

# Caracterización de un mutante enano de calabacín (*Cucurbita pepo*)

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
Universidad de Almería



**TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Biotecnología

Departamento: Biología y Geología

Curso académico 2021-2022

**Modalidad:** Proyecto experimental

**Alumna:** María Mota Carreño

**Directora:** Dra. Cecilia Martínez Martínez

**Codirectora:** Sonsoles Alonso de Diego

Universidad de Almería



## RESUMEN

*Cucurbita pepo* constituye actualmente una de las especies más importantes a nivel económico y se encuentra entre las familias de especies cultivadas con mayor importancia a nivel mundial. De esa importancia económica se deriva el interés en desarrollo de programas de mejora en esta especie. El uso de líneas mutantes desarrolladas sobre material élite de mejora, en lugar del uso de la variabilidad natural, presenta ciertas ventajas por no tener que eliminar caracteres indeseables que, con frecuencia, se presentan en la variabilidad natural. En este trabajo se presentan los resultados de caracterización sobre una población segregante de un mutante enano. Este mutante que destaca por su arquitectura de planta reducida y robusta y la disminución del tamaño de sus órganos, fue analizada fenotípicamente llevando a cabo la medición de diferentes parámetros. Por otro lado, se realizó la caracterización genotípica de la población segregante con un marcador tipo SNP detectado por *BSA-seq*. La mutación es una sustitución de guanina (G) por adenina (A) en un gen que codifica para la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa de la ruta de biosíntesis de los brasinoesteroides. Por lo que, además del estudio fenotípico y el análisis de cosegregación con el marcador, se realizaron tratamientos con *epi-brassinolide* y se analizan y discuten sus efectos sobre la recuperación del fenotipo salvaje.

## ABSTRACT

*Cucurbita pepo* is currently one of the most economically important species and is one of the most important cultivated species in the world. This economic importance is the reason for the interest in developing breeding programmes for this species. The use of mutant lines developed on elite breeding material, instead of using natural variability, has certain advantages in that it does not have to eliminate undesirable traits that are often present in natural variability. This project presents characterisation results on a segregating population of a dwarf mutant. This mutant, which stands out for its reduced and robust plant architecture and reduced organ size, was phenotypically analysed by measuring different parameters. On the other hand, genotypic characterisation of the segregating population was carried out with a SNP-type marker detected by BSA-seq. The mutation is a substitution of guanine (G) for adenine (A) in a gene that codes for the 7-dehydrocholesterol reductase enzyme of the brassinosteroid biosynthesis pathway. Therefore, in addition to the phenotypic study and cosegregation analysis with the marker, treatments with *epi-brassinolide* were performed and their effects on the recovery of the wild-type phenotype are analysed and discussed.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	I
<b>ABSTRACT</b> .....	II
<b>ÍNDICE</b> .....	III
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. El calabacín .....	1
1.1.1. Principales características .....	1
1.1.2. Caracterización morfológica y desarrollo .....	1
1.1.3. Colecciones de mutantes en cucurbitáceas .....	2
1.1.4. Colección de mutantes de <i>Cucurbita pepo</i> .....	4
1.1.5. Mutantes caracterizados en <i>C. pepo</i> .....	5
1.2. Brasinoesteroides en el desarrollo vegetal .....	6
1.2.1. Ruta de biosíntesis de brasinoesteroides .....	7
1.2.2. Mutantes de la ruta de biosíntesis de brasinoesteroides .....	10
1.2.3. Implicación de los brasinoesteroides en el desarrollo vegetal .....	11
<b>2. OBJETIVOS DEL PROYECTO</b> .....	14
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
3.1. Condiciones de cultivo .....	15
3.2. Material vegetal .....	15
3.3. Toma de muestras y extracción de ADN .....	16
3.4. Genotipado de la variante alélica detectada por <i>BSA-seq</i> .....	17
3.5. Caracterización fenotípica en plantas mutantes y no mutantes .....	18
3.5.1. Caracterización del crecimiento vegetativo y del desarrollo sexual .....	18
3.5.2. Tratamiento con brasinoesteroides .....	19
3.6. Análisis estadístico .....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	20
4.1. Características generales de la línea 2307 .....	20
4.2. Análisis de la población segregante BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> .....	20
4.2.1. Estudio del modo de herencia .....	20
4.2.2. Detección de la mutación y diseño de marcadores .....	21

---

4.2.3. Análisis genotípico .....	21
4.3. Caracterización fenotípica.....	22
4.3.1. Análisis morfológico.....	22
4.3.2. Crecimiento de órganos vegetales.....	24
Crecimiento de hojas .....	24
Crecimiento de flores.....	26
4.3.3. Tratamiento con brasinoesteroides .....	27
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>32</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>33</b>

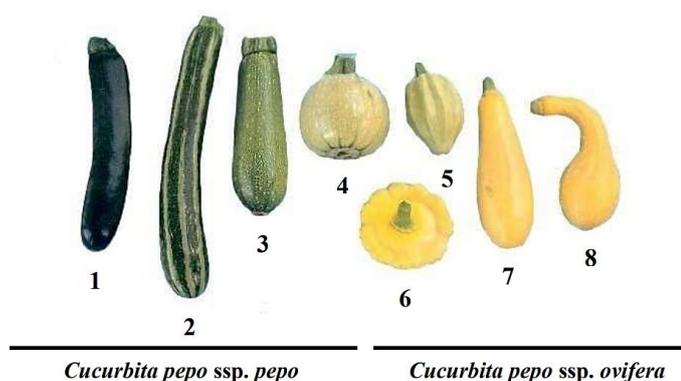
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El calabacín

#### 1.1.1. Principales características

El calabacín (*Cucurbita pepo*) pertenece a la familia de las cucurbitáceas. Se encuentra entre las familias más importantes de especies cultivadas en todo el mundo y comprende alrededor de 1.000 especies distribuidas en 96 géneros (Renner y Schafer, 2016). Entre los más valorados por su importancia económica encontramos junto al género *Cucurbita* (calabacines y calabazas), los géneros *Citrullus* (sandía) y *Cucumis* (pepino y melón). *Cucurbita pepo* es una especie nativa mesoamericana, esto es, su origen se sitúa en el suroeste de Los Estados Unidos y del norte de México. Restos arqueológicos que datan entre 7000 y 10000 A.C., sitúan en México la domesticación inicial de la especie (Smith, 1997). Además, existen otras formas salvajes que también se distribuyen por Asia y Europa (Perez, 2016, citado por Ratnam et al., 2017).

La especie *C. pepo* está formada por 3 subespecies distintas: *C. pepo* ssp. *fraterna*, *C. pepo* ssp. *ovifera* y *C. pepo* ssp. *pepo* (Decker, 1988). *C. pepo* ssp. *ovifera* y *C. pepo* ssp. *pepo* son cultivadas y se han establecido hasta ocho morfotipos diferentes caracterizados y englobados entre estos dos subgrupos (Paris et al., 2012). *C. pepo* presenta una alta variedad de morfotipos comestibles (Figura 1), siendo el morfotipo *Zucchini*, uno de los cultivares más recientes y el de mayor relevancia a nivel económico. El morfotipo *Zucchini*, comúnmente conocido como calabacín, es cultivado tradicionalmente en la región mediterránea y se caracteriza por el consumo de sus frutos en estado inmaduro, que presentan forma alargada y cilíndrica, siendo mayoritariamente de color verde oscuro.



**Figura 1.** Distintos morfotipos de *Cucurbita pepo*. De izquierda a derecha: Zucchini, Coccozelle, Vegetable Marrow y Pumpkin (*C. pepo* subsp. *pepo*), Acorn, Scallop, Straightneck y Crookneck (*C. pepo* subsp. *ovifera*) (Fuente: Carvajal Moreno, 2014).

#### 1.1.2. Caracterización morfológica y desarrollo

El calabacín es una planta rastrera anual de crecimiento indeterminado. Presenta un tallo principal dominante del que parten ramificaciones distribuidas helicoidalmente que dan lugar a las flores y hojas. Desarrolla hojas palmeadas de gran tamaño, que pueden llegar a alcanzar los 20-30 cm de longitud y los 20-35 cm de anchura. Son hojas de color verde, lobuladas (5-7 lóbulos), con bordes

dentados y apicalmente agudas unidas a la planta mediante resistentes pecíolos gruesos, largos y huecos cubiertos de pelos rígidos que le dan un aspecto áspero al tacto (Ratnam et al., 2017).

Se trata de planta monoica, ya que desarrolla flores unisexuales masculinas y femeninas en el mismo pie de planta. Produce flores grandes, acampanadas y actinomorfas, de color amarillo intenso. Las flores masculinas se caracterizan por presentar largos pedicelos, mientras que las femeninas se caracterizan porque poseen pedúnculos gruesos (de 3 a 5 cm de largo), y un ovario con forma ovalada. El desarrollo reproductivo, como en la mayoría de las variedades, se presenta de forma muy temprana y se muestra en tres etapas a lo largo del desarrollo de la planta. Una primera etapa, en la que intervienen los primeros nudos (4-8) y las flores son únicamente masculinas; en una segunda etapa, o fase alternante, se produce tras la transición a floración femenina, en la que se alterna la producción de flores masculinas y femeninas; y la tercera etapa en la que sólo se desarrollan flores femeninas. El patrón de expresión sexual es dependiente de las condiciones ambientales, de tal modo que, condiciones ambientales de primavera-verano (día largo, alta temperatura y alta radiación) promueven una masculinización floral, en detrimento del número total de flores femeninas (Manzano et al., 2010; García et al., 2020a;b; Peñaranda et al., 2007).



**Figura 2.** Arquitectura de la planta en el morfotipo *Zucchini*. (a): Arquitectura general; (b): Flor femenina (“Zucchini flower” por allispossible.org.uk bajo licencia CC BY 2.0); (c): Flor masculina (“Cucurbita pepo flower” por cspyrglou bajo licencia CC BY-NC-SA 2.0).

El fruto que desarrolla, el calabacín o *zucchini*, es una baya carnosa, cilíndrica y alargada de color verde oscuro que alcanza los 20 cm de longitud cuando es recolectado para su consumo en estado inmaduro, pero pudiendo llegar a los 50 cm de tamaño y 12 cm de diámetro tras su completo desarrollo en planta. En estado inmaduro, se caracteriza por la ausencia de semillas y unas cualidades organolépticas preferibles para su consumo, a diferencia del fruto maduro, en el cual ya no se conservan dichas características deseables para el consumidor (Ratnam et al., 2017).

### 1.1.3. Recursos genómicos y colecciones de mutantes

*C. pepo* es una de las especies de mayor valor económico, no sólo en Almería, sino también a nivel mundial, por lo que es relevante para la mejora genética vegetal. Principalmente, los objetivos de mejora se han focalizado en el desarrollo de resistencias a enfermedades provocadas por hongos o virus, optimización de la precocidad o de la floración femenina, etc (Ferriol y Picó, 2008). Sin embargo,

en comparación con otras cucurbitáceas existe un retraso evidente en los programas de mejora en *C. pepo* que no cubren las demandas de mercado actuales (Vicente, 2015). El desarrollo de colecciones de mutantes sobre líneas élite ha suplido en gran medida este retraso, al aportar caracteres novedosos sobre recursos fitogenéticos ya mejorados.

Gracias a las herramientas NGS (*Next Generation Sequencing*) ya se han obtenido las primeras colecciones de marcadores SSR y SNPs (Blanca et al., 2011) y se han desarrollado mapas genéticos basados en marcadores tipo SNPs en la especie (Esteras et al., 2012; Montero-Pau et al., 2017). Además de estas valiosas herramientas, los trabajos de resecuenciación del genoma sobre accesiones de la variabilidad natural del banco de germoplasma del USDA, han generado una ingente colección de variantes tipo SNP, disponibles para su exploración en *Cucurbit Genomics Database* (Cucurbit Genomics Database (CuGenDB), 2022. <http://cucurbitgenomics.org/news>).

Actualmente, las directrices en los programas de mejora se conducen hacia programas de mutagénesis, mediante los cuales se permita la generación de variabilidad genética de manera artificial, con el fin de introducir más variantes (Vicente, 2015). El etilmetanosulfonato o metanosulfonato de etilo (EMS) es un químico utilizado como uno de los agentes mutagenizantes más empleados, especialmente en técnicas de genética reversa para la generación de lesiones inducidas y localizadas en el genoma. Se trata de un agente alquilante que actúa sobre las bases nitrogenadas de guanina (G) principalmente, generando en su mayoría transiciones, esto es sustituciones A>G y C>T. De esta forma, el EMS genera mutaciones puntuales en los que se intercambia una base nitrogenada por otra, lo que se conoce también como polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polomorphism*) (Rojas et al., 2016). Su efecto mutagénico genera frecuentemente gran cantidad de mutaciones puntuales recesivas a lo largo del todo el genoma, mostrando una escala de fenotipos de gran utilidad para estudios de la función de genes. También destaca su gran nivel de saturación del genoma sin llegar a provocar daños excesivos en el ADN incompatibles con la viabilidad del organismo (Silme y Çağırğan, 2007). No obstante, además de la generación de variantes alélicas, la mutagénesis va más allá de sus aplicaciones en la mejora vegetal. Si bien, para la selección y aislamiento de mutantes de interés para la mejora genética de la especie se requiere conocer la función que tiene, la identificación de fenotipos mutantes de interés en genes desconocidos junto a las nuevas técnicas de genómica y secuenciación, va a lograr la disección y caracterización funcional en dichos genes (Genómica funcional) (Vicente, 2015).

En el tiempo actual, se cuenta con plataformas de mutantes para su utilización en mejora genética en variedad de especies hortícolas. Ejemplos de ellas son las colecciones en tomate (Menda et al., 2004, Minoia et al., 2010), en melón (Dahmani-Mardas et al., 2010, Gonzalez et al., 2011), sandía (Hou, et al., 2016) o pepino (Boualem et al., 2014). En el año 2014 Vicente-Dólera et al. desarrollaron la primera colección de mutantes de *Cucurbita pepo*, y más recientemente se desarrolló la colección llevada a cabo por el grupo de investigación de Genética de Hortícolas (BIO293) de la Universidad de Almería (García et al., 2018).

#### 1.1.4. Colección de mutantes de *Cucurbita pepo*

En el año 2018 se llevó a cabo la publicación de la colección de mutantes de *C. pepo* desarrollada en la Universidad de Almería (García et al., 2018) conformada por 3751 familias mutantes  $M_2$  procedentes de la variedad *background* MUC-16, un cultivar local de origen español (Murcia), cultivar también utilizado para la generación del genoma de referencia en calabacín (Montero-Pau et al., 2018), y que procede del Banco de Germoplasma del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universitat Politècnica de València. Se trata de una plataforma de mutantes generados a partir de semillas tratadas con el mutágeno químico metanosulfonato de etilo.

