



Universidad de Granada

**Caracterización del proceso de abscisión floral en**  
*Cucurbita pepo*  
Inducción mediada por etileno

Raquel Rosales López

Granada, 2007







Caracterización del proceso de abscisión floral en *Cucurbita pepo*  
Inducción mediada por etileno

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la Licenciada en Biología  
Raquel Rosales López

Fdo: Raquel Rosales López

Con el Vº Bº de la directora del trabajo:

Fdo: Dolores Garrido Garrido  
Dra. En Ciencias Biológicas  
Profesora titular del Dpto. de Fisiología Vegetal  
Universidad de Granada

Granada, 2007



El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. Ha sido financiado por el proyecto del Ministerio de Investigación y Ciencia AGL2004-08019-CO2-01, así como por una beca Formación del Personal Universitario del Ministerio de Educación, y una ayuda puente del Plan Propio de la Universidad de Granada.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones:

**Payán M.C., Peñaranda A., Rosales R., Garrido D., Gómez P., Jamilena, M.** 2006. Ethylene mediates the induction of fruits with attached flower in zucchini squash. En: *Cucurbitacea 2006* (Eds.: Holmes G.J.) Universal Press, Raleigh North Carolina USA, 171-179.

**Rosales R., García-Ayllón S., Jamilena M., Gómez P., Garrido D.** 2007. Is Ethylene directly involved in floral abscission in *Cucurbita pepo*. En: *Advances in Plant Ethylene Research* (Eds: Ramina A., Chang C., Giovannoni J., Klee H., Perata P., Woltering E.) **5**, 319-321. Springer. ISBN: 978-1-4020-6013-7.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo ha sido presentado en los siguientes congresos:

- The 14<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Cracovia (Polonia). Agosto, 2004.

- IX Congreso Luso Español de Fisiología Vegetal. Evora (Portugal). Septiembre, 2005.
- 7<sup>th</sup> International Symposium on the Plant Hormone Ethylene. Pisa (Italia). Junio, 2006.
- III Congreso de mejora genética de plantas. Valencia 2006.
- X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Alcalá de Henares, 2007.





<u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1. <i>Cucurbita pepo</i> : ASPECTOS GENERALES, VARIEDADES E INTERÉS .....	3
2. ABSCISIÓN .....	8
2.1. Diferenciación de la zona de abscisión .....	8
2.2. Proceso de separación: regulación .....	11
2.2.1. Señales ambientales que modulan la abscisión .....	12
2.2.2. Señales hormonales que regulan la abscisión .....	12
2.3. Cambios ultraestructurales de la zona de abscisión .....	21
2.4. Modificaciones de la pared celular .....	23
2.5. Cambios bioquímicos y moleculares .....	27
2.5.1. Enzimas que modifican la pared celular en abscisión .....	27
2.5.2. Genes regulados positivamente durante la abscisión .....	33
 <u>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u> .....	 35
 <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u> .....	 39
1. MATERIAL VEGETAL .....	41
2. APLICACIÓN DE ETILENO E INHIBIDOR DE SU SÍNTESIS AVG .....	42
2.1. Tratamientos de ethrel y AVG sobre flor completa .....	42
2.2. Tratamientos de ethrel sobre secciones de zona de abscisión .....	43
3. ACTIVIDADES HIDROLÍTICAS CELULASA Y POLIGALACTURONASA .....	44
4. ACTIVIDAD EXPANSINA .....	45
4.1. Extracción de las proteínas de la pared celular .....	45
4.2. Precipitación de las proteínas de la pared celular .....	45
4.3. Ensayo de extensometría .....	46
5. ACTIVIDAD PECTINA METIL ESTERASA (PME) .....	46
6. ACTIVIDAD QUITINASA .....	47
7. CUANTIFICACIÓN PROTEICA .....	48
8. EXTRACCIÓN DE ADN E HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN .....	48
8.1. Extracción de ADN genómico .....	48
8.2. Análisis genómico: Southern blot .....	49
9. EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ARN E HIBRIDACIÓN TIPO NORTHERN .....	50
9.1. Extracción de ARN total .....	50
9.2. Tratamientos del ARN con ADNasa .....	51
9.3. Análisis de la expresión: Northern blot .....	51
9.4. Síntesis de ADNc .....	52

10. DISEÑO DE CEBADORES.....	53
11. RT-PCR.....	53
12. RACE.....	56
13. TRANSFORMACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS.....	56
13.1. Preparación de células competentes.....	57
13.2. Transformación.....	57
13.3. Miniprep.....	58
14. SECUENCIACIÓN.....	59
15. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR.....	59
15.1. RT-PCR a tiempo real.....	59
15.2. RT-PCR cuantitativa.....	60
16. ANÁLISIS DE AZÚCARES NEUTROS.....	60
17. ANÁLISIS DE AGPS.....	61
18. ELECTROFORESIS EN GELES SDS/PAGE.....	61
19. GELES DE DOS DIMENSIONES.....	62
19.1. Preparación de muestras.....	62
19.2. Primera dimensión.....	63
19.3. Segunda dimensión.....	63
19.4. Preparación de muestras para MALDI/MS/MS.....	64
20. WESTERN BLOT.....	65
21. MICROSCOPIA ÓPTICA Y PROCESADO DE IMÁGENES.....	66
22.1. Fijación.....	66
22.2. Inclusión en resina Embed 812.....	66
22.3. Polimerización.....	67
22.4. Obtención de cortes semifinos.....	67
22.5. Tinción de cortes semifinos.....	67
22.6. Tinción con el reactivo de Schiff.....	68
22. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	69
23. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.....	70
<u>RESULTADOS</u> .....	71
1. CARACTERIZACIÓN DE LA ZONA DE ABSCISIÓN PISTILAR EN <i>Cucurbita pepo</i> .....	73
1.1. Definición de estadios florales.....	73
1.2. Anatomía de la zona de abscisión.....	77
1.2.1. Microscopía óptica.....	77
1.2.2. Microscopía electrónica de barrido.....	84

2.	MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR.....	88
2.1.	Caracterización fisiológica de enzimas hidrolíticas.....	88
2.1.1.	Actividad enzimática Endo-Poligalacturonasa y Endo-Glucanasa en Calabacín.....	88
2.2.	Caracterización molecular de enzimas hidrolíticas.....	92
2.2.1.	Caracterización molecular del gen <i>CpPG</i> de <i>Cucurbita pepo</i> .....	92
2.2.1.1.	Clonación y caracterización molecular del gen <i>CpPG</i> .....	92
2.2.1.2.	Análisis genómico: Southern Blot.....	95
2.2.1.3.	Análisis de expresión de <i>CpPG</i> : RT-PCR a tiempo real y RT-PCR semicuantitativa.....	96
2.2.2.	Caracterización molecular del gen <i>CpCLI</i> de <i>Cucurbita pepo</i> .....	99
2.2.2.1.	Clonación y caracterización molecular del gen <i>CpCLI</i> .....	99
2.2.2.2.	Análisis genómico: Southern Blot.....	106
2.2.2.3.	Análisis de la expresión de <i>CpCLI</i> : RT-PCR semicuantitativa.....	107
2.3.	Otras enzimas que modifican la PC.....	108
2.3.1.	Actividad Expansina en ZA de <i>Cucurbita pepo</i> .....	109
2.3.2.	Presencia de Expansinas en ZA: Western Blot.....	110
2.3.3.	Caracterización molecular del gen <i>CpEXPAI</i> .....	111
2.3.3.1.	Clonación y caracterización molecular del gen <i>CpEXPAI</i> .....	111
2.3.3.2.	Análisis genómico: Southern Blot.....	118
2.3.3.3.	Análisis de la expresión de <i>CpEXPAI</i> : RT-PCR semicuantitativa.....	119
2.3.4.	Actividad Pectin Metil esterasa.....	120
3.	EFFECTO DEL ETILENO EN EL PROCESO DE ABSCISIÓN DE ÓRGANOS FLORALES EN <i>Cucurbita pepo</i> .....	122
3.1.	Inducción de la abscisión de órganos florales.....	122
3.2.	Modificaciones morfológicas inducidas por etileno en ZAs de <i>C.pepo</i> .....	128
3.3.	Modificaciones a nivel fisiológico y molecular.....	130
3.3.1.	Análisis de la sustancia blanca.....	130
3.3.1.1.	Detección de Azúcares neutros.....	130
3.3.1.2.	Precipitación de AGPs con $\beta$ -GlcY.....	132
3.3.1.3.	Presencia de AGPs en la ZA: Western Blot.....	135
3.3.2.	Actividad endo-glucanasa y endo-poligalacturonasa.....	136
3.3.3.	Análisis de la expresión de <i>CpCLI</i> .....	138
3.3.4.	Actividad Expansina.....	139
3.3.5.	Análisis de la expresión de <i>CpEXPAI</i> .....	140
3.3.6.	Actividad Pectin metil esterasa.....	141
3.3.7.	Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de etileno.....	142
3.4.	Cambios en el patrón proteico inducidos por etileno en la ZA de <i>C.pepo</i> .....	144
3.4.1.	Electroforesis en dos dimensiones.....	144
3.4.2.	Actividad Quitinasa.....	147

---

<u>DISCUSION</u> .....	151
1. ANATOMÍA DE LA ZONA DE ABSCISIÓN EN <i>Cucurbita pepo</i> .....	153
2. IMPLICACIÓN DEL ETILENO EN LA ABSCISIÓN FLORAL DE <i>C.PEPO</i> .....	157
2.1. El etileno acelera la abscisión floral de <i>C.pepo</i> .....	157
2.2. Cambios morfológicos en la ZA inducidos por etileno.....	160
2.3. Efecto en las enzimas hidrolíticas.....	162
2.3.1. Inducción por etileno de la actividad CL y PG.....	163
2.3.2. Cracterización molecular de CpPG.....	164
2.3.3. Caracterización molecular de CpCL1.....	165
2.4. Efecto del etileno en otras enzimas que modifican la PC.....	167
2.4.1. Expansinas.....	167
2.4.2. Pectina metil esterasa.....	170
2.5. Efecto del etileno en las enzimas involucradas en su síntesis.....	171
2.6. Cambios en el patrón proteico de las ZAs inducidas por etileno.....	172
2.6.1, Geles bidimensionales.....	172
2.6.2. Actividad quitinasa.....	173
3. ¿CÓMO REGULA EL ETILENO LA ABSCISIÓN FLORAL?.....	174
<u>CONCLUSIONES</u> .....	175
<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	179

