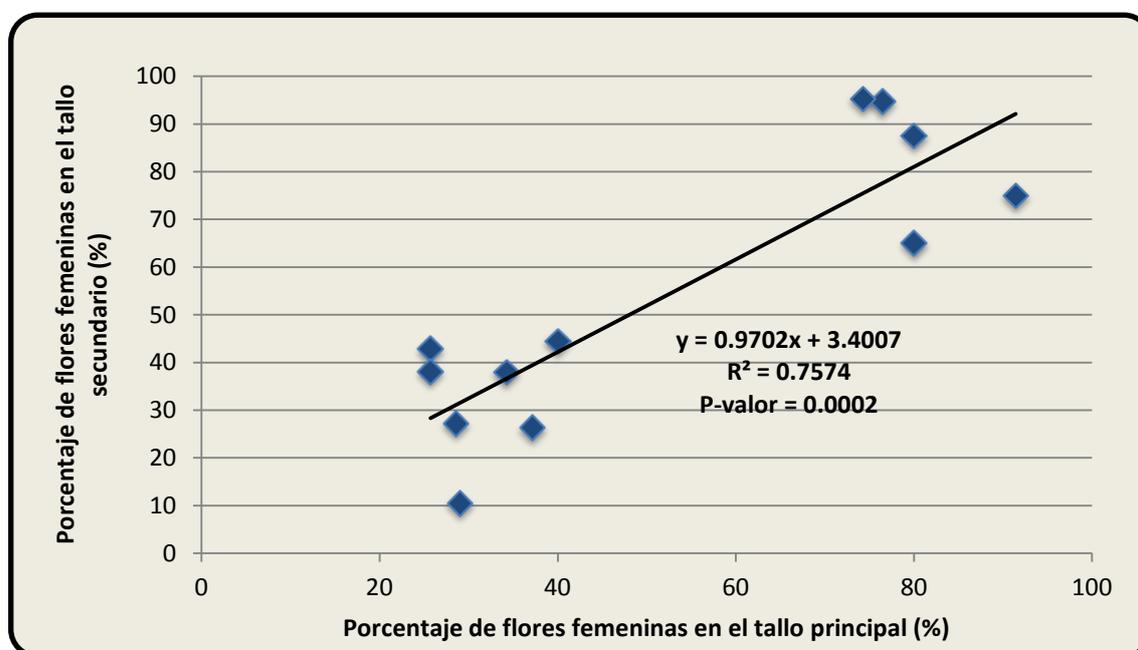


Figura 24: Correlación entre el porcentaje de flores femeninas en el tallo principal frente al tallo secundario en 12 plantas de la población F2 de *Bog x Veg*.

En cuanto a la precocidad de la floración femenina, es decir el número de nudos hasta la aparición de la primera flor femenina, el tallo principal es normalmente menos precoz que los tallos secundarios (Figuras 25 y 26), aunque el tallo secundario tiende a ser más precoz cuanto más lo es el principal (Figura 26).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

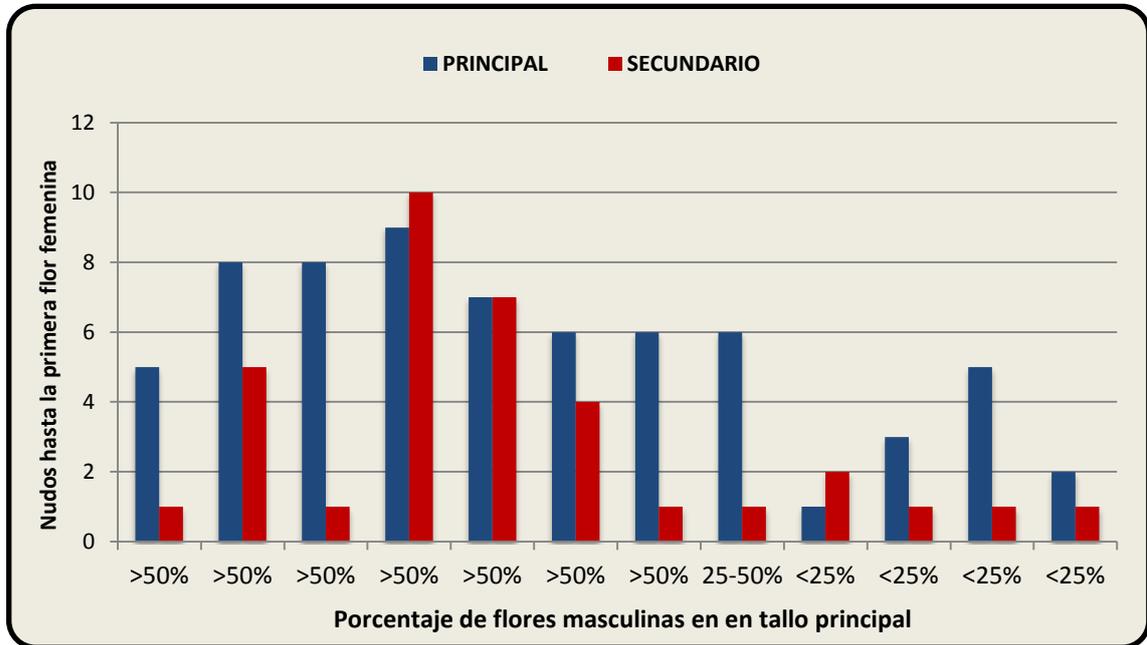


Figura 25: Precocidad de la floración femenina de los tallos principales y secundarios de las 12 plantas monoicas analizadas en la población F2 de *Bog x Veg*. Se muestra el porcentaje de flores masculinas en cada una de las plantas analizadas.

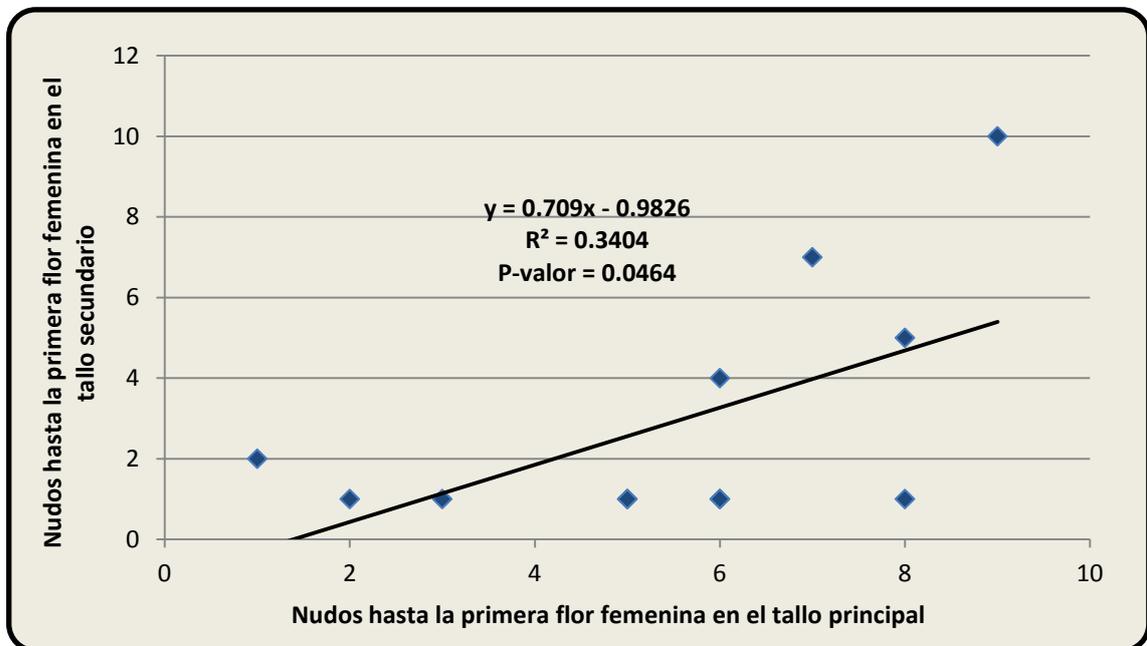


Figura 26: Correlación entre la precocidad de la floración femenina en el tallo principal y el secundario en 12 plantas de la población F2 de *Bog x Veg*.

Todos estos resultados indican que la evaluación de la expresión sexual en el tallo principal es suficiente para conocer la expresión sexual en toda la planta. Aunque esto no es muy útil en calabacín, pues en este caso la producción se da únicamente en el tallo principal, este resultado es de gran importancia para la mejora genética de otros morfotipos de *C. pepo* con gran cantidad de tallos secundarios.

IV.1.3. Efecto de la poda de flores femeninas sobre la expresión sexual de calabacín

Estudios recientes del calabacín demuestran que la producción de etileno se acumula principalmente en las flores femeninas (Manzano y col., 2010; 2011). Puesto que la expresión sexual de las plantas se decide en el meristemo apical de la planta, Manzano (2009) ha propuesto un modelo en el que el etileno producido por las flores femeninas en desarrollo podría afectar al meristemo apical de la planta. Además, estudios en la especie *Cucurbita texana* han indicado que la poda de flores femeninas puede alterar la expresión sexual de esta especie (Krupnick y col., 1999). En este trabajo estudiamos si la poda de flores femeninas en diferentes estadios de desarrollo puede afectar a la expresión sexual de la línea pura *Bog*. Para ello, las plantas de *Bog* se sometieron a varios tratamientos, que consistieron en el aclareo de flores femeninas en los siguientes estadios de desarrollo (Figura 27):

- Flores pequeñas, flores entre 2 y 4 cm de largo.
- Flores en preantesis, flores de pétalos cerrados que amarillean, pero que todavía no habían alcanzado la antesis.
- Flores en antesis, flores totalmente desarrolladas y abiertas.

El aclareo se inició en el nudo 18 del tallo principal, y terminó en el nudo 28. Las plantas control no se sometieron a ningún tipo de aclareo.



Figura 27: Estadios de desarrollo de las flores femeninas que fueron utilizadas en el aclareo. 1: Flor pequeña (2-4 cm de tamaño). 2: Flor en preantesis. 3: Flor en antesis.

Los resultados obtenidos indican que el aclareo de flores femeninas no altera significativamente la distribución de flores masculinas y femeninas por planta en el tallo principal de calabacín (Figura 28), ni el número de flores masculinas y femeninas por planta en el tallo principal (Figura 29), aunque el aclareo de flores en preantesis parece que aumentó la feminización de los nudos 21 y posteriores. Por tanto, al contrario de lo que ocurre en *C. texana* (Krupnick y col., 1999), el aclareo de flores femeninas en *C. pepo* no parece alterar su expresión sexual.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