Para la generación de la colección de mutantes, el tratamiento de las semillas se realizó a concentraciones óptimas de 0,2 y 0,3% de EMS, las cuales fueron comprobadas de forma previa mediante la evaluación de los efectos sobre la germinación y la fertilidad en una generación  $M_1$  tras la aplicación de diferentes concentraciones del mutágeno. Un grupo de 6000 semillas de MUC-16 se trató con EMS al 0,3% mientras que otro grupo de 2000 semillas se trató con EMS al 0,2%, de los que se obtuvieron, respectivamente, un total de 2822 y 929 frutos con al menos 20 semillas viables. De este modo, se constituiría un grupo formado por un total de 3751 familias  $M_2$  (García et al., 2018). Mediante un cribado fenotípico, la colección de mutantes fue evaluada primeramente a nivel de plántula para observar las alteraciones que afectan en el estadio de plántula, como pueden ser los cotiledones y las primeras hojas. Paralelamente se realizó una resecuenciación de dos familias mutantes, observando que la densidad media de mutaciones encontradas en esta colección se sitúa en 1 cada 111 kb. Esta colección se caracteriza por incluir estas mutaciones distribuidas uniformemente a lo largo del genoma de *C. pepo*, constituidas en más del 75% por transiciones C > T y G > A, y en menor proporción T > C y A > G y transversiones. De forma general, estos cambios se veían reflejados en la generación de más de un 10% de variaciones morfológicas en el estadio de plántula (García et al., 2018), con un 1,86% de plántulas albinas y cloróticas (figura 3), valor similar al observado en otra colección de calabacín desarrollada (1,3%) (Vicente et al., 2014). Así como con otras colecciones de cucurbitáceas como la de pepino (Boualem et al., 2014) y melón (González et al., 2011).



**Figura 3.** Diferentes alteraciones fenotípicas detectadas en plántulas de la colección de mutantes de *C. pepo* (Fuente: García et al, 2018).

### 1.1.5. Mutantes caracterizados en *C. pepo*

Una vez obtenida la colección de mutantes, esta ha sido utilizada en diversos *screenings* para la búsqueda de caracteres de interés agronómico, mediante genética directa identificando fenotipos sugerentes para la posterior búsqueda de la mutación responsable.

Uno de los primeros *screenings* que se realizó a partir de esta colección implicó la búsqueda de mutantes para insensibilidad a etileno. Para ello, el estudio centró el criterio base de fenotipado en la triple respuesta al etileno, por la cual, aquellas plantas WT sensibles a etileno mostrarían una reducción en la elongación y un engrosamiento del hipocótilo, formación de un gancho apical muy pronunciado, además de una reducción del tamaño de la raíz. De esta forma, se consiguieron identificar 4 líneas mutantes que no mostraban esta triple respuesta, esto es, que ante un tratamiento de etileno en oscuridad mostraban un fenotipo de falta de triple respuesta y por tanto de insensibilidad a etileno. Fueron denominados de manera provisional como: *ein1*, *ein2*, *ein3* a las tres familias mutantes que presentaban algunos de sus individuos con un fenotipo mutante intermedio; y *EIN4* a aquel que mostró un fenotipo mutante extremo respecto al *wild-type*.



**Figura 4:** Se muestra el fenotipo de triple respuesta a etileno en plántulas etioladas de la familia mutante *ein1*. Fuente: García et al., 2018.

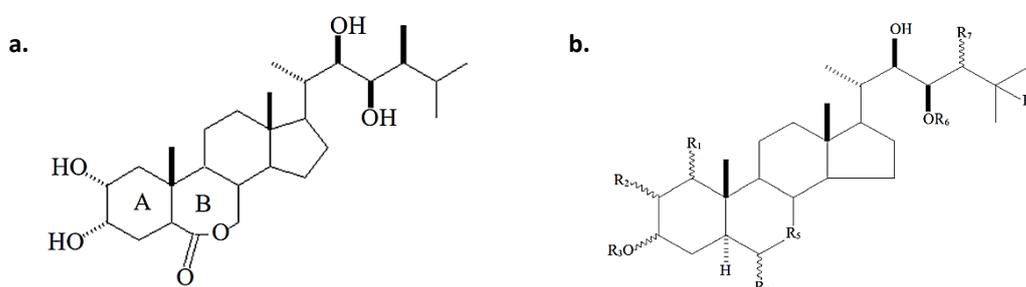
La caracterización de estos cuatro mutantes, condujo a la identificación de la mutación causal y al renombramiento de las mutaciones *ein2* y *ein3* como *etr1a* y *etr2b*, por afectar el primer exón de ambos de los receptores de etileno en *C. pepo*, *CpETR1A* y *CpETR2B* respectivamente. También se determinó el carácter semi-dominante de estos mutantes y el nivel de insensibilidad a etileno en cada uno determinando que, en homocigosis, el mutante *etr2b* se caracteriza por mostrar un mayor nivel de insensibilidad que el mutante *etr1a*, así como su fenotipo, capaz de alterar el patrón de floración y convertir las plantas de calabacín monoicas en plantas andromonoicas (García et al, 2020a). Los mutantes *ein1* y *EIN4*, renombrados posteriormente como *etr1b* y *etr1a-1*, también fueron analizados y caracterizados por provocar variaciones en el dominio transmembrana de los genes *CpETR1A* y *CpETR1B*. Causando un fenotipo de alteración del sexo que da lugar al desarrollo de plantas androicas (García et al., 2020b).

A partir de otro *screening* realizado en la colección de mutantes sobre planta adulta se detectó el mutante *aco1a* (Cebrián et al., 2022) también implicado en la determinación del sexo. El análisis de la secuencia candidata de la mutación determinó la posición de la mutación *aco1a* en el gen *CpACO1A* que codifica para la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa 1A, implicada en la biosíntesis del etileno. También se determinó su carácter recesivo y su implicación en la conversión de flores femeninas en hermafroditas, con el consecuente paso de monoecia a andromonoecia parcial, además de la formación de frutos partenocárpicos (Cebrián et al., 2022). Por último, un mutante deficiente en jasmonatos, cuya mutación se localiza sobre el sitio de *splicing* del sexto intrón del gen *LOX1A*, causa un codón stop prematuro (Cebrián, 2022, Tesis Doctoral no publicada). El mutante se caracteriza por una falta de apertura floral en flores masculinas y femeninas.

Derivado de la caracterización fenotípica de más de 200 familias de la colección en planta adulta, a partir de la cual fueron detectados los mutantes *aco1a* y *lox1a*, se identificó además una línea mutante caracterizada por su enanismo, que será la que se estudie en este TFG.

## 1.2. Brasinoesteroides en el desarrollo vegetal

Los brasinoesteroides (BR) son un grupo de hormonas esteroideas vegetales implicadas en numerosos procesos fisiológicos que juegan un importante papel en procesos de crecimiento y desarrollo, además de intervenir en la respuesta al estrés (Ahamed et al., 2020). No fue hasta el año 1979 cuando se reconoció la presencia de hormonas esteroideas en vegetales, solo consideradas como tal hasta entonces en animales (Khripach et al., 2000). El estudio llevado a cabo ese mismo año fue realizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), y provenía de una investigación puesta en marcha desde 1960, la cual se centró en la búsqueda de hormonas vegetales a partir de polen (Grove et al., 1979). Uno de los activos que generaba una mayor promoción del crecimiento fue extraído del polen de la especie *Brassica napus*, por lo que estos compuestos recibieron el nombre de *brassinins* en inglés. Posteriormente, se identificó el primer brasinoesteroide que recibió el nombre de *brassinolide* (BL) (Grove et al., 1979).



**Figura 5.** (a): Estructura química general del brasinoesteroide. (b): Estructura química de *brassinolide* (BL). Fuente: Hernández y García, 2016.

Los brasinoesteroides son las únicas fitohormonas que presentan una estructura de tipo esteroideal. Son esteroides que pueden contener 27, 28 o 29 átomos de carbono. Son moléculas que

presentan un esqueleto  $5\alpha$ -colestano, formadas por cuatro anillos de isopreno y una cadena lateral. Los anillos A y B, y la cadena lateral pueden tener diferentes sustituyentes (figura 5). Las posibles diferencias en el número de grupos hidroxilo que pueden variar su posición en los carbonos 2 y 3, junto a la presencia de grupos cetona o grupos lactona en los carbonos 6 y 7, generan hasta 50 variantes estructurales en la molécula, de las cuales, únicamente la BL genera la mejor actividad como promotora del crecimiento (Kwon y Choe, 2005).

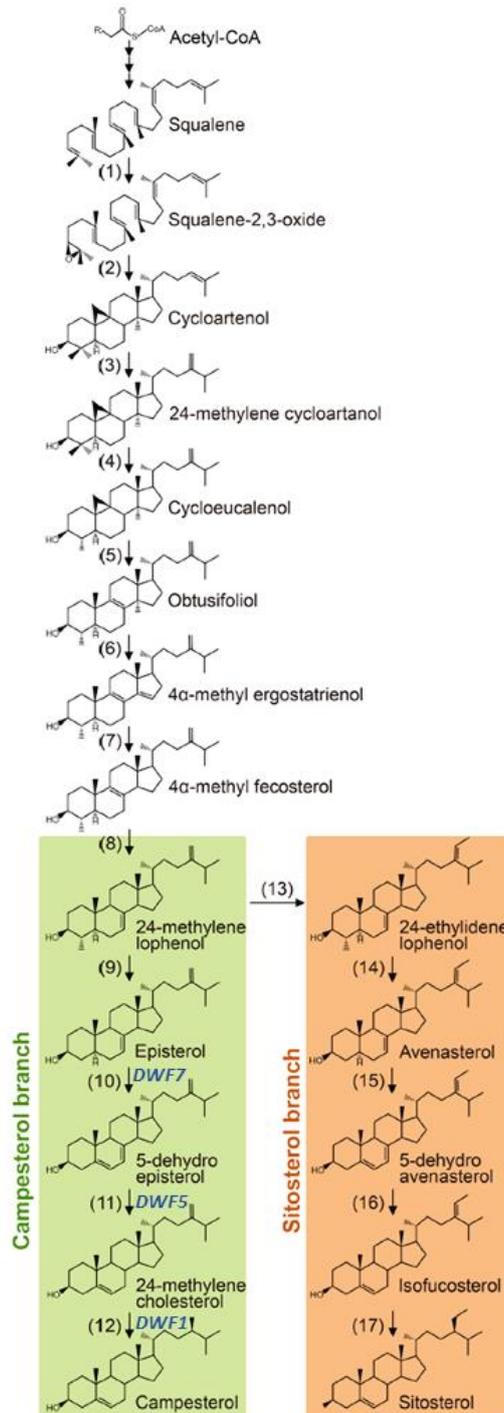
### 1.2.1. Ruta de biosíntesis de brasinoesteroides

Entre estos compuestos activos, los más abundantes son aquellos que presentan 28 átomos de carbono ( $C_{28}$ -BRs), entre ellos la castasterona (CS) y el *brassinolide* (BL) (Wei y Li, 2020), siendo el *brassinolide* el que presenta una mayor actividad fisiológica dentro del grupo de los brasinoesteroides (Fujioka y Yokota, 2003; Ohnishi, 2018). La biosíntesis de  $C_{28}$ -BRs ya ha sido analizada y caracterizada en detalle, sin embargo, para los  $C_{27}$  y  $C_{29}$ -BRs que parten de precursores diferentes como el colesterol o el sitosterol, podrían generarse también por vías similares a los de  $C_{28}$ -BRs (Wei y Li, 2020). Gracias al estudio de mutantes, y ensayos bioquímicos realizados en cultivos celulares, ha sido posible establecer la ruta biosintética de BR y realizar la caracterización de la mayoría de enzimas implicadas en las rutas biosintéticas de fitoesteroles (Sakurai, 1999; Choe et al., 1999b). La biosíntesis de BR tiene lugar a partir de una molécula precursora de todos los esteroides vegetales, el cicloartenol (Sakurai, 1999), un esteroide de 30 átomos de carbono derivado del escualeno, a partir del cual, mediante una serie de reacciones químicas se sintetizan las moléculas intermediarias que darán lugar a las diferentes formas estructurales que pueden presentar los BR. Se trata de un compuesto clave en la biosíntesis de BR ya que constituye un sustrato esencial en diferentes reacciones y rutas que dirigen hacia la síntesis de  $C_{28}$ ,  $C_{27}$  y  $C_{29}$ -BRs (Bajguz et al., 2020).