# INTRODUCCIÓN

---



## 1. *Cucurbita pepo*: ASPECTOS GENERALES, VARIETADES E INTERÉS

El Calabacín (*Cucurbita pepo* spp. *pepo*), pertenece al género *Cucurbita*, uno de los géneros cultivados más importantes económicamente. Está compuesto por unas veintidós especies salvajes y cinco especies cultivadas (Decker, 1988). Estas especies son *C.pepo*, *C. moschata*, *C.maxima*, *C.ficifolia* y *C.argirosperma*, siendo las tres primeras (*C.pepo*, *C. moschata* y *C.maxima*), las más importantes económicamente y las más ampliamente distribuidas. *Cucurbita* es un género Americano, caracterizado por sus hojas grandes palmeadas, por sus flores amarillo-anaranjadas productoras de néctar y polinizadas por abejas, y por sus frutos grandes, duros, esféricos e indehiscentes. La mayoría de las especies de este género son mesófitas, con sistemas radiculares fibrosos y monoicas (Paris, 2001; Nee, 1990).

*C.pepo* es la especie cultivada con mayor importancia económica a nivel mundial del género *Cucurbita*, así como la más polimórfica. Este polimorfismo se manifiesta especialmente en sus frutos (tamaño, forma, color, patrón de coloración, textura, etc), pero también en sus características vegetativas (hábito de crecimiento, longitud y grosor de los entrenudos, tamaño de las hojas, etc).

Actualmente se cree que han existido al menos dos domesticaciones independientes de *C.pepo*, una en Méjico y otra en el este de Estados Unidos. Esta idea está apoyada por hallazgos arqueológicos que ponen de manifiesto la domesticación de *C.pepo* desde hace más de 4000 años en tres sitios bastante alejados de Norte América, concretamente en el sureste y noroeste de Méjico y este de Estados Unidos (Paris, 2001), junto con datos de estudios aloenzimáticos (Decker, 1988), y estudios filogenéticos con ADN mitocondrial (Sanjur y cols., 2002) y marcadores RAPDs, AFLPs, ISSR y SSR (revisado por Smith, 2006). Estas dos domesticaciones dieron lugar a dos linajes, que actualmente se clasifican como dos subespecies *C.pepo* spp.



*pepo* y *C.pepo* spp. *ovifera*. *C.pepo* spp.*pepo*, fue domesticada desde un progenitor desconocido hace unos 10000 años en Méjico; mientras que *C.pepo* spp. *ovifera* se cree que proviene de una domesticación posterior (hace unos 5000 años) en el este de Estados Unidos desde la especie salvaje *C.pepo* spp. *ovifera* variedad *ozarcana*.

Existen ocho variedades botánicas o morfotipos comestibles diferentes de *C.pepo* clasificadas en función de la morfología de sus frutos y confirmado por análisis con marcadores moleculares (Paris, 1989; Paris y cols., 2003; Paris y Janick, 2005). Estas ocho variedades son Pumpkin, Vegetal Marrow, Cocozelle y Zucchini, pertenecientes a *C.pepo* spp. *pepo*; y Scallop, Acorn, Crookneck y Straightneck de la subespecie *ovifera* (Figura 1).

El calabacín se corresponde con la variedad Zucchini. La palabra Zucchini proviene del diminutivo en plural de la voz italiana “zucca” que significa calabaza de verano. Es la variedad más reciente de *C.pepo*, ya que se diversificó en Italia más tarde que las otra variedades y de forma más restringida, de hecho, la primera descripción de la morfología del calabacín actual la realizó Tamaro en 1901 (Paris, 2001). Posteriormente se introdujo en Estados Unidos desde Italia durante los años veinte y en tan solo diez años, se constituyó como un grupo bien definido (Paris, 1989).

Las variedades de Zucchini que se cultivan actualmente son híbridos mejorados en América en los últimos 50 años, obtenidos a partir de variedades italianas, en su mayoría de frutos verde oscuro o amarillo, habiéndose convertido en la calabaza de verano más importante económicamente.

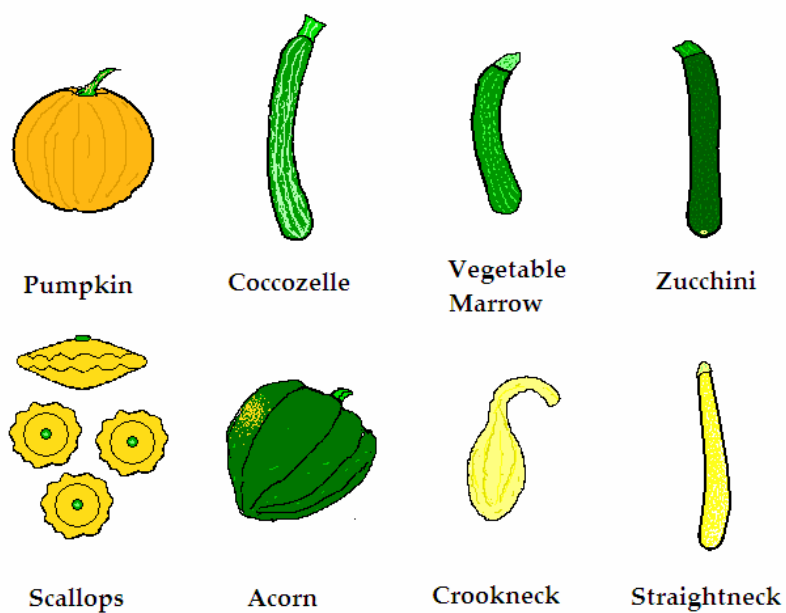
El calabacín tipo Zucchini se caracteriza por sus frutos cilíndricos, nada o un poco afilados, con una relación longitud-anchura de 3.5 a 4.5. En la mayoría de los

casos el fruto es verde oscuro imponiéndose sobre los tipos amarillentos iniciales. Es una planta rastrera y monoica, con flores unisexuales axilares.

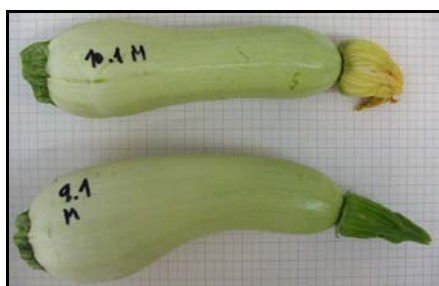
Centrándonos en el cultivo del calabacín tipo Zucchini en España, actualmente supera las 300.000 toneladas, concentrándose en Almería el 70% de la producción española, donde se ha convertido en el cuarto cultivo en importancia en cuanto a productividad (236.000 toneladas en 2006), y rentabilidad.

Nuestro grupo de investigación ha profundizado en la expresión sexual de las variedades tipo Zucchini cultivadas en Almería (Payán, 2006). La mayoría de estas variedades presentan un desarrollo reproductivo temprano (la primera flor aparece en el primer nudo), mostrando tres etapas sexuales a lo largo del desarrollo longitudinal de la planta. Una primera etapa en la que todas las flores son masculinas, durante los 4-8 primeros nudos dependiendo de la variedad; una segunda etapa mixta, donde aparecen flores masculinas y femeninas en proporciones variables; y una última etapa femenina, en la que solo se desarrollan flores femeninas. Este patrón de expresión sexual está muy influenciado por las condiciones ambientales, de manera que en la temporada de primavera-verano, con condiciones de día largo, y con temperaturas y radiación elevadas, se produce una masculinización de la planta, lo que da lugar a un retraso en la aparición de la primera flor femenina y a la disminución del número de flores hembras por planta, llegando a desaparecer en algunas variedades la fase final femenina. Estas altas temperaturas, también son las principales causantes del síndrome conocido como “flor pegada” (Figura 2), que es uno de los problemas más importantes en la calidad del fruto de calabacín en los cultivos bajo plástico. Peñaranda y colaboradores (2007), describen el síndrome flor pegada como un retraso muy marcado en el desarrollo de las flores que permanecen cerradas y unidas al fruto incluso después de que éste alcance el calibre y el peso comercial, de manera que la flor no abscinde y tiene que ser retirada

manualmente del fruto, lo que ocasiona podredumbre en el mismo. La inhibición de la abscisión floral va asociado a una expresión sexual anómala, de manera que las flores que permanecen unidas a los frutos, presentan estambres en diferente grado de desarrollo dependiendo de la flor, pero que en fenotipos extremos pueden llegar a producir polen maduro. El porcentaje de frutos que presentan “flor pegada” es dependiente de la variedad, variando entre un 0 y un 70% entre las variedades analizadas bajo condiciones inductoras de “flor pegada” (Gómez y cols., 2004; Peñaranda y cols., 2007). En función de este parámetro se pueden distinguir tres grupos bien diferenciados. Un primer grupo que presenta un porcentaje muy bajo de frutos con flores unidas, que incluye las variedades Cora, Tosca, Balboa y Storr’s Green; un segundo grupo con un porcentaje intermedio formado por las Elite y Baccara y un tercer grupo formado por Cavili, Xsara y Mastil, que presentan el porcentaje más elevado de flor pegada.



**Figura 1:** Representación de los 8 tipo de frutos de las 8 variedades de *C. pepo*



**Figura 2:** Flor femenina en postantesis con fruto de tamaño comercial (20 cm) y bajo ella una flor con síndrome flor pegada con fruto de mayor calibre aunque sus pétalos permanezcan verdes y completamente cerrados.

