

Universidad de Almería



Trabajo Fin de Máster

Máster en Horticultura Mediterránea Bajo Invernadero

**Identificación y caracterización de mutantes EMS
tolerantes a la salinidad en calabacín (*Cucurbita
pepo*)**

Alumna: María Luisa Ruiz Ortega

Tutora: Cecilia Martínez Martínez

Co-tutora: Sonsoles Alonso de Diego

Noviembre, 2020

Resumen

La salinidad es uno de los estreses abióticos más graves que limitan la productividad de los cultivos agrícolas. Este estrés afecta a todos los procesos principales del desarrollo de las plantas, como la germinación, el crecimiento, la fotosíntesis, las relaciones hídricas y la absorción de minerales. Se sabe que el calabacín (*Cucurbita pepo*) es un cultivo de cucurbitáceas sensible al estrés salino, por tanto, la búsqueda de recursos de variabilidad, natural o inducida, tolerantes a la salinidad es interesante para la mejora genética. El grupo hortícola BIO293 de la Universidad de Almería dispone de una colección de mutantes EMS formada por 2822 líneas M_2 independientes. El presente trabajo consistió en el desarrollo de un método de detección y posterior aplicación del método en una evaluación masiva que persigue identificar mutantes tolerantes a la salinidad. Para la puesta a punto del método de evaluación, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (85, 150, 200 y 300 mM) sobre el fondo genético de la colección, MUCU16. En base a los resultados se eligió la concentración de 300 mM de NaCl para detectar mutantes en la fase de germinación, ya que bajo este tratamiento el fondo genético no germina en nuestras condiciones de ensayo. La evaluación de la colección permitió detectar 46 líneas que segregan para la tolerancia a la salinidad. La segregación de la mutación de tolerancia a la salinidad en 45 de las 46 líneas candidatas identificadas se corresponde con una segregación 3:1 y se ajusta al control del carácter tolerancia a salinidad por un solo gen recesivo. Únicamente para una familia, la 1493, se ajusta al control por un gen dominante.

Abstract

Salinity is one of the most serious abiotic stresses that limit the yield of agricultural crops. This stress affects all major processes of plant development such as germination, growth, photosynthesis, water relations and uptake of mineral. Zucchini (*Cucurbita pepo*) is a cucurbit crop known to be sensitive to salt stress, therefore, it is interesting seek for resources of natural or induced variability tolerant to salinity. The horticultural group BIO293 of the University of Almería has a collection of EMS mutants made up of 2822 independent M_2 lines. The present work consisted of the development to indentify salinity-tolerant mutants. To fine-tune the screening, the effect of different concentrations of NaCl (85, 150, 200 and 300 mM) on the genetic background of the collection, MUCU16, was studied. Based on the obtained results, a concentration of 300 mM of NaCl was used to detect mutant because under this treatment the genetic background does not germinate. The evaluation of the collection led to the detection of 46 lines that segregate for tolerance to salinity. The segregation of the salinity tolerance mutation in 45 of the 46 candidate lines identified corresponds to a 3:1 segregation and it is adjusted to the control of the salinity tolerance trait by a single recessive gene. Only for one family, 1493, it is controlled by a dominant gene.

Palabras clave: estrés, tolerancia a la salinidad, mutantes EMS, *Cucurbita pepo*

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los efectos negativos de la agricultura en el suelo es la modificación de la composición química y entre las principales modificaciones se encuentra la acumulación de sales, dando lugar a una de las principales restricciones para el crecimiento de plantas en algunas regiones potencialmente agrícolas (Quesada et al., 2000). Los suelos salinos son aquellos que poseen una conductividad eléctrica superior a 4 dS m⁻¹ a 25°C (casi 40mM de

NaCl). Aunque es cierto que las plantas sensibles se ven afectadas con 2 dS m⁻¹ aproximadamente, mientras que algunas plantas pueden ser tolerantes al doble de dicha salinidad (**Hernández-González et al., 2014**).

La salinidad es uno de los estreses abióticos más graves que limitan la productividad de las plantas, especialmente en las regiones áridas y semiáridas (**Ghani et al., 2018**), afectando a diversas fases del crecimiento desde la germinación a la producción de frutos (**Ashraf and Harris, 2004**). Se sabe que la salinidad del suelo afecta al crecimiento de las plantas, en primera instancia en forma de estrés osmótico, seguido por toxicidad iónica. El estrés osmótico sucede debido a un descenso del potencial hídrico tras el aumento de la concentración de solutos, como iones Na⁺ y Cl⁻, en la zona de la raíz que son potencialmente absorbidos por las plantas en altas tasas. La captación de estos iones afecta de forma negativa a la permeabilidad de la membrana de las plantas, es decir, se genera en el suelo bajo potencial hídrico alrededor del área de la raíz que interfiere con la capacidad que poseen las plantas para extraer agua del suelo y mantenerse turgentes, por lo que los síntomas son similares al estrés por sequía en algunas especies. Si el estrés por salinidad se prolonga o aumenta la concentración, se observa toxicidad iónica, esto es, se produce una alteración de la membrana en cuanto a integridad y función producida por la concentración de iones Na⁺ y Cl⁻, dando lugar a cambios en el equilibrio de solutos que afecta también a la absorción de nutrientes (**Ghani et al., 2018**).

La mejora genética de las especies cultivadas en relación a la tolerancia a la salinidad se ha realizado por medio de selección en base a las diferencias de caracteres agronómicos, como el rendimiento, altura de la planta, área foliar y el daño foliar, tasa de crecimiento relativo (**González et al., 2002**) Los cambios observados entre líneas tolerantes y no tolerantes en estos caracteres resultan de los efectos combinados genéticos y ambientales que influyen sobre cambios fisiológicos que confieren tolerancia a la salinidad, por lo que son seleccionables (**Ashraf and Harris, 2004**).

Distintas especies del género *Cucurbita* son cultivadas y consumidas en todo el mundo. La producción anual de cucurbitáceas fue de 32,5 millones de toneladas en 2014 (**FAOSTAT, 2018**). De las tres especies del género *Cucurbita*, dos de ellas, *C. maxima* y *C. moschata*, son especies importantes por ser consumidas por sus frutos (**Sun et al., 2017**), y por su uso como portainjertos para otros cultivos de cucurbitáceas, incluyendo el pepino, la sandía y el melón, para mejorar la tolerancia a las enfermedades transmitidas por el suelo y al estrés abiótico (**Kong et al., 2014; Sun et al., 2017**). La tercera, *C. pepo*, es la de mayor importancia económica en Europa y, en particular, en España. A pesar de su gran importancia económica, el entendimiento de los mecanismos de tolerancia a la sal en los cultivos de *Cucurbita* spp. es aún reducido, por lo que buscar materiales tolerantes a la salinidad para incorporarlos a programas de mejora en estas especies y, paralelamente, estudiar los mecanismos que sustentan la tolerancia a la salinidad es de gran interés. La búsqueda de materiales tolerantes se puede realizar bien estudiando la variabilidad natural de una especie o generando variabilidad a través de mutágenos. El metasulfonato de etilo (EMS) es un agente alquilante que posee una eficacia demostrada como mutágeno, el cual causa fundamentalmente mutaciones puntuales (**Berná, 1997**). A nivel molecular causa la metilación de guanina y timina, que se “comportan” como adenina y citosina respectivamente, de forma que durante la replicación del ADN, se añaden bases complementarias a adenina y citosina en lugar de guanina y timina, lo que resulta en una sustitución de bases que conduce a cambios puntuales (**Rojas et al., 2016**). El EMS frecuentemente provoca gran cantidad de mutaciones recesivas (**León-García, 2016**). La explotación de una colección de mutantes puede realizarse con dos estrategias. Una