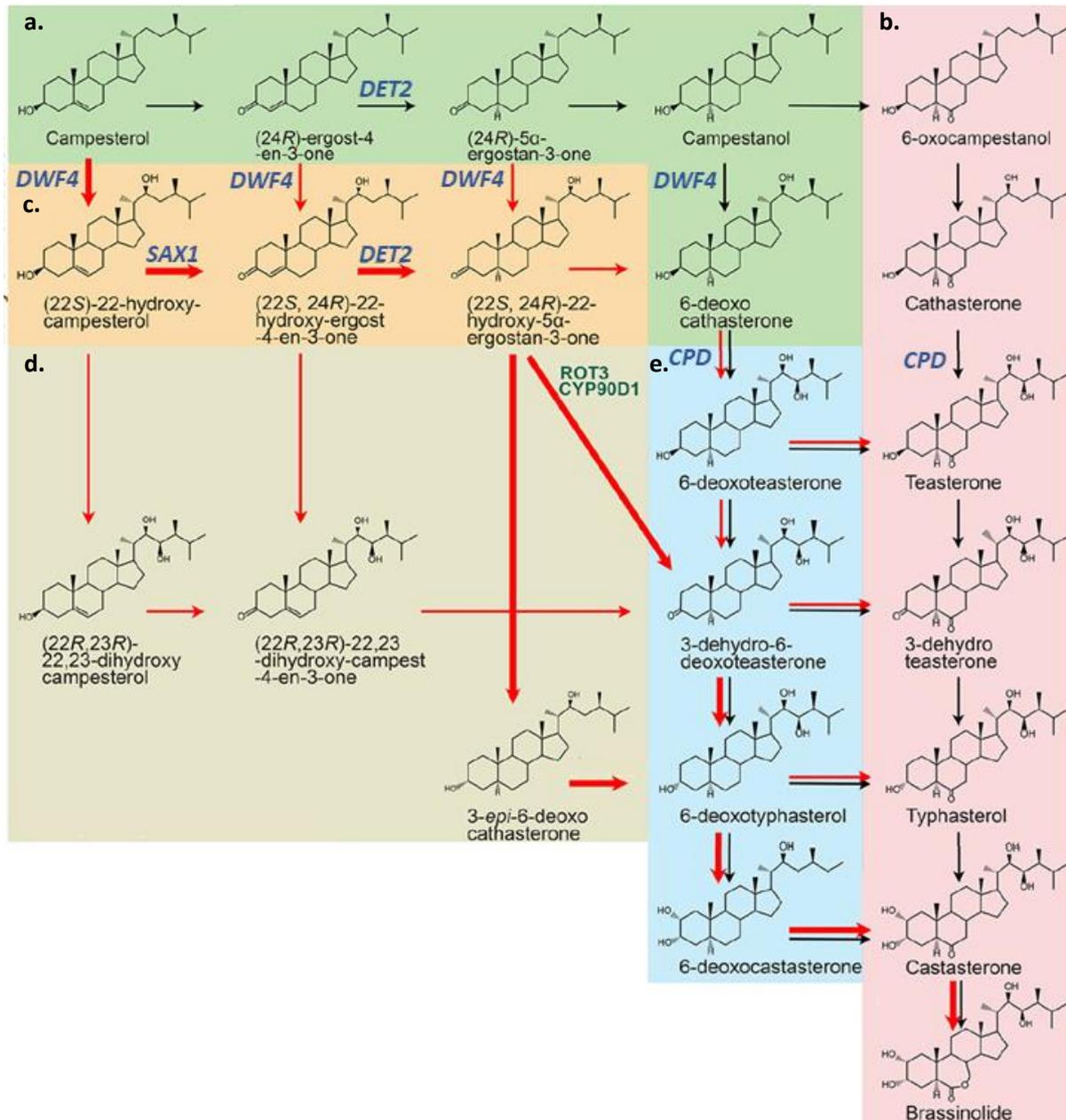
Los primeros pasos de esta ruta de biosíntesis llevan a cabo la generación de diferentes esteroides, los cuales están sujetos a una serie de modificaciones antes de convertirse en BR. (Choe et al., 1999b). En esta primera etapa común a todos los tipos de BR (Bajguz et al., 2020), se lleva a cabo la transformación de una molécula de escualeno ( $C_{30}$ ) mediante una serie de reacciones químicas catalizadas por diferentes enzimas, para dar lugar a cicloartenol, molécula precursora del resto de esteroides vegetales, que a su vez dará lugar a dos esteroides precursores de BR: el campesterol y el sitosterol (Figura 6).

Una reacción de oxidación (paso 1, figura 6) lleva a cabo la transformación de una molécula de escualeno en 2,3 oxidoscualeno, a partir del cual se formará cicloartenol (paso 2, figura 6), el primer triterpenoide iniciador en la biosíntesis de fitoesteroides. Posteriormente, una metilación (paso 3, figura 6) llevada a cabo por una cicloartenol sintasa, genera 24-metilenocicloartanol. Esta molécula es seguidamente desmetilada (paso 4, figura 6) dando lugar a cicloeucalenol, del cual se han eliminado dos grupos metilo a través de tres reacciones enzimáticas secuenciales, que resultan esenciales para otorgar funcionalidad fisiológica en los fitoesteroides. El cicloeucalenol es posteriormente isomerizado (paso 5, figura 6) en obtusifoliol, el cual, tras una desmetilación (paso 6, figura 6) en el C14, llevada a cabo por el citocromo P450s, y seguida de una reducción enzimática (paso 7, figura 6), genera una

molécula de 4 $\alpha$ -metil fecosterol. Por último, esta molécula es isomerizada (paso 8, figura 6) dando lugar a 24-metilenlofenol (Wei y Li, 2020; Sakurai,1999). A partir de este paso, el 24-metilenlofenol se convierte en el sustrato de dos vías diferentes que divergen, por un lado, hacia la biosíntesis de campesterol (paso 9, figura 6), precursor de C<sub>28</sub>-BRs; mientras que la otra se dirige hacia la formación de sitosterol (paso 13, figura 6), iniciador de C<sub>29</sub>-BRs (Bajguz et al., 2020).



**Figura 6.** Biosíntesis de campesterol y sitosterol a partir de escualeno. Los números corresponden a las reacciones descritas en el texto (Modificado de Wei y Li, 2020). En azul se representan las enzimas identificadas a partir de mutantes enanos de *Arabidopsis*.



**Figura 7.** Ruta específica de biosíntesis de BR a partir de campesterol. Las flechas gruesas representan la ruta más eficiente y dominante (Modificado de Wei y Li, 2020). (a): Vía de oxidación en C22 tardía. (b): Vía de oxidación en C6 temprana. (c): Vía de oxidación en C22 temprana. (c): Vía de hidroxilación C23. (d): Vía de oxidación en C6 tardía. En azul se representan las enzimas identificadas a partir de mutantes enanos de *Arabidopsis*.

El metabolito intermediario más característico de la ruta de biosíntesis de  $C_{28}$ -BRs es el episterol. El episterol es seguidamente convertido a 24-metilencolesterol (pasos 10 y 11, figura 6) mediante dos reacciones enzimáticas, y finalmente se isomeriza a campesterol (paso 12, figura 6). En este punto, la ruta se disgrega siguiendo vías diferentes de forma paralela y entrelazadas entre sí, mediante las cuales el campesterol puede ser convertido en diferentes intermediarios según la vía seguida (Figura 7) (Wei y Li, 2020; Bajguz et al., 2020). Las vías predominantes suelen ser la vía de oxidación C22 temprana y la vía de oxidación C6 tardía, tal y como se ha comprobado en varias especies

(Nomura et al., 2001 ; Wei y Li, 2020), demostrándose que la ruta más eficiente e imperante en la biosíntesis de BL en *Arabidopsis* sigue la vía descrita como: campesterol → 22-hidroxi-campesterol → 22-hidroxi-ergost-4-en-3-ona → 22-hidroxi-5 $\alpha$ -ergostan-3-ona → 3-*epi*-6-deoxocatasterona/3-dehidro-6-deoxotestosterona → 6-deoxotifasterol → 6-deoxocatasterona → Catasterona → *Brassinolide* ((22R, 23R, 24S)-2a, 3a, 22, 23-tetrahidroxi-24-metil-B-homo-7-oxa-5a-colestan-6-ona) (Ohnishi et al., 2012). Ohnishi et al., proponen además en 2018, una ruta genérica de biosíntesis de *brassinolide* vía campestanol (CN).

### 1.2.2. Mutantes de la Ruta de biosíntesis de brasinoesteroides

Gracias al descubrimiento de mutantes en diferentes especies como *Arabidopsis*, arroz, guisante o tomate, (Fujioka y Yokota, 2003) ha sido posible la descripción y caracterización de cada uno de los pasos en la ruta de biosíntesis de fitoesteroles. Estos mutantes, que tienen lesiones en estas rutas biosintéticas, están divididos en dos grupos. Por un lado, se incluyen los mutantes que poseen dichas lesiones en los genes que regulan las fases más tardías. Estos mutantes se caracterizan por la generación de fenotipos no distinguibles entre sí y entre otros mutantes de la ruta biosintética de BR (Fujioka y Yokota, 2003), además de poseer de capacidad de rescatar el fenotipo WT tras la aplicación exógena con BR. Por otro lado, encontramos los mutantes deficientes en las fases más tempranas de la ruta. Estos poseen algunas características comunes de los mutantes deficientes en BR en estadio adulto, además de múltiples defectos durante la embriogénesis y el crecimiento que no pueden ser corregidos tras el tratamiento con BR (Fujioka y Yokota, 2003; Kwon y Choe, 2005).

Los mutantes específicos de la ruta de biosíntesis de BR suelen mostrar la reversión del fenotipo tras la aplicación con BR de forma exógena, y las peculiaridades morfológicas asociadas a este fenotipo como son hojas pequeñas, oscuras y redondas, pecíolos cortos y robustos, además de una baja fertilidad (Fujioka y Yokota, 2003). En *Arabidopsis*, algunos de estos mutantes han sido descritos:

- El mutante *sax1* (Ephritikhine et al., 1999), de hipersensibilidad a ABA y a auxinas, que posee lesiones en la oxidación e isomerización de los precursores (22S)-22-hidroxi-campesterol en la vía de oxidación C22 temprana (Figura 7).
- El mutante *dwf1* (Takahashi et al., 1995) previamente nombrado como *diminuto*, y sus demás formas alélicas *dim*, *cbb1*, *cro2*, intervienen en la isomerización y reducción del 24-metilen-colesterol (Figura 6, paso 12) inhibiendo la formación de campesterol (Choe et al., 1999a; Fujioka y Yokota, 2003).
- El mutante *dwf5* y sus seis alelos independientes (Choe et al., 2000; Fujioka y Yokota, 2003) provocan la pérdida de función en el gen *DWF5* que codifica para la reductasa- $\Delta^7$ , inhibiendo el paso del intermediario 5-dehidroepisterol a 24-metilen-colesterol (Figura 6, paso 11).
- La mutación *dwf7* (Choe et al., 1999b) imposibilita la síntesis del 5-dehidroepisterol a partir de episterol (Figura 6, paso 10) y los consiguientes compuestos debido a una falla en la reacción catalizada que provoca deficiencias en BR debido a la escasez de sustratos intermediarios para otras reacciones de biosíntesis.

- El mutante *det2* (Chory et al., 1991) es deficiente en una enzima 5 $\alpha$ -reductasa que cataliza la reducción de fitoesteroides intermediarios en dos rutas paralelas de biosíntesis de BR; por un lado, en la vía de oxidación C22 tardía, en la que cataliza el paso que da lugar a (24R)-5 $\alpha$ -ergostan-3-ona a partir de (24R)-ergost-4-en-3-ona, mientras que en la vía de oxidación C22 temprana cataliza en el paso de (22S,24R)-22-hidroxi-ergost-4-en-3-ona a (22S,24R)-22-hidroxi-5 $\alpha$ -ergostan-3-ona (Figura 7).
- El mutante *dwf4* (Azpiroz et al., 1998) y su alélico *cro3* (Serrano-Cartagena et al., 1999) generan una pérdida de función en el gen *DWF4* que codifica para una enzima citocromo P<sub>450</sub> monooxigenasa (Choe et al., 1998), cuya función 22 $\alpha$ -hidroxilasa está inhibida, provocando la acumulación de los sustratos que cataliza, es decir, todos aquellos intermediarios que intervienen en la vía de oxidación C22 tardía (Figura 7).
- Por último, el mutante *cpd* (Szekeres et al., 1996) y sus alélicos *cbb3* (Altmann et al., 1995; Kauschmann et al., 1996), y *dwf3*, los cuales muestran desetiología e inhibición de los genes inducidos por luz, además de la pérdida de función del gen *CPD* el cual codifica para un citocromo P<sub>450</sub> con función 23 $\alpha$ -hidroxilasa (Fujioka y Yokota, 2003).

Todos estos mutantes han sido identificados para las fases de biosíntesis de BR más tardías, lo que genera fenotipos muy similares entre sí y que se caracterizan por la capacidad de recuperar el fenotipo WT tras un tratamiento exógeno con BR o la aplicación de alguno de sus intermediarios deficientes. Sin embargo, también se han identificado mutantes en las fases más tempranas de la ruta de biosíntesis, como son *smt*, *fackel*, *hyd1*, y *smt2*, los cuales se caracterizan por no tener capacidad de respuesta tras el tratamiento con BR (Fujioka y Yokota, 2003).

### 1.2.3. Implicación de los brasinoesteroides en el desarrollo.

Los brasinoesteroides tienen una amplia variedad de funciones fisiológicas. Participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. En general, estas hormonas controlan la división, elongación y diferenciación en diferentes tipos celulares durante todo el desarrollo de la planta, controlando la arquitectura, diferenciación vascular, fertilidad masculina, floración, fotomorfogénesis o senescencia (Gudesblat y Russinova, 2011). Además, desempeñan un importante papel en la mediación de las respuestas a estreses abióticos como sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas y estrés por metales pesados, así como en la adaptación a los cambios ambientales (Li et al., 2021; Ahammed et al., 2020; Tang et al., 2016). Durante las últimas décadas, tanto estudios genéticos, como bioquímicos, se han focalizado en dilucidar los mecanismos de señalización de los BR, así como de los componentes que intervienen. Aunque los BR son las hormonas vegetales con mayor actividad promotora del crecimiento, los mecanismos mediante los cuales induce el crecimiento en los diferentes tejidos y órganos aún no están aclarados (Gudesblat y Russinova, 2011). Sin embargo, las rutas de biosíntesis y de señalización de BR estudiadas ampliamente en modelos vegetales han permitido mejorar de forma significativa el entendimiento de los mecanismos reguladores, sobre todo en aquellos procesos biológicos relacionados con el desarrollo y el crecimiento celular (Ahammed et al., 2020).

La señalización de los BR comienza a partir de la percepción mediada por unos receptores de membrana, a partir de la cual, se activan las cascadas de transducción de señales citosólicas mediadas por los BR, dirigiendo a la activación de la transcripción de los genes que controlan el crecimiento celular (Li et al., 2021), pudiendo, además, regular procesos fisiológicos mediante la interacción con otras hormonas (Divi y Krishna 2009; Li et al., 2021). Aunque la biosíntesis de BR ocurre en el retículo endoplasmático, su percepción tiene lugar en las membranas plasmáticas celulares. Una vez sintetizados, los BR son conducidos directamente al apoplasto, por el que se transportan a las células diana y se unen directamente a unos receptores de la membrana llamados *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1)*, y sus correspondientes homólogos (Nolan et al., 2020; Ahammed et al., 2020). Tras la recepción a través de estos receptores de membrana, se pone en marcha una cascada de señalización mediante la activación de los factores de transcripción de las familias *BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1)* y *BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1)* mediante los cuales se controla la expresión genética regulada por BR (Nolan et al., 2020).

Inicialmente caracterizados por su capacidad promotora del crecimiento desde su descubrimiento y caracterización en los años 70, los brasinoesteroides han sido estudiados por sus importantes implicaciones en el crecimiento vegetal. Desde un principio, este crecimiento se creía como una consecuencia de elongación celular promovida por BR, sin embargo, se ha determinado el papel que ejercen en múltiples aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, como es la división celular, fotomorfogénesis o la diferenciación vascular (Oh et al., 2020; Ahammed et al., 2020). No obstante, su principal función biológica es la expansión celular, mediante el crecimiento en las tres dimensiones; y elongación celular a través del crecimiento en una dirección para elongar células y órganos (Oh et al., 2020).