## **2. ABSCISIÓN**

El término abscisión deriva del latino “abscindere” que significa desgarrar, separar; por lo que en un sentido amplio puede aplicarse a la caída de cualquier órgano de la planta independientemente del proceso involucrado en ella, englobándose tres mecanismos distintos dentro de esta definición, rotura mecánica, desgaste medioambiental y abscisión con degradación de las paredes celulares (Sexton y Roberts, 1982). El mecanismo más investigado es el que involucra la disolución de la pared celular (PC) entre células vivas adyacentes en el lugar de separación, por lo que el uso del término abscisión se ha restringido exclusivamente a este fenómeno, y en este sentido estricto es como lo emplearemos en este trabajo.

La abscisión es un proceso fisiológico muy importante en el ciclo de vida de una planta, así la abscisión de polen, frutos, semillas y hojas, garantiza la dispersión y propagación eficiente de la planta; la abscisión de órganos que ya no son esenciales para la planta elimina la demanda respiratoria de esas estructuras, y por último, la abscisión de órganos en respuesta a estreses ambientales tales como ataque de patógenos o estrés hídrico, disminuye el área de exposición y el efecto pernicioso que ejercen estos estreses sobre la planta (revisado por Patterson, 2001). La abscisión es un proceso activo (involucra la degradación de las paredes celulares) que está muy coordinado, en el que intervienen muchos cambios en la estructura celular, en el metabolismo y en la expresión génica.

### **2.1. Diferenciación de la zona de abscisión**

La separación celular durante la caída de un órgano en la planta afecta a una sección muy estrecha, de unas pocas capas de células de grosor conocida como zona de separación, pero la zona anatómicamente identificable es mayor, se conoce como zona de abscisión e incluye la zona de separación (Abeles, 1968). La zona de abscisión (ZA)

se diferencia en zonas predeterminadas, estando constituida por células que pueden identificarse bioquímica y morfológicamente antes de que tenga lugar el proceso de separación. Estas células se conocen como células diana Tipo II y se caracterizan por alargarse en respuesta a etileno pero no a auxinas (Wright y Osborne, 1974; Osborne y Sargent, 1976a), en contraposición a las células tipo I de las zonas adyacentes (Figura 3) que se alargan en respuesta a auxinas pero no a etileno (Osborne, 1989). El número de células que forman una ZA suele ser fija, para un órgano concreto en una especie, pero varía entre especies (Taylor y Whitelaw, 2001), por ejemplo, la ZA del pedicelo de las flores de tomate están formadas por 5-10 capas de células (Roberts y cols., 1984), mientras que la de la base del foliolo de *Sambucus nigra* por 30-40 (Osborne y Sargent, 1976a). Como hemos mencionado anteriormente las células de la ZA, especialmente en hojas, suelen ser morfológicamente distintas a las células de las zonas próximas antes de que se produzca la separación celular. En general son células pequeñas, isodiamétricas, de contenido citoplasmático denso y con abundantes conexiones plasmodesmales, aunque en algunos casos son muy similares a las células que rodean el tejido parenquimático cortical (Osborne, 1989). Además las células de la ZA presentan algunas modificaciones a nivel de la PC que pueden ser importantes en la diferenciación de la zona de separación, más concretamente, éstas células suelen carecer de paredes secundarias aunque esto no les resta fortaleza (Roberts y cols., 2000). Parece que las células tipo II de la ZA se diferencian pronto en el desarrollo del órgano y permanecen en un estado de inhibición del desarrollo mientras que sus vecinas, se alargan, maduran y se vacuolan, siendo capaces desde que se diferencian de responder al estímulo adecuado, alargándose durante el proceso de abscisión.

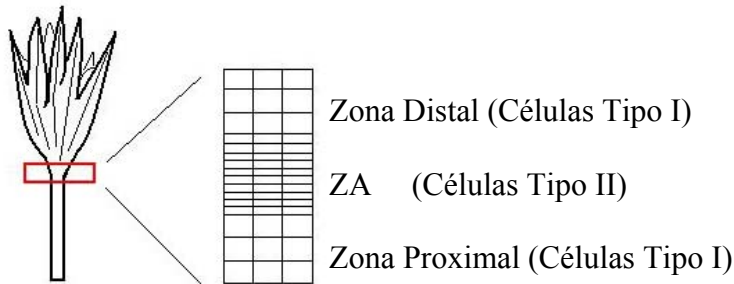


Figura 3: Esquema de la ZA de una flor mostrando la región proximal y distal a la ZA.

Una fuente muy importante de información para entender mejor los sucesos morfogénéticos que contribuyen a la diferenciación de la ZA, es el aislamiento de mutantes aberrantes de la abscisión de un órgano. Es el caso del mutante de tomate *Jointless*, que no tiene ZA en el pedúnculo (Mao y cols., 2000). El gen tipo salvaje *JOINTLESS* codifica para una proteína tipo MADS-box (familia de factores de transcripción que contribuye al establecimiento de sitios específicos de diferenciación celular). Parece que este gen controla si la ZA se forma o no, mientras que el posicionamiento exacto de la ZA está determinado por el nivel de expresión del gen y el ambiente celular en el que tiene lugar. Estudios con quimeras periclinales generadas desde mutantes *jointless* y plantas salvajes, mostraron que el nivel celular meristemático L3 (capa de células que origina el tejido vascular y otros tejidos internos) dicta la formación de la ZA del pedicelo. La ZA solo se forma cuando la capa L3 tiene fenotipo salvaje, independientemente de que el fenotipo para L1 (capa de células de la que deriva la epidermis) y L2 (Capa de células que originan la subepidermis) sea salvaje o mutante (Szymkowiak e Irish, 1999).

Otro mutante aislado en tomate es *lateral suppressor* (Schumacher y cols., 1999). El gen *LATERAL SUPPRESSOR* (LS) codifica a un miembro de un grupo de posibles

activadores transcripcionales. El péptido LS tiene homología con un grupo de proteínas VHID, que participan en la transducción de señales asociadas con giberelinas. Aunque estos mutantes no tienen abscisión floral, sí presentan abscisión de hojas y órganos florales, de lo que se deduce que la regulación de la formación de la ZA en diferentes tejidos no debe ser la misma.

## **2.2. Proceso de separación: Regulación**

Para que se inicie el proceso de abscisión, tras la diferenciación del nivel celular en el que se producirá la separación, es necesario que se activen las células de la ZA; de manera que hasta que estas células no están presentes y no son capaces de responder al estímulo adecuado, la abscisión no puede iniciarse (Osborne y Sargent, 1976b). Una vez que se desencadena el proceso, se va reduciendo la fuerza necesaria para separar el tejido distal (zona más próxima al órgano que va a caer), del proximal (zona más cercana al cuerpo de la planta) en la ZA, lo que también se conoce como fuerza de la ZA (*breakstrength*). En función de este parámetro se puede dividir el proceso de abscisión en dos fases, la fase estacionaria, de retardo o fase “*lag*”; y la fase de separación (Sexton y Roberts, 1982). Durante la fase *lag* se produce muy poca o ninguna reducción en la fuerza de la ZA, produciéndose hacia el final de esta fase los primeros cambios anatómicos en las células de la ZA. Durante la fase de separación la fuerza de la zona de separación se reduce casi linealmente, observándose modificaciones muy importantes en las paredes celulares de la zona de separación.

Todo esto evidencia que la abscisión es un proceso muy coordinado, regulado por diferentes señales intra- e intercelulares, además de por algunas señales ambientales.



### **2.2.1. Señales ambientales que modulan la abscisión**

La abscisión puede verse afectada por factores ambientales como la radiación ultravioleta, el fotoperiodo, la concentración de ozono o las variaciones estacionales; así como por diferentes factores estresantes (revisado por Taylor y Whitelaw, 2001).

La oscuridad y la baja intensidad luminosa promueven la abscisión de flores, capullos florales, hojas y frutos que en algunos casos está mediado por incrementos en los niveles de auxinas, como en hojas de *Coleus* (revisado por Taylor y Whitelaw, 2001); y en otros por aumento en los niveles de etileno como ocurre en la abscisión floral en pimiento y *Lilium* (revisado por Taylor y Whitelaw, 2001). La inducción de la abscisión debida a la contaminación por ozono, estrés hídrico, daño o ataque por patógenos, normalmente se produce por un efecto indirecto, debido a que todos estos factores de estrés incrementan la producción de etileno en la planta y alteran los niveles de otras hormonas como auxinas y ácido abscísico (ABA).

### **2.2.2. Señales hormonales que regulan la abscisión**

Está muy documentado el papel del etileno acelerando la abscisión de hojas, flores, órganos florales y frutos en diferentes especies (revisado por Brown, 1997), así como el de las auxinas retardándolo. También se ha estudiado la implicación de otras hormonas como el ABA y las citoquininas, aunque generalmente estas hormonas no tienen un efecto directo sobre la abscisión. En la mayoría de los casos el ABA acelera la abscisión mediante una inducción de la senescencia del órgano en cuestión, lo que provoca un incremento de la producción de etileno y es esta hormona, la que finalmente afecta al proceso de abscisión. Las citoquininas producen el efecto contrario, es decir, inhiben la senescencia, disminuyendo la producción de etileno y por tanto retrasan la abscisión. Sin embargo se ha visto que el ABA es el regulador principal de la abscisión en algunas especies, como en *Theobroma cacao* (Aneja y cols., 1999), aunque por regla general se

podría decir que la abscisión es un proceso activado por etileno e inhibido por auxinas (AIA). Se ha propuesto un modelo de regulación de este proceso en el que el flujo basipétalo polar de auxinas a través de la ZA la insensibiliza al etileno, evitando así la abscisión (Figura 4). En este modelo la fase estacionaria de la abscisión se divide en dos estadios. En el estadio I las células de la ZA son sensibles a AIA e insensibles a etileno, es decir, la aplicación de auxinas en este estadio prolonga indefinidamente, mientras que el etileno no es capaz de inducir la abscisión, aunque se ha visto que pequeñas dosis de etileno, pueden acortar el estadio I. El estadio II es aquel en el que el transporte polar de AIA en la ZA disminuye aumentando la sensibilidad de la zona al etileno, de manera que la aplicación de etileno en este estadio acelera la abscisión y la aplicación de auxinas no solo no la retrasa sino que también puede acelerarla.