estrategia de genética inversa determina la existencia de mutaciones en genes específicos y, detectadas las mutaciones, busca el fenotipo asociado con esas mutaciones. La genética directa parte de un fenotipo, detectado en una familia de mutantes, para, a continuación, buscar la mutación causal (García et al., 2018). En la actualidad existen dos colecciones de mutantes EMS en *C. pepo*. La primera empleó una estrategia de genética inversa y se detectaron 58 mutaciones en cinco genes candidatos, de las que trece causaban cambios en la proteína. Se demostró que una de las mutaciones observada en un gen *Peroxidasa*, es responsable del albinismo (Vicente-Dolera et al., 2014). La segunda colección, ha sido explotada por un método de genética directa que permitió detectar cuatro mutantes con insensibilidad a etileno (García et al., 2018). Estos mutantes muestran diferencias en el determinismo del sexo, pasando de ser monoicas a andromonoicas y androicas (García et al., 2020a; 2020b).

En este trabajo se presentan el diseño de un método de genética directa para detectar mutantes tolerantes a la salinidad, este método se aplica en un *screening* masivo a la colección de 2822 líneas mutantes EMS en *C. pepo* del grupo BIO293 de la Universidad de Almería.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para diseñar un método de genética directa de selección de mutantes tolerantes a la salinidad se empleó la variedad local, MUCU16. Esta variedad de origen español (Murcia) procede del banco de germoplasma de la Universidad Politécnica de Valencia-Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (UPV-COMAV) y ha sido utilizada para secuenciar el genoma del calabacín y para la generación de colecciones de mutantes EMS en esta especie, en particular la colección que se empleó en este trabajo. Se caracteriza por presentar frutos de color verde oscuro.

En este trabajo se aplica un método de genética directa diseñado para evaluar la colección de semillas mutantes EMS de *C. pepo* del grupo BIO293 conservada en el banco de germoplasma de la Universidad de Almería. Se trata de una colección de líneas independientes M_2 . Para la obtención de estas líneas, semillas M_0 fueron sometidas al mutágeno EMS al 0,3% de concentración. Tras la mutagénesis, se obtuvieron semillas M_1 , las cuales se sembraron y se autopolinizaron. Las semillas procedentes de dicha autopolinización constituirían la colección de 2822 líneas M_2 (Figura 1).

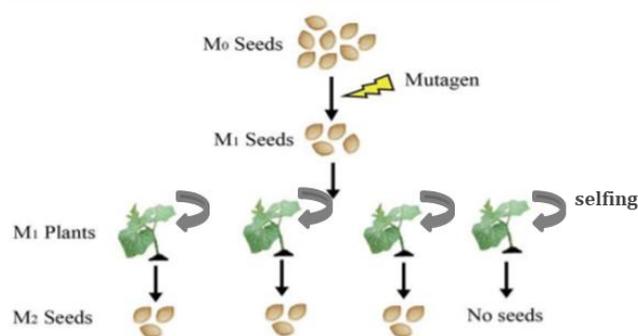


Figura 1. Diagrama esquemático de la obtención de una línea M_2 . Modificada de Chen et al., 2018.

2.2. Tratamientos y procedimiento

En la primera etapa del trabajo, para el diseño de un método de genética directa para la selección de mutantes tolerantes a la salinidad en *Cucurbita pepo*, se emplearon distintas concentraciones de NaCl 85 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM. Para estudiar el efecto del estrés salino en la germinación previamente en *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado un rango de concentraciones de 0 a 400 mM de NaCl (Thomas et al., 1995), en *C. Moschata* 250 mM (Chen et al., 2018) o en tomate (*Solanum lycopersicum*) 85 mM de NaCl (González et al., 2020). Es por esto que, para *C. pepo*, un cultivo de cucurbitáceas relativamente sensible a la salinidad, decidimos probar con un rango de concentraciones de 0 a 300 mM de NaCl. Los resultados obtenidos respecto al fondo genético de la colección de mutantes EMS, MUCU16, permitieron seleccionar una concentración de tratamiento a aplicar, así como determinar el tiempo de estudio de la germinación que después se aplicaron en el método de genética directa sobre la colección de mutantes EMS.

En la primera etapa 30 semillas/tratamiento de MUCU16 (control (H₂O estéril), 85, 150, 200 y 300 mM de NaCl) fueron embebidas en 30 mL de soluciones de ensayo durante 16h, a 24°C y 90 rpm. A continuación, las semillas fueron sembradas en placas Petri con papel de filtro (10 semillas/placa) e incubadas 24 horas en oscuridad a 24°C y con 80% de humedad relativa. La evaluación de la germinación tuvo lugar desde de las 24h hasta las 72h, en intervalos de 2h. Se consideró semilla germinada aquella cuya radícula tenía un tamaño ≥ 1 mm. Tras 72h las semillas se cubrieron con vermiculita y se incubaron a 26°C y 75% de humedad relativa, con ciclos de 16h/8h (luz/ oscuridad) durante 7 días. En este periodo se regaron alternando solución salina/H₂O estéril, según tratamiento, en el caso de las semillas control, sólo con H₂O estéril. A los 7 días, las plántulas crecidas fueron lavadas y secadas, y se midió la longitud de los hipocótilos y de las raíces.

En base a los resultados obtenidos se determinó evaluar la colección de mutantes en base a la germinación. Considerando semillas mutantes aquellas capaces de germinar a una concentración de 300 mM de NaCl antes de 72h. Se evaluaron un total de 2822 líneas independientes M₂, para ello se procedió del mismo modo que se hizo en la puesta a punto con la diferencia de que esta vez solo se empleó la concentración de 300 mM de NaCl. De todas las líneas evaluadas se observaron semillas germinadas en 83. Se volvió a repetir el proceso con estas, y se observaron semillas germinadas en 46 líneas M₂, siendo estas consideradas candidatas potencialmente tolerantes a la salinidad. Al igual que en la puesta a punto del método, el control utilizado era MUCU16, siendo el control positivo MUCU16 en H₂O y como control negativo MUCU16 a concentración de 300 mM de NaCl al igual que el resto de líneas M₂.

2.3. Medidas realizadas

2.3.1. Evaluación de la germinación

Tanto durante la puesta a punto del método como en la evaluación masiva de la colección, se estimaron los parámetros tasa de germinación acumulada (porcentaje acumulado de semillas germinadas respecto del total en cada observación), y G₅₀ (tiempo al que se alcanzó el 50% de germinación).