Diversos estudios documentan cómo los brasinoesteroides promueven la expansión celular a través de la regulación de la expresión de los genes implicados en las modificaciones de la pared celular, algunos de ellos dianas directas los factores de transcripción *BZR1* y *BES1*. Clouse (2011) sugiere que la elongación celular en mutantes deficientes en BR es promovida tras la sobreexpresión de la proteína DREPP (developmentally regulated plasma membrane polypeptide). El descubrimiento de esta proteína en un estudio de proteómica realizado en el año 2008, y su posterior caracterización genética, confirmaron la función de la proteína DREPP como diana directa del factor *BZR1*, indicando su papel como regulador positivo en la respuesta a BR. La similitud de la proteína DREPP con una proteína asociada al microtúbulo durante el crecimiento celular direccionado, sugería que la proteína DREPP podía intervenir en la reorganización de los microtúbulos, proceso que ya se relacionaba a la implicación de los BR (Mayumi y Shibaoka, 1995; citado por Clouse, 2011). Por otro lado, también se ha descubierto que el factor de transcripción *At4g39070 (B-BOX DOMAIN PROTEIN 20) (The Arabidopsis Information Resource, 2022. <https://www.arabidopsis.org/>)* queda reprimido por la unión de *BZR1* a su promotor, permitiendo la elongación del hipocótilo (Sun et al., 2010; citado por Clouse, 2011).

Para el crecimiento, además de la elongación y expansión celular, aumentar el número de células en un órgano o tejido es imprescindible. Los resultados obtenidos por Hu et al.

(2000) sugieren una posible promoción de la división celular mediada por BR. En este estudio se llevó a cabo el tratamiento con 24-epibrassinolide a un cultivo de células mutantes deficientes en BR *det2* de *Arabidopsis*, y mediante un ensayo cDNA *array* se determinó qué genes respondían al tratamiento, entre ellos el gen *CyD3* que codifica para una ciclina tipo D presente en altos niveles en tejidos proliferantes como es el meristemo apical, primordios foliares o en yemas axilares. La transcripción de este gen es inducido normalmente por citoquininas, sin embargo, los niveles de transcritos inducidos por BR resultaron similares, por lo que se sugería que tanto citoquininas como los brasinoesteroides podrían desempeñar un papel semejante induciendo la división celular.

Otros resultados obtenidos de la caracterización del mutante *dwf7* en *Arabidopsis* también sugieren actividad promotora de la división celular. El nivel de expresión en genes implicados en la división celular e inducción apical como son los genes *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN2* (*PCNA2*) y *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION2* (*ESR2*), era más bajo en los mutantes *dwf7* (Oh et al., 2020).

## 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

El objetivo principal en este trabajo es la caracterización de un mutante enano de *Cucurbita pepo*. Este mutante presenta potencial interés para la mejora genética en cucurbitáceas y valor desde el punto de vista de la genética funcional, para determinar el papel de los brasinoesteroides sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de esta especie.

Para ello se realizará la confirmación de la mutación causal en una población segregante para el carácter, y se realizará una evaluación de plantas mutantes y no mutantes desde el punto de vista del crecimiento vegetativo y del desarrollo sexual. en el estudio y evaluación de una línea mutante enana no caracterizada y con un potencial, en lo relativo al conocimiento de las rutas biosintéticas hormonales asociadas al crecimiento vegetal.

Los objetivos parciales a desarrollar en el contexto de este TFG son los siguientes:

- Estudiar la herencia del carácter en una población segregante  $BC_1S_1$  generada a partir de las plantas mutantes  $M_2$  por retrocruce con el fondo genético de la colección MUC-16 ( $BC_1$ ), y posterior autopolinización ( $BC_1S_1$ ).
- Constrastar una mutación EMS, sustitución de A>G, detectada por la técnica de genética directa *BSA-seq* (*Bulk sequencing analysis*) en una población segregante del mutante con más de 300 plantas.
- Caracterización del fenotipo de desarrollo vegetativo y sexual de las plantas mutantes y tipo salvaje.
- Evaluación del efecto del tratamiento con brasinoesteroides a distintas concentraciones sobre el crecimiento del mutante enano.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

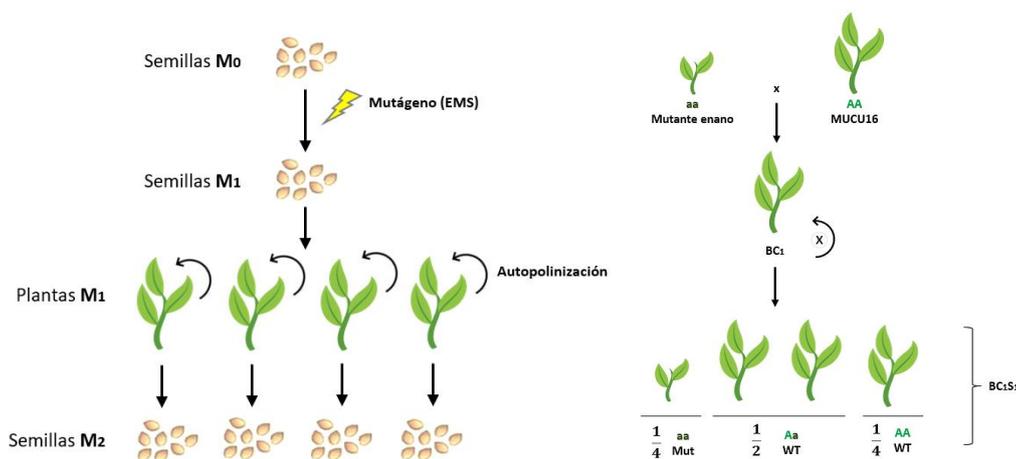
#### 3.1. Condiciones de cultivo

El ensayo realizado se llevó a cabo en el campo de investigación y experimentación Fundación Finca Experimental UAL-Anecoop, durante la campaña de cultivo de primavera de 2022, entre los meses de febrero y junio. Las semillas procedentes de una población  $BC_1S_1$  fueron germinadas y cultivadas en bandejas con vermiculita durante 14 días en semillero comercial. Tras este tiempo, y previa identificación genotípica, las plántulas fueron llevadas a invernadero o semillero.

Un total de 18 plantas mutantes ( $df/df$ ) y 18 plantas WT homocigotas ( $wt/wt$ ) fueron destinadas a un semillero para ser crecidas en maceteros de 5L y recibir el tratamiento con brasinoesteroides, mientras que 30 plantas mutantes ( $df/df$ ) y 30 plantas WT homocigotas ( $wt/wt$ ) se trasplantaron en suelo en el invernadero para su correspondiente caracterización fenotípica.

#### 3.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado en el trabajo ha sido desarrollado a partir de una colección de mutantes EMS de *C. pepo* perteneciente al grupo de investigación BIO293 de la Universidad de Almería (García et al., 2018). Esta colección incluye 3.751 familias  $M_2$ . De estas líneas EMS generadas, la línea mutante 2307 que fue detectada tras un fenotipado masivo en planta adulta. Este mutante, caracterizado por su enanismo, es el objeto de interés de este TFG. Para su estudio se generaron poblaciones segregantes  $BC_1S_1$ , generadas según se explica en la Figura 9, a partir de las plantas mutantes enanas detectadas en la  $M_2$  y el fondo genético de la colección MUCU16 (MUC-16), una variedad local de origen español (Murcia) procedente del Banco de Germoplasma del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universitat Politècnica de València.



**Figura 9.** Diagramas esquemáticos de la obtención de una línea  $M_2$  (izquierda) (modificada de Chen et al., 2018) y del programa de cruces para la obtención de una población segregante  $BC_1S_1$  (derecha).

Sobre la generación BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> se realizó la caracterización fenotípica y genotípica que constituye este TFG.

### 3.3. Toma de muestras y extracción de ADN

La recolección de material vegetal se realizó en plántulas en el estadio de planta joven, con 3 hojas verdaderas. Se tomaron pequeñas muestras de las hojas de 309 plantas de una población segregante BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> y se introdujeron en tubos *Eppendorf* de 2mL, los cuales se mantuvieron en hielo seco para su transporte y posterior almacenamiento a -80°C hasta el momento de su utilización. La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo a partir de una modificación adaptada del método SDS descrito a continuación. Este protocolo se basa en la utilización de tres reactivos clave: detergente SDS, fenol-cloromormo isoamílico e isopropanol, implicados en los pasos de lisis celular, extracción de los ácidos nucleicos y precipitación, respectivamente.

Se siguieron las siguientes indicaciones:

- Se depositan dos perlas de acero de 3 mm de diámetro en cada uno de los tubos de 2 mL conservados a -80°C C y se añade 500 µL de un buffer de extracción elaborado con SDS previamente calentado seguido de una homogeneización en homogeneizador *Bead Mill 24* (Fisherbrand™) durante 6 minutos. Este paso tiene por objetivo lograr una adecuada lisis celular.
- Al homogeneizado se aplica una breve agitación mediante vórtex y se incuba en termo-bloque a 65°C durante 20 minutos en agitación suave y constante.
- A continuación, se añaden 300 µL de fenol-cloroformo isoamílico (5:24:1) enfriado y se aplica vórtex para mezclar bien. El objetivo es precipitar restos celulares.
- Se centrifuga a 11.000 g (RFC) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, con cuidado se recoge la fase superior sin tocar la interfase y se transfiere a un nuevo tubo *Eppendorf* de 1,5 mL. Si la fase superior no existe o está muy sucia, recoger y repetir extracción con fenol-cloroformo.
- El sobrenadante recogido se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a temperatura ambiente a 11.000 g (RFC) para eliminar los restos de cloroformo. Posteriormente volver a recoger la fase superior y depositarla en otro tubo *Eppendorf* de 1,5 mL.
- Añadir a estos sobrenadantes 400 µL de isopropanol a -20°C, mezclar suavemente por inversión hasta visualizar hebras de ADN e incubar a -20 °C durante al menos 20 minutos. Pasado este tiempo se centrifuga a 11.000 g (RFC) durante 10 minutos. Durante este paso se pretende la precipitación del ADN.

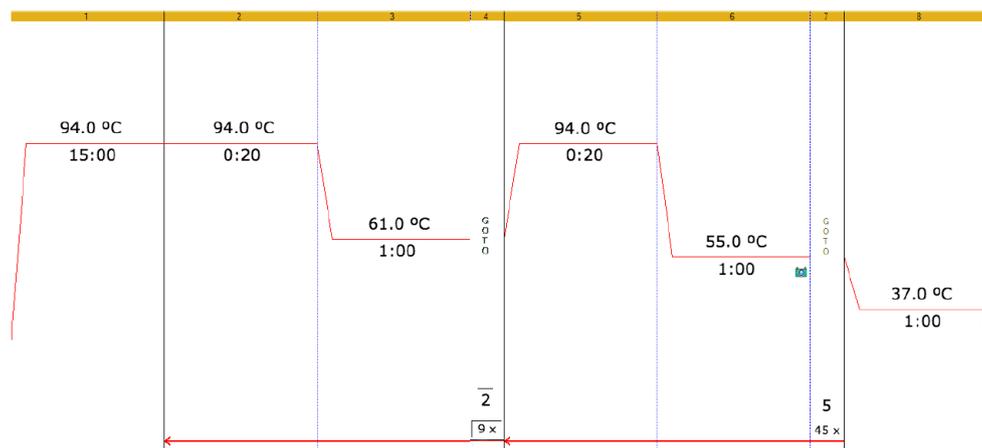
- El sobrenadante es descartado y se añaden 250  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% para lavar el pellet. A continuación, se aplica vortex hasta levantar el pellet y se vuelve a centrifugar durante 5 minutos a 11.000  $g$  (RFC).
- El sobrenadante vuelve a ser descartado y se deja secar el pellet hasta evaporar todo el etanol.
- El pellet se resuspende en 50  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q y se le añaden 0,33  $\mu\text{L}$  de RNAasa (proporción RNAasa: 0,2  $\mu\text{L}$  RNAasa / 30  $\mu\text{L}$  de volumen total). Se deja incubar en termo-bloque durante 2 minutos a 65°C. Por último, se deja incubar a temperatura ambiente hasta secar.

#### 3.4. Genotipado de la variante alélica detectada por BSA-seq

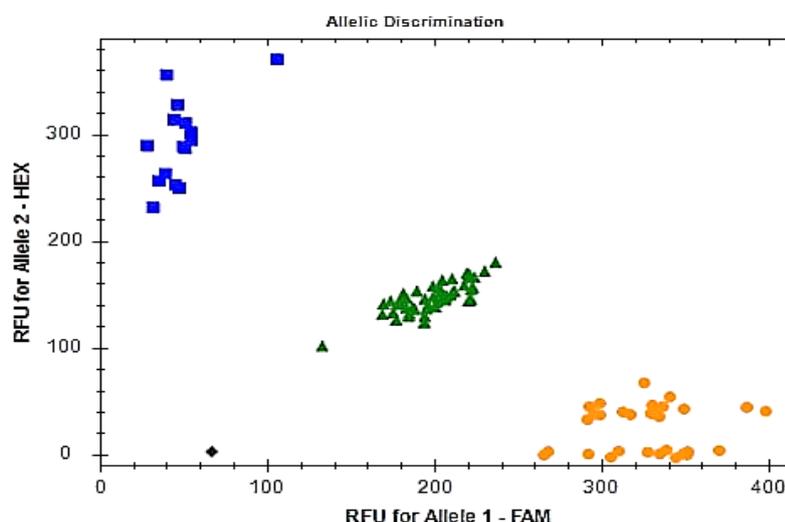
De forma previa a este ensayo, se llevó a cabo la secuenciación de plantas en grupo de la población segregante BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> separadas por fenotipo. La secuenciación por separado del denominado *bulk* WT (Tipo salvaje, por sus siglas en inglés) y el *bulk* mutante y la comparación de las frecuencias alélicas en ambos *bulk*, permitió detectar una variante alélica de interés para su caracterización. El diseño de cebadores KASP para la amplificación se realizó en un servicio externo.

El sistema KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*) de genotipado desarrollado por la compañía KBioscience (Mammadov et al., 2012) fue utilizado para la detección de polimorfismos en las muestras de ADN genómico de distintas plantas de una población segregante BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>. Este sistema, mediante una PCR competitiva alelo-específica, consigue una identificación bi-alélica de polimorfismos tipo SNPs en *loci* específicos. Se utilizan tres cebadores en total, dos de ellos específicos del alelo (en *forward*) y un cebador correspondiente a una región común (en *reverse*). Se utiliza además una sonda marcada con dos tipos de fluorocromos y que se unen a los extremos 5' de los cebadores. Una vez que los cebadores estén unidos a sus secuencias específicas, el *quencher* (atenuador) unido al fluorocromo se escinde de este permitiendo la emisión de fluorescencia.