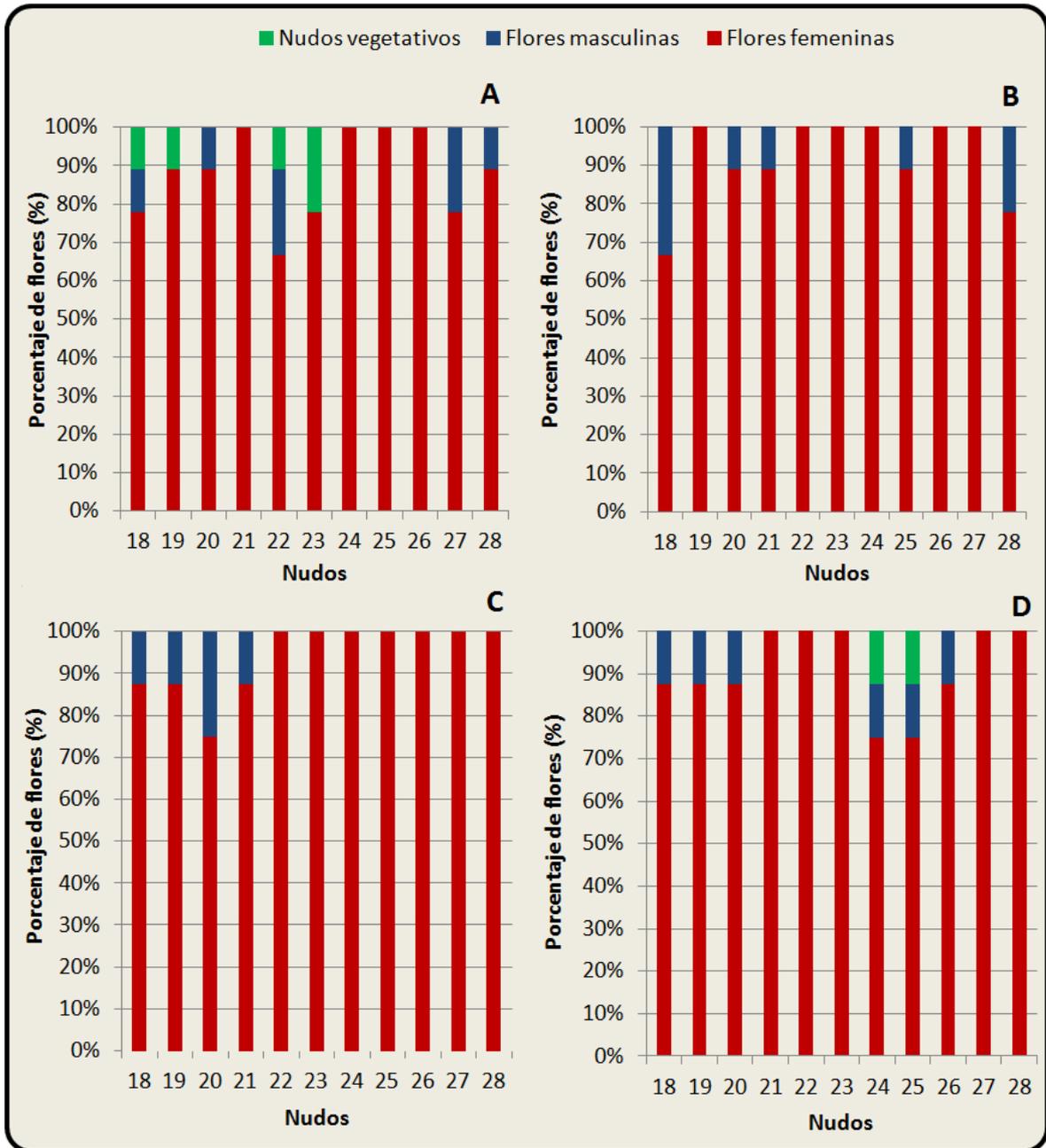


Figura 28: Efecto del aclareo de flores femeninas en la expresión sexual de la línea pura *Bog*. A: Plantas control. B: Plantas con el aclareo de flores en antesis. C: Plantas con el aclareo de flores en preantesis. D: Plantas con el aclareo de flores pequeñas. Las barras indican el porcentaje de flores femeninas (rojo), masculinas (azul) y nudos sin flor (verde) en cada uno de los nudos de la planta posteriores al tratamiento de aclareo.

Para confirmar que no hay diferencias significativas entre unos tratamientos y otros, como se puede observar en la Figura 29, se hizo un análisis estadístico donde se

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

comprobó que efectivamente la expresión sexual (porcentaje de flores femeninas y masculinas) de las plantas sometidas a los distintos tratamientos de aclareo, no varía frente al control. Por lo que en esta población *Bog*, la poda de flores femeninas no repercute en una feminización y masculinización de la planta en los nudos siguientes al aclareo.

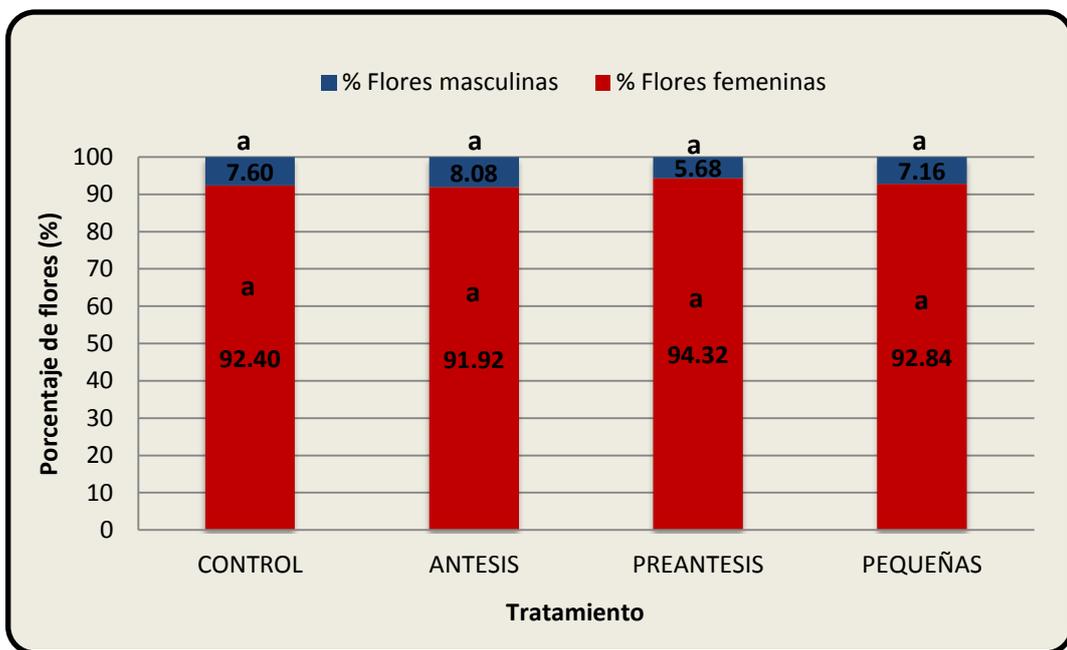


Figura 29: Efecto del aclareo de flores femeninas sobre el porcentaje de flores femeninas y masculinas en plantas de calabacín del genotipo *Bog*.

IV.2. CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS FLORALES EN LOS DISTINTOS TIPOS DE FLORES

IV.2.1. Comparación del crecimiento del ovario y los pétalos en flores femeninas, bisexuales y masculinas

De acuerdo con resultados previos de nuestro grupo de investigación (Peñaranda y col., 2007; Manzano y col., 2011), las flores bisexuales de calabacín se caracterizan por tener un ovario mucho más grande que las flores femeninas, incluso en flores cuyos pétalos están todavía verdes y no han llegado a abrirse. Las flores bisexuales que hemos identificado en las plantas de las poblaciones F2 del cruzamiento *Bog x Veg* y descendientes de la autopolinización de *Cavili* mostraron también el mismo fenotipo (Figura 30). Con el fin de conocer si estas diferencias en el desarrollo de los pétalos y ovarios están asociadas con diferentes tasas de crecimiento de los órganos, se hizo un seguimiento del crecimiento de las flores de la población F2 de *Cavili*, desde que los pétalos de las flores tenían una longitud de 4-5 mm, hasta que llegaban a antesis. El estudio se realizó en un total de 15 flores de cada tipo (masculinas, femeninas y bisexuales).



Figura 30: Flores femeninas (1) y bisexuales (2) en la población F2 de *Cavili*.

Los resultados han demostrado que los pétalos y ovarios de flores femeninas y bisexuales tienen diferentes tasas de crecimiento longitudinal (Figura 31). En los primeros ocho días, las tasas de crecimiento de flores bisexuales y femeninas fueron muy similares (Figura 31). A partir del día 8, sin embargo, los ovarios de las flores bisexuales crecieron a una tasa significativamente mayor que los de las flores femeninas, mientras que los pétalos de las flores bisexuales mostraron una menor tasa de crecimiento longitudinal que en las flores femeninas (Figura 31).

Se evidencia claramente que los pétalos de las flores bisexuales no se desarrollan a la par que su ovario, si no que llevan un retraso que hace que estas flores se diferencien a simple vista de las femeninas, dado que en las femeninas se observa cómo el ovario crece al mismo tiempo que se están desarrollando y madurando los pétalos y el pistilo. Sin embargo vemos que las flores en un principio se desarrollan igual sin apenas diferencias entre las bisexuales y las femeninas, es a partir del día 8 cuando las bisexuales comienzan a desarrollar el ovario más rápidamente que sus pétalos respecto al crecimiento del ovario de las flores femeninas. A partir del día 14, los pétalos de las flores bisexuales apenas crecen, lo que conlleva que en muchas de estas flores los pétalos no lleguen a madurar y a abrirse, aunque el ovario siga creciendo con una tasa ligeramente menor (Figura 31).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

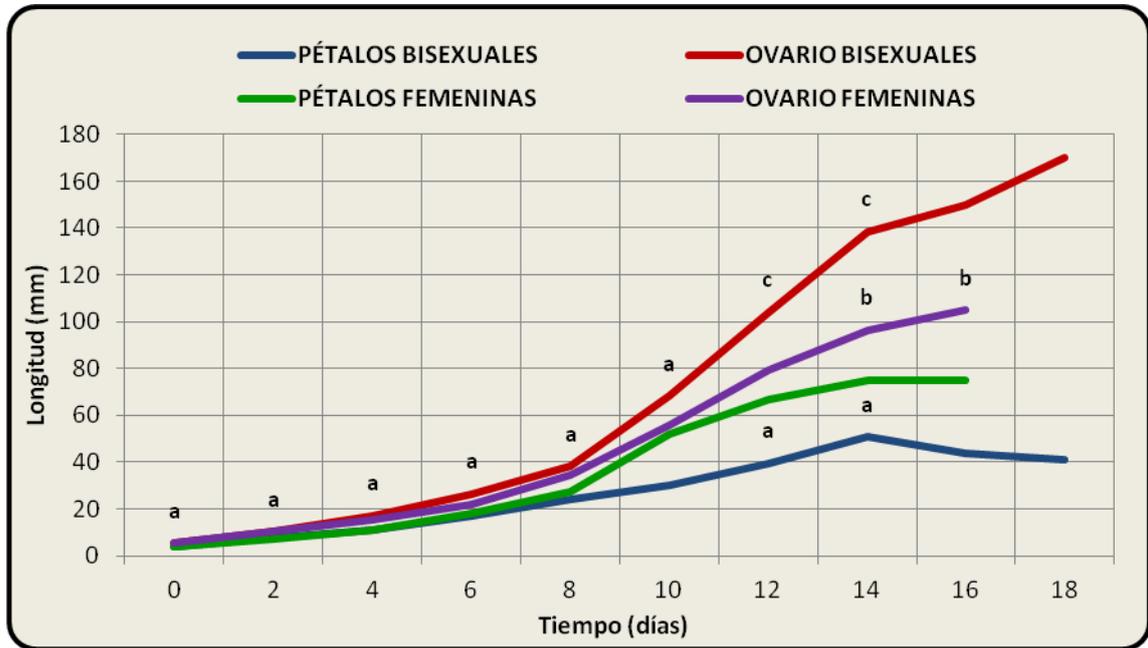


Figura 31: Comparación del crecimiento longitudinal de pétalos y ovarios en las flores femeninas y bisexuales de la población F2 de *Cavili*. El final de cada una de las curvas indica el tiempo de antesis o apertura de la flor. Nótese que las flores bisexuales tardan más tiempo que las bisexuales en alcanzar la antesis, y muchas de ellas no llegan a abrirse después de 18 días.