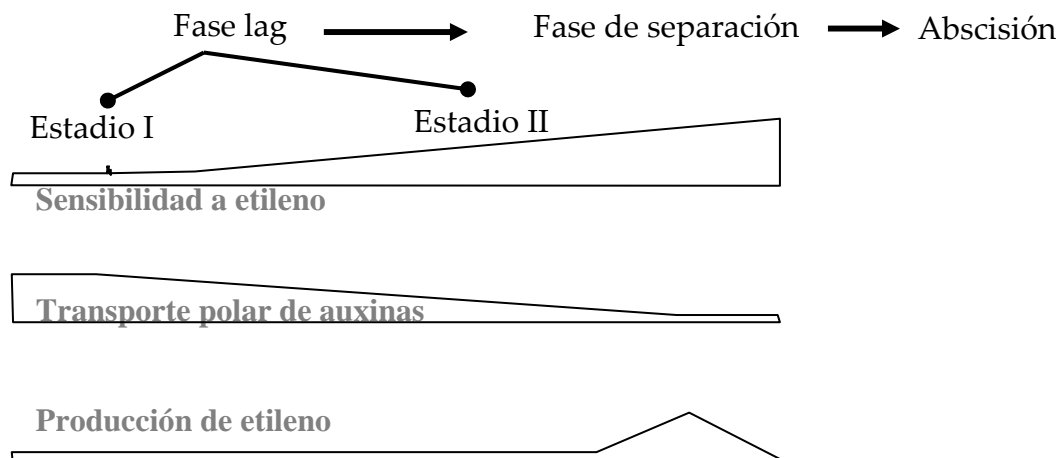


Figura 4: Modelo de la regulación de la abscisión foliar y floral por la interacción de las AIA y el etileno, propuesto en 1952 por Hall (Hall, 1952) y revisado posteriormente por Sexton y Roberts (1982); Taylor y Whitelaw (2001) entre otros. Durante el estadio I de la fase lag, el flujo polar de AIA por la ZA retrasa el proceso, disminuyendo la sensibilidad de la ZA al etileno. En el estadio II se reduce el flujo de AIA por la ZA, aumentando la sensibilidad al etileno, que ahora ya es capaz de acelerar la abscisión. En la fase de separación la fuerza de la ZA se reduce rápidamente y tanto el etileno como las AIA, acortan esta fase acelerando la abscisión del órgano.

En la gran mayoría de los casos la abscisión floral a nivel del pedúnculo sigue el modelo de regulación por balance etileno/AIA descrito en la Figura 4. Sin embargo el control de la abscisión floral a nivel de la corola es menos claro, y en muchos casos las AIA inducen la producción de etileno, acelerando la abscisión (Brown, 1997).

Actualmente se están utilizando los diferentes mutantes disponibles que presentan insensibilidad a etileno o síntesis reducida de etileno, para profundizar en el papel del etileno en la regulación de la abscisión. La mutación del gen *LeETR3* de tomate, específico de la ZA (homólogo a *AtERS1* en *Arabidopsis*) provoca retraso en la abscisión, lo que sugiere que este receptor contribuye específicamente a la respuesta de las células tipo II de la ZA al etileno y por tanto a la abscisión. Además, plantas de tomate transgénicas en las que se reducen los niveles del transcrito de *LeETR1*, muestran un retraso en la abscisión floral que se correlaciona con la reducción de los niveles de transcrito *LeETR1* (Whitelaw y cols., 2002). También en tomate, plantas transgénicas con una síntesis reducida de etileno presentan una sensibilidad reducida al etileno, y la abscisión de flores y hojas se produce más lentamente (Revisado por González-Carranza y cols., 1998). Los mutantes de respuesta a etileno de *Arabidopsis* *etr1-1* (receptor ETR1 de etileno) y *ein2-1* (EIN proteína que actúa en la cascada de señalización del etileno, aguas abajo de la kinasa CTR) muestran una respuesta reducida a etileno y un retraso en la abscisión floral, pero al igual que en tomate no se produce un bloqueo total de la caída del órgano (Patterson y Bleecker, 2004). Con todos estos datos podemos afirmar que la percepción y señalización del etileno controla, al menos en parte, el progreso de la abscisión.

Por otra parte, el etileno también modifica la expresión de los genes que codifican poligalacturonasas (PGs) y endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas (EGasas) específicas de la ZA. Estas proteínas son las principales enzimas hidrolíticas involucradas en la disolución de

la PC durante la abscisión e imprescindibles para que se produzca la separación celular. Las EGAsas pertenecen a familias multigénicas. En *Phaseolus vulgaris* se han caracterizado diferentes isoenzimas de EGasa, y solo BAC (Bean Abscission Celullase) es específica de la abscisión de hojas. Su expresión se correlaciona con el proceso de abscisión y su ARNm se acumula en la abscisión inducida por etileno y se inhibe al aplicar AIA (Tucker y cols., 1988). En tomate se han clonado 8 isoenzimas de EGasa y de ellas Cel1, Cel2, Cel5 y Cel6 parecen estar implicadas en la abscisión; la expresión de Cel1 y Cel 5 aumenta durante la abscisión y la de Cel6 disminuye. Cel1 y Cel 5 están reguladas positivamente por etileno e inhibida por auxinas, mientras que Cel6 se induce por auxinas (del Campillo y Bennett, 1996). Otro ejemplo del papel regulador del etileno en la expresión de las EGAsas específicas de abscisión es la EGasa pPEG1 de melocotón, la cual se expresa específicamente en la ZA de frutos y hojas y su expresión se induce por etileno (Trainotti y cols., 1997).

En cuanto a las PGs, hay numerosos ejemplos de la regulación positiva de la actividad y expresión de esta enzima por etileno en el proceso de abscisión. Entre estos ejemplos se encuentran las PGs de la ZA de hojas de tomate y de hojas y frutos de naranja, cuya actividad aumenta durante la abscisión inducida por etileno (revisado por Brown, 1997). En *Brassica napus*, la PG específica de abscisión PGAZBRAN, está regulada positivamente por etileno en la ZA de hojas (González-Carranza y cols., 2002). En tomate, las PGs específicas de la ZA de hojas y flores TAPG1 y TAPG4, se inducen por etileno y se inhiben por AIA (Hong y cols., 2000). Es necesaria la presencia de etileno para que haya una expresión continuada de los genes de estas enzimas hidrolíticas, de manera que si se elimina el etileno antes de que la abscisión haya avanzado lo suficiente, el proceso de degradación de las PCs se detiene y comienza a revertirse, posiblemente porque disminuye la secreción de enzimas hidrolíticas a la PC,

umentando el balance síntesis/degradación de los componentes de la PC. Esto sugiere una regulación a nivel post-transcripcional por parte del etileno.

Las expansinas son unas proteínas que modifican la pared celular y que se han visto implicadas en la abscisión inducida por etileno en *Sambucus nigra* (Belfield y cols., 2005).

Existen otros genes que no están directamente implicados en la separación pero que intervienen en la protección frente a patógenos y en la respuesta al daño de la zona que queda expuesta tras la abscisión. Algunos de estos genes están regulados por etileno, por ejemplo en *Sambucus* se han identificado una serie de genes que solo aparecen en la ZA tras una inducción con etileno y entre ellos, una polifenol oxidasa y una quitinasa tipo CHIA4 eran dependientes de etileno, y una proteína tipo metalotioneína se inducía de una manera muy importante por esta fitohormona (Coupe y cols., 1997).

Todos estos ejemplos apoyan el modelo de regulación de la abscisión en el que el etileno induce el proceso y las auxinas lo retrasan, sin embargo existen dudas sobre si el etileno es el único inductor de los cambios en el programa de expresión génica que finalmente provoca la caída del órgano en cuestión. Actualmente se están presentando evidencias de la posible existencia de una ruta reguladora de la abscisión independiente de etileno. En primer lugar se han encontrado casos en los que el etileno acelera la abscisión floral pero no es imprescindible para que se produzca, por ejemplo en la abscisión floral de *Theobroma cacao* (Aneja y cols., 1999); en otros casos el etileno no es capaz de acelerar la abscisión, como ocurre en la abscisión floral en *Cymbidium* y otras monocotiledóneas (van Doorn, 2002). Sin embargo, la mayoría de los estudios que apoyan la teoría de una ruta reguladora independiente a etileno provienen de estudios en la abscisión floral de *Arabidopsis*. Un ejemplo es la caracterización del proceso de

abscisión en los mutantes insensibles a etileno en *Arabidopsis* y tomate *etr1-1* y *ein2-1*. Como se ha mencionado anteriormente, estos mutantes muestran un retraso en la abscisión de los órganos florales, pero éstos finalmente abscinden, sugiriendo que el etileno no es imprescindible para la activación del proceso. Evidencias más claras de esta posible ruta independiente de etileno vienen de la identificación en *Arabidopsis* de genes como HAESA, AGL15 y de mutantes cuya abscisión está muy retrasada o bloqueada completamente, como *ida* y *dab*; que pasamos a describir.

**HAESA** es un receptor protein kinasa (RLK5) de *Arabidopsis*, expresado específicamente en las ZAs de los órganos florales (Jinn y cols., 2000). Las líneas transgénicas que expresan HAESA antisentido con niveles de la proteína muy bajos, muestran un retraso en la abscisión inversamente proporcional a los niveles de la proteína. Sin embargo la expresión de HAESA parece ser independiente de la transducción de la señal de etileno, ya que el precursor del etileno ACC (ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico) no altera la expresión de HAESA. Además el patrón de expresión de HAESA en la ZA no se ve alterado en mutantes *etr1-1*. Los autores sugieren que HAESA y ETR1 actúan en paralelo en el control de la expresión de los genes que provocan la abscisión.