Un total de 309 plántulas BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> en estadio de plántula fueron seleccionadas para el análisis genotípico. Las condiciones para la reacción de amplificación quedan especificadas en la figura 10. A cada uno de estos 309 individuos analizados se le ha sido otorgado un genotipo en función de la variante alélica que presentaba, el cual dependía de la fluorescencia que mostraba (Figura 11). Si durante la PCR-KASP llevada a cabo para el genotipado se generaba únicamente señal fluorescente asociado al alelo de la mutación (HEX), dicho individuo quedaría genotipado como mutante homocigoto (*df/df*). Si la señal generada procedía únicamente del fluorocromo asociado al alelo salvaje (FAM), en este caso el individuo sería clasificado como homocigoto salvaje (*wt/wt*). Finalmente, si se detectaban ambas señales esto indicaba que el individuo poseía ambos alelos, y por tanto se clasificaría como heterocigoto (*wt/df*).



**Figura 10.** Programa de amplificación utilizado en la reacción PCR-KASP.



**Figura 11.** Discriminación alélica de la presencia de la mutación a partir del marcador seleccionado mediante genotipado KASP en una población  $BC_1S_1$ . Cada planta se agrupa en función de su genotipo como *wt/wt* (amarillo), *wt/df* (verde) y *df/df* (azul). Los puntos negros corresponden a la señal producida por un control negativo (NTP).

### 3.5. Caracterización fenotípica de plantas mutantes y no mutantes

#### 3.5.1. Caracterización del crecimiento vegetativo y del desarrollo sexual

Plantas mutantes y no mutantes de la población segregante fueron caracterizadas en cuanto a su morfología en estadio de plántula, y en cuanto al crecimiento de flores masculinas y femeninas en estadio de planta adulta. Por genotipo, un total de 10 hojas jóvenes de tamaño menor de 3 cm, así como un total de 14 flores femeninas y otras 14 masculinas, ambas de tamaño menor de 1 cm, se tomaron como partida para realizar una caracterización del crecimiento de órganos vegetativos y reproductivos. La toma de medidas se llevó a cabo utilizando un calibre y una regla milimetrada.

Se estableció la primera medida como tiempo  $T_0$  y se procedió al seguimiento del experimento cada dos días hasta antesis para las flores, y hasta llegar a  $T_{10}$  en el caso de las hojas. Además, se realizó

una caracterización del desarrollo vegetativo en plantas de 4 semanas de edad sobre 10 plantas de cada genotipo: 10 (*df/df*), 10 (*wt/df*) y 10 (*wt/wt*). Estas plantas fueron analizadas para el número de hojas, el peso fresco de la parte radicular y su correspondiente peso seco, el peso fresco de la parte vegetativa y su correspondiente peso seco, altura de la planta y longitud de la parte radicular.

### 3.5.2 Tratamiento con Brasinoesteroides

Anteriores estudios realizados en *Cucurbita pepo* llevaron a cabo la administración exógena de 24-epibrassinolide (EBR) a una concentración de 0,2  $\mu\text{M}$  (Tao et al, 2015). Tomando como referencia dicho valor, se decidió utilizar para los diferentes tratamientos de 0,2, y 2  $\mu\text{M}$ , además del control a concentración 0  $\mu\text{M}$ . La disolución stock se preparó disolviendo la cantidad de 2mg de EBR en polvo en 150  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% y se mantuvo conservada en frío a 4°C. Para los tratamientos control se utilizó una disolución de agua.

Un total de 18 plantas seleccionadas de cada genotipo para este ensayo se distribuyeron tres grupos de tratamiento (6 plantas por tratamiento), cada uno correspondiente a cada una de las concentraciones aplicadas (0, 0,2 y 2  $\mu\text{M}$ ). La aplicación de EBR se realizó de forma exógena mediante pulverización en el meristemo apical de la planta, hasta dejarlo completamente húmedo. El tratamiento se repitió diariamente durante siete días. En el momento inicial, se seleccionó una hoja de cada planta con un tamaño de limbo de aproximadamente 2,5 a 3 cm y tras los días de tratamiento se llevó a cabo la medida de la longitud del limbo y la longitud del pecíolo para la posterior evaluación de los cambios producidos.

### 3.6. Análisis estadístico

Para realizar las comparaciones estadísticas entre genotipos y tratamientos se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurión. En primer lugar, se estudiaron la normalidad (prueba de Kolmogorov o Shapiro-Wilk) y la homocedasticidad de los datos. 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 y/o simples, 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.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características generales de la Línea 2307

La línea 2307 es una línea mutante identificada durante un fenotipado masivo de la colección de mutantes EMS de *C. pepo* (García et al., 2018). Tras el fenotipado de la colección realizado en estadio de planta adulta, se identificaron varias líneas que poseían fenotipo alterado, entre las cuales se encontraba la línea 2307, singularizada por mostrar un fenotipo enano con menor crecimiento tanto a nivel vegetativo como reproductivo. En la figura 12 se muestra el fenotipo observado en campo. Las plantas mutantes se caracterizan por presentar poco volumen de planta y limitado desarrollo (Figura 12b) en comparación con las plantas WT (Figura 12a). Además, las flores que produce el mutante son de menor tamaño que las que produce el WT (Figura 12c). Por esta razón se denominó al mutante, como mutante enano (*dwarf*, genotipo *df/df*).



**Figura 12.** Comparación planta WT y planta mutante. (a): Planta WT; (b): planta mutante; (c): Flor mutante (izquierda) y flor WT (derecha).

### 4.2. Análisis de la población segregante $BC_1S_1$

#### 4.2.1. Estudio del modo de herencia

Con el objetivo de buscar la mutación causal del fenotipo observado en la línea 2307, una población segregante  $BC_1S_1$  fue analizada.

Se procedió a comprobar la segregación del fenotipo *df* en esta población. Tras estudiar la segregación de plantas de fenotipo salvaje y mutantes, se observó que 75 plantas eran mutantes enanas (*df*) y 234 presentaban fenotipo salvaje (*wt*). Mediante un análisis estadístico Chi cuadrado,  $\chi^2$  (nivel de confianza del 95%), se comprobó que el fenotipo enano es causado por un único gen, cuyos alelos recesivos en homocigosis (*df/df*) causan el fenotipo mutante ( $\chi^2=0,3981$ ) (tabla 1).

**Tabla 1.** Prueba estadística Chi cuadrado. Análisis de segregación.

Segregación	Fenotipo <i>wt</i>	Fenotipo <i>df</i>	total	$\chi^2$
Observados	234	75	309	0,3981
Esperados (1:2:1)	231,75	77,25	309	
<i>Para un nivel de confianza del 95% (<math>\alpha=0,05</math>) y 1 grado de libertad: <math>\chi^2 = 3,8415</math>.</i>				

#### 4.2.2. Detección de la mutación y diseño de marcadores

Sobre esta población segregante, por medio de una estrategia de *BSA-seq* se determinaron mutaciones candidatas al control del carácter. De la población BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> se seleccionaron 20 plantas en grupo con fenotipo y 20 sin fenotipo mutante, se agruparon en dos *bulks* independientes, cuyo ADN se re-secuenció llevando a cabo una secuenciación completa del genoma (*Whole genome sequencing*). Posteriormente, estas secuencias se mapearon contra la versión 4.1 el genoma de referencia de la especie (Montero-Pau et al., 2018). Finalmente, se llevó a cabo un filtrado de los resultados para el análisis de las frecuencias alélicas (AF) para el alelo alternativo al del genoma de referencia en ambos *bulks*, estableciendo un valor de AF =1 para el *bulk* mutante y un valor de AF ≤0,3 para el *bulk* WT. Entre las variantes detectadas que cumplían con las características de filtrado establecidas se detectó una variante canónica EMS candidata a ser la mutación causal. Esta variante es una sustitución de guanina (G) por adenina (A) en la posición 3.048.864 del grupo de ligamiento 17 (LG17) del genoma v4.1 (Montero-Pau et al., 2018). Su análisis sobre el genoma de referencia empleando las herramientas disponibles en *Cucurbit Genomics Database* (Cucurbit Genomics Database (CuGenDB), 2022. <http://cucurbitgenomics.org/news>) se pudo establecer que la variante se sitúa en el extremo 3' del sexto intrón del gen *Cp4.1LG17g04540*. Este gen, implicado en la ruta biosintética de los brasinoesteroides, codifica para la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa y consta de un total de 13 exones y 12 intrones (figura 13). Finalmente, a partir de esta variante se seleccionó el marcador en la posición genómica de interés y, una vez realizada la selección, se procedió al diseño de los cebadores que se emplearon para el genotipado de la población segregante BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, el cual fue denominado como SNP1.



**Figura 13.** Posición de la sustitución G>A del gen alterado por la mutación. El asterisco sitúa la posición de la mutación en el extremo 3' del intrón 6.

#### 4.2.3. Análisis genotípico

Con el objetivo de establecer si esta variante era responsable del fenotipo observado, se realizó una caracterización genotípica sobre la misma población (BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>). A través de los servicios de

una empresa externa se diseñaron los cebadores para la identificación de la mutación asociada al fenotipo enano. Se seleccionó una población de 309 plantas procedentes de una generación BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> y se testó el marcador en una reacción de PCR alelo-competitiva tipo KASP. Los resultados obtenidos mostraban cómo el marcador (SNP1) asociado a la variante que afecta al gen *Cp4.1LG17g04540*, implicado en la biosíntesis de los brasinoesteroides, discriminaba correctamente entre los individuos de la población segregante y cosegregaba con el fenotipo mutante en la población BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> estudiada (tablas 2 y 3).

**Tabla 2.** Resumen del genotipado para el marcador. Tabla de resultados.

Fenotipo	Genotipo SNP1 (A:G)	Recuento
Enano	A:A	75
Wt	A:G	152
Wt	G:G	82
Total	-	309

**Tabla 3.** Prueba estadística Chi cuadrado. Comprobación del marcador.

Genotipo	wt/wt	wt/df	df/df	Total	$\chi^2$
Observados	82	152	75	309	0,3981
Esperados (1:2:1)	77,25	154,5	77,25	309	

Para un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0,05$ ) y 1 grado de libertad:  $\chi^2 = 3,8415$ .

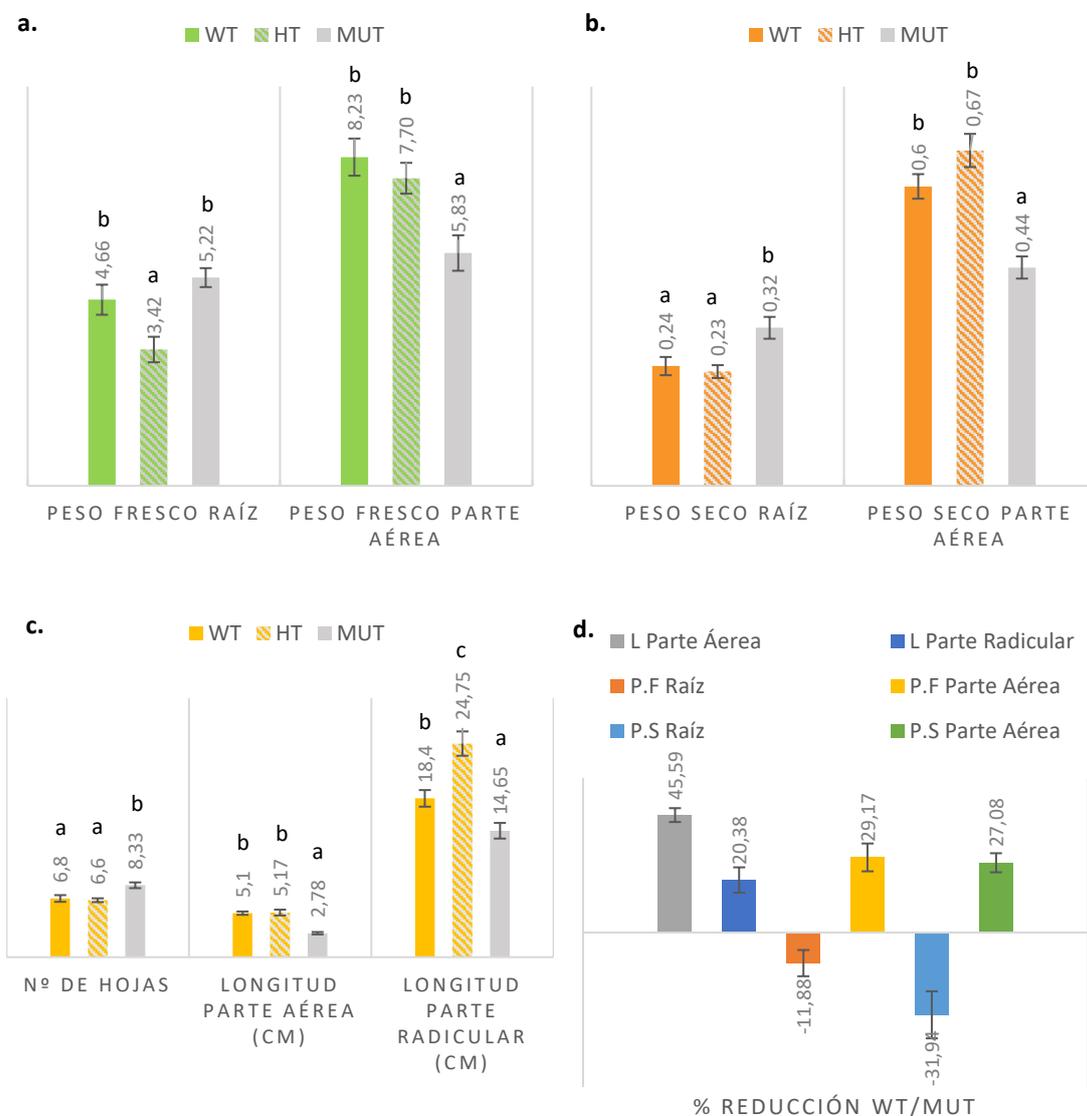
Derivado de estos resultados, se concluyó que la mutación responsable del fenotipo es una sustitución G>A en el gen de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (*Cp4.1LG17g04540*). En base a los resultados ya observados en el mutante *lox3a* (Cebrián, 2022), perteneciente a la misma colección de mutantes, cuya mutación situada en el sitio de *splicing* del sexto intrón del gen causa un cambio en el patrón del procesamiento de los intrones resultando en la generación de un codón stop prematuro en el gen de biosíntesis de los jasmonatos, es posible que, el efecto asociado a la variante detectada en el gen *Cp4.1LG17g04540* podría también consistir en la alteración del sitio de *splicing* dando lugar a cambios en el transcrito y afectando la actividad de la enzima. No obstante, ese trabajo no se ha sido desarrollado en el marco de este TFG.