El crecimiento de los pétalos en las flores masculinas (Figura 32) coincide con lo observado por Peñaranda (2010). Los pétalos de las flores masculinas crecieron a una tasa menor que las femeninas y tardaron unos 6 días más que las femeninas en alcanzar la antesis. La longitud de los pétalos maduros de las flores masculinas fue mayor que la de las flores femeninas y bisexuales (Figuras 32 y 33). El crecimiento de los pétalos de las flores bisexuales, por tanto, tuvo un comportamiento intermedio entre flores femeninas y masculinas (Figura 32).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

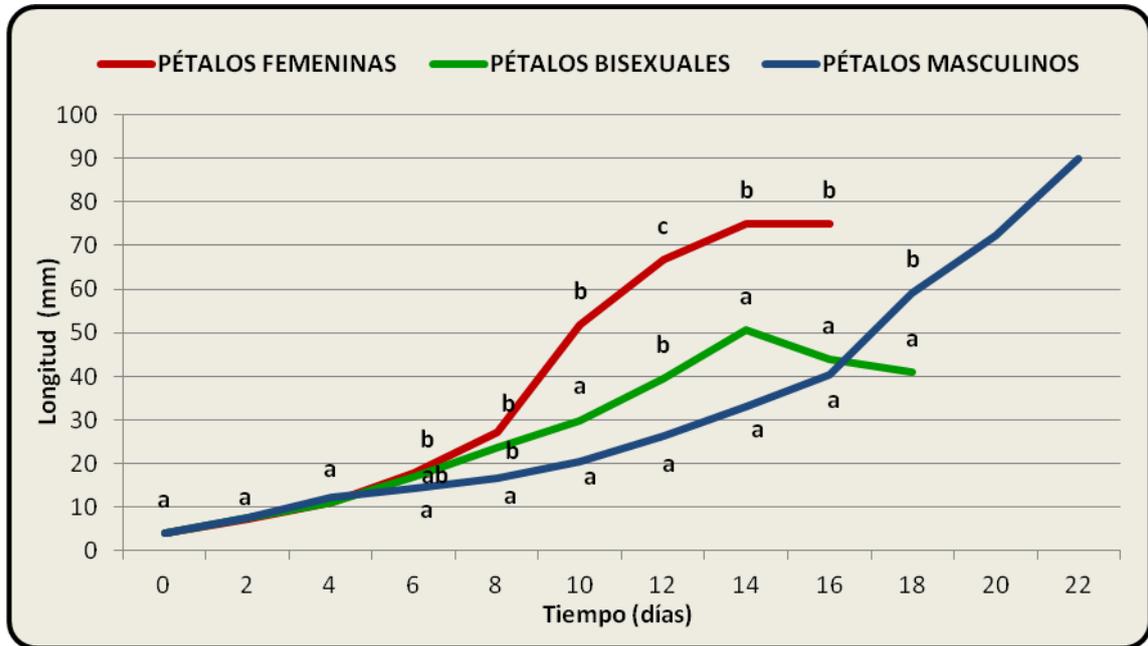


Figura 32: Comparación del crecimiento de los pétalos en flores femeninas, bisexuales y masculinas de la población F2 de *Cavili*.



Figura 33: Diferencia entre los pétalos de las distintas flores. 1: Flor femenina. 2: Flor masculina. 3: Flor bisexual.

Puesto que las flores bisexuales de calabacín parecen originarse como consecuencia de una disminución de etileno en los botones florales femeninos, lo que causaría el arresto del crecimiento de los estambres (Peñaranda, 2010; Manzano y col., 2011), estos resultados indicarían que el etileno de los botones florales femeninos también podrían regular el crecimiento y maduración de los pétalos, así como el crecimiento del ovario. Los frutos que originan las flores bisexuales, de hecho, son partenocárpicas, pues se desarrollan en ausencia de polinización ni tratamientos hormonales. Este crecimiento partenocárpico de los frutos requeriría una disminución de etileno en las flores femeninas tal y como se ha demostrado al comparar la producción de esta hormona en variedades partenocárpicas y no-partenocárpicas de calabacín (Manzano y col., 2010).

IV.2.2. Coordinación en el crecimiento de los órganos florales

Para estudiar la coordinación en el crecimiento de los órganos en flores femeninas, bisexuales y masculinas, hemos medido los órganos de flores en diferentes estadios de desarrollo. En comparación al crecimiento longitudinal de los pétalos, la tasa de crecimiento longitudinal del ovario en las flores bisexuales de las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y descendientes de *Cavili* fue mayor que en las flores femeninas (Figura 34). En la población F2 *Bog x Veg* por cada milímetro que crecen los pétalos, el ovario de las flores bisexuales creció 1.2mm y sin embargo el ovario de las femeninas 0.4mm (Figura 34A). En la población F2 de *Cavili* (Figura 34B), es más pronunciado este crecimiento dado que por cada milímetro que crecieron los pétalos, el ovario de las flores bisexuales creció 2.1mm y el ovario de las femeninas 1.5mm. Esta diferencia entre las dos poblaciones puede deberse a que el morfotipo *Cavili* es más alargado que el de *Bog x Veg*.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

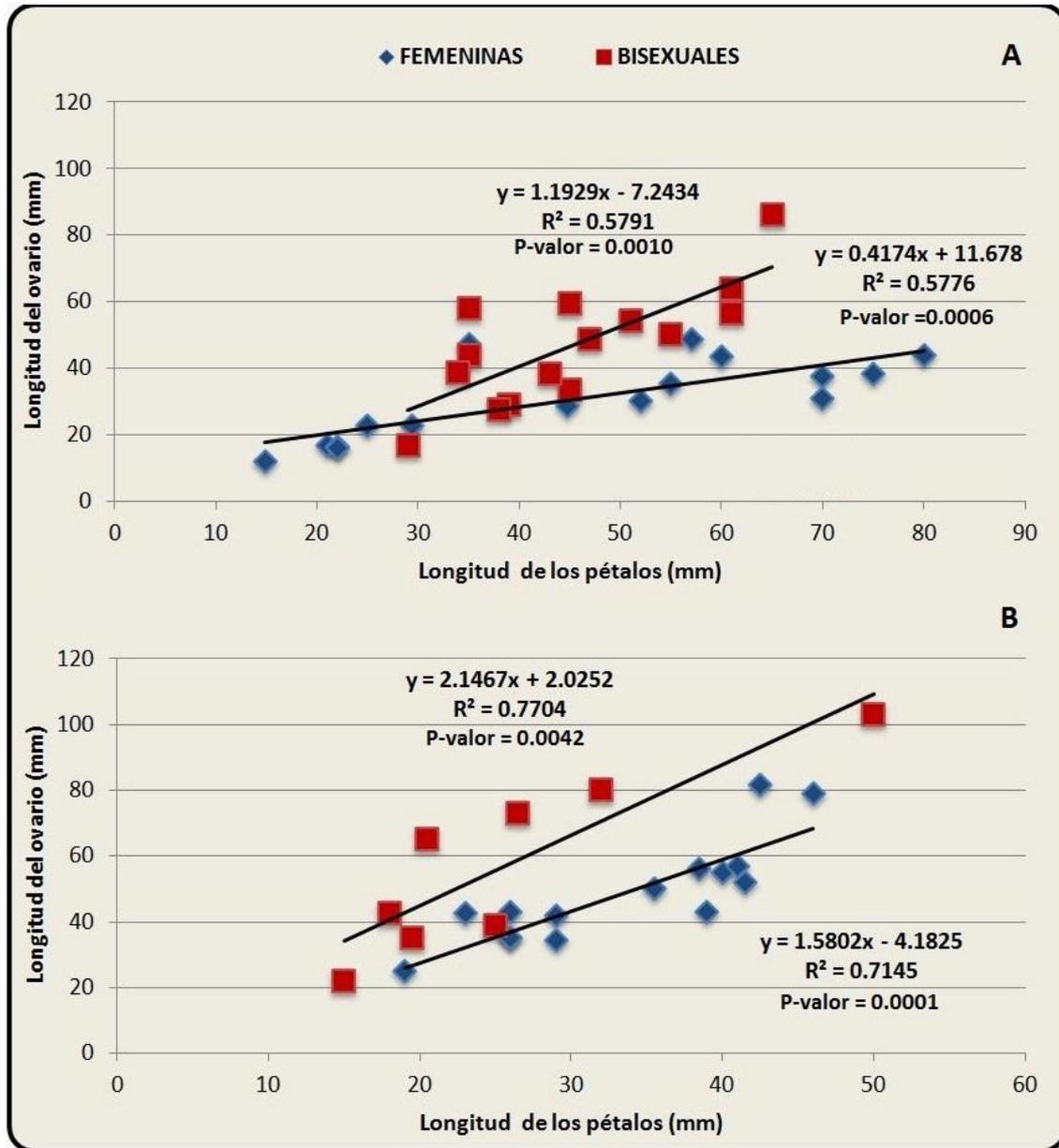


Figura 34: Comparación del crecimiento longitudinal de pétalos y ovario en flores femeninas y bisexuales de distintos tamaños. A: En la población F2 de *Bog x Veg*. B: En la población F2 de *Cavili*.

Para estudiar el crecimiento transversal del ovario se hicieron dos medidas: diámetro externo del ovario y diámetro del endocarpo, que es donde se sitúa la placenta con los óvulos (Figura 35). El crecimiento transversal del ovario respecto a los pétalos también fue mayor en las flores bisexuales que en las flores femeninas. De hecho, en la

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

población F2 de *Bog x Veg* (Figura 36A) vemos que el diámetro del ovario de las flores bisexuales, por cada milímetro que crecen los pétalos, crece 0.67 mm frente a las femeninas en las que el ovario solo crece 0.24 mm. Por otro lado en la población F2 de *Cavili* (Figura 36B) no se observa una diferencia tan grande entre los diámetro de los ovarios de las flores bisexuales y femeninas, ya que el diámetro del ovario de las bisexuales, por cada milímetro que crecen los pétalos, crece 0.62 mm y las femeninas 0.51 mm. Esta diferencia entre las dos poblaciones se debe a que el morfotipo del fruto de *Bog x Veg* crece más a lo ancho (diametralmente) que a lo largo (longitudinalmente), como hace el morfotipo de *Cavili* (Figura 37).

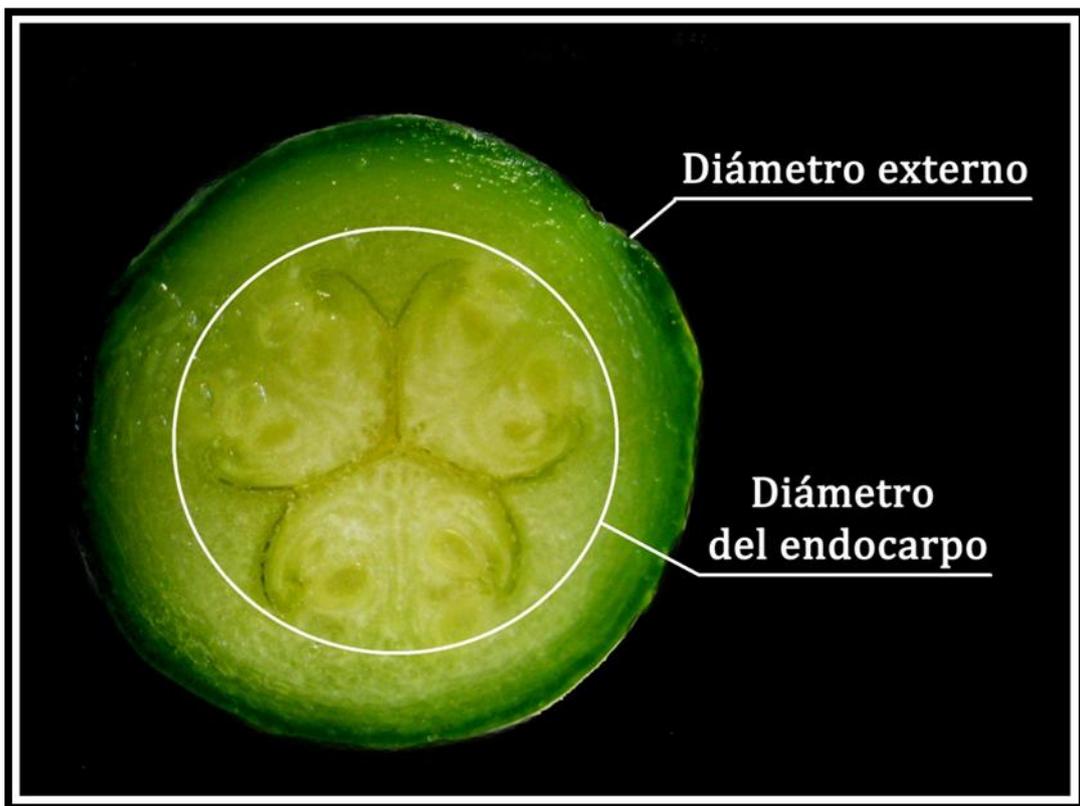


Figura 35: Diámetro externo y diámetro del endocarpo de un ovario de calabacín.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