**AGL15** (AGAMOUS-like 15) es un factor regulador de la familia de genes con dominio MADS, cuyo transcrito se acumula preferentemente en embriones. La expresión constitutiva de AGL15 (p35S:AGL15) da lugar a la inhibición de la senescencia y abscisión del periantio en *Arabidopsis* (Fernández y cols., 2000). Al tratar las flores de plantas p35S:AGL15 con etileno, se indujo la abscisión; y la F<sub>1</sub> procedente del cruce de p35S:AGL15 con el mutante dominante *etr1-1*, mostraba un fenotipo combinado de ambos parentales. Parece por tanto, que la expresión constitutiva ectópica de AGL15 no provoca cambios bioquímicos o de desarrollo graves en las células de la

ZA y que no actúa a través de cambios en la percepción de etileno. Debemos resaltar el hecho de que la sobreexpresión de AGL15 exclusivamente en la ZA no es suficiente para inhibir la abscisión (Fang y Fernández, 2002), por lo que parece que el retraso de la abscisión provocado por la expresión constitutiva de AGL15 es un efecto indirecto de la acción de este gen retrasando la senescencia y manteniendo la juvenilidad de los órganos florales.

Los mutantes *dab* (*delayed abscission*) fueron identificados en *Arabidopsis* por Patterson y Bleeker (2004). Estos mutantes muestran un retraso muy importante en la abscisión de órganos florales, mayor que la encontrada en los mutantes insensibles a etileno, sin embargo, el etileno es capaz de revertir este retraso en la abscisión en los mutantes *dab*.

**IDA** (INFLORESCENCE DEFICIENTE IN ABSCISSION) es un gen que codifica un ligando putativo que ha resultado imprescindible para que se produzca la abscisión (Butenko y cols., 2003). El mutante *ida* tiene completamente bloqueada la abscisión floral, los órganos florales permanecen unidos al fruto incluso después de la dehiscencia de la silicua. Al igual que los mutantes *dab*, las plantas *ida* responden perfectamente a etileno, el cual provoca la triple respuesta en plántulas y la senescencia de hojas en plantas adultas, pero no induce la abscisión de los órganos florales. En estudios más detallados sobre la implicación de IDA en la abscisión floral de *Arabidopsis* se comprobó que la sobreexpresión de IDA (35S:IDA) acelera la abscisión floral incluso en zonas de abscisión latentes (Stenvik y cols., 2006). Además en las plantas 35S:IDA se detectaron niveles muy elevados de proteínas arabinogalactanos (AGP) secretadas por las células de las ZA florales, niveles que se encontraban disminuidos en el fenotipo salvaje e inexistentes en el mutante *ida*. Estos datos indican que las AGPs están involucradas en el proceso de abscisión floral, y reguladas por IDA, pero aún no existen

datos publicados sobre el papel de las AGPs en el proceso. Tampoco se conoce la naturaleza del receptor de IDA, por lo que se ha especulado la posibilidad de que la proteína codificada por HAESA sea el receptor tipo kinasa de ese ligando. Butenko y sus colaboradores (2006) comprobaron que la expresión de HAESA no se veía alterada en los mutantes *ida* y que ambos genes, IDA y HAESA, se expresaban en las mismas células al mismo tiempo; pero no hay datos que confirmen definitivamente que IDA sea el ligando de HAESA en la ZA floral de *Arabidopsis*. A nivel de enzimas hidrolíticas, en los mutantes *ida* se detectaron niveles más bajos de expresión de los genes CHIT (quitinasa) y BAC (celulasa de abscisión de judía), ambos específicos y marcadores del proceso de abscisión. El patrón de expresión de IDA es diferente espacialmente en el mutante *etr1-1* comparado con la expresión en el fenotipo salvaje, pero IDA se expresa en flores al comienzo de la disolución de la PC tanto en plantas salvajes como en *etr1-1*. Si analizamos todos estos datos juntos, parece ser que IDA está influenciado por el etileno, por lo que el retraso en la abscisión en los mutantes *etr1-1* puede deberse en parte a una represión del patrón de expresión de IDA, que es imprescindible para que se complete el proceso de abscisión.

Existen otros genes que intervienen en diferentes momentos en la sucesión de eventos que dan lugar a la caída de un órgano. Tomando como modelo la abscisión floral en *Arabidopsis* se ha propuesto un esquema que incluye los genes ya citados junto con otros genes importantes en la regulación del proceso (revisado por Lewis y cols., 2006). En primer lugar los genes BOP1 y 2, son necesarios para la formación de los órganos florales y por tanto, imprescindibles para que se diferencie la ZA en la base de la flor. Una vez formada la ZA (regulado por JOINTLESS), un incremento en la expresión de los genes receptores de etileno ETR1 y EIN2 estimularían la sensibilidad de las células tipo II al etileno, induciendo la senescencia y la abscisión. El cambio en el gradiente de AIA, activa la expresión de los genes de respuesta a AIA, ARF2, 1 y 19



(AUXIN RESPONSE FACTOR) junto con NPH4 (NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL4), genes que promueven abscisión vía activación de la senescencia, en parte al inducir el gen ACCS de la biosíntesis de etileno (Ellis y cols., 2005). Los genes DAB1 y 2 como ya se ha mencionado, promoverían abscisión en una ruta independiente de etileno. Se ha comprobado que los genes que forman los complejos de remodelación de la cromatina (ARP7 y 4; Kandasamy y cols., 2005) inducen el inicio de la abscisión y la senescencia de una manera global pudiendo estar regulados por etileno aguas abajo de la percepción de esta fitohormona. Por otra parte, hemos visto que el gen AGL15 actúa retrasando la abscisión de una forma general, al mantener la juvenilidad de la planta, por lo que actuaría aguas arriba de la percepción de etileno, manteniendo las células de la ZA en un estadio juvenil que no respondería tan rápidamente a etileno. Una vez iniciado el proceso de abscisión, se induce la expresión de un conjunto de enzimas modificadoras de la PC que provocan la relajación de la misma y la degradación de la lámina media. La inducción de estas enzimas está mediada por proteínas como el ligando putativo IDA regulado por la ruta de señalización de etileno, y otras proteínas en una posible ruta independiente de etileno, como el receptor HAESA. La disolución de la PC y lámina media provoca finalmente la caída del órgano, induciéndose la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRPs), paso que también estaría regulado por etileno.

A continuación presentamos un esquema en el que intentamos incluir la información que existe hasta el momento sobre la regulación de la abscisión, teniendo en cuenta tanto la vía regulada por etileno, como aquellos genes cuya expresión no está regulada por esta hormona.

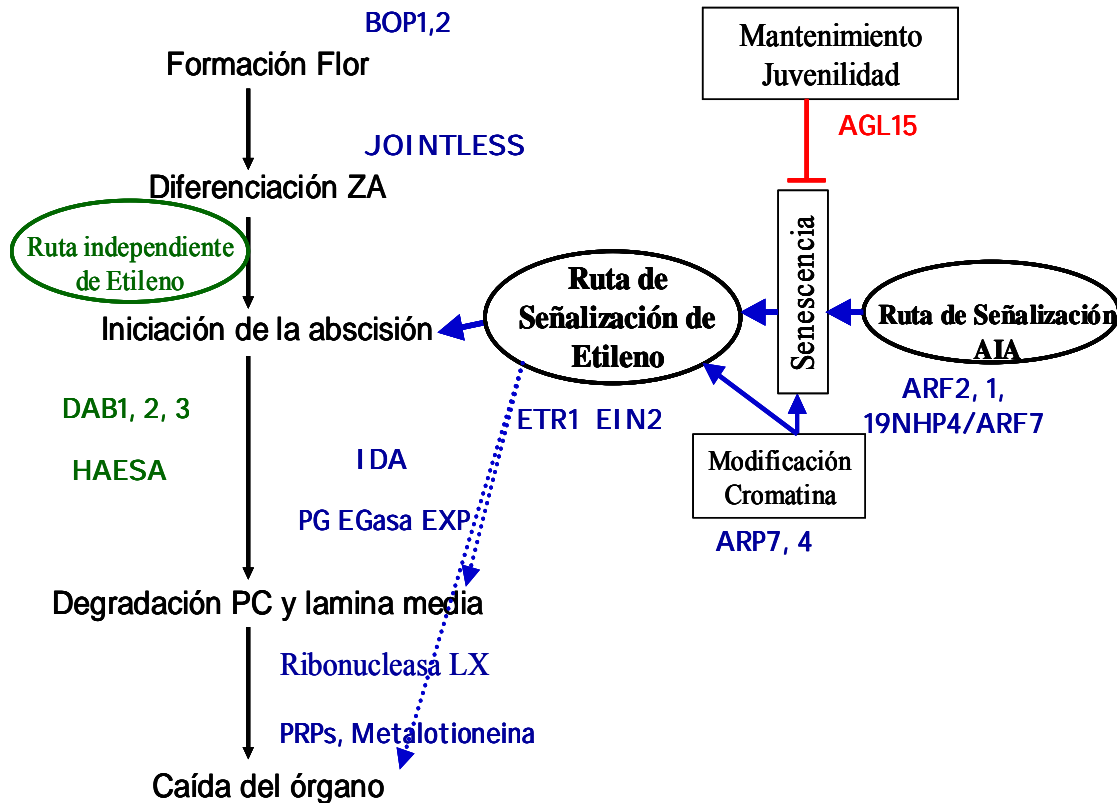


Figura 5: Organigrama del proceso de abscisión, incluyendo los principales genes que participan en el proceso. Los genes que participan en la ruta de señalización dependiente de etileno aparecen en azul, mientras que los genes implicados en la posible ruta independiente de etileno aparecen en verde.