### 4.3. Caracterización fenotípica

#### 4.3.1. Análisis morfológico

Determinada la mutación causal del fenotipo se procedió a su caracterización fenotípica, para lo que se seleccionaron plantas de genotipo *wt/wt*, *wt/df* y *df/df*. El análisis morfológico se realizó en plantas de cuatro semanas de edad. Se seleccionaron 10 plantas de genotipo homocigoto salvaje (*wt/wt*), 10 heterocigotas (*wt/df*) y 10 mutantes (*df/df*) en función de los resultados de genotipado que se obtuvieron anteriormente. Estas plantas fueron analizadas para el número de hojas, altura de

la planta, longitud de la parte radicular y para el peso fresco y su correspondiente peso seco de las partes radicular y vegetativa.



**Figura 14.** Parámetros del crecimiento vegetativo analizados (a): Variación del peso fresco de la raíz y la parte aérea entre los genotipos. Expresado en gramos. (b): Variación del peso seco de la raíz y la parte aérea entre genotipos. Expresado en gramos. (c): Número de hojas, y longitud de las partes aérea y radicular. (d): Representación gráfica de la reducción de cada uno de los parámetros en el mutante (*df/df*) respecto del tipo salvaje (*wt/wt*). Distintos superíndices suponen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

A primera vista, la diferencia entre la planta tipo salvaje y el mutante es muy clara, ya que las variaciones en longitud y tamaño de los órganos se observan a nivel visual. En la figura 14 se representan los resultados de análisis estadístico para parámetros del crecimiento vegetativo. Visualizando los datos de peso fresco (Figura 14a), se ve que el peso fresco radicular es menor en el heterocigoto, mientras que el peso fresco de la parte aérea es menor en el mutante. En cuanto al peso

seco, existen diferencias entre las plantas de fenotipo salvaje y el mutante, tanto en la raíz como en la parte aérea. La mutación resulta en un incremento del peso seco de la raíz y un menor peso seco de la parte aérea (Figura 14b). En la figura 14c se presentan los resultados relativos al número de hojas y longitud de la parte aérea y la parte radicular. Mientras se detecta que el número de hojas es mayor en el mutante y la longitud de la parte aérea es menor, es en el heterocigoto donde la raíz alcanza mayor tamaño (Figura 14c).

Como consecuencia de estas diferencias, se observa una reducción respecto al tipo salvaje (*wt/wt*) de hasta un 45,6% y 20,4% en las longitudes medidas respectivamente (figura 14d). Esta disminución también se ve reflejada de forma significativa en el peso de la parte aérea (figuras 14a y 14d); se puede ver que en fresco existe una reducción en torno al 19,2% y de un 27,1% en seco (figura 14d), mientras que el peso de la raíz (fresco y seco) se incrementa con respecto al tipo salvaje.

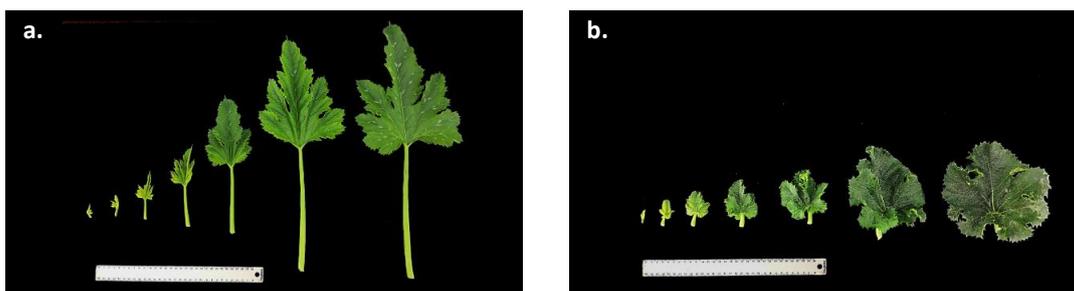
#### 4.3.2. Crecimiento de órganos vegetales

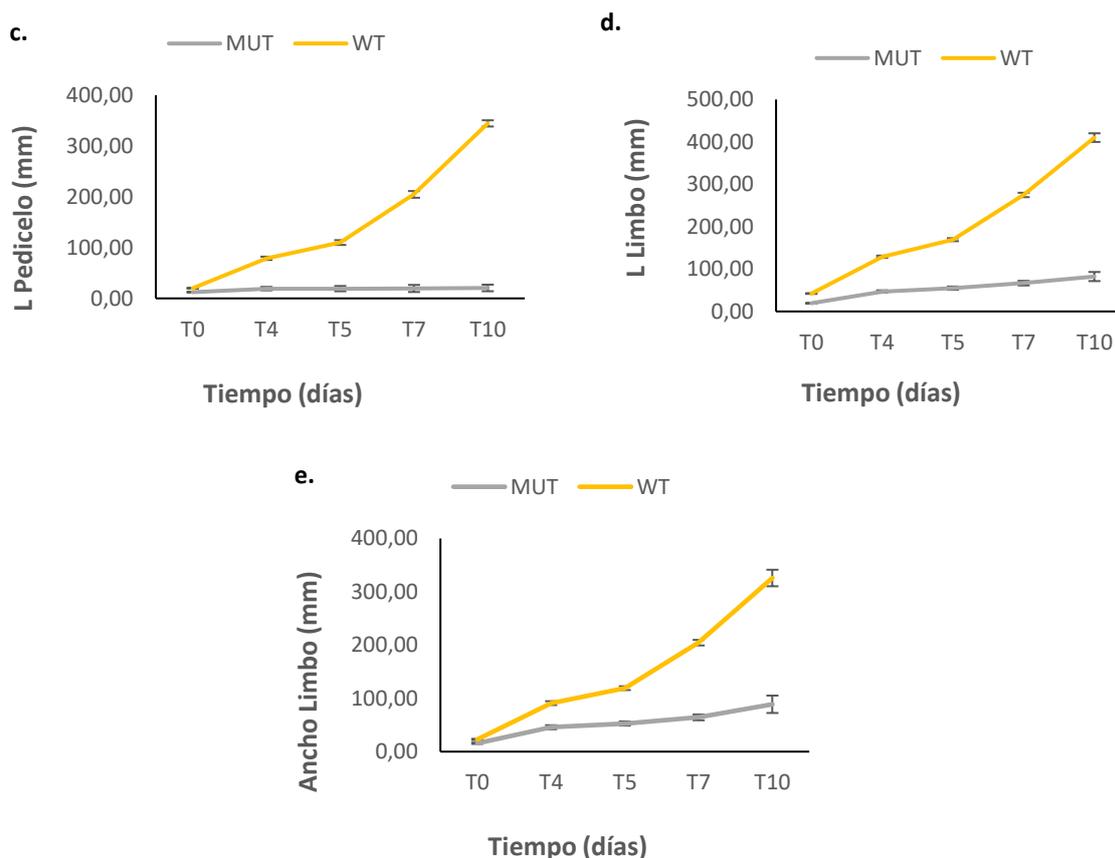
Para comparar cómo evolucionan los órganos vegetales se llevó a cabo el seguimiento cada dos días del crecimiento de hojas jóvenes y de flores tanto masculinas como femeninas hasta el momento de anthesis en plantas mutantes y tipo salvaje.

##### Crecimiento de hojas

En la figura 15 se representa el efecto de la mutación sobre el desarrollo foliar, estudiando el crecimiento del pedicelo, y del ancho y largo del limbo de la hoja en 10 hojas de genotipo mutante (*df/df*) y en otras 10 hojas de genotipo salvaje (*wt/wt*), cuyo tamaño de partida en  $T_0$  fue de 3 cm en ambos casos. Las hojas en el mutante tienen una forma más redondeada, esto es, alcanzan una anchura de 88,89 mm, similar al valor que alcanza la longitud del limbo de 82,33 mm a tiempo  $T_{10}$ , mientras que para el WT no se mantiene dicha relación.

El crecimiento del limbo de la hoja en el WT se acelera a partir de  $T_5$ , pasando de 116,10 mm de longitud a 327,70 mm de longitud en  $T_{10}$ , al igual que ocurre con la anchura que pasa de 67,70 mm de anchura a  $T_5$ , a medir 231,11 mm a  $T_{10}$  (Figuras 15d, 15e). En cuanto a la longitud del pedicelo, el WT comienza el desarrollo de la hoja de forma lineal ( $T_0$  a  $T_5$ ) y posteriormente se acelera el crecimiento ( $T_5$  a  $T_{10}$ ). La tasa de crecimiento del pedicelo en la hoja mutante es bastante más baja y mientras que en el WT se alcanza los 324,00 mm a  $T_{10}$ , en el mutante no supera los 26 mm a (Figura 15c y ).





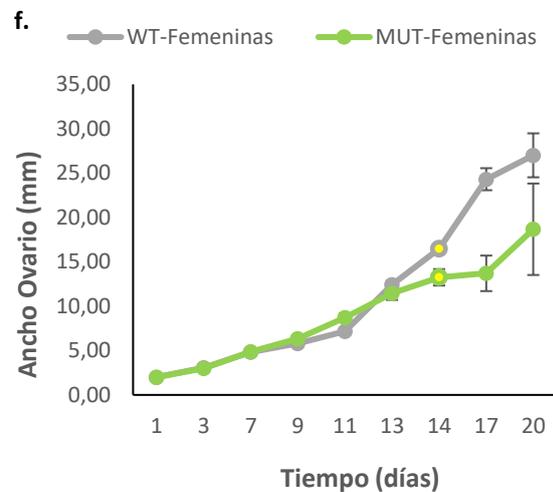
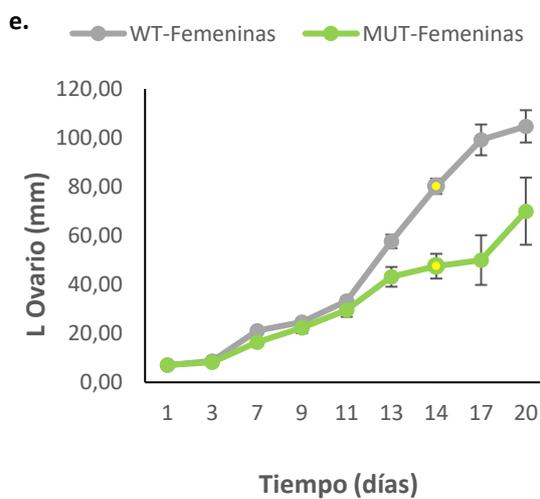
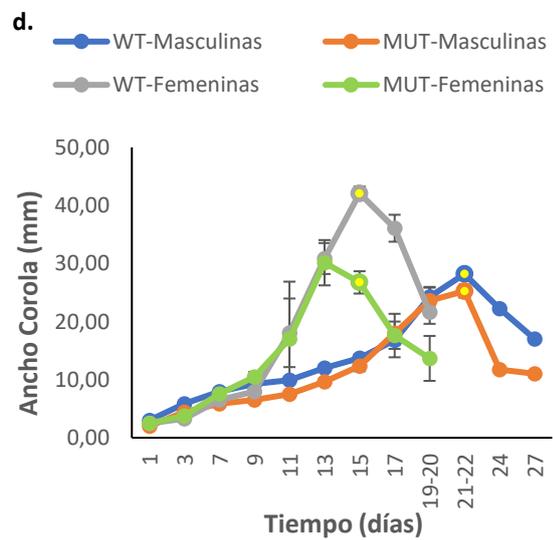
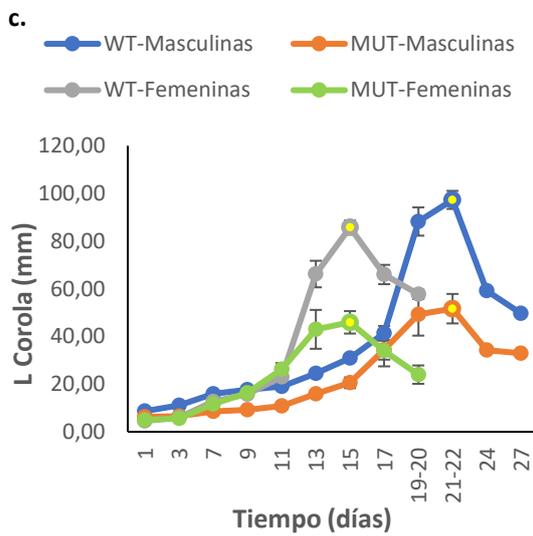
**Figura 15.** Crecimiento de la hoja en el mutante *df* y el tipo salvaje. (a): Hojas de tipo salvaje (*wt/wt*). (b): Hojas de tipo mutante (*df/df*). (c): Longitud de pedicelo. Expresado en centímetros. (d): Longitud de limbo. Expresado en centímetros. (e): Anchura de limbo Expresado en centímetros.

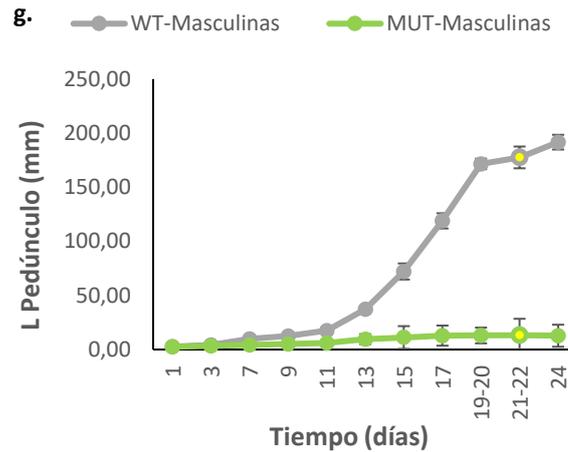
### Crecimiento de flores

Un total de 14 flores femeninas y 14 flores masculinas fueron seleccionadas para el seguimiento de su crecimiento en las plantas de genotipo *wt/wt*, y otras tantas se seleccionaron para plantas de genotipo *df/df*. Sin embargo, solo fue posible seguir el crecimiento de 6 flores femeninas y 7 masculinas en la línea mutante, debido a la alta propensión de aborto floral que presentaba. En ellas se midió la anchura y longitud de la corola, así como el tamaño del ovario en las femeninas y del pedúnculo en las masculinas.

Las medidas de las flores quedan representadas en la figura 16. Como se observa se produce un incremento progresivo del tamaño floral, tanto en las flores del mutante como en las flores de las plantas tipo salvaje. De forma general, se puede observar cómo ambos genotipos siguen una tendencia similar, aumentando el tamaño de las flores hasta un máximo (figura 16). Este punto coincide con el momento de anthesis o apertura floral, a partir del cual la corola se cierra y muere. A medidas más tempranas, tanto el tipo salvaje como el mutante parecen seguir el mismo ritmo hasta un instante a partir del cual el tipo salvaje dispara el crecimiento de la flor, lo cual se puede ver reflejado en el tamaño de la corola principalmente (Figura 16c y d). De esta forma, aunque ambos genotipos parecen

llegar simultáneamente a antesis, la línea mutante detuvo el crecimiento de la flor de forma anticipada, generando así flores de tamaño significativamente más pequeñas que las flores control (Figura 12).