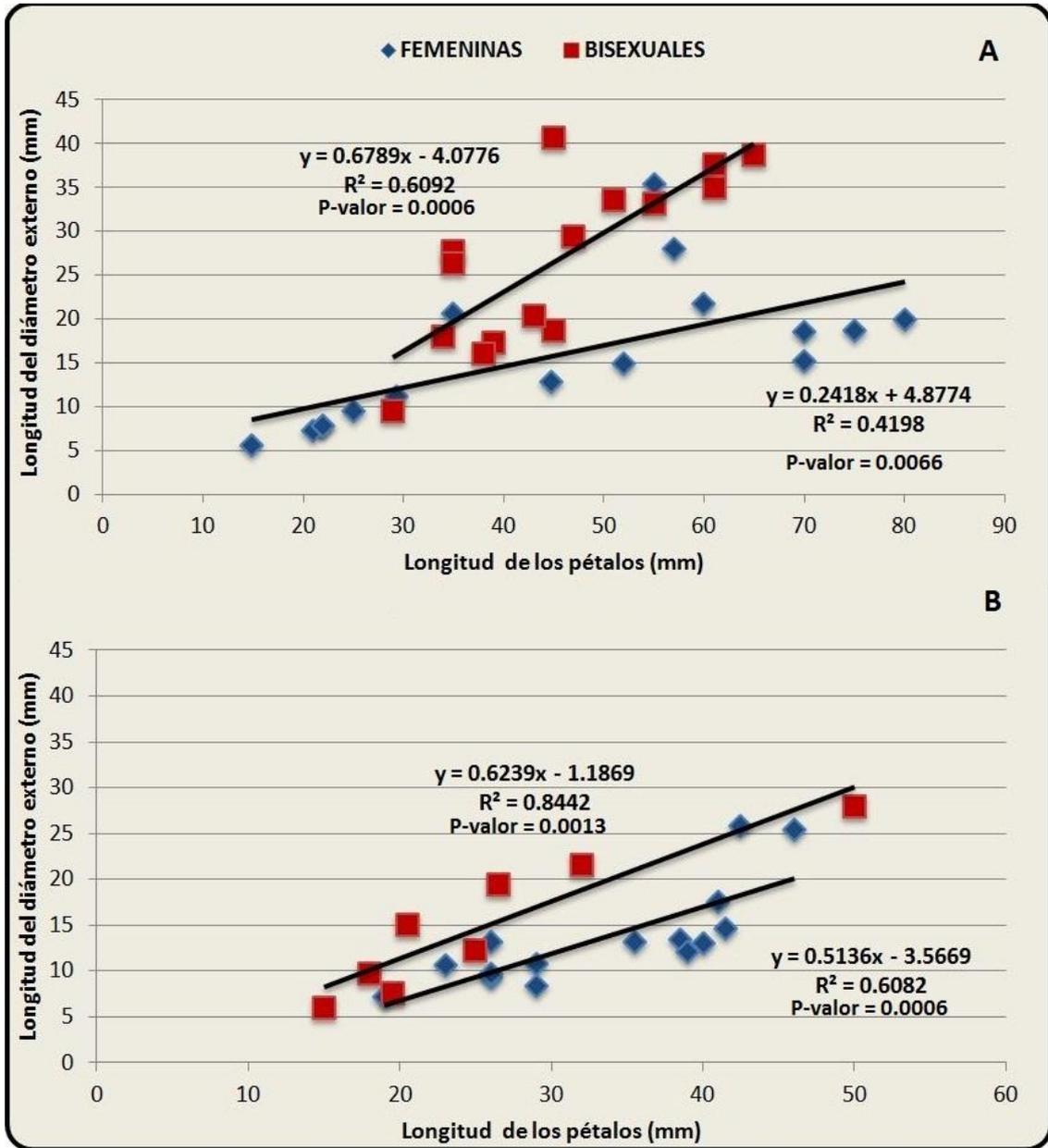


Figura 36: Comparación del crecimiento transversal del ovario respecto a los pétalos en flores bisexuales y femeninas. A: En la población F2 de *Bog x Veg*. B: En la población F2 de *Cavili*.

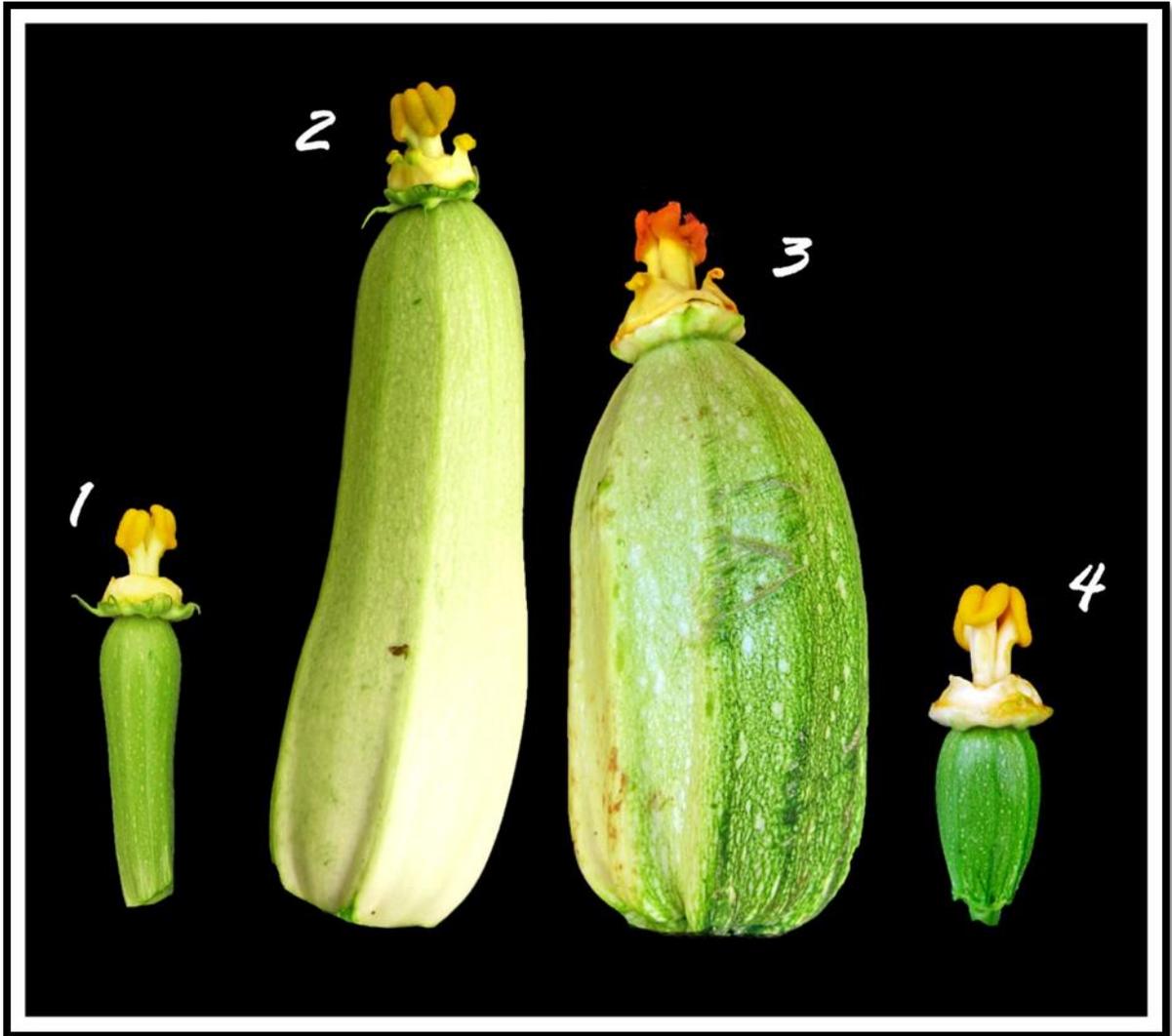


Figura 37: Diferencias entre los morfotipos de los frutos de las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y *Cavili*. F2 de *Cavili*: 1: Flor femenina, 2: Flor bisexual. F2 de *Bog x Veg*: 3: Flor bisexual, 4: Flor femenina.

Lo que más contribuye al crecimiento transversal del ovario es el endocarpo (Figura 38). De hecho, en las flores bisexuales hemos detectado que el crecimiento del endocarpo frente al crecimiento de los pétalos fue significativamente mayor en las flores bisexuales que en las femeninas, especialmente en la población F2 de *Bog x Veg* (Figura 38A).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

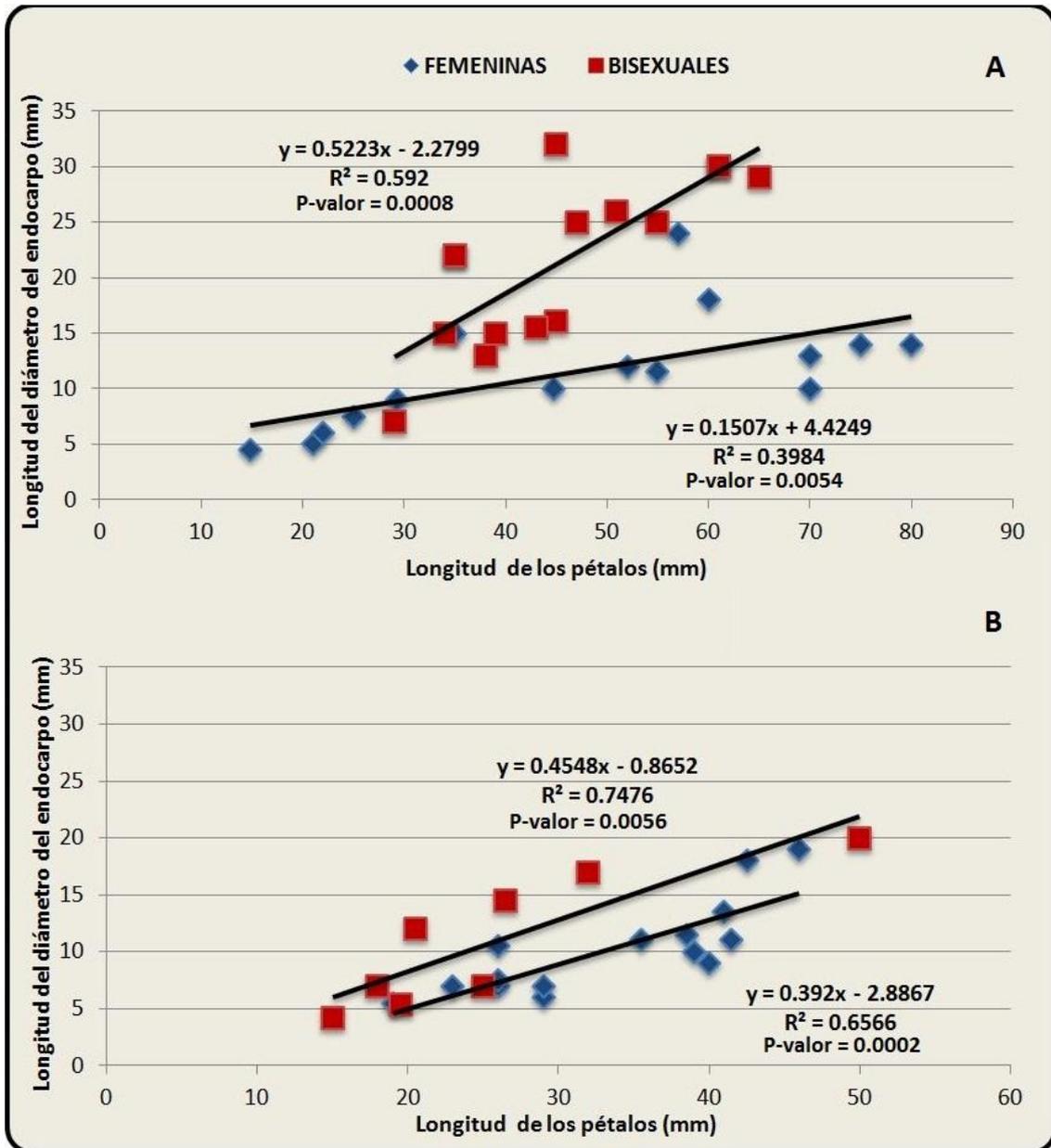


Figura 38: Comparación del crecimiento del diámetro del endocarpo respecto a la longitud de los pétalos en flores bisexuales y femeninas. A: En la población F2 de *Bog x Veg*. B: En la población F2 de *Cavili*.