2.3.2. Crecimiento de las radículas, raíces e hipocótilos

Para la evaluación del crecimiento de las radículas, raíces e hipocótilos, se midió su longitud con el programa ImageJ. En el caso de las radículas, éstas se fotografiaron a las 48h desde el inicio de la germinación y, en el caso de las raíces e hipocótilos, tras 7 días en vermiculita.

2.3.3. Análisis estadístico

Se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurión que permite realizar comparaciones entre los diferentes tratamientos empleados. En primer lugar, se estudiaron la normalidad (prueba de Kolmogorov o Shapiro-Wilk) y la homocedasticidad. En caso de no cumplir con la hipótesis de normalidad, se realizaron bien una transformación de los datos o se evaluó el efecto de los tratamientos con métodos no paramétricos, como la prueba de Kruskal-Wallis para establecer las diferencias de la varianza. Si cumplían con la hipótesis de normalidad, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, para determinar si hay diferencias significativas entre los dos ensayos temporales realizados y entre tratamientos. La prueba HSD de Tukey se empleó para determinar los grupos homogéneos.

A partir de los datos de germinación acumulada de las 2822 líneas EMS se estudió el ajuste de la segregación de tolerancia a la salinidad con un test de chi cuadrado (χ^2). Con esta prueba estadística comprobamos si nuestros valores observados se ajustan a nuestra hipótesis (valores esperados). En este caso, se estudió el ajuste de tolerancia a la salinidad a un gen recesivo y en caso de falta de ajuste se comprobó el ajuste a un gen dominante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tolerancia a la salinidad es un carácter agronómico de alto interés para la mayoría de las especies hortícolas, entre ellas las del género *Cucurbita*. En el presente trabajo se muestra el diseño y la puesta a punto de un método de genética directa para detectar mutantes de *C. pepo* tolerantes a la salinidad. Con este objetivo, se empleó el fondo genético de la mutagénesis, es decir, la línea sobre la que se realizó el tratamiento con EMS, MUCU16, para evaluar concentraciones y estadios de desarrollo, fase de germinación o crecimiento en plántula, y metodología de análisis. Los resultados de este primer ensayo permitieron establecer la metodología para evaluar 2822 líneas independientes de la colección M₂ que segregarán para la tolerancia a la salinidad.

3.1. Diseño de un método de genética directa para detectar mutantes tolerantes a la salinidad en *C. pepo*

Para establecer un método de detección de mutantes tolerantes a la salinidad se evaluó la tolerancia al estrés salino del fondo genético, MUCU16. Esta evaluación permite establecer las condiciones de salinidad a partir de las cuales el fondo genético es afectado, perdiendo la semilla su capacidad de germinación o viendo las plántulas reducido su crecimiento. Por tanto, a esta concentración se espera que germinen semillas mutantes, pero no semillas de tipo salvaje (WT) con el genotipo del fondo genético. La germinación y crecimiento de las plántulas de MUCU16 fue evaluada dos veces de forma independiente a diferentes concentraciones de NaCl (85 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM) y H₂O en el caso de las semillas control.

3.1.1. Germinación

La evaluación de la germinación se realizó en dos repeticiones temporales, con 30 semillas por tratamiento y repetición. Los resultados se presentan en la **Figura 2**, para la primera repetición (**A y C**) y para la segunda repetición (**B y D**). Se analizan dos parámetros, el tiempo de germinación G_{50} que equivale al tiempo en el que se observan germinadas (con 1mm o más) el 50% o más de las semillas del tratamiento (**Figura 2 A y B**). El segundo parámetro es la germinación acumulada que indica el comportamiento general frente a cada tratamiento (**Figura 2 C y D**).

Ninguna semilla germinó a 300mM, lo que indicaría que es una concentración salina limitante para *C. pepo* y en particular para MUCU16. En contraste, cuando se realizó la primera observación de la germinación, a las 20-24 horas, más del 50% de las semillas del control (H_2O) estaban germinadas. El valor de G_{50} de MUCU16 para cada tratamiento en los dos ensayos se muestra en la **Figura 2 (A y B)**. Aunque se observan diferencias en el valor G_{50} entre los dos ensayos, en ambos casos hay una correlación negativa entre el incremento de la concentración salina y el valor de G_{50} , si bien en el primer ensayo la concentración 150mM tuvo menor impacto en la germinación que en el segundo ensayo y la concentración 200mM, por el contrario, retrasó la germinación en mayor medida en el primer ensayo.

En la **Figura 2 (C y D)** se representan los resultados de germinación acumulada. Se observa que para el ensayo 1 (**Figura 2 C**), MUCU16 alcanzó el 100% de germinación acumulada en el control (H_2O) a las 24 horas. Mientras que en los tratamientos se alcanzó el 80% en 85 mM, el 70% en 150 mM y el 50% en 200 mM en el tiempo de ensayo. Los resultados del ensayo 2 (**Figura 2 D**), para el control fueron similares, si bien, el 100% de las semillas no estaban germinadas hasta 30 horas, lo que se refleja también en la representación del G_{50} . El efecto de los tratamientos fue una reducción de la germinación acumulada que alcanzó el 87% en 85 mM, el 80% en 150 mM y el 53% en 200 mM en el tiempo de ensayo. Al contrario de lo observado en el primer ensayo, durante el segundo ensayo, la germinación fue más irregular, y una vez iniciada en cada tratamiento el tiempo para alcanzar la germinación acumulada definitiva es mayor a 85 mM y 150 mM. Mientras que en el primer ensayo, la primera semilla germinada a 85mM se observa a las 24 h y la última a las 43h, en el segundo ensayo la primera semilla germinada se observa a las 24 h y no germinan más a partir de las 48 h. Y similar se observa en la concentración de 150 mM. Por lo que el tiempo de germinación se prolonga.