### 2.3. Cambios ultraestructurales de la ZA

Al comenzar el proceso de abscisión aparecen los primeros cambios en las células de la ZA, que se inician con una importante activación citoplasmática. Las primeras modificaciones son un alargamiento del núcleo debido al aumento de la actividad transcripcional (Abeles, 1968), acompañado de la proliferación del retículo endoplasmático rugoso (RER), así como del número de ribosomas. Esta proliferación del RER y de polisomas es una alteración muy característica entre las diferentes ZAs de especies en las que se ha estudiado la ultraestructura durante el proceso, por ejemplo

durante la abscisión foliar de *Impatiens sultani* (Sexton, 1976; Sexton y Redshaw, 1981), en la abscisión de pedicelos florales de tabaco y tomate por Jensen y Valdovinos (1968), y en la abscisión de los foliolos de *Sambucus nigra* por Osborne y Sargent (1976a), etc. Estos cambios indican un incremento en la síntesis de proteínas que degradan la PC. Varios trabajos muestran que las cisternas del aparato de Golgi se dilatan y se forman un alto número de vesículas (Henderson y cols., 2001), y en otros casos, como en la abscisión floral de tabaco, aunque no aparece cambios cuantitativos ni en las cisternas ni en las vesículas del Golgi, sí se observa un aumento de la densidad electrónica de las vesículas del aparato de Golgi, lo que indicaría un aumento de la síntesis y/o secreción de enzimas hidrolíticas para el proceso de degradación de la pared (Lieberman y cols., 1983). Junto al incremento del RER y de las cisternas y vesículas del aparato de Golgi se ha observado la acumulación de peroxisomas e invaginaciones a lo largo de toda la membrana plasmática (Sexton y Redshaw, 1983; Osborne y Sargent, 1976a), que parecen estar depositando en la PC los materiales recién sintetizados. Estas invaginaciones van asociadas al incremento de tamaño de las células a ambos lados (distal y proximal) de la línea de división. En *Impatiens sultani* (Sexton y Redshaw, 1981) este alargamiento de las células corticales de la zona de separación ocurre por un cambio en su volumen sin apenas aumento de la superficie celular (redondeamiento). En otras especies el aumento de tamaño no solo se debe a un redondeamiento, sino que hay un crecimiento en la direccionalidad. Por tanto, aunque el mecanismo de crecimiento puede variar entre diferentes especies, el proceso es común, de manera que el alargamiento de las células de la zona de separación siempre se produce a lo largo del eje del pecíolo y en una dirección que produce tensión en los tejidos que mantienen esta zona unida. Estas observaciones junto las realizadas en tomate, tabaco, *Sambucus* y judía, indican que la separación y la expansión de las células parenquimáticas de la zona de separación, generaría la tensión en el pecíolo suficiente, para estirar y romper los vasos xilemáticos y también facilitaría la separación del cortex exterior y otros tejidos

vasculares en la abscisión (Valdovinos y Jensen, 1968; Osborne y Sargent, 1976a; Wright y Osbone, 1974). Tras el incremento en retículo endoplasmático rugoso y los ribosomas, se produce la degradación de la PC, lo que determina la aparición del plano de fractura; a esto le sigue la autólisis parcial o total del contenido celular, observándose senescencia en las células del plano de fractura proximal. Con mucha frecuencia durante el proceso de abscisión, se producen otras modificaciones anatómicas (revisado por van Doorn y Stead, 1997) como la acumulación de almidón en las células de la ZA por aumento del número de amiloplastos, aunque en algunas especies el número de amiloplastos es menor que en las células vecinas, por lo que no parece ser un requisito indispensable para la abscisión. Puede que la disolución de la pared celular esté precedida de división celular, aunque esta división celular no sea universal ni esencial para la abscisión y además cuando ocurre, se localiza fuera de la capa de separación, relacionándose con la formación de tejido de protección. Muy a menudo, la abscisión va acompañada de la formación de tilosas que participan en la protección de las partes distales de la planta frente a la invasión por patógenos tras la separación.

## **2.4. Modificaciones de la pared celular**

El proceso de abscisión culmina con la separación del órgano en cuestión del cuerpo de la planta, lo que implica la rotura de la adhesión célula-célula. Se ha comprobado en diferentes modelos de abscisión, que la separación celular comienza a nivel de la lámina media, a lo que le sigue la despolimerización de la PC primaria (en ZAs florales de tomate y tabaco por Valdovinos y Jensen, 1968).

A continuación describiremos brevemente la estructura de la PC primaria y la lámina media en células vegetales, sus principales componentes y las enzimas que se encargan de la despolimerización de éstos, para entender mejor qué sucede exactamente durante el proceso de abscisión.

En el modelo estructural más aceptado, la PC primaria está compuesta por un armazón de **microfibrillas de celulosa cristalina** [matriz paracristalina de varias docenas de cadenas de (1→4)β-D-Glucanos unidas unas a otras por puentes de hidrógeno a lo largo de toda su longitud] embebidas en una matriz compleja de polisacáridos con pequeñas cantidades de proteínas estructurales intercaladas en esa matriz (Cosgrove, 1997). Los polisacáridos que forman esta matriz se pueden dividir en dos clases, hemicelulosas y pectinas.

Las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos complejos, siendo los más abundantes en plantas fanerógamas, los xiloglucanos y los glucoarabinoxilanos (Carpita y McCann, 2000). Los xiloglucanos tienen un eje similar a la celulosa [(1→4)β-D-Glucanos] que está ramificado con residuos de xilosa al que se le añaden seriadamente residuos de galactosa o arabinosa. Los glucoarabinoxilanos consisten en un eje de (1→4)β-D-xilanos ramificado con arabinosas y ácido glucurónico, aunque también se le pueden unir otros residuos como ésteres de ácido ferúlico. Otros polisacáridos que parecen entrecruzar las microfibrillas de algunas paredes primarias son glucomananos, galactoglucomananos y galactomananos. En función de la composición en hemicelulosas se distinguen dos tipos de PC, Tipo I y Tipo II.

La mayoría de las plantas dicotiledóneas presentan PCs Tipo I, en las que la principal hemicelulosa que entrelaza las microfibrillas de celulosa es xiloglucano, formando una estructura que está embebida en una matriz de pectina. En las PCs Tipo II la principal hemicelulosa es glucoarabinoxilano y son el tipo de pared que poseen las monocotiledóneas subclase commelinidae (Darley y cols., 2001).

Las **pectinas** son un grupo de polisacáridos complejos, muy hidratados, ricos en ácido D-galacturónico, definidos clásicamente como materiales que se extraen de la PC con quelantes de  $\text{Ca}^{+2}$ , agua caliente o ácido diluido (Cosgrove, 2005). Son muy importantes en la determinación de la porosidad y grosor de la pared. Además las pectinas unen las células vecinas en una capa adhesiva llamada **lámina media**. Se le atribuyen diferentes funciones, como proporcionar una superficie cargada que modula el pH y el balance iónico de la pared, y regular la adhesión célula-célula en la lámina media. Las enzimas de la pared celular pueden unirse a la red de pectina cargada, restringiendo su actividad a regiones localizadas de la pared. Además, al limitar la porosidad de la pared, pueden afectar al crecimiento celular, regulando el acceso de las enzimas que degradan la pared a sus sustratos (Seymor y Knox, 2002).

Los principales polisacáridos constituyentes de la pectina son homogalacturanos (HGAs) y ramnogalacturanos I (RG I). Los HGAs son homopolímeros de  $(1\rightarrow4)\beta$ -D-ácido galacturónico. Hay dos tipos de modificaciones estructurales de los HGAs, los xilogalacturanos y ramnogalacturanos II. El grupo carboxil de HGA y xilogalacturanos está muy metil-esterificado, lo que bloquea los grupos ácidos y reduce su capacidad de formar geles. La enzima pectin metilesterasa (PME) localizada en la PC, rompe algunos de esos grupos metil, uniéndose el  $\text{Ca}^{+2}$  a los iones carboxilados, lo que permite que las cadenas de HGAs se condensan por entrecruzamiento con  $\text{Ca}^{+2}$ , formando zonas de empalme. Parece que la distancia entre estas uniones, es lo que crea la especificidad celular del tamaño de poro, siendo las unidades ramnosa de RG I y sus cadenas laterales las que interrumpen las uniones  $\text{Ca}^{+2}$  y contribuyen a la definición de la porosidad (Carpita y MacCann, 2000). Los RG I son heteropolímeros de repeticiones del disacárido  $(1\rightarrow2)\alpha$ -L-ramnosa- $(1\rightarrow4)\beta$ -D-ácido galacturónico. Otros polisacáridos de azúcares neutros como los arabinanos, galactanos, y arabinogalactanos, se encuentran unidos a los residuos de ramnosa de RG I, proponiéndose que aumentan la flexibilidad

de la pared y que se unen a la superficie de la celulosa. Hay dos tipos de estructuras arabinogalactanos (AG). Los AG Tipo I, que pueden encontrarse como polímeros simples o como cadenas laterales de RG I, y los AG Tipo II, que más frecuentemente aparecen como cadenas laterales de proteínas arabinogalactanos (Seymour y Knox, 2002).

En la matriz de polisacáridos que embebe la estructura formada por las microfibrillas de celulosa existe una pequeña proporción de **proteínas estructurales** que también forman redes en la pared. Existen cuatro tipos mayoritarios de proteínas estructurales de la pared, las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), las proteínas ricas en prolina (PRPs), las proteínas ricas en glicina (GRPs), y las proteínas arabinogalactanos (AGPs). La HRGP mejor estudiada en plantas es la extensina, codificada por una familia multigénica.