Tal y como hemos observado, el crecimiento longitudinal y transversal del ovario de las flores bisexuales es mayor que el de las flores femeninas. Sin embargo, el crecimiento del estilo y estigma respecto a la de los pétalos fue muy similar en flores femeninas y bisexuales (Figura 39). Aunque hemos detectado una correlación positiva

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

entre el crecimiento de los pétalos y el crecimiento del estilo y estigma en las dos poblaciones estudiadas. La relación entre el crecimiento de estos órganos, estilo y estigma, en los dos tipos florales, femeninas y bisexuales, fue muy similar, es decir, el patrón de crecimiento del estilo y estigma en las flores bisexuales no cambia respecto al de las flores femeninas. Por tanto, aunque el crecimiento del ovario en las flores bisexuales crece más rápido que el de las flores femeninas, el crecimiento del resto del carpelo (estilo y estigma) es muy similar.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

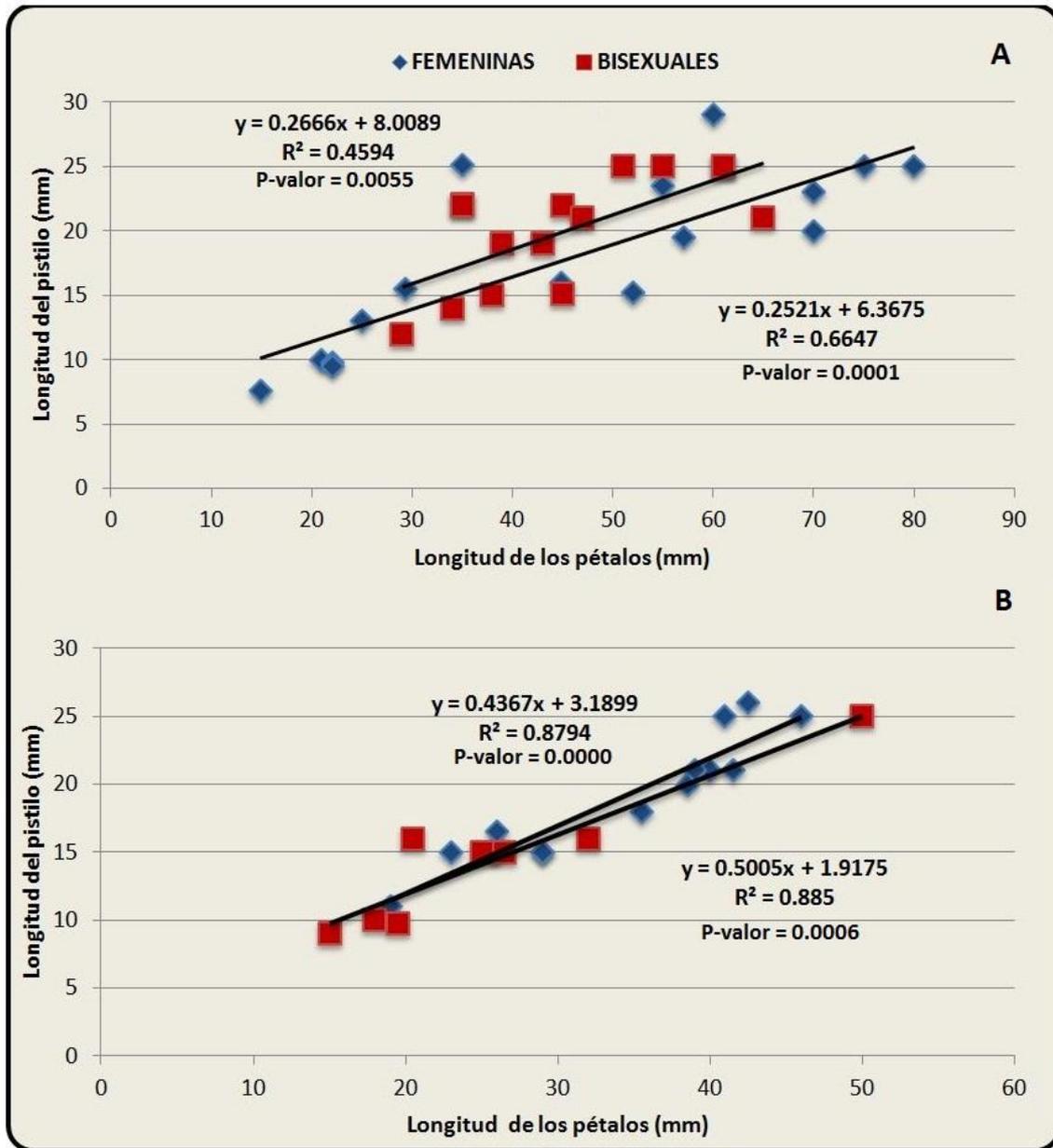


Figura 39: Comparación del crecimiento de pétalos y estilo más estigma en flores femeninas y bisexuales de distintos tamaños. A: En la población F2 de *Bog x Veg*. B: En la población F2 de *Cavili*.

Por último, y por lo que respecta al crecimiento de los estambres, éste es mucho menor en las flores bisexuales que en las flores masculinas (Figura 40). Cuando comparamos el crecimiento de estambres respecto al de los pétalos en las flores masculinas y bisexuales de las dos poblaciones bajo estudio, y a pesar de que el número de flores masculinas analizadas fue muy bajo, observamos que el coeficiente de regresión

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

R^2 es mayor de 0.8 tanto en las masculinas de la población F2 *Bog x Veg* (Figura 41A) como en las de la población F2 de *Cavili* (Figura 41B), lo que implica una correlación clara entre las dos variables analizadas (crecimiento de los estambres frente al crecimiento de los pétalos). Además, el crecimiento de estambres respecto al de pétalos fue mayor en las flores masculinas que en las bisexuales, al menos en la población F2 de *Cavili* (Figura 41B), lo que indica que en las flores bisexuales se ralentiza el crecimiento de los estambres respecto al crecimiento de pétalos.

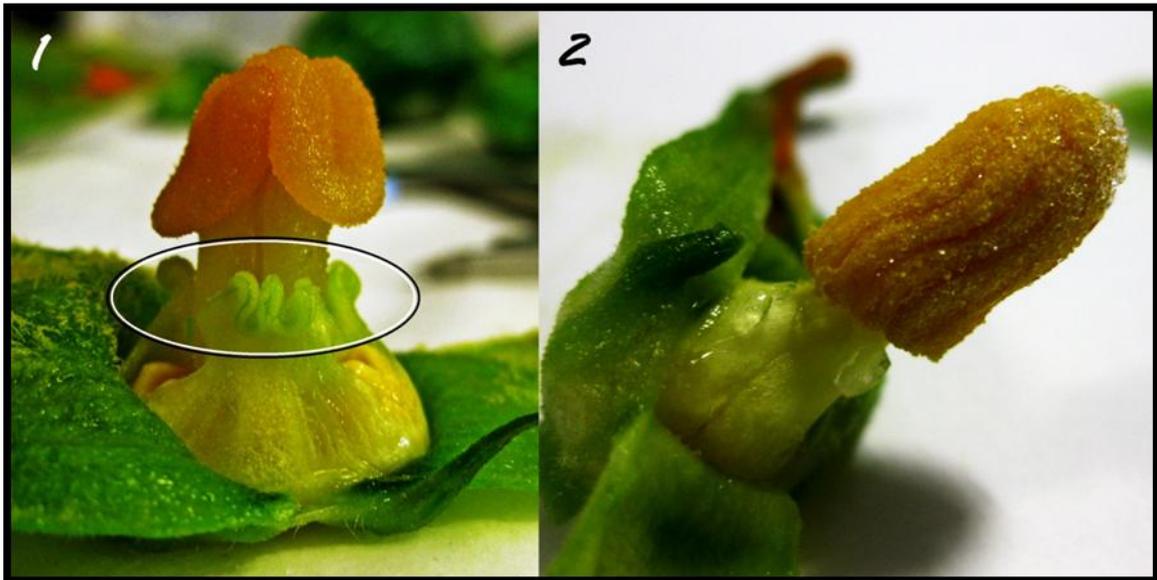


Figura 40: Diferencia entre los estambres de una flor bisexual (1) y una flor masculina (2). El círculo indica los estambres inmaduros de la flor bisexual.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

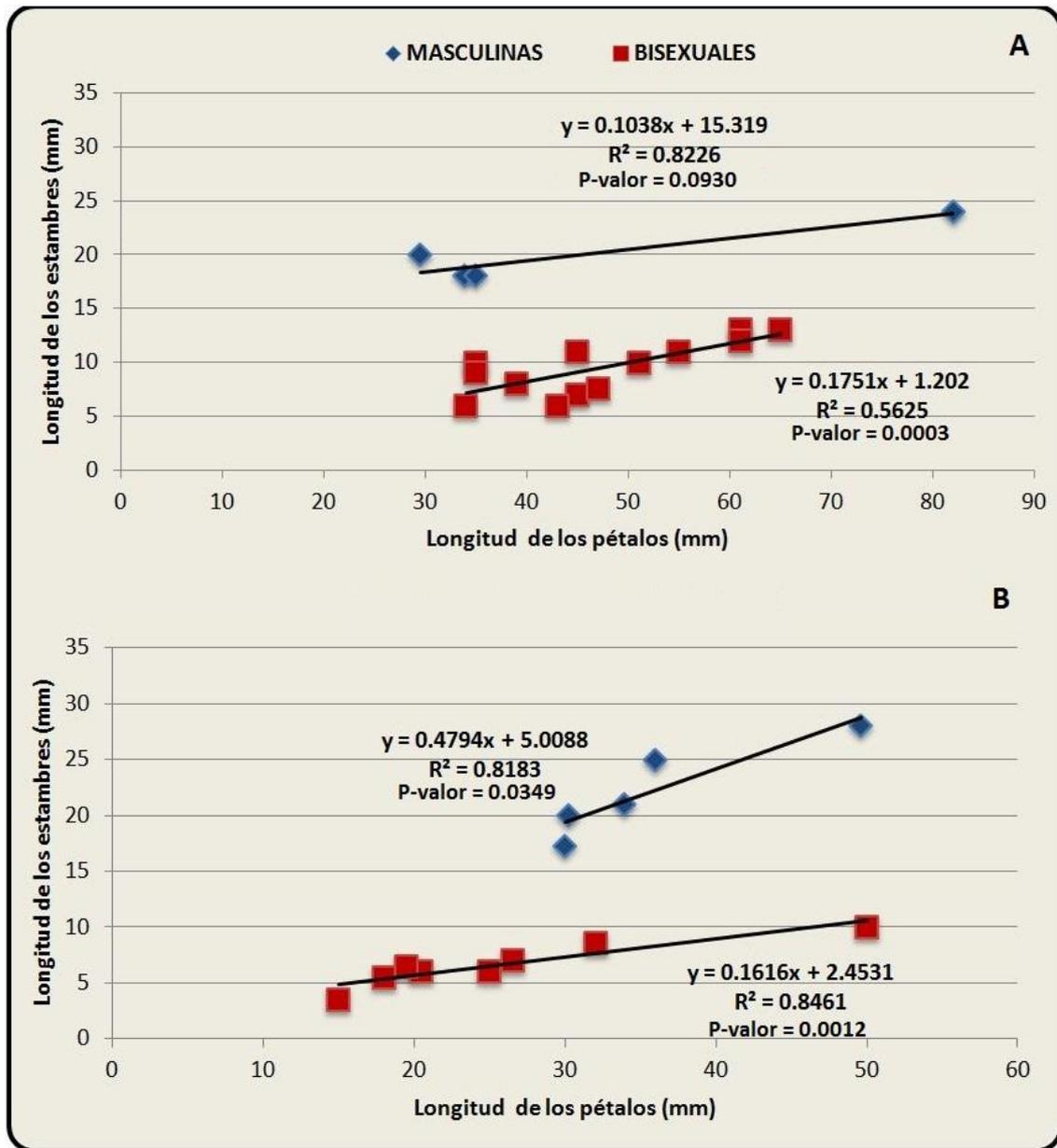


Figura 41: Comparación de del crecimiento de los estambres frente a los pétalos en flores bisexuales y masculinas. A: En la población F2 de *Bog x Veg*. B: En la población F2 de *Cavili*.