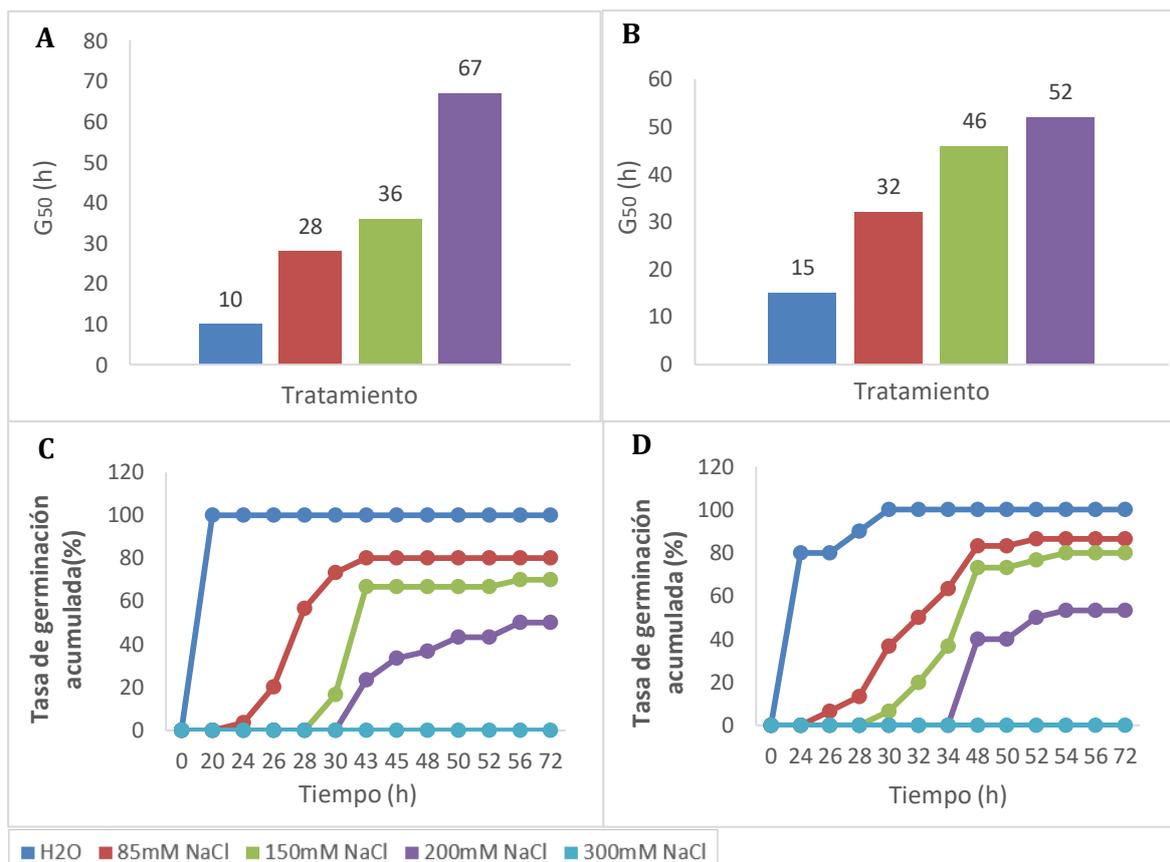


Figura 2. Efecto sobre germinación de MUCU16 de distintas concentraciones de NaCl. Se representa el G₅₀, tiempo al que se alcanza el 50% de germinación (A) ensayo 1 y (B) ensayo 2. Tasas de germinación acumulada (%) (C) ensayo 1 y (D) ensayo 2.

La salinidad puede afectar la germinación por medio de dos mecanismos, creando un potencial externo que impide la toma de agua o a través del efecto tóxico de iones Na⁺ y Cl⁻ (Farhodi et al., 2007). Ambos efectos inhiben o retrasan la germinación. *C. pepo* es una especie que se considera moderadamente sensible a la salinidad (Blaylock, 1994). En el ensayo de germinación realizado con el fondo genético de la colección de mutantes, MUCU16, se observa un efecto sobre la germinación directamente proporcional de la dosis de NaCl, tanto en la tasa de germinación acumulada, como en el G₅₀, en ambos ensayos. Conforme incrementa la concentración de NaCl, menor número de semillas germinan y germinan con mayor retraso. Las semillas control (germinadas en H₂O) alcanzaron el 100% de germinación acumulada entre las 20-24h y su G₅₀ no fue superior a 15h. Estos resultados nos permiten confirmar, que efectivamente la salinidad afecta al proceso de germinación de las semillas de *C. pepo*, pues las semillas en presencia de NaCl germinaron más tarde en comparación con las semillas control (que germinaron en H₂O), lo que coincide con los resultados previos en algodón (*Gossypium hirsutum*) (Guo-Wei et al., 2011; Sharif et al., 2019), *Arabidopsis thaliana* (Quesada et al., 2000), especies en las que se observa que la salinidad afecta a la germinación. Por otro lado, en comparación con otras especies, *C. pepo* presenta una tolerancia moderada a la salinidad. En *Triticum aestivum* (trigo), las líneas con mayor tolerancia frente a la salinidad, llegando a una tasa de germinación del 70%, eran

germinadas a una concentración de NaCl de 20mM (Lethin, et al., 2020). Por el contrario, *B. insularis* puede germinar a concentraciones de NaCl de 200mM e incluso 300mM, si bien la viabilidad de la semilla disminuye incluso a temperaturas que favorecen la germinación (Santo et al., 2017). En sandía, se observa una disminución de la germinación y el crecimiento en plántula a partir de los 80-90 mM (Qing-song et al., 2004; Zhi-hong et al., 2006).

La germinación es un proceso complejo en el que, con frecuencia, se observa variabilidad. Esta variabilidad depende de distintos atributos que evolutivamente condicionaban el éxito reproductivo, como el tamaño de la semilla o el modo de dispersión, pero también factores ambientales como la temperatura (Xu et al., 2015) y de factores internos como la variabilidad de los procesos celulares o de reacciones bioquímicas (Mitchell et al., 2017). En las especies cultivadas, en las que las semillas se generan en las mismas condiciones ambientales, la variabilidad intrapoblacional se puede deber a la posición de la semilla en el fruto en formación que puede causar cambios en el rendimiento de la germinación por la competencia por los nutrientes (Susko y Lovett-Doust, 2000; Mitchell et al., 2017). Esta variabilidad intrapoblacional puede ser debida al contenido en ácido abscísico, ABA, que favorece la dormancia e impide la germinación. En *Arabidopsis thaliana* se han observado diferencias en el contenido de ABA de semillas de la misma silicua (Kanno et al., 2010), lo que puede tener un efecto en la variabilidad de la germinación. Estos resultados previos pueden explicar la variabilidad observada entre los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 e indican la necesidad de realizar repeticiones que confirmen los resultados obtenidos. A la vez, afectan a la concentración a seleccionar que debe garantizar la detección de mutantes. Por estas razones, además de la germinación se analizó el crecimiento en plántula. El interés es determinar si puede ser un estadio más adecuado que la germinación para realizar un *screening* masivo.

3.1.2. Crecimiento

El crecimiento de las semillas hasta alcanzar el estadio de plántula con los cotiledones extendidos, se realizó en dos momentos. Primero se evaluó la longitud de la radícula a las 48h de la germinación de las semillas y con posterioridad se evaluó el tamaño de raíz e hipocótilo, pasados 7 días en vermiculita.

La longitud de la radícula a las 48h fue analizada en los dos ensayos, para cada tratamiento y cada semilla germinada por tratamiento. La **Tabla 1** muestra los resultados de un análisis ANOVA multifactorial que incluye las repeticiones temporales (ensayos 1 y 2) y los tratamientos analizados (control, 85 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM). Los resultados muestran que, a pesar de las diferencias observadas en la germinación, respecto a las repeticiones temporales, no hay diferencias en el crecimiento de la radícula pasadas 48h de la germinación. Sí se observan diferencias entre los tratamientos y se confirma el efecto de la salinidad. A mayor concentración de NaCl, además de mayor retraso en la germinación y menor número de semillas germinadas, hay un menor crecimiento de la radícula.