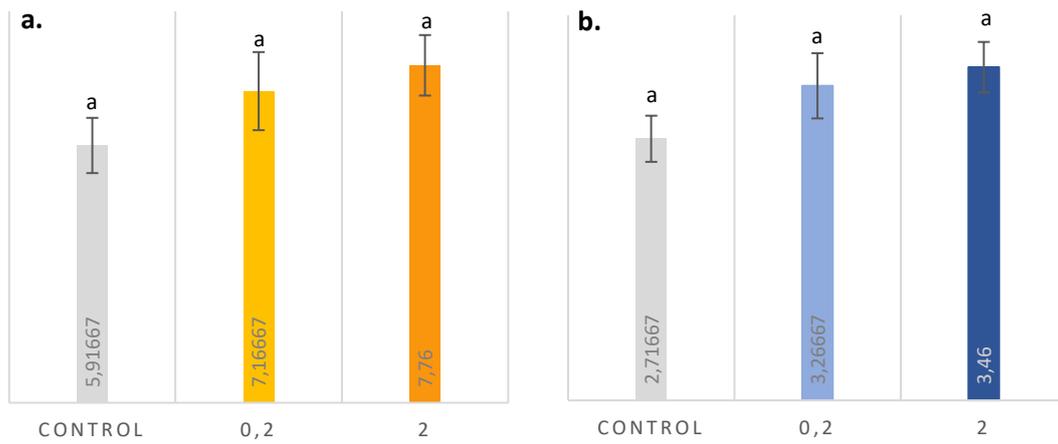


**Figura 16.** Efecto de mutación de en la tasa de crecimiento de flores en el mutante *df*. (c): Longitud de la corola. Expresada en milímetros. (d): Anchura de la corola. Expresada en milímetros. (e): Longitud de ovario. Expresada en milímetros. (f): Anchura de ovario. Expresada en milímetros. (g): Longitud de pedúnculo en flores masculinas. Expresada en milímetros.

Estos resultados también se ven reflejados en el tamaño del ovario en flores femeninas. Observando las figuras 16a y b vemos cómo el ovario en las mutantes crece notablemente menos y de una forma más lenta y progresiva en comparación con el ovario de las tipo salvaje. En flores masculinas, el efecto mutante es enormemente apreciable, ya que el tamaño del pedúnculo apenas cambia desde las primeras medidas (Figura 16c).

#### 4.3.3. Tratamiento con brasinoesteroides

Mediante este ensayo se evaluó el efecto de la aplicación exógena de brasinoesteroides en el crecimiento de plantas mutantes (*df/df*). Se aplicaron dos concentraciones 0,2 y 2  $\mu\text{M}$ , además de un control 0  $\mu\text{M}$ . Para evaluar el impacto de los brasinoesteroides se marcaron hojas de tamaño entre 2,5 y 3 cm en las distintas plantas. Tras siete días de tratamiento, las hojas seleccionadas fueron medidas para la longitud del limbo y la longitud del pecíolo. En la figura 17 se puede apreciar que, aunque los tratamientos no consiguieron el efecto de incrementar el tamaño del limbo o el pecíolo de la hoja de forma significativa, ambos tratamientos resultan en un incremento del valor medio, con respecto al control, pero sin ser significativo. Además, entre ambos tratamientos tampoco resultan diferencias muy relevantes. En otras especies se ha descrito que el efecto de la aplicación exógena de brasinoesteroides en mutantes deficientes es muy sutil y no se observan grandes cambios (Zhang et al., 2021). Por lo que, a pesar de no observar cambios significativos, es claro el efecto sobre el incremento de tamaño de la hoja. Puesto que el estudio fue realizado sobre planta con 10 o más hojas de desarrollo será necesario contrastar los resultados en planta joven y con otras dosis de tratamiento.



**Figura 17.** Parámetros de crecimiento evaluados en el mutante (*df/df*) tras el tratamiento con brasinoesteroides a concentraciones de 0,2 y 2 mM. (a): Longitud del limbo. Expresada en milímetros. (b): Longitud del pedicelo. Iguales superíndices no suponen cambios significativos (P valor  $\geq$  0,05).

## 5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización y evaluación de la mutación responsable del fenotipo enano en la línea mutante de *Cucurbita pepo*. Esta línea fue detectada en la colección de mutantes desarrollada para la mejora del calabacín (García et al., 2018). La mutación, denominada en este trabajo como *df*, consiste en un cambio puntual de una guanina (G) por una adenina (A) en el gen de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa, implicado en la ruta de biosíntesis de brasinoesteroides. Esta variación origina en las plantas mutantes alteraciones que afectan al crecimiento vegetativo, dando lugar a una planta enana y muy compacta, tanto a nivel vegetativo como nivel reproductivo.

En lo referente al mutante *df* objeto de estudio, otros mutantes de la ruta biosintética de los brasinoesteroides también han sido ya identificados y caracterizados en otras especies, como es en tomate o arroz (Wang et al., 2017a). El primer mutante de deficiencia en brasinoesteroides en tomate se denominó *extreme dwarf (dx)* debido al fenotipo enano severo que mostraba al ser una mutación de falta de función (Bishop et al., 1996). También en *Arabidopsis*, donde se han encontrado varios mutantes deficientes en la ruta de biosíntesis de brasinoesteroides (Asami y Yoshida, 1999) como son *dwarf1* (Choe et al., 1999a), *cbb3* (Kauschmann et al., 1996), *dwarf4* (Choe et al., 1998) o *dwarf7* (Choe et al., 1999b) entre otros. Sin embargo, en cucurbitáceas muy pocos mutantes de este tipo han sido encontrados hasta el momento, pero entre los que se encuentran los mutantes enanos *scp-1* y *scp-2* (Wang et al., 2017a; Hou et al., 2017) o *cpa* (Zhang et al., 2021) caracterizados de forma reciente en pepino (*Cucumis sativus*). Todos estos datos sugieren que el mutante enano detectado en calabacín está afectado en la ruta de biosíntesis de los brasinoesteroides.

El estudio de la segregación del carácter en una población BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, indicó que se trata de un carácter controlado por un solo gen recesivo, sólo las plantas de genotipo *df/df* muestran fenotipo enano. Otros mutantes de la ruta de biosíntesis de brasinoesteroides en *Arabidopsis*, como son los mutantes *dwf4* (Azpiroz et al., 1998 ; Choe et al., 1998) y *dwf7-1* (Choe et al., 1999b; Cheon et al., 2010) y el mutante *scp-1* de pepino también están controlado por un solo gen recesivo (Wang et al., 2017a). Dentro de la colección de *C. pepo* (García et al., 2018) se ha identificado diversos modos de herencia para las mutaciones detectadas. Entre ellos, se ha podido identificar como recesivo el mutante *aco1a*, implicado en la biosíntesis del etileno y responsable del desarrollo de frutos partenocárpicos (Cebrián et al., 2021), y el mutante *lox3a*, implicado en la ruta de biosíntesis de jasmonatos (Cebrián, 2022). De carácter dominante se ha detectado la mutación *etr1a-1* de insensibilidad a etileno (García et al., 2020a), mientras que los mutantes *etr1a*, *etr2b* y *etr1b* también de insensibilidad a etileno, han sido reconocidos como semi-dominantes (García et al., 2020a,b).

Por otro lado, los resultados de cosegregación entre la mutación detectada por *BSA-seq* y 309 plantas genotipadas, apoyan que la mutación causante del fenotipo es la presentada en este TFG. Aunque la mutación no causa una sustitución aminoacídica de impacto, la localización de la variante en el extremo 3' del sexto intrón del gen, indica que podría estar afectado respecto al procesamiento de los intrones. En este sentido, y en esta misma colección de mutantes, ya se ha detectado otro mutante con cambios en el sitio de *splicing*. El mutante *lox3a* (Cebrián, 2022), presenta una mutación

en el extremo 5' del exón 6 de el gen *LIPOXIGENASA3A* (*Cp4.1LG12g09270.1*) de biosíntesis de ácido jasmónico. La mutación causa un acortamiento del transcrito que da lugar a una proteína con un codón stop prematuro (Cebrián, 2022).

Los ensayos realizados en la segunda parte de este TFG se focalizaron principalmente en la caracterización fenotípica de la población segregante del mutante enano. Se trata de un mutante que presenta una arquitectura de planta pequeña y robusta. Posee flores y pecíolos de tamaño reducido y engrosado, además de hojas pequeñas redondeadas y oscuras que presentan un pedicelo muy acortado y grueso en proporción al tamaño total de la hoja. Las flores que genera se caracterizan por ser pequeñas y escasas, con ovarios y corolas acortados en el caso de las flores femeninas, y con pedúnculos reducidos en las masculinas. En general, no se producen en gran cantidad, sin embargo, el número de flores correctamente desarrolladas es destacablemente mayor en las masculinas que en las femeninas, y además, se caracteriza por presentar flores con una tasa abortiva muy elevada (datos no presentados). En este sentido, tratamientos realizados sobre esta especie con el bloqueador de la biosíntesis de brasinosteroides, *brassinazole*, indican que los brasinoesteroides podrían regular la inducción de la fase femenina en *C. pepo*, aunque su efecto sería menor que el de etileno (Manzano et al., 2011). En pepino la aplicación del *epibrassinolide* promueve una floración femenina más temprana y mayor (Papadopoulou y Grumet, 2005).

Además, se ha evaluado el desarrollo vegetativo de las plantas. La mutación produce alteraciones en el peso fresco (de forma no significativa) y seco de la raíz, mayor en el genotipo *df/df*, que en los genotipos *wt/wt* y *wt/df*, aunque en tamaño, la raíz de los mutantes resulta ser la menor de estos tres. Respecto a la parte aérea, tanto en fresco como en seco, el mutante presentaba el menor de los pesos entre los tres genotipos, aunque aumenta el número de hojas. Estas características, así como el menor crecimiento de las hojas son características observadas en otros mutantes de brasinoesteroides previamente caracterizados en *Arabidopsis* (Azpiroz et al., 1998; Choe et al., 1999a; Choe et al., 2000). Asimismo, el tamaño de los órganos florales es menor con respecto al fenotipo salvaje. Respecto al crecimiento de las flores, al inicio del desarrollo, las flores de ambos fenotipos crecen al mismo ritmo, sólo al final del desarrollo de las flores de tipo salvaje se observa una aceleración del crecimiento en estas, pero no en el mutante. Por esto, las flores del mutante alcanzan antes a mayor tamaño. Todos estos aspectos, tanto de morfología foliar y floral, también se mantienen en mutantes *cpa*, *scp-1* y *scp-2* de pepino (Zhang et al., 2021; Wang et al., 2017a; Hou et al., 2017), que mostraban hipocótilos más cortos, hojas más oscuras y reducidas con pecíolos acortados, y una producción normal de flores masculinas a excepción de su tamaño enano.

Por último, con el objeto de comprobar si el tratamiento con brasinosteroides podía recuperar el fenotipo, se realizaron aplicaciones con la forma activa de BR, *24-epibrassinolide* (EBR) a dos concentraciones. Dado que no se conocen numerosos antecedentes de trabajos de este tipo, el estudio llevado a cabo en *C. pepo* por Tao et al. en 2015, por el que se evaluó la susceptibilidad del morfotipo *Zucchini* ante el virus CMV (cucumber mosaic virus) tras la aplicación exógena de EBR a una concentración efectiva de 0,2  $\mu$ M, fue tomado como referencia para la preparación de las diferentes concentraciones a realizar. Se optó por realizar un tratamiento a esta concentración (0,2  $\mu$ M) y diez

veces mayor ( $2 \mu\text{M}$ ). Además, estas mismas concentraciones fueron las empleadas para estudiar el efecto de la aplicación exógena de brasinosteroides en un mutante de pepino cuya mutación también se localiza sobre la 7-dehidrocolesterol reductasa (Zhang et al., 2021). De este modo, seis plantas del genotipo *df/df* para cada tratamiento y el control se trataron diariamente y se evaluaron al finalizar. Aunque los resultados no arrojaron cambios significativos en el crecimiento de las hojas, sí se observó cierto incremento en el tamaño. Estos resultados son similares a otros obtenidos sobre mutantes de brasinoesteroides, en los que la aplicación exógena causa una recuperación parcial del fenotipo salvaje, tal y como ocurría en los mutantes de *Arabidopsis* anteriormente mencionados (Azpiroz et al., 1998; Choe et al., 1998; Choe et al., 1999a; Choe et al., 1999b; Cheon et al., 2010)

La mutación *df* de la línea 2307 es caracterizada por una alteración provocada por una transición de una guanina (G) por una adenina (A) en el gen que codifica para la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa, tal y como ocurre en el mutante *dwf5* de *Arabidopsis*, el cual es conocido por ser deficiente en el paso de 5-dehidroepisterol a 24-metilen-colesterol, y que es catalizado por una enzima esterol  $\Delta^7$ -reductasa (S7R) (Choe et al. 2000). El mutante *cpa* recientemente identificado en pepino también resulta en la alteración de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (Zhang et al., 2021). El mutante *cpa* (*compact plant architecture*) se trata de un mutante identificado en una población EMS de *C. sativus* que se caracteriza por presentar un fenotipo enano muy extremo, con internodos y pecíolos acortados y hojas pequeñas, oscuras y arrugadas. En este trabajo (Zhang et al., 2021) se llevó a cabo, además, el estudio y evaluación de las plantas ante la aplicación exógena de EBR a concentraciones de 0, 0,2 y  $2 \mu\text{M}$ , en el que se demostró una clara reversión del fenotipo, aunque también de forma parcial, tal y como ocurre en el caso del mutante *df* objeto de estudio en este TFG. Como menciona Zhang et al. (2021), esta recuperación de forma parcial podría deberse a que la mutación afecta en la ruta general de biosíntesis de fitoesteroles, no en la ruta específica para BR, señalando que el desarrollo vegetal no es dependiente completamente de BR, sino de la actividad de otros fitoesteroles. También cabe destacar que el éxito logrado de este experimento no es tanto la concentración que es aplicada, sino la edad de las plantas seleccionadas para el estudio. Es por ello, que para el mutante *df* no se pudieran conseguir los resultados del todo esperados, ya que dicho tratamiento fue iniciado en plantas relativamente mayores, mientras que, en Zhang et al., (2021) se comenzó el tratamiento a partir de plántulas jóvenes. De esta forma, dado que este último ensayo no ha logrado resultados concluyentes, se llevará a cabo una repetición de este experimento sobre plantas más jóvenes y con las mismas concentraciones, aprovechando la experiencia y resultados obtenidos en este TFG.