Las **AGPs** son glicoproteínas formadas por un eje central proteico O-glicosilado con una o más cadenas laterales de AG que se unen a hidroxiprolinas del eje proteico. El núcleo proteico supone aproximadamente el 10% del peso de las AGPs y es rico en Hyp/Pro, Ala, Ser y Thr. Presenta un dominio C-terminal hidrofóbico, que es una señal para la adición de un anclaje-glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Gaspar y cols., 2001), por el que se unen a la membrana plasmática. El núcleo proteico está glicosilado con AG tipo II, formados por cadenas de galactanos sustituidas con residuos terminales de arabinosa. La gran complejidad de las AGPs le viene dada por la gran variabilidad en las cadenas laterales, que están modificadas con diferentes proporciones de residuos de ácido D-glucurónico, L-Fucosa, L-Ramnosa, D-Xilosa y otros azúcares. Pueden localizarse en la membrana plasmática, unidas a la PC o solubles en los espacios de la PC, esta localización permite que modificaciones en su estructura tan compleja puedan servir para determinar la identidad celular o como señal para las células vecinas

(Majewska y Nothnagel, 2001). Existen evidencias de la implicación de las AGPs en procesos de división celular, en la embriogénesis somática, en el crecimiento del tubo polínico, o la abscisión (revisado por Sfeiter y Roberts, 2007), sin embargo se sabe muy poco sobre su modo de acción.

## **2.5. Cambios Bioquímicos y moleculares**

Los estudios de la ultraestructura de la PC revelan que al iniciarse el proceso de abscisión se produce un incremento de la síntesis de ARN (Abeles, 1968), junto con una proliferación del RER y de polisomas (Valdovinos y Jensen, 1968) en las células de la ZA, lo que pone de manifiesto el requerimiento de síntesis de nuevos ARNm y proteínas para que tenga lugar la abscisión. A nivel molecular, los estudios sobre estas proteínas necesarias para la caída del órgano en cuestión, se han centrado en los cambios en el patrón de expresión de enzimas hidrolíticas de la PC, así como en genes que están regulados positivamente durante el proceso de abscisión, buscando proteínas que intervengan de manera importante en este proceso.

### **2.5.1. Enzimas que modifican la PC en abscisión**

Los primeros signos de degradación de la PC durante la abscisión se producen a nivel de la lámina media (Peterson y cols., 1996), lo que puede observarse como una disminución en la tinción de compuestos ricos en pectina de la PC, disminuyendo las pectinas insolubles a medida que aumenta la proporción de pectinas ácidas solubles (Osborne, 1989). La disolución de la PC también puede conllevar la degradación de celulosa y hemicelulosas, observándose algunas microfibrillas de celulosa disociadas (revisado por Roberts y cols., 2002). Hay diferentes factores que contribuyen a la relajación de la PC, como la disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  y del pH, pero principalmente se debe a un incremento en la actividad de enzimas que modifican la PC.



El proceso de separación involucra un conjunto de enzimas solubilizadoras de la pared, por lo que fueron las primeras en estudiarse e involucrarse con el proceso de abscisión. A continuación se describe el papel de las principales enzimas que degradan y modifican la PC en el proceso de abscisión.

- Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa: La mayoría de la EGAsas en plantas pertenecen a la familia 9 glicósido hidrolasa que despolimeriza polisacáridos que contienen enlaces 1,4- $\beta$ -D-Glucanos. También son conocidas como celulasas, aunque en plantas solo unas pocas, aquellas que presentan dominio de unión a celulosa, tienen actividad sobre la celulosa cristalina. Aunque no hay mucha información sobre la especificidad de sustrato de las EGAsas, parece que la mayoría despolimerizan glucanos no cristalinos como los xiloglucanos (Cosgrove, 2005). Libertini y sus colaboradores (2004) agrupan las EGAsas en 3 subfamilias apoyados por análisis filogenéticos de las secuencias completas de las EGAsa de *Arabidopsis*, arroz y otras especies vegetales y validado estadísticamente por un análisis bootstrap con valores  $\geq 90\%$ . Esas tres subfamilias son las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  EGAsas. Las  $\alpha$  y  $\beta$  presentan un péptido señal N-terminal con el que son secretadas a la PC, siendo este péptido señal considerablemente más largo en las  $\beta$ -EGAsas. Las  $\gamma$ -EGAsas son proteínas más largas y presentan un dominio transmembrana N-terminal de unión a la membrana plasmática, por lo que se cree que están de cara al citoplasma y que participarían en la síntesis de celulosa. A esta subfamilia pertenecen las KOR de *Arabidopsis*. Las  $\alpha$  y  $\beta$ -EGAsas están involucradas en diferentes procesos fisiológicos como elongación, maduración y abscisión, además de existir un subgrupo de  $\alpha$ -EGAsas (entre ellas la Cel 8 de tomate) que parecen degradar celulosa cristalina (revisado por Libertini y cols., 2004).

Las EGAsas en plantas, pertenecen a familias multigénicas, formadas por diferentes isoenzimas que participan en diversos procesos fisiológicos como

maduración de frutos, síntesis de celulosa, abscisión, etc. Se han caracterizado isoenzimas específicas del proceso de abscisión en varias especies. A pesar de haberse demostrado la implicación de las EGasa en la disolución de la pared celular durante este proceso, no está claro cómo contribuyen al proceso de separación. Parece que están involucradas en la desaparición de las hemicelulosas, permitiendo la expansión de las células de la capa de separación (revisado por Brown, 1997). Se han documentado incrementos en la actividad de EGAsas implicadas en abscisión a lo largo de este proceso en ZAs de diferentes especies, como en cáliz de naranjas (Burns y cols., 1998), en hojas de tomate (Wang y cols., 2005), o en hojas de judía y de *Sambucus* (revisado por Roberts y cols., 2002). También existen numerosas evidencias sobre la inducción de la síntesis de EGAsas específicas de abscisión durante este proceso, que como se ha mencionado anteriormente, en la mayoría de los casos está regulada positivamente por etileno e inhibida por AIA. En judía se ha identificado una celulasa de punto isoeléctrico (pI) 9.5 que se acumula específicamente en la ZA de hojas, BAC, *Bean abscission cellulase* (Tucker y cols., 1988; del Campillo y Lewis, 1992b). En tomate se han clonado 8 genes de EGAsas, de ellos Cel1, Cel2, Cel5 y Cel6 participan en la abscisión floral de tomate, habiéndose comprobado la necesidad de un aumento en la expresión de Cel1, Cel2 y Cel5 para que tenga lugar la separación, Cel 2 y Cel 5 se acumulan durante todo el proceso, mientras que el incremento de la expresión de Cel 1 se concentra al final del proceso de abscisión justo antes de la separación (del Campillo y Bennett, 1996; Brummell y cols., 1999). También se han identificado EGasa específicas del proceso de abscisión en ZAs de hojas y flores de melocotón PpEG4 y ppEG1 (Trainotti y cols., 1997 y 2006). En *Arabidopsis* la familia génica EGasa está compuesta por más de 27 genes diferentes, pero aún no se ha implicado a ninguno de ellos en el proceso de abscisión (del Campillo, 1999).

- Poligalacturonasa: Es una enzima clave en la despolimerización de la pectina, ya que hidroliza los enlaces  $\alpha$ -(1-4) entre residuos de ácido glucurónico adyacentes en el eje de la pectina. No se conoce con exactitud sus requerimientos de sustrato, pero parece que solo actúa entre residuos galacturónicos de-esterificados (Seymour y Knox, 2002), por lo que requeriría de la acción previa de una Pectin esterasa que disminuyera el grado de metilación de la pectina.

Las PG se identificaron hace más de 40 años y se han involucrado en procesos del desarrollo en los que se produce degradación de pectina como abscisión y dehiscencia de vainas y anteras, maduración de frutos, maduración y crecimiento del tubo polínico, etc (revisado por Hadfield y Bennett, 1998).

Durante el proceso de abscisión se ha detectado un incremento de la actividad PG que en general coincide con una disminución de la resistencia de la ZA (*Breakstrength*). La actividad PG aumenta en la ZA floral durante la abscisión en tomate (Wang y cols., 2005; Tucker y cols., 1984), en frutos de palmera (Henderson y cols., 2001), o en foliolos de *Sambucus* (Rose y cols., 2003). Al igual que la EGasa, la PG pertenece a familias multigénicas, habiéndose identificado isoformas específicas de abscisión, divergentes de PGs involucradas en otros procesos. En tomate se han identificado tres PGs relacionadas con abscisión, TAPG1, TAPG2 y TAPG4 (Hong y cols., 2000). La expresión de TAPG1 y 4 se limita a la ZA de hojas, flor, fruto y órganos florales. TAPG4, se expresa al inicio del proceso de abscisión en la zona de los haces vasculares, más adelante en el proceso se induce la expresión de TAPG1 en toda la ZA. Estas tres PG son muy homólogas entre ellas pero muy divergentes de la PG de maduración de fruto. En *Arabidopsis* se ha identificado una PG específica de abscisión PGAZAT a través de su homología con la PG de abscisión de *Brassicca napus* PGAZBRAN (González-Carranza y cols., 2002). PGAZBRAN se expresa durante la

abscisión de hojas y flores y su ARNm se acumula antes de la caída de la hoja. PGAZAT se expresa en la ZA de órganos florales, a medida que avanza el proceso de abscisión. La expresión de las PGs de abscisión de tomate, *Arabidopsis* y *B.napus*, citadas, se induce por etileno y se inhibe por AIA. El diferente patrón de expresión de PGs que se expresan en la misma ZA (TAPG1, 2 y 4) podría indicar una respuesta diferencial por determinado grupo de células en la ZA con respecto a otras.