Tabla 1. Crecimiento de la radícula a las 48 h en los distintos tratamientos con NaCl sobre MUCU16. Se presenta la longitud promedio (cm) \pm E. S. y los grupos homogéneos.

Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2
Control (H ₂ O)	3,167 \pm 0,241 d	2,550 \pm 0,268 d
85 mM NaCl	1,264 \pm 0,070 c	1,130 \pm 0,113 c
150 mM NaCl	0,526 \pm 0,053 b	0,385 \pm 0,053 ab
200 mM NaCl	0,238 \pm 0,013 a	0,232 \pm 0,039 a
300 mM NaCl*	0	0

*No había germinado ninguna semilla.

La segunda evaluación del crecimiento se realizó tras 7 días en vermiculita (Material y Métodos), cuando los cotiledones estaban desarrollados. Se midió la longitud de las raíces de las plántulas en desarrollo, así como la longitud de los hipocótilos. En la **Tabla 2** se presentan los resultados obtenidos para cada tratamiento y repetición del crecimiento radicular y del hipocótilo. Los resultados de evaluación del crecimiento radicular confirman que no hay diferencias entre las repeticiones temporales (ensayo 1 y 2) para cada tratamiento, como se observaba en el crecimiento de la radícula a las 48h. Mientras que el crecimiento del hipocótilo, que se produce con posterioridad, si hay diferencias entre los dos ensayos para las plántulas control. Las plántulas control del ensayo 1 alcanzaron mayor tamaño del hipocótilo a igual edad (si bien no es significativa) en comparación con las plántulas control del ensayo 2, en concordancia con un adelanto de la germinación observada en este ensayo (G_{50} menor y germinación del 100% a las 24h) (**Figura 2**). Al igual que la germinación y el crecimiento radicular a las 48h, se observa que a mayor concentración de NaCl hay menor crecimiento. Es decir, la sal afecta también al crecimiento radicular y del hipocótilo de las plantas.

Tabla 2. Crecimiento de las plántulas tras 7 días en vermiculita. Se representa la longitud promedio (cm) de raíz e hipocótilo de MUCU16 \pm E.S. y los grupos homogéneos.

Tratamiento	Raíz		Hipocótilo	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
Control (H ₂ O)	6,712 \pm 0,667 c	6,826 \pm 0,454 c	3,951 \pm 0,389 c	3,031 \pm 0,249 c
85 mM NaCl	4,210 \pm 0,310 c	4,699 \pm 0,301 c	1,189 \pm 0,068 b	1,222 \pm 0,048 b
150 mM NaCl	1,464 \pm 0,156 b	1,654 \pm 0,167 b	0	0,381 \pm 0,034 a
200 mM NaCl**	0,965 \pm 0,190 a	0,602 \pm 0,063 a	0	0
300 mM NaCl*	0	0	0	0

*No había germinado ninguna semilla.

**El hipocótilo no se llegó a desarrollar.

La disminución de biomasa debido a estrés iónico está bien documentada en distintas especies y los resultados observados para MUCU16 son similares a los observados en otras especies a distintos estadios del crecimiento temprano de las plántulas. En *Brassica rapa* se ha observado que la aplicación de NaCl en una concentración de 150mM redujo el peso seco foliar y radical respecto a su control, lo que se traduce en una reducción producida por el estrés bajo el que se encuentra la planta en altas concentraciones salinas (**Navarro-León et**

al., 2020). La medida del peso seco de la planta en *C. máxima* y *C. moschata* se mostró reducida en estrés salino a concentración de 150mM de NaCl (Niu et al., 2018). Se ha propuesto que altas concentraciones pueden afectar a la tasa de fotosíntesis y a la actividad enzimática dando lugar a una disminución en la síntesis de proteínas y carbohidratos; afectar a la producción de hormonas del crecimiento y llevar a la inhibición del crecimiento (Abdul Qados, 2011).

Los efectos del estrés por salinidad son múltiples, entre otros se producen metabolitos de estrés como la prolina y el MDA, cambia el contenido en agua en la planta y el metabolismo. Estudios realizados en especies de la familia de las cucurbitáceas, sensibles a la sal, como son el pepino, la calabaza (*C. moschata*), la calabaza amarga (*Momordica charantia*) y *Lagenaria siceraria*, con distintas concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 75 mM) demostraron que el tratamiento con sal favorece un incremento en la producción de prolina variable entre especies y concentraciones (Ghani et al., 2018). La prolina que se sintetiza y acumula en el citoplasma en respuesta a estrés salino (Carillo et al., 2011) tiene distintos efectos osmoprotectores, como la protección de enzimas frente a la desnaturalización, la estabilización de la membrana celular o favorecer el equilibrio osmótico (Ashraf y Foolad, 2007), por lo que con frecuencia se observa en especies y variedades tolerantes sometidas a estrés por salinidad. El efecto del estrés por salinidad en las plantas se produce a nivel bioquímico y fisiológico, alterando múltiples procesos y causando la activación de distintos mecanismos. La comprensión de los mecanismos activados durante el estrés es imprescindible para entender la tolerancia a la salinidad y desarrollar materiales tolerantes. La genética directa permite detectar, a través de la evaluación del fenotipo de tolerancia a la salinidad, mutantes y mutaciones que controlen la tolerancia a este estrés. Estos resultados indican que metabolitos como la prolina pueden ser de potencial interés para detectar o caracterizar mutantes tolerantes a la salinidad. Presentan la desventaja frente a otros como la germinación, de requerir un trabajo adicional de análisis.

3.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de 2822 líneas de mutantes EMS

El objetivo del *screening* es detectar líneas mutantes que presenten tolerancia al estrés salino, considerando como referencia de falta de tolerancia a NaCl el fondo genético (MUCU16). A la hora de diseñar el método se empleó la información obtenida de los tratamientos con NaCl sobre el fondo genético para establecer tres parámetros: el estadio de estudio, la concentración de NaCl a usar y el intervalo de tiempo al que se consideraría que las semillas germinadas en cada línea eran mutantes tolerantes. En base a los resultados expuestos en el primer apartado de Resultados y Discusión se determinó usar una concentración de NaCl de 300 mM, concentración en la que el fondo genético no germinó, y realizar el ensayo en la fase de germinación. Esta fase es más precoz y acorta los tiempos de evaluación, además de condicionar las primeras fases del crecimiento de las plántulas, por lo que se ha considerado más adecuada para realizar un ensayo que requiere evaluar tanto material vegetal, ya que en total se han analizado 2822 líneas EMS, con 10 semillas por línea, esto es, 28220 semillas.