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que la disminución en la producción y/o sensibilidad al etileno que conduce a la formación de las flores bisexuales (Manzano y col., 2011), no solo afecta al arresto de los estambres, induciendo un desarrollo parcial de los mismos, sino que aumenta significativamente el crecimiento transversal y longitudinal del ovario. El crecimiento del ovario en ausencia de polinización

da lugar a frutos partenocárpicos que alcanzan un tamaño comercial. Este tipo de partenocarpia, aunque podría utilizarse para disminuir el uso de auxinas sintéticas en el cuajado de los frutos de calabacín, tiene un efecto negativo sobre el desarrollo de pétalos, estilo y estigma, que hace que estos órganos florales no lleguen a alcanzar la antesis y la abscisión, por lo que estas estructuras quedan unidas al fruto y dan lugar al síndrome de la flor pegada (Peñaranda y col., 2007).

IV.3. ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE LA ANDROMONOECIA EN CALABACÍN

IV.3.1. Control genético de la andromonoecia

Para estudiar el control genético de la aparición de flores bisexuales o de plantas andromonoicas, se ha realizado un análisis genético formal, determinando la segregación de este carácter en las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y de *Cavili*, así como en las poblaciones F3 de *Bog x Veg*. Las plantas de estas poblaciones se clasificaron en monoicas y andromonoicas de acuerdo con su índice de andromonoecia, y se determinó si su segregación fenotípica se ajustaba a uno o varios genes utilizando el estadístico chi-cuadrado (χ^2). En este caso las plantas sólo se clasificaron en dos grupos, monoicas (plantas con un índice de andromonoecia entre 0 y 2) y andromonoicas (plantas con un índice de andromonoecia entre 2 y 3), dado que el fenotipo intermedio parece depender de las condiciones ambientales del cultivo (Martínez y col., datos no publicados). Para establecer las clases fenotípicas consideradas en el análisis estadístico se tuvo en cuenta el desarrollo de los estambres y su capacidad para producir granos de polen. Cuando los estambres eran pequeños e inmaduros se le daba el valor de 1 a la flor. Si los estambres eran mayores de 0.5 cm se les daba el valor de 2 ó 3 en función del tamaño y la cantidad de polen que pudieran presentar.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

La Figura 42 muestra como segregan las plantas monoicas y andromonoicas en la población F2 de *Bog* x *Veg*.

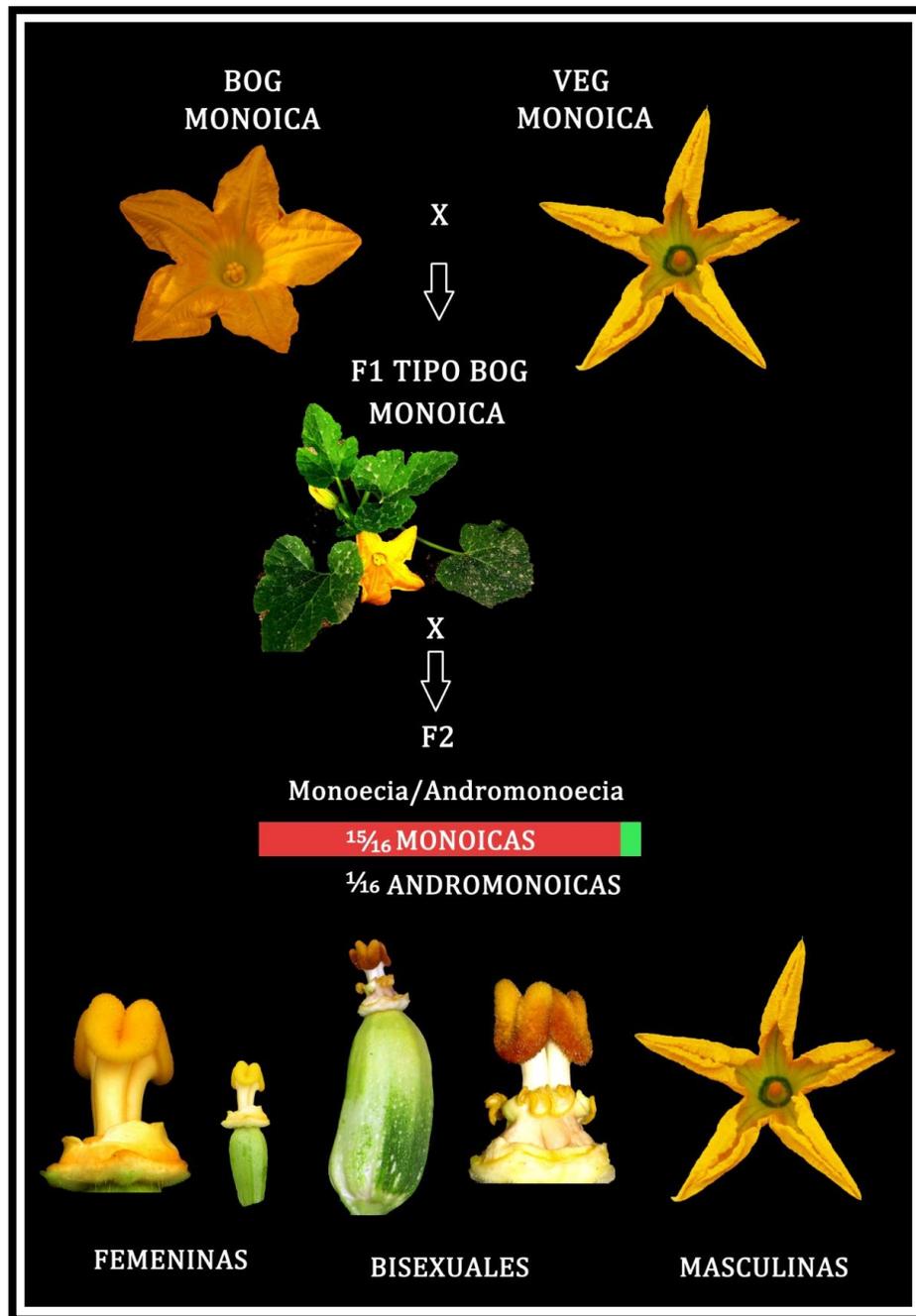


Figura 42: Obtención de la población F2 de *Bog* x *Veg*. Fenotipo *Bog*, plantas muy femeninas, con más del 60% de flores femeninas. Fenotipo *Veg*, plantas muy masculinas, con menos del 30% de flores femeninas.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Para saber el número de genes que regulan la andromonoecia en las poblaciones F2 estudiadas, hemos estudiado la segregación de este carácter. Si la monoecia/andromonoecia dependiera de un único gen con dominancia completa, las dos clases fenotípicas segregarían en la F2 en proporciones $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{4}$. El estadístico χ^2 rechaza la hipótesis nula, lo que demuestra que la segregación en las dos poblaciones estudiadas no se ajusta a lo esperado para un único gen (Tabla 10).

Tabla 10: Análisis de segregación fenotípica (monoecia/andromonoecia) en las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y de *Cavili*.

Población	Plantas observadas		Plantas esperadas		χ^2	P-valor
	Monoicas	Andromonicas	Monoicas	Andromonicas		
<i>Bog x Veg</i> F2	154	13	125.25	41.75	70.05	0
<i>Cavili</i> F2	188	11	149.25	49.75	146.56	0

La segregación se ha ajustado a las proporciones 3:1 (monoicas:andromonicas), que son las proporciones esperadas si el control de este carácter en la población dependiera de un único.

No obstante, cuando las proporciones de plantas monoicas y andromonicas de las dos poblaciones F2 estudiadas se ajustan a 15:1, que son las proporciones esperadas en el caso de que el carácter esté regulado por dos genes con dominancia completa, el estadístico χ^2 permite aceptar la hipótesis nula (Tabla 11). Estos resultados demuestran que la andromonoecia en estas dos poblaciones está controlada por al menos dos genes recesivos (Figura 43).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Tabla 11: Análisis de segregación fenotípica (monoecia/andromonoecia) en las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y de *Cavili*.

Población	Plantas observadas		Plantas esperadas		χ^2	P-valor
	Monoicas	Andromonicas	Monoicas	Andromonicas		
<i>Bog x Veg</i> F2	154	13	156.56	10.43	0.67	0.41
<i>Cavili</i> F2	188	11	186.56	12.43	0.18	0.675

La segregación se ha ajustado a las proporciones 15:1 (monoicas:andromonoicas), que son las proporciones esperadas si el control de este carácter en la población dependiera de dos genes con dominancia completa.



Figura 43: Hipótesis de la segregación de dos genes en el control de la andromonoecia en calabacín. Por cada quince plantas monoicas hay una andromonoica.

Las poblaciones F3 de *Bog x Veg* que evaluamos, procedían de la autofecundación de plantas F2 de *Bog x Veg* con distintos porcentajes de flores femeninas en el tallo principal (Tabla 12). El número de plantas analizado no es suficiente para realizar ningún análisis estadístico. No obstante, en las poblaciones F3.4 y F3.5 se ve como en tan solo 10 plantas, que se pusieron de dichas poblaciones, hay 1 y hasta 2 plantas andromonoicas, por lo que podemos decir que en estas poblaciones se está fijando el carácter hacia la, probando el control genético, más allá del efecto ambiental, del mismo.

Tabla 12: Segregación del carácter monoecia/andromonoecia en las distintas poblaciones de la F3 de *Bog x Veg*.

<i>Bog x Veg</i> F3	% Flores femeninas parentales	Plantas observadas	
		Monoicas	Andromonicas
1	20	7	0
2	25	12	0
3	30	8	0
4	40	7	2
5	55	3	1
6	55	6	0

IV.3.2. Análisis de segregación de la andromonoecia con el gen *CpACS2/7*

Martínez y col. (2012) han identificado y clonado un gen de calabacín, *CpACS2/7*, homólogo a los genes *CmACS7* y *CsACS2* de melón y pepino, respectivamente. La mutaciones de falta de función en estos dos últimos genes produce la conversión de flores femeninas en bisexuales, es decir de plantas monoicas en andromonoicas (Boualem y col., 2008; 2009). La expresión específica del gen *CpACS2/7* en las flores femeninas de calabacín y su menor nivel de expresión en las flores bisexuales de plantas andromonoicas (Martínez y col., 2012) indican que estos tres genes son ortólogos y comparten, por tanto, la misma función en cada una de las especies. Con el fin de estudiar si la mutación detectada en el gen *CpACS2/7* de *Bog* (Martínez, datos no publicados) cosegrega con la andromonoecia, en este proyecto hemos analizado esta mutación en 10 plantas monoicas (índice de andromonoecia = 0) y 10 plantas andromonoicas (índice de andromonoecia ≥ 2) de la población F2 de *Bog x Veg*.