## 6. CONCLUSIONES

PRIMERA: El fenotipo enano detectado en una caracterización en planta adulta de una colección EMS de calabacín segrega para un único gen recesivo.

SEGUNDA: Los resultados del genotipado sobre una población segregante con más de 300 plantas, indican que la mutación causal del fenotipo enano es un cambio tipo SNP, resultado de una transición de una guanina (G) por una adenina (A) en el gen que codifica para la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa, perteneciente a la ruta de biosíntesis de los brasinoesteroides.

TERCERA: La mutación causa un fenotipo de enanismo que afecta tanto al desarrollo vegetativo, como al desarrollo sexual. Las plantas mutantes presentan un crecimiento menor, con menor tamaño de hoja y volumen de planta. Las flores del mutante, tanto masculinas, como femeninas también se caracterizan por tener un menor tamaño.

CUARTA: Al igual que otros mutantes afectados en la ruta de los brasinoesteroides, el mutante *df* muestra una respuesta positiva y parcial a la aplicación exógena de brasinoesteroides. No obstante, la edad de la planta podría ser un condicionante para la respuesta a la aplicación exógena.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahammed, G. J., Li, X., Liu, A., & Chen, S. (2020). Brassinosteroids in plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, *39*(4), 1451-1464.
- Altmann, T., Felix, G., Jessop, A., Kauschmann, A., Uwer, U., Peña-Cortés, H., & Willmitzer, L. (1995). Ac/Ds transposon mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: mutant spectrum and frequency of Ds insertion mutants. *Molecular and General Genetics MGG*, *247*(5), 646-652.
- Asami, T., & Yoshida, S. (1999). Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends in plant science*, *4*(9), 348–353. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01456-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01456-9)
- Azpiroz, R., Wu, Y., LoCascio, J. C., & Feldmann, K. A. (1998). An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *The Plant cell*, *10*(2), 219–230. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.2.219>
- Bajguz, A., Chmur, M., & Gruszka, D. (2020). Comprehensive overview of the brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections. *Frontiers in plant science*, *11*, 1034.
- Bishop, G. J., Harrison, K., & Jones, J. D. (1996). The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *The Plant Cell*, *8*(6), 959-969.
- Blanca, J., Cañizares, J., Roig, C., Ziarsolo, P., Nuez, F., & Picó, B. (2011). Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *BMC genomics*, *12*(1), 1-15.
- Boualem, A., Fleurier, S., Troadec, C., Audigier, P., Kumar, A. P., Chatterjee, M., ... & Bendahmane, A. (2014). Development of a *Cucumis sativus* TILLinG platform for forward and reverse genetics. *PLoS One*, *9*(5), e97963.
- Carvajal Moreno, F. (2014). *Mejora de la vida comercial, calidad y conservación del fruto de calabacín (Cucurbita pepo L.): estudio comparativo en variedades comerciales*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Cebrián, G (2022). *Role of Ethylene and Jasmonate on traits of agronomic interest of Cucurbita pepo: a genomic approach*. Tesis Doctoral no publicada. Universidad de Almería. Almería.
- Cebrián, G., Iglesias-Moya, J., Romero, J., Martínez, C., Garrido, D., & Jamilena, M. (2022). The Ethylene Biosynthesis Gene CpACO1A: A New Player in the Regulation of Sex Determination and Female Flower Development in *Cucurbita pepo*. *Frontiers in plant science*, *12*.
- Cheon, J., Park, S. Y., Schulz, B., & Choe, S. (2010). *Arabidopsis* brassinosteroid biosynthetic mutant dwarf7-1 exhibits slower rates of cell division and shoot induction. *BMC plant biology*, *10*, 270. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-270>

- Choe, S., Dilkes, B. P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., & Feldmann, K. A. (1998). The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell*, *10*(2), 231-243.
- Choe, S., Dilkes, B. P., Gregory, B. D., Ross, A. S., Yuan, H., Noguchi, T., ... & Feldmann, K. A. (1999a). The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant physiology*, *119*(3), 897-908.
- Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C. P., Gregory, B. D., ... & Feldmann, K. A. (1999b). The *Arabidopsis* dwarf7/ste1 mutant is defective in the  $\Delta$ 7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell*, *11*(2), 207-221.
- Choe, S., Tanaka, A., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ross, A. S., ... & Feldmann, K. A. (2000). Lesions in the sterol  $\Delta$ 7 reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Journal*, *21*(5), 431-443.
- Chory, J., Nagpal, P., & Peto, C. A. (1991). Phenotypic and genetic analysis of det2, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *3*(5), 445-459.
- Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell*, *23*(4), 1219-1230.
- Dahmani-Mardas, F., Troadec, C., Boualem, A., Leve<sup>^</sup>que, S., Alsadon, A. A., Aldoss, A. A., ... & Bendahmane, A. (2010). Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PloS one*, *5*(12), e15776.
- Decker, D. S. (1988). Origin (s), Evolution, and Systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 4-15.
- Divi, U. K., & Krishna, P. (2009). Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New biotechnology*, *26*(3-4), 131-136.
- Ephritikhine, G., Pagant, S., Fujioka, S., Takatsuto, S., Lapous, D., Caboche, M., ... & Barbier-Brygoo, H. (1999). The sax1 mutation defines a new locus involved in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *18*(3), 315-320.
- Esteras, C., Gómez, P., Monforte, A. J., Blanca, J., Vicente-Dólera, N., Roig, C., ... & Picó, B. (2012). High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC genomics*, *13*(1), 1-21.
- Ferriol M, Picó B (2008) Pumpkin and Winter Squash. In Handbook of plant breeding, vegetables I. Edited by Prohens J, Nuez F. *Springer, New York*; 317–349.
- Fujioka, S., & Yokota, T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual review of plant biology*, *54*(1), 137-164.

- García, A., Aguado, E., Garrido, D., Martínez, C., & Jamilena, M. (2020b). 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), 1548-1560.
- García, A., Aguado, E., Martínez, C., Loska, D., Beltrán, S., Valenzuela, J. L., ... & Jamilena, M. (2020a). The ethylene receptors CpETR1A and CpETR2B cooperate in the control of sex determination in *Cucurbita pepo*. *Journal of experimental botany*, *71*(1), 154-167.
- García, A., Aguado, E., Parra, G., Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Cebrián, G., Romero, J., Beltrán, S., Garrido, D., & Jamilena, M. (2018). Phenomic and Genomic Characterization of a Mutant Platform in *Cucurbita pepo*. *Frontiers in plant science*, *9*, 1049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01049>
- González, M., Xu, M., Esteras, C., Roig, C., Monforte, A. J., Troadec, C., ... & Picó, B. (2011). Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de Sapo melons. *BMC Research notes*, *4*(1), 1-11.
- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen, J. D., ... & Cook, J. C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, *281*(5728), 216-217.
- Gudesblat, G. E., & Russinova, E. (2011). Plants grow on brassinosteroids. *Current opinion in plant biology*, *14*(5), 530-537
- Hernández Silva, E., & García-Martínez, I. (2016). Brasinoesteroides en la agricultura. I. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *7*(2), 441-450.
- Hou, S., Niu, H., Tao, Q., Wang, S., Gong, Z., Li, S., ... & Li, Z. (2017). A mutant in the CsDET2 gene leads to a systemic brassinosteroid deficiency and super compact phenotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theoretical and applied genetics*, *130*(8), 1693-1703.
- Hu, Y., Bao, F., & Li, J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *24*(5), 693-701.
- Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L., & Altmann, T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *The Plant Journal*, *9*(5), 701-713.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., & de Groot, A. (2000). Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of botany*, *86*(3), 441-447.
- Kwon, M., & Choe, S. (2005). Brassinosteroid biosynthesis and dwarf mutants. *Journal of Plant Biology*, *48*(1), 1-15.
- Li, S., Zheng, H., Lin, L., Wang, F., & Sui, N. (2021). Roles of brassinosteroids in plant growth and abiotic stress response. *Plant Growth Regulation*, *93*(1), 29-38.
- Mammadov, J., Aggarwal, R., Buyyarapu, R., & Kumpatla, S. (2012). SNP markers and their impact on plant breeding. *International journal of plant genomics*, *2012*.

- Manzano, S., Martínez, C., Domínguez, V., Avalos, E., Garrido, D., Gómez, P., & Jamilena, M. (2010). A major gene conferring reduced ethylene sensitivity and maleness in *Cucurbita pepo*. *Journal of plant growth regulation*, 29(1), 73-80.
- Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Gómez, P., Garrido, D., & Jamilena, M. (2011). The role of ethylene and brassinosteroids in the control of sex expression and flower development in *Cucurbita pepo*. *Plant growth regulation*, 65(2), 213-221.
- Mayumi, K., & Shibaoka, H. (1995). A possible double role for brassinolide in the reorientation of cortical microtubules in the epidermal cells of azuki bean epicotyls. *Plant and cell physiology*, 36(1), 173-181.
- Menda, N., Semel, Y., Peled, D., Eshed, Y., & Zamir, D. (2004). In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant Journal*, 38(5), 861-872.
- Minoia, S., Petrozza, A., D'Onofrio, O., Piron, F., Mosca, G., Sozio, G., ... & Carriero, F. (2010). A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC research notes*, 3(1), 1-8.
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Bombarely, A., Ziarolo, P., Esteras, C., Martí-Gómez, C., ... & Cañizares, J. (2018). De novo assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the *Cucurbita* genus. *Plant biotechnology journal*, 16(6), 1161-1171.
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Esteras, C., Martínez-Pérez, E. M., Gómez, P., Monforte, A. J., Cañizares, J., & Picó, B. (2017). An SNP-based saturated genetic map and QTL analysis of fruit-related traits in Zucchini using Genotyping-by-sequencing. *BMC genomics*, 18(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3439-y>
- Nolan, T. M., Vukašinović, N., Liu, D., Russinova, E., & Yin, Y. (2020). Brassinosteroids: multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *The Plant Cell*, 32(2), 295-318.
- Nomura, T., Sato, T., Bishop, G. J., Kamiya, Y., Takatsuto, S., & Yokota, T. (2001). Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocastasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry*, 57(2), 171-178.
- Oh, M. H., Honey, S. H., & Tax, F. E. (2020). The Control of Cell Expansion, Cell Division, and Vascular Development by Brassinosteroids: A Historical Perspective. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1743. <https://doi.org/10.3390/ijms21051743>
- Ohnishi T. (2018). Recent advances in brassinosteroid biosynthetic pathway: insight into novel brassinosteroid shortcut pathway. *Journal of pesticide science*, 43(3), 159–167. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D18-040>
- Ohnishi, T., Godza, B., Watanabe, B., Fujioka, S., Hategan, L., Ide, K., ... & Mizutani, M. (2012). CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31551-31560.

- Papadopoulou, E., & Grumet, R. (2005). Brassinosteroid-induced femaleness in cucumber and relationship to ethylene production. *HortScience*, 40(6), 1763-1767.
- Paris, H. S., Lebeda, A., Křístková, E., Andres, T. C., & Nee, M. H. (2012). Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated subspecies of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 66(1), 71-90.
- Peñaranda, A., Payan, M. C., Garrido, D., Gómez, P., & Jamilena, M. (2007). Production of fruits with attached flowers in zucchini squash is correlated with the arrest of maturation of female flowers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(4), 579-584.
- Perez Gutierrez, R. M. (2016). Review of *Cucurbita pepo* (pumpkin) its phytochemistry and pharmacology. *Med. Chem*, 6(1), 12-21.
- Ratnam, N., Najibullah, M., & Ibrahim, M. D. (2017). A review on *Cucurbita pepo*. *Int J Pharm Phytochem Res*, 9, 1190-4.
- Renner, S. S., & Schaefer, H. (2016). Phylogeny and evolution of the Cucurbitaceae. In *Genetics and genomics of Cucurbitaceae* (pp. 13-23). Springer, Cham.
- Rojas, L., Collado, R., García, A. L., Rivero, L., Ocaña, B., Hernández, M., ... & 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).
- Sakurai, A. (1999). Brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(5), 351-361.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(4), 725-739.
- Silme, R. S., & Çağırğan, M. I. (2007). TILLING (Targetting Induced Local Lesions In Genomes) Technology for. *Journal of Applied Biological Sciences*, 1(1), 77-80.
- Smith, B. D. (1997). The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science*, 276(5314), 932-934.
- Sun, Y., Fan, X. Y., Cao, D. M., Tang, W., He, K., Zhu, J. Y., ... & Wang, Z. Y. (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Developmental cell*, 19(5), 765-777.
- Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Rédei, G. P., Nagy, F., Schell, J., & Koncz, C. (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85(2), 171-82.
- Takahashi, T., Gasch, A., Nishizawa, N., & Chua, N. H. (1995). The DIMINUTO gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Genes & Development*, 9(1), 97-107.

- Tang, J., Han, Z., & Chai, J. (2016). Q&A: what are brassinosteroids and how do they act in plants?. *BMC biology*, *14*(1), 1-5.
- Tao, Y., Yu, Q. X., Zhou, Y. H., Shi, K., Zhou, J., Yu, J. Q., & Xia, X. J. (2015). Application of 24-epibrassinolide decreases the susceptibility to cucumber mosaic virus in zucchini (*Cucurbita pepo* L). *Scientia Horticulturae*, *195*, 116-123.
- Vicente, N. (2015). *Nuevos recursos para la mejora genética de la especie cucurbita pepo: colección de familias de mutantes y plataforma de selección TILLING*. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. Almería. consultado en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=111638>.
- Vicente-Dolera, N., Troadec, C., Moya, M., del Rio-Celestino, M., Pomares-Viciano, T., Bendahmane, A., ... & Gómez, P. (2014). First TILLING platform in *Cucurbita pepo*: a new mutant resource for gene function and crop improvement. *PLoS One*, *9*(11), e112743.
- Wang, H., Li, W., Qin, Y., Pan, Y., Wang, X., Weng, Y., ... & Li, Y. (2017a). The cytochrome P450 gene *CsCYP85A1* is a putative candidate for super compact-1 (*scp-1*) plant architecture mutation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in plant science*, *8*, 266.
- Wei, Z., & Li, J. (2020). Regulation of brassinosteroid homeostasis in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 583622.
- Zhang, M., Song, M., Cheng, F., Yang, Z., Davoudi, M., Chen, J., & Lou, Q. (2021). Identification of a putative candidate gene encoding 7-dehydrocholesterol reductase involved in brassinosteroids biosynthesis for compact plant architecture in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *134*(7), 2023-2034.