Por otro lado, la concentración elegida debe permitir seleccionar sólo aquellos candidatos con una capacidad de germinación en sal notablemente superior que el fondo genético. Teniendo esto en cuenta, así como otros ensayos previos realizados en el grupo BIO293 en los que se comprobó que semillas de MUCU16 embebidas hasta 72h en 300mM

de NaCl eran viables (datos no mostrados), se optó por esta concentración. En definitiva, la evaluación de la germinación de las 2822 líneas se realizó en 13 tandas de 200 líneas cada una, la concentración de sal seleccionada (300 mM) y el tiempo de observación (0-72h). Basándonos en los resultados de los ensayos de germinación del fondo genético, se decidió considerar mutante putativo a toda aquella línea que germinase antes de las 56h de observación por dos razones principales; por un lado, porque MUCU16 no puede germinar a esta dosis en este tiempo de observación y, por otro lado, porque a partir de este tiempo no hubo diferencias en la germinación acumulada para ninguno de los tratamientos en ninguno de los dos ensayos realizados, es decir, no aumentó el número de semillas germinadas (**Figura 2, C y D**). Además, más adelante, durante la evaluación masiva de la colección, se comprobó que en el 90-95% de los casos, MUCU16 germinaba en 300mM de NaCl a partir de las 72h (datos no mostrados). Por tanto, se decidió considerar toda semilla germinada antes de las 56h como semilla con genotipo mutante, aquellas semillas germinadas entre las 56 y las 72h como semillas con genotipo heterocigoto ya que germinaban con retraso respecto de las semillas mutantes y, por último, todas las semillas germinadas después de las 72h como semillas con genotipo WT, ya que germinaban igual que el fondo genético (**Figura 3**).

Habitualmente las mutaciones EMS son monogénicas recesivas (**Calderón, 2006; Praena, 2017**), por lo que la segregación esperada en una línea mutante será de $\frac{1}{4}$. Dado que se ensayaron 10 semillas por línea, se esperaban 2-3 semillas germinadas, esto es, mutantes con tolerancia a la salinidad en aquellas líneas M_2 segregando para el carácter. El resto de las semillas de la línea 7-8 tendrán fenotipo tipo salvaje (WT) y no germinarán a esa concentración en el tiempo estipulado. Por tanto, en cuanto al fenotipo, para nuestro *screening* se considerarían mutantes con fenotipo tolerante a la salinidad a todos aquellos que germinaron hasta las 56 horas, y con fenotipo salvaje (no tolerante a la salinidad) aquellos que germinasen después de las 56h, que incluiría tanto a los heterocigotos como a los WT (**Figura 3**). Se realizaron dos evaluaciones. En una primera evaluación de la colección completa, se identificaron 83 líneas potencialmente tolerantes a la sal. Estas 83 líneas se volvieron a ensayar y se confirmó el fenotipo de tolerancia a la salinidad en parte de las semillas en 46 líneas, que se consideran líneas mutantes putativos. La descendencia de estas líneas candidatas se evaluará nuevamente en la M_3 en germinación y se caracterizarán en otros estadios de desarrollo, para confirmar la mutación de tolerancia a la salinidad.

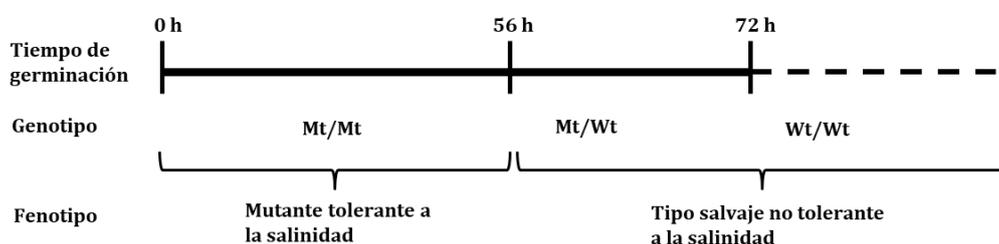


Figura 3. Esquema del tiempo de germinación en el *screening* masivo de la colección EMS. En base a los resultados obtenidos previamente se establece el tiempo de germinación según el cual se considera que tenemos un fenotipo mutante (tolerante a la salinidad) o un fenotipo salvaje (no tolerante a la salinidad). Se indica, en función del tiempo de germinación, el genotipo posible de las semillas. Mutantes (Mt/Mt) para que germinaban antes de las 56h, heterocigotas (Mt/Wt) para

aquellas que germinaban desde las 56h al final del ensayo y homocigotas salvajes (Wt/Wt) para aquellas que no germinaban en el tiempo de ensayo.

Puesto que con frecuencia el tratamiento con el EMS causa mutaciones recesivas, de cada una de las 46 líneas candidatas, se comprobó la hipótesis de ajuste de la segregación a la esperada en una mutación recesiva en un único gen, esto es 3:1 (No tolerante:Tolerante). Para comprobar esta hipótesis de control de tolerancia a la salinidad en las 46 líneas identificadas, se realizó un contraste de hipótesis por medio de una chi cuadrado (**Tabla 3**). Dado que se ensayaron 10 semillas por línea, lo que se esperaría son 2,5 semillas germinadas antes de las 56 horas (genotipo tolerante, Mt/Mt) y 7,5 semillas sin germinar (genotipo heterocigoto o WT, Mt/Wt o Wt/Wt).

En la **Tabla 3** se indican el número de semillas observadas y la $\chi^2_{\text{Calculada}}$ para cada línea. La $\chi^2_{\text{Teórica}}$ con un grado de libertad y con un nivel de confianza del 0,05 es de 3,84, por lo que, a excepción de la línea 1493, en el resto de líneas se acepta la hipótesis nula y, por tanto, la segregación se ajusta a la obtenida para la tolerancia a la salinidad controlada por un gen recesivo. En el caso de la línea 1493, se calculó la χ^2 considerando que la tolerancia a la salinidad en esta línea está regulada por un gen dominante y los resultados ($\chi^2_{\text{Calculada}} = 0,066$) indican que se acepta esta hipótesis.

Los datos obtenidos con χ^2 , se ajustan a herencia mendeliana controlada por un gen, contrastan con los observados en especie cercana a *C. pepo*, como es *C. moschata*. En esta especie evaluaron diversas familias de mutantes EMS para la identificación de mutantes tolerantes a NaCl en el estadio de plántula a 200mM de sal, sus datos de supervivencia no seguían una segregación 3:1 (tolerancia controlada por un gen recesivo) o la proporción de 15:1 (tolerancia controlada por dos genes recesivos) por lo que dedujeron que podía tratarse de una regulación compleja de varios loci (**Chen et al., 2018**). Sin embargo, sí existen trabajos en los que se muestra que la regulación de la tolerancia a la salinidad está controlada por un único gen en *Arabidopsis* (**Quesada et al., 2000**). Se identificaron 17 líneas mutantes tolerantes a la salinidad en base a tres estrategias (EMS, bombardeo de neutrones y mutagénesis insercional (T-ADN)), en el estadio de germinación, evaluando la tolerancia a 250 mM de NaCl. La mayor parte de ellos presentaban herencia monogénica recesiva con penetración incompleta, es decir, un porcentaje de mutantes no mostró el fenotipo y la tolerancia podría depender de múltiples factores (**Quesada et al., 2000**).