El ADN de cada una de las plantas F2 analizadas se utilizó para amplificar un fragmento del gen *CpACS2/7* mediante PCR, y el producto de la reacción se purificó y se utilizó para cortar con Taq I, una enzima que pierde su sitio de restricción en el alelo mutante de *Bog* pero no en el alelo silvestre de *Veg*. Esto origina un marcador tipo CAP (Cleavage Amplified Polymorphism) que nos permite identificar la mutación en cualquier población segregante. Tras separar el resultado de la digestión en un gel de agarosa, en el parental *Veg* aparecen 4 bandas y en *Bog* aparecen 3 bandas (Figura 45).

En la Figura 44 se muestra la diana de la enzima Taq I (Figura 44A) y también se presenta el mapa de restricción (Programa NEBcutter 2.0) realizado al digerir con la enzima Taq I el fragmento amplificado de *CpACS2/7* sobre el ADN de la línea pura *Veg* (Figura 44B) y *Bog* (Figura 44C). Como se observa, se generan sobre *Veg* tres fragmentos tras la digestión. El primero de ellos es de 315 pares de bases (pb), este fragmento y la diana que lo genera se encuentra también en *Bog* (Figura 44 y Figura 45). El segundo fragmento observado en *Veg* tiene un tamaño de 424 pb, que va desde la base 315 a la 739. A continuación se encuentra un fragmento de 54 pb que debido a su tamaño no se observa en la Figura 45, donde se muestra el gel. La diana de Taq I, la causante de este pequeño fragmento, ha desaparecido en *Bog* debido a un cambio nucleotídico y da lugar al diferente patrón de bandas que hay entre *Bog* y *Veg*, lo que permite realizar este análisis de la F2 descendiente del cruce de *Bog* x *Veg*. El último fragmento se encuentra entre la base 793 y la 1259, dando lugar a una banda de 466 pb (Figura 45) que difiere de la encontrada en *Bog*, que es de 520 pb, ya que en *Bog* el último fragmento se encuentra entre la base 739 y la 1259.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

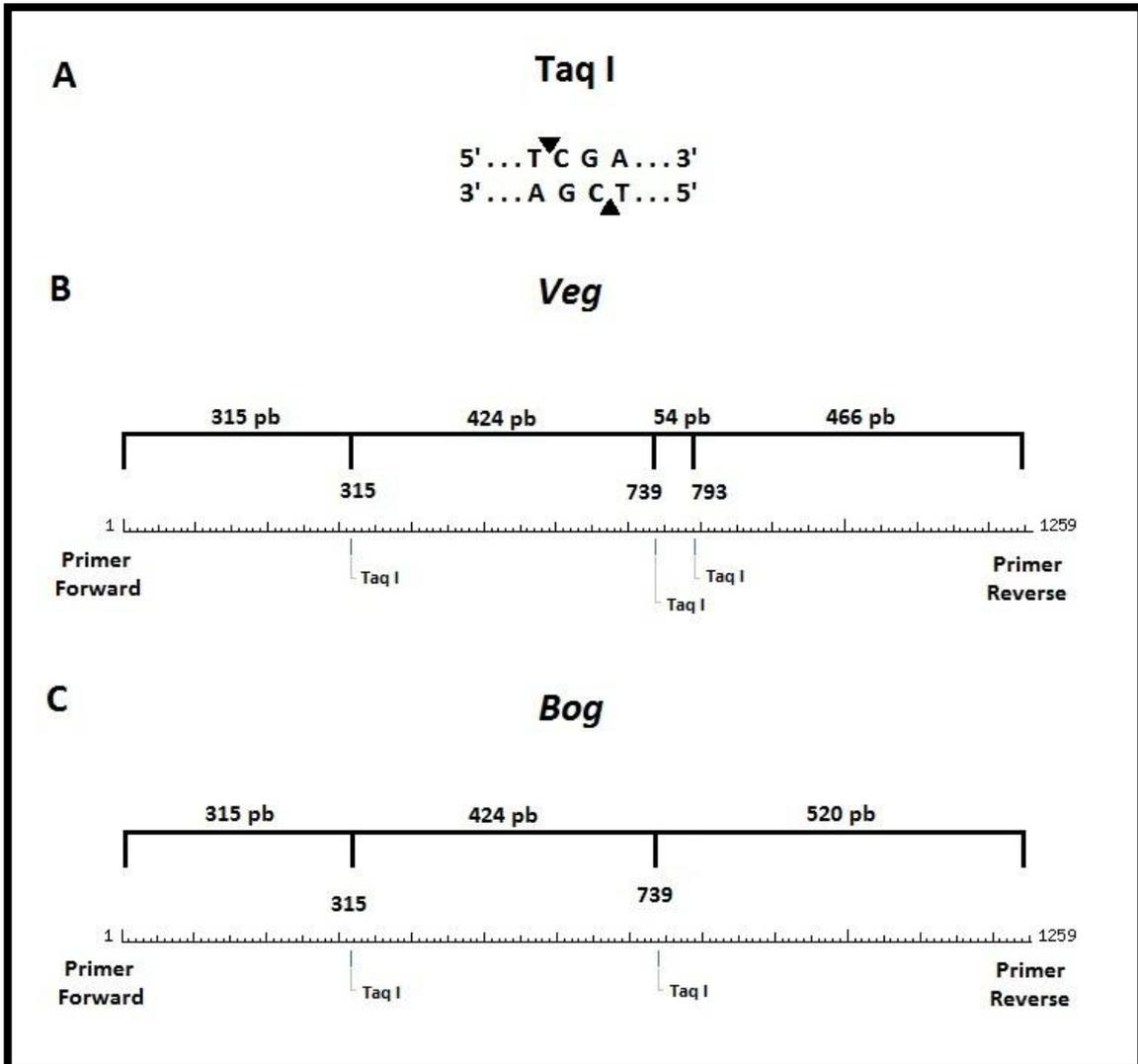


Figura 44: A: Diana de la enzima Taq I. B: Mapa de restricción realizado al digerir con la enzima Taq I el fragmento amplificado de *CpACS2/7* sobre el ADN de la línea pura *Veg*. C: Mapa de restricción realizado al digerir con la enzima Taq I el fragmento amplificado de *CpACS2/7* sobre el ADN de la línea pura *Bog*. (Fuente: Programa NEBcutter 2.0).

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

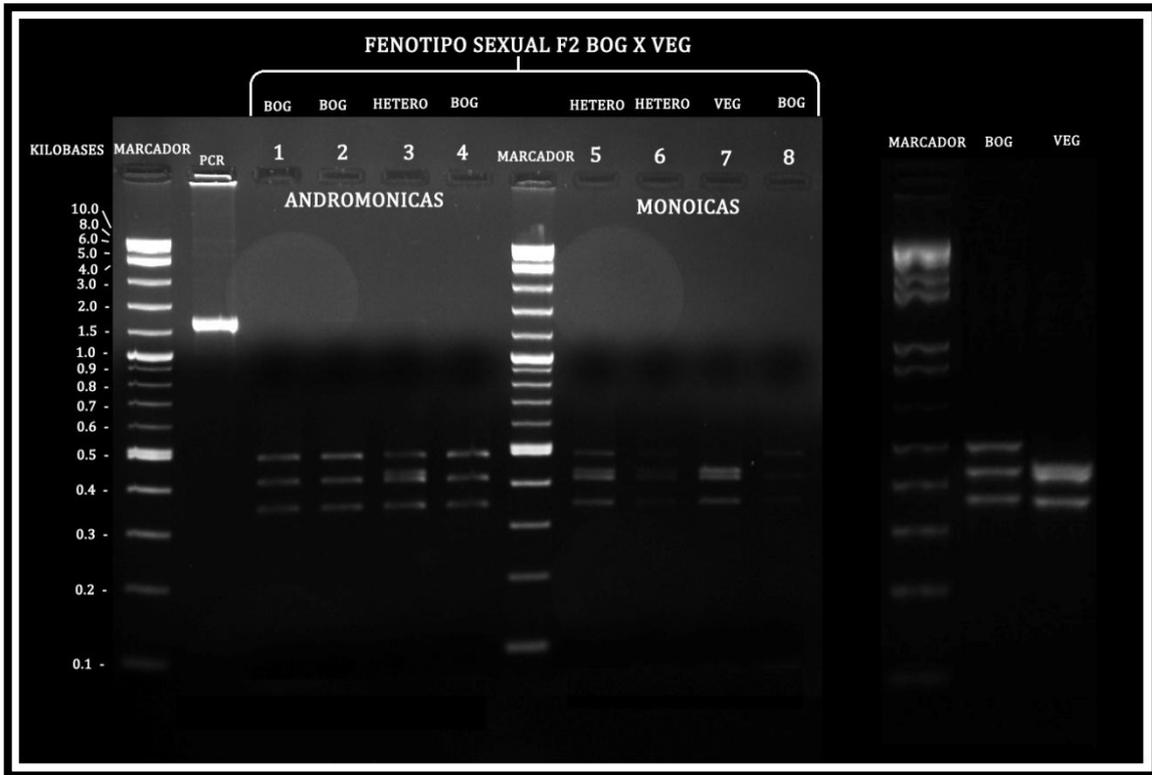


Figura 45: Genotipado de *CpACS2/7* en las plantas andromonoicas y monoicas de la población F2 de *Bog* x *Veg* y de las líneas puras *Bog* y *Veg*. En cada una de las plantas analizadas, su ADN se utilizó para amplificar un fragmento de PCR del gen *CpACS2/7* de 1500 pb (PCR). Excepto en el carril que se indica como PCR, en el resto, el producto de la PCR se digirió con *Taq I* para identificar el marcador CAP asociado con la mutación en el alelo de *Bog*. B, alelo de *Bog*. V, alelo de *Veg*.

En la población F2, además de los genotipos homocigotos, se observaron individuos heterocigotos que mostraban los dos alelos (Figura 44). Ninguno de los dos alelos cosegregaba con las plantas andromonoicas de la población F2 (Figura 44). En las plantas monoicas observamos los tres genotipos posibles. Sin embargo, ninguna de las 10 plantas andromonoicas analizadas era homocigota para el alelo *Veg* (VV), sino que 8 fueron homocigotas para el alelo *Bog* (BB), y 2 fueron heterocigotas (VB). De acuerdo con las leyes mendelianas, la probabilidad de no obtener homocigotos VV entre las 10 plantas andromonoicas de la F2 es $(\frac{3}{4})^{10} = 0.05$. Por tanto, es muy poco probable que este sesgo haya ocurrido por azar, lo que indicaría que el alelo *Bog* del gen *CpACS2/7* no es suficiente (algunas plantas monoicas lo llevan) pero sí necesario para inducir la andromonoecia en esta población. Por tanto, de los dos genes implicados en la andromonoecia de calabacín

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

que hemos identificado en el apartado anterior, uno de ellos podría ser *CpACS2/7*, lo que está de acuerdo con el resto de resultados de expresión (Martínez y col., 2012) que indican que este gen está implicado en el control de la monoecia/andromonoecia en *C. pepo*.

CONCLUSIONES



V. CONCLUSIONES

PRIMERA.- El desarrollo de flores bisexuales en plantas andromonoicas de dos poblaciones F2 de calabacín no se correlaciona con el número de flores masculinas o femeninas por planta. Por tanto, aunque el nivel de andromonoecia y la expresión sexual son dos caracteres controlados por etileno en calabacín, los genes que los regulan ambos procesos deben ser diferentes. *CpWEI*, un gen de calabacín que regula la sensibilidad a etileno y el número de flores femeninas por planta, no está implicado en el desarrollo de flores bisexuales y la andromonoecia de esta especie.

SEGUNDA.- El análisis de la expresión sexual en las poblaciones F2 así como en plantas de la línea *Bolognesse* sometidas a diferentes tipos de aclareo de flores femeninas, ha demostrado que existe una correlación positiva entre la expresión sexual de los tallos principales y secundarios de calabacín, y que la poda de flores femeninas y frutos no produce ninguna alteración de la expresión sexual en el tallo principal.