En *Oriza sativa*, también se ha empleado la estrategia EMS para detectar mutantes tolerantes a la salinidad. Se caracterizaron 6000 líneas en planta adulta y se detectó un mutante, *hst1*, el estudio de la descendencia de este mutante demostró un mejor rendimiento en diferentes concentraciones de NaCl en plántula. La caracterización genómica de la mutación permitió determinar que la tolerancia está causada por una mutación recesiva en el gen *OsRR22*. Este gen que se expresa en raíces, tallo y hoja, podría estar implicado en regular genes implicados en la respuesta a estrés osmótico y/o en el transporte de iones entre las células del parénquima y las células del tejido vascular de la raíz (**Takagi et al., 2015**). Finalmente, el análisis de una colección de 1676 EMS de mutantes en *Triticum aestivum* (trigo) permitió identificar 70 líneas con tolerancia a la sal (200 mM) (**Lethin et al., 2020**).

Tabla 3. Estimación de chi cuadrado (χ^2) en las líneas potencialmente tolerantes a la salinidad, para un gen recesivo (segregación 3:1). Se muestran las semillas observadas de cada fenotipo.

Línea	Germinadas observadas antes de las 56 h	No germinadas observadas	χ^2 Calculada
1048	2	8	0,13
1135	3	7	0,13
1140	1	9	1,20
1143	4	6	1,20
1167	1	9	1,20
1192	5	5	3,33
1252	2	8	0,13
1378	2	8	0,13
1389	2	8	0,13
1407	3	7	0,13
1420	2	8	0,13
1489	1	9	1,20
1493	8	2	16,13
1500	4	6	1,20
1552	1	9	1,20
1565	5	5	3,33
1571	1	9	1,20
1723	4	6	1,20
1915	1	9	1,20
1974	4	6	1,20
1987	1	9	1,20
2011	1	9	1,20
2063	4	6	1,20
2075	1	9	1,20
2111	2	8	0,13
2112	5	5	3,33
2117	2	8	0,13
2139	2	8	0,13
2141	1	9	1,20
2146	3	7	0,13
2224	2	8	0,13
2244	1	9	1,20
2461	1	9	1,20
2469	1	9	1,20
2503	2	8	0,13
2551	1	9	1,20
2578	4	6	1,20
2588	2	8	0,13
2592	4	6	1,20

2593	2	8	0,13
2596	3	7	0,13
2606	1	9	1,20
2685	2	8	0,13
2692	3	7	0,13
2699	2	8	0,13
2726	1	9	1,20
MUCU16 H ₂ O	10	0	--

Se han realizado múltiples estudios para entender la respuesta de estrés a la salinidad. Múltiples procesos pueden intervenir en la reacción de respuesta a la salinidad y la tolerancia puede depender de distintos mecanismos, como la regulación de la producción de sustancias osmoprotectores o la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los cambios en los niveles de hormonas (**Park et al., 2016**). Como una respuesta común al estrés de la sal, la acumulación de prolina contribuye a la eliminación del ROS, estabilizando las estructuras subcelulares y modulando el redox celular homeostasis (**Sharma et al., 2011**). Por lo tanto, caracterizar el contenido de prolina de nuestras 46 líneas candidatas será de interés para nuestros mutantes en el futuro. Además, se planteará un estudio más amplio en germinación y durante el desarrollo de las plántulas en la generación M₃, obtenida de autopolinización de plantas M₂ mutantes y no mutantes de cada una de las líneas. Actualmente, las plántulas M₂ claramente identificadas por su fenotipo de germinación, como mutantes o WT están siendo multiplicadas para obtener la M₃. El objetivo es disponer de semilla suficiente, principal limitación para ampliar los estudios en la M₂, para confirmar, en un tercer ensayo, que los genotipos ya identificados son tolerantes a la salinidad durante la germinación y en otros procesos del desarrollo.

4. CONCLUSIONES

PRIMERA. La salinidad es un estrés que afecta al proceso de germinación de las semillas en la variedad MUCU16 de la especie *C. pepo*, teniendo la dosis de NaCl un efecto directamente proporcional en el éxito de la germinación.

SEGUNDA. El estrés salino también tiene efecto durante el crecimiento temprano de las plántulas de *C. pepo*. Altera tanto el desarrollo del hipocótilo, como el crecimiento radicular.

TERCERA. El método de genética directa diseñado en base a los resultados del fondo genético de la colección EMS, MUCU16, permite evaluar la tolerancia a la salinidad en el estadio de germinación, a una concentración de 300 mM NaCl, a la que no germina el fondo genético, ya que a concentraciones más bajas puede observarse germinación de semillas que no sean tolerantes a la salinidad.

CUARTA. Las líneas M₂ candidatas detectadas en el *screening* masivo de tolerancia a la salinidad en el estadio de germinación, ha permitido identificar 46 líneas que segregan para la tolerancia a la salinidad. Estas líneas han sido confirmadas dos veces en la M₂ y se analizaran en la generación M₃.

QUINTA. La segregación de la mutación de tolerancia a salinidad en 45 de las 46 líneas candidatas identificadas, se corresponde con una segregación 3:1 y se ajusta al control del