TERCERA.- El desarrollo de estambres en las flores bisexuales de calabacín, no altera el desarrollo del estilo y el estigma de las flores, pero produce un aumento en la tasa de crecimiento longitudinal y transversal del ovario. Puesto que estas flores se producen por una disminución en la producción de etileno en los botones florales femeninos, estos resultados demuestran que el etileno está implicado en el desarrollo partenocárpico del ovario en calabacín.

CUARTA.- El análisis de segregación de plantas monoicas y andromonoicas en las poblaciones F2 de *Bog x Veg* y de *Cavili* indica que la andromonoecia de calabacín está controlada por al menos dos genes recesivos.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

QUINTA.- El gen *CpACS2/7* de calabacín no cosegrega con la andromonoecia en las población F2 de *Bog* x *Veg*. A pesar de ello, el análisis de segregación de este gen y la andromonoecia demuestra que el alelo de *CpACS2/7* en la línea pura *Bog* no es suficiente pero sí necesario para inducir andromonoecia en esta población.



BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

Atsmon D y Galun E (1962). Physiology of sex in *Cucumis sativus* L. leaf age patterns and sexual differentiation of floral buds. *Annals of Botany* 26: 137-146.

Atsmon D y Tabbak C (1979). Comparative effects of gibberellins, silver nitrate and aminoethoxyvinyl glycine on sexual tendency and ethylene evolution in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Physiology* 20: 1547-1555.

Azcon-Bieto J y Talon M (2000). Fisiología y bioquímica vegetal. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, pp: 403-417.

Bai SL, Peng YB, Cui JX, Gu HT, Xu LY, Li YQ, Xu ZH y Bai SN (2004). Developmental analyses reveal early arrests of the spore-bearing parts of reproductive organs in unisexual flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Planta* 220: 230-240.

Boualem A, Fergany M, Fernandez R, Troadec C, Martin A, Morin H, Sari M, Collin F, Flowers JM, Pitrat M, Purugganan MD, Dogimont C y Bendahmane A (2008). A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* 321:836–838.

Boualem A, Troadec C, Kovalski I, Sari M, Perl-Treves R y Bendahmane A (2009). A conserved ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in two *Cucumis* species. *PLoS ONE* 4:1–10.

Byers RE, Baker LR, Sell HM, Herner RC y Dilley DR (1972). Ethylene: A natural regulator of sex expression in *Cucumis melo* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 69: 712-720.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

- Cabrera A y Uclés D (2011). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería. Campaña 2010/2011. Ed. Fundación Cajamar. Almería, España, pp: 30-60.
- Camacho F (2009). Material didáctico de Horticultura Intensiva, 3º I.T.A. (Hortofruticultura y Jardinería) 2009/2010. Universidad de Almería.
- Coen ES y Meyerowitz EM (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development . *Nature* 353: 31-37.
- Decker DS (1988). Origin(s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany* 42: 4-15.
- Delgado J (1999). El cultivo de calabacín en el Levante de Almería. Técnicas de producción de frutas y hortalizas en los cultivos protegidos. Ed. Instituto la Rural.
- Dellaporta SL y Calderon-Urrea A (1993). Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1241-1251.
- DenNijs APM y Visser DL (1980). Induction of male flowering in gynoeocious cucumbers (*Cucumis sativus* L.) by silver ions. *Euphytica* 29: 273-280.
- Elassar G, Rudich J y Kedar N (1974). Partenocarpic fruit development in muskmelon induced by growth regulators. *HortScience* 9: 17-30.
- Goldman A (2004). The Compleat Squash. Ed. Artisan. New York, U.S.A., pp: 102-149.
- Gómez P, Peñaranda A, Garrido D y Jamilena M (2004a) Evaluation of flower abscission and sex expression in different cultivars of zucchini squash (*Cucurbita pepo*). En:

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

- Lebeda A y Paris HS (eds) Progress in Cucurbit genetics and breeding research. *Eucarpia-Cucurbitaceae*. Palacký University in Olomouc, Olomouc, Czech Republic, pp: 347-352.
- Gómez P, Peñaranda A, Payán C, Cárceles R y Jamilena M (2004b). Alternativas a la utilización de hormonas sintéticas para el cuajado del fruto de calabacín en invernadero. Actas del VI Congreso de SEAE. Almería, España, pp: 2197-2208.
- Jeffrey C (1990). Systematics of de cucurbitaceae: an overview. En: Bates DM, Robinson, RW y Jeffrey C (eds.). *Biology y Utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, New York, U.S.A., pp: 449-463.
- Johnson PR y Ecker JR (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual Review of Genetics* 32: 227-254.
- Kende H (1993). Ethylen biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 283-307.
- Kenigsbuch D y Coen Y (1990). The inheritance of gynoecy in muskmelon. *Genome* 33: 317-320.
- Kim IS, Okubo H y Fujieda K (1992). Genetic and hormonal control of parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of the Faculty of Agriculture of Kyushu University* 36: 173-181.
- Krupnick GA, Brown KM y Stephenson AG (1999). The influence of fruit on the regulation of internal ethylene concentrations and sex expression in *Cucurbita texana*. *International Journal of Plant Sciences* 160: 321-330.

- Kubicki B (1970). Cucumber hybrid seed production based on gynocious lines multiplied with the aid of complimentary hermaphroditic lines. *Genetica Polonica* 11: 181-186.
- Little HA, Papadopoulou E, Hammar SA y Grumet R (2007). The influence of ethylene perception on sex expression in melon (*Cucumis melo* L.) as assessed by expression of the mutant ethylene receptor, At-etr1-1, under the control of constitutive and floral targeted promoters. *Sexual Plant Reproduction* 20: 123-136.
- Malepszy S y Niemirowicz-Szczytt K (1991). Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology. *Plant Science* 80: 39-47.
- Manzano S (2009). Regulación genética de la determinación sexual en *Cucurbita pepo*: clonación, caracterización y análisis funcional de genes implicados en la biosíntesis, percepción y respuesta a etileno. Tesis Doctoral Universidad de Almería.
- Manzano S, Marcos S, Martínez C, Megías Z, Mazet J y Jamilena M (2010). Producción de etileno y partenocarpia en calabacín. *Actas de horticultura* 55: 203-204.
- Manzano S, Martínez C, Domínguez V, Avalos E, Garrido D, Gómez P y Jamilena M (2010). A major gene conferring reduced ethylene sensitivity and maleness in *Cucurbita pepo*. *Plant Growth Regulation* 29: 73-80.
- Manzano S, Martinez C, Megias Z, Gómez P, Garrido D y Jamilena M (2011). The role of ethylene and brassinosteroids in the control of sex expression and flower development in *Cucurbita pepo*. *Plant Growth Regulation* 65: 213-221.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Maroto JV (2000). Elementos de Horticultura General. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp: 424.

Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C y Bendahmane A (2009). A transposoninduced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* 461:1135–1138.

Nee M, (1990). The domestication of *Cucurbita* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany* 44: 56-68.

Nepi M y Pacini E (1993). Pollination, pollen viability and receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany* 72: 527-536.

Nuez F, Ruiz JJ, Valcárcel JV y Fernández de Córdoba P (2000). Colección de Semillas de Calabaza del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

Owens KW, Peterson CE y Tolla GE (1980). Production of hermaphrodite flowers on gynoecious muskmelon by silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine. *HortScience* 15: 654-655.

Página del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente:
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/default.aspx>

Paris HS (1989). Historical records, origins, and development of edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany* 43: 423-443.

Paris HS (2001). History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews* 25: 71-170.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Paris HS y Janick J (2005). Early evidence for the culinary use of squash flowers in Italy. *Chronica Horticulturae* 45: 20-21.

Peñaranda A (2010). Estudio de la maduración floral y la calidad del fruto en calabacín (*Cucurbita pepo*): implicación de los receptores de etileno. Tesis Doctoral Universidad de Almería.

Peñaranda A, Payán C, Garrido D, Gómez P y Jamilena M (2007). Production of fruits with attached flowers in zucchini squash is correlated with the arrest of maturation of female flowers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 82: 579-584.

Perl-Treves R (1999). Male to female conversion along the cucumber shoot: Approaches to studying sex genes and floral development in *Cucumis sativus*. En: Ainsworth CC (ed) *Sex Determination in Plants*. BIOS Scientific, Oxford, United Kingdom, pp: 189-215.

Pierce LK y Wehner TC (1990). Review of genes and linkage groups in cucumber. *HortScience* 25: 605-615.

Pitrat M (1998). Gene list for melon. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 21: 69-81.

Reche J (1997). Cultivo de calabacín en invernadero. Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Almería, pp: 35-37.

Robinson RW y Decker-Walters DS (1997). *Cucurbits*. Ed. CAB International, New York, U.S.A., pp: 226.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

- Rudich J (1990). Biochemical aspects of hormonal regulation of sex expression in Cucurbits. En: Bates DM, Robinson RW y Jeffrey C (eds) *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell University Press, New York, U.S.A., pp: 288-304.
- Rudich J, Halevy AH y Kedar N (1972). Ethylene evolution from cucumber plants as related to sex expression. *Plant Physiology* 49: 998-999.
- Saito T y Ito H (1964). Factors responsible for the sex expression of the cucumber plant. XIV. Auxin and gibberellin content in the stem apex and the sex pattern of flowers. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 14: 227-239.
- Sánchez CM (2006). Implicación del etileno en la expresión sexual del calabacín (*Cucurbita pepo* L.). Proyecto fin de carrera monográfico. Ingeniería Técnica Agrícola especialidad Hortofruticultura y Jardinería. Universidad de Almería, Escuela Politécnica Superior.
- Sanz M (1995). Fitorreguladores para el calabacín. *Hortofruticultura* 33: 46-48.
- Sistema de Información Geográfica de Identificación de Parcelas Agrícolas (SIGPAC): <http://sigpac.mapa.es/fega/visor/>
- Smith BD (1997). The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10.000 years ago. *Science* 276: 932-934.
- Stepanova AN y Alonso JM (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 548-555.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

- Takeo K, Ise H, Minowa H, y Dounowaki T (1992). Fruit growth induced by benzyladenine in *Cucumis sativus* L. *Journal of the Japanese Society of the Horticultural Science* 60: 915-920.
- Vincze T, Posfai J y Roberts RJ (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31: 3688-3691.
- Wang KL, Li H y Ecker JR (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14 Suppl: S131-S151.
- Whitaker TW y Prior DE (1946). Effects of plant-growth regulators on the set of fruit from hand-pollinated flowers in *Cucumis melo* L. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 48: 417-422.
- Wien HC (1997). The cucurbits: Cucumber, melon, squash and pumpkin. En: Wien HC (ed) *The Physiology of Vegetable Crops*. CAB International, New York, U.S.A., pp: 345-386.
- Wien HC, Stapleton SC, Maynard DN, McClurg C y Riggs D (2004). Flowering, sex expression of pumpkin (*Cucurbita* sp.) cultivars under various temperatures in greenhouse and distant field trials. *HortScience* 39: 239-242.
- Wong CY (1941). Chemically induced parthenocarpy in certain horticultural plants with special references to watermelon. *Botanical Gazette* 103: 64-84.
- Yamasaki S, Fujii N y Takahashi H (2003). Photoperiodic regulation of *CS-ACS2*, *CS-ACS4* and *CS-ERS* gene expression contributes to the femaleness of cucumber flowers through diurnal ethylene production under short-day conditions. *Plant, Cell & Environment* 26: 537-546.

Segregación de la expresión sexual y la andromonoecia en poblaciones F2 y F3 de diferentes cruzamientos de calabacín

Yamasaki S, Fujii N, Matsuura S, Mizusawa H y Takahashi H (2001). The *M* locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants. *Plant Cell Physiology* 42: 608-619.

Zomlefer WB (2004). Guía de las familias de plantas con flor. Ed. Acribia S.A.. Zaragoza, España, pp: 456.