carácter tolerancia a salinidad por un solo gen recesivo. Únicamente para una familia, la 1493, se ajusta al control por un gen dominante.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul Qados, Amira M.S. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia Faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 10(1): 7–15.
- Ashraf, M., y Harris P.J.C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science 166(1): 3–16.
- Ashraf, M., y Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59(2): 206–16.
- Berná, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Blaylock, A.D (1994). Soil Salinity, Salt Tolerance, and Growth Potential of Horticultural and Landscape Plants. Co-operative Extension Service Department of Plant, Soil, and Insect Sciences College of Agriculture. Universidad de Wyoming.
- Calderón, L. (2006). Caracterización genética de las respuestas morfo-fisiológica del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a la deficiencia de fósforo. Tesis Doctoral. Centro de investigación y estudios avanzados. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética. Campus Guanajuato.
- Carrillo, P., Annunziata, M.G., Fuggi, A. y Woodrow, P. (2011). Salinity stress and salt tolerance. ResearchGate.
- Chen, X., Guo, W., Jiang, L., Hayat, S., Chen, B., Yang, P., Zhou, J. Li, X. y Bai, Y. (2018). Screening of EMS-induced NaCl-tolerant mutants in *Cucurbita Moschata* Duchesne Ex Poir. Pakistan Journal of Botany 50(4): 1305–12.
- Farhoudi, R., Sharifzadeh, R., Poustini, K., Makkizadeh, M.T. y Kochak Por, M. (2007). The effects of NaCl priming on salt tolerance in canola (*Brassica napus*) seedlings grown under saline conditions. Seed Science and Technology. 35 (3) 754-759.
- García, A., Aguado, E., Parra, G., Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Cebrián G., Romero J., Beltrán S., Garrido, D. y Jamilena, M. (2018). Phenomic and genomic characterization of a mutant platform in *Cucurbita pepo*. Frontiers in Plant Science, 9: 1049.
- García, A., Aguado, E., Garrido, D., Martínez, C. y Jamilena, M. (2020a) Two androecious mutations reveal the crucial role of ethylene receptors in the initiation of female flower development in *Cucurbita pepo*. The Plant Journal . 103 (4).
- García, A., Aguado, E., Martínez, C., Loska, D., Beltrán, S., Valenzuela, J. L., Garrido, D. y Jamilena, M. (2020b). The ethylene receptors *CpETR1A* and *CpETR2B* cooperate in the control of sex determination in *Cucurbita pepo*. Journal of Experimental Botany. 71(1), 154-167.
- Ghani, M.N.O., Yahya A. y Mohd F.I. (2018). Effects of NaCl salinity on leaf water status, proline and mineral ion content of four *Cucurbitaceae* species. Australian Journal of Crop Science 12(9): 1434–39.
- González, L.M., González, M.C. y Ramírez, R. (2002). Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. Cultivos Tropicales. (23) 27-37.
- González-Grande, P., Suárez, N., Marín, O. (2020). Effect of salinity and seed salt priming on the physiology of adult plants of *Solanum lycopersicum* cv. 'Río Grande'. Brazilian Journal of Botany 43:775–787.
- Guo-Wei, Z., Hai-Ling, L., Lei, Z., Bing-Lin, C. y Zhi-Guo, Z. (2011). Salt tolerance evaluation of cotton (*Gossypium hirsutum*) at its germinating and seedling stages and selection of related indices. Yingyong Shengtai Xuebao. 22: 2045–2053.
- Hernández-González, Z., Sahagún-Castellanos, J., Espinosa-Robles, P., Colinas-León, M. T. y Rodríguez-Pérez, J. E. (2014). Efecto del patrón en el rendimiento y tamaño de fruto en pepino injertado. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 37(1): 37 (1): 41-47.
- Kanno, Y., Jikumaru, Y. Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S. R., Kamiya, Y. y Seo M. (2010). Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. Plant and Cell Physiology 51(12): 1988–2001.
- Kong, Q., Chen, J., Liu, Y., Ma, Y., Liu, P., Wu, S., Huang, Y. y Bie Z. (2014). Genetic diversity of *Cucurbita* rootstock germplasm as assessed using simple sequence repeat markers. Scientia Horticulturae 175: 150–55.
- León-García, A. (2016). Determinación de la concentración óptima de Metano Sulfonato de Etilo en *Phaseolus Vulgaris* L. Cultivar DOR 364. Tesis Doctoral. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.
- Lethin, J., Shakil, S., Hassan, S., Sirijovski, N., Töpel, M., Olsson, O. y Aronsson, H. (2020). Development and characterization of an EMS-mutagenized wheat population and identification of salt-tolerant wheat lines. BMC Plant Biology 20(1): 1–15.
- Mitchell, J., Johnston, I.G. y Bassel, G.W. (2017). Variability in seeds: biological, ecological, and agricultural implications. Journal of Experimental Botany 68(4): 809–17.

- Navarro-León, E., Ruiz, J. M., Albacete, A. y Blasco, B. (2020). Tolerance to cadmium toxicity and phytoremediation potential of three *Brassica rapa* CAX1a TILLING mutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189.
- Niu, M., Xie, J., Chen, C., Cao, H., Sun, J., Kong, Q., Shabala, S., Shabala, L., Huang, Y. y Bie Z. (2018). An early ABA-induced stomatal closure, Na⁺ sequestration in leaf vein and K⁺ retention in mesophyll confer salt tissue tolerance in species. *Journal of Experimental Botany* 69(20): 4945–60.
- Organización para la Agricultura y la Alimentación. (2018). www.fao.org.
- Park, H. J., Woe-Yeon, K., y Dae-Jin, Y. (2016). A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant. *Molecules and Cells* 39(6): 447–59.
- Praena, J. (2017). Identificación y caracterización de mutantes afectados en el desarrollo temprano en líneas T-DNA de tomate y de *Solanum pimpinellifolium*. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Qing-song, Z. et al. (2004). The Effect of NaCl on Germination Character of Watermelon Seed. *Journal of Henan Vocation-technical Teachers College*.
- Quesada, V., Ponce, M. R., y Micol, J. L. (2000). Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics Society of America* 154(1): 421–36.
- Rojas, L., Collado, R., León, A., Rivero, L., Ocaña, B., Hernández, M., Veitía, N., Martirena-Ramírez, A., Torres, D. y García L. R. (2016). Concentración óptima de Metano Sulfonato de Etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'DOR 364' para inducir variaciones fenotípicas. *Bioteología Vegetal* 16(3): 179–88.
- Santo, A., Mattana, E., Frigau, L., Marzo Pastor, A., Picher Morelló, M. C. y Bacchetta, G. (2017). Effects of NaCl stress on seed germination and seedling development of *Brassica insularis* Moris (*Brassicaceae*). *Plant Biology* 19(3): 368–76.
- Sharif, I., Aleem, S., Farooq, J., Rizwan, M., Younas, A., Sarwar, G. y Chohan, S. M. (2019). Salinity stress in cotton: effects, mechanism of tolerance and its management strategies. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25(4): 807–20.
- Sharma, S., Villamor, J. G., y Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology* 157(1): 292–304.
- Sun, H., Wu, S., Zhang, G., Jiao, C., Guo, S., Ren, Y., Zhang, J., Zhang, H., Li, H., Fei, Z. y Xu Y. (2017). Karyotype stability and unbiased fractionation in the paleo-allotetraploid *Cucurbita* genomes. *Molecular Plant* 10(10): 1293–1306.
- Susko, D.J. y Lovett-Doust, L. (2000). Patrones de variación de la masa de semillas y sus efectos sobre los rasgos de las plántulas en *Alliaria petiolata* (*Brassicaceae*). *Soy J Bot.* 87 (1): 56-66.
- Takagi, H., Tamiru, M., Abe, A., Yoshida, K., Uemura, A., Yaegashi, H., Obara, T., Oikawa, K., Utsushi, H., Kanzaki, E. et al. (2015). MutMapa accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nature Biotechnology* 33(5): 445–49.
- Thomas, J. C., Sepahi, M., Arendall, B. y Bohnert, H. J. (1995). Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 18, 801-806.
- Vicente-Dólera, N., Troadec, C., Moya, M., del Río-Celestino, M., Pomares-Viciano, T., Bendahmane, A., Picó, B., Román, B. y Gómez, P. (2014). First TILLING platform in *Cucurbita pepo*: a new mutant resource for gene function and crop improvement." *PLoS ONE* 9 (11).
- Xu, J., Li, W., Zhang, C., Liu, W. y Du, G. (2015). Variation in seed germination of 134 common species on the eastern tibetan plateau: phylogenetic, life history and environmental correlates. *PLoS ONE* 9 (6).
- Zhi-hong, Y., Wen-ge, L., Sheng-jie, Z., Nan, H. y Jun-liang, W. (2006). Effect of NaCl Stress on Germination of Different Watermelon Varieties. *Journal of Plant Genetic Resources*.