- Expansina (EXP): son proteínas de la PC que se identificaron por inducir la extensión dependiente de pH (crecimiento ácido) en PCs aisladas de hipocotilos de pepino (McQueen-Mason, 1992). No presentan actividad hidrolítica sino que actúan interrumpiendo los puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y otros glucanos a los que están unidos, concretamente interrumpirían los enlaces celulos-xiloglucanos. Parece que se desplazan a lo largo de la superficie de las microfibrillas de celulosa, lo que le permite relajar de manera localizada el punto de unión de las microfibrillas de celulosa con el complejo de xiloglucanos que las mantienen unidas, relajando así la unión entre microfibrillas de celulosa y creando el espacio necesario para la actuación de enzimas hidrolíticas, además de permitir la extensión de la pared (Cosgrove, 2000a). Las expansinas se han clasificado en cuatro familias, dos de ellas se ha comprobado que participan en la extensión de la PC las  $\alpha$ - y  $\beta$ -Expansinas. Estas dos familias de genes se caracterizan por presentar un péptido señal N-terminal, así como una serie de cisteínas conservadas y un motivo HFD (histidina, fenilalanina, ácido glutámico). Ambas presentan dos dominios conservados, el dominio 1, homólogo a la familia 45 de endoglucanasas, y el Dominio 2 que es homólogo al dominio 2 de alergenos de polen de gramíneas. Las  $\alpha$ -Exp se diferencian de las  $\beta$ -Exp por no presentar un dominio de glicosilación N-linked que sí presentan las  $\beta$ -Exp, además de otras diferencias en motivos conservados en las  $\alpha$ - o  $\beta$ -Exp en su secuencia aminoacídica (Cosgrove y cols., 2002).

Las expansinas además de tener un papel muy importante en la extensión celular durante el crecimiento celular, se han visto implicadas en abscisión, ablandamiento del fruto, o la invasión del estigma por el tubo polínico en gramíneas (Cosgrove, 2000b).

La primera asociación entre abscisión y expansinas fue propuesta por Cho y Cosgrove (2000) en plantas de *Arabidopsis* en las que la expansina AtEXPA10 estaba sobreexpresada o inhibida. En las plantas que sobreexpresaban AtEXPA10 se produjo la abscisión en la base del peciolo de la hoja, que normalmente no abscinde en *Arabidopsis*, sin embargo no se detectó la expresión de este gen en las ZAs verdaderas de *Arabidopsis*. Evidencias más claras de la implicación de las expansinas en la abscisión, vienen de trabajos en *Sambucus nigra* y en *Rosa bourboniana*. En *Sambucus* se describió el incremento de la actividad expansina a lo largo del proceso de abscisión inducido por etileno y se aislaron dos expansinas cuya expresión se detectaba exclusivamente en ZAs inducidas por etileno, SniExp2 y SniExp4 (Belfield y cols., 2005). La expresión de la expansina RbEXPA1 está asociada a la abscisión natural de los pétalos en (Sane y cols., 2007), además su expresión se induce por etileno y se inhibe por auxinas.

- Pectin metilesterasa o pectin esterasa (PME): Aparece en prácticamente todos los tejidos de la planta expresándose a lo largo de todo su desarrollo. Esta enzima elimina los ésteres metilo de los residuos esterificados de ácido galacturónico, convirtiendo su carbón C-6 en ácido carboxílico. Como hemos mencionado anteriormente, la desmetilación llevada a cabo por PME, permite la unión de  $\text{Ca}^{+2}$  en los ácidos carboxílicos creándose zonas de empalme de cadenas HGA, aumentando la rigidez de la membrana (Carpita y McCann, 2000). En procesos como la maduración de frutos o la abscisión, aumenta el grado de desmetilación de la PC pero las

concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  se mantienen bajas, de manera que disminuyen las zonas de empalme de HGA y por tanto la rigidez de la membrana, por lo que la actividad PME parece ser importante en procesos que involucren solubilización de pectinas. Recordemos que la PG necesita que se produzca la despolimerización de la pectina para poder actuar. Se ha comprobado que están involucradas en el crecimiento y maduración de frutos en tomate (Seymour y Knox, 2002), sin embargo en las ZAs de las especies analizadas, ha sido más difícil establecer cambios en su actividad asociados al proceso de abscisión. Uno de los pocos ejemplos en los que se ha detectado un incremento, aunque leve, de la actividad PME en la abscisión, es en la abscisión floral de tomate (Wang y cols., 2005).

- Xiloglucan endotransglucosilasa (XET): Esta enzima corta xiloglucanos en el eje de la lámina media y transfiere uno de los fragmentos a otro xiloglucano (Cosgrove, 2003). Al ser los xiloglucanos la principal hemicelulosa de la PC primaria Tipo I se han propuesto varias funciones para XET incluyendo, relajación de la pared, aumento de la fuerza de ésta, reestructuración de la pared durante la maduración de frutos, abscisión etc. (Cosgrove, 2005). Al igual que ocurre con PME, existen muy pocas pruebas directas que apoyen la implicación de XET en la relajación de la PC. Por el contrario se ha comprobado que su actividad aumenta durante la maduración de frutos de Kiwi (van Doorn y Stead, 1997). No se han documentado alteraciones en la actividad y/o expresión de esta enzima durante el proceso de abscisión

### **2.5.2. Genes regulados positivamente durante la abscisión**

Se han identificado genes cuya expresión está regulada positivamente durante la abscisión, codificando la mayoría de ellos, proteínas relacionadas con la patogénesis. Esto es lógico si tenemos en cuenta que tras la caída del órgano, esta zona de la planta se hace más susceptible a la invasión por patógenos. Estas proteínas se han encontrado

en ZAs de hojas de judía (del Campillo y Lewis, 1992) y en la ZA del foliolo de *Sambucus* tratada con etileno (Coupe y cols., 1997).

En judía se aislaron una quitinasa específica de la ZA y dos proteínas PR (patogénesis-related). En *Sambucus* las proteínas que estaban reguladas positivamente en ZAs tratadas con etileno incluían una quitinasa clase IV y otra clase I, una  $\beta$ -1,3-glucanasa, una polifenoloxidasa (PPO), proteínas tipo PR-1 y PR-4, un inhibidor de proteinasas y una proteína tipo metalotioneína. La quitinasa clase IV y la PPO tenían un requerimiento absoluto de etileno, mientras que PR-4 se acumula al mismo nivel independientemente de que la ZA se exponga a etileno o no. La proteína tipo Metalotioneína, puede que se encargue de eliminar los radicales libres que de otra forma, se acumularían en la ZA. Todas estas proteínas no participan en la consecución de la separación del órgano, sino en la protección de la zona expuesta tras la caída del órgano a la invasión por patógenos.

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---





*C. pepo* morfotipo Zucchini (calabacín) es la especie cultivada del género *Cucurbita* de mayor importancia económica a nivel mundial. El cultivo del calabacín variedad Zucchini en España actualmente supera las 300.000 toneladas, concentrándose en Almería el 70% de la producción española, donde se ha convertido en el cuarto cultivo en importancia en cuanto a productividad (236.000 toneladas en 2006), y rentabilidad. En los invernaderos del sudeste español se producen dos cosechas anuales de este cultivo: una cosecha de otoño-invierno, y otra de primavera-verano. En las condiciones ambientales de la segunda cosecha (fotoperiodo día largo, radiación y temperaturas elevadas), se ha observado en todos los cultivares utilizados de calabacín la formación de un tipo frutos que provienen de flores femeninas que no han completado su desarrollo, y que además pierden parcial o totalmente su unisexualidad, ya que desarrollan reductos de anteras en el tercer verticilo floral, que en ocasiones contienen polen maduro. Este tipo de flores presenta además una característica que resulta muy negativa para los agricultores, el retraso en la abscisión floral, de manera que durante el desarrollo del fruto la flor no cae, permanece pegada a él, y esto en la mayoría de los casos da lugar a la podredumbre de esa zona y del fruto, lo que ocasiona graves pérdidas en cosecha. Este fenómeno se conoce como “flor pegada”.

Con el objeto de dilucidar tratamientos que puedan paliar esta anomalía, hemos iniciado el estudio y caracterización de la zona de abscisión floral de calabacín, así como de las hormonas implicadas en el proceso, tanto de flores masculinas como femeninas, así como el estudio de la zona de abscisión de las “flores pegadas”. Se han utilizado para este estudio dos variedades que presentan grandes diferencias en cuanto a porcentajes de flor pegada: Cora (bajo porcentaje de frutos con flor pegada) y Cavili (una de las variedades que presenta mayor porcentaje de frutos con flor pegada).

Concretamente, los objetivos de esta Memoria han sido:

1. Caracterización estructural a microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de la zona de abscisión de flores masculinas, femeninas y flor pegada.
2. Estudio fisiológico de las enzimas implicadas en la modificación de las paredes de la zona de abscisión, PG, celulasas, expansinas, pectinmetilesterasas, que han sido descritas en otras especies; además de la caracterización molecular de dichas enzimas.
3. Estudio de la dependencia hormonal de la zona de abscisión. En concreto, puesto que el etileno es la hormona que acelera la abscisión en la mayor parte de los estudios publicados, el objetivo ha sido estudiar la posibilidad de que la zona de abscisión de calabacín responda a etileno, si el etileno es capaz de activar la abscisión en la flor pegada, y si las enzimas relacionadas con el proceso se activan o no en presencia de esta fitohormona.
4. Estudio de la expresión y traducción de genes inducidos por etileno en la zona de abscisión.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. Material Vegetal

El material vegetal se obtuvo a partir de híbridos comerciales de diferentes compañías de semillas. Se utilizaron dos híbridos de calabacín (*Cucurbita pepo* morfotipo *Zucchini*) que presentaban en diferente grado el síndrome “flor pegada”. La variedad Cora (suministrada por Clause-Tezier), con un bajo porcentaje de flor pegada en condiciones de cultivo a altas temperaturas (ver Introducción), y la variedad Cavili (suministrada por Nunhems) con un elevado porcentaje de flor pegada en las mismas condiciones (ver Introducción). Las semillas de ambas variedades se germinaron a 25°C en oscuridad durante 48-72 horas en placas de Petri y sobre papel de filtro humedecido con agua destilada. Una vez germinadas las semillas se trasplantaron a tacos de lana de roca (Grodan) y se llevaron al invernadero. Cuando las plántulas desarrollaron la tercera o cuarta hoja los cepellones se transfirieron a bloques de lana de roca de un metro de largo, colocando 2 plántulas por bloque. Las plantas crecieron en cultivo hidropónico en un invernadero tipo parral perteneciente al centro del IFAPA en La Mojonera (Almería). La solución nutritiva se aportó a través del riego, que fue por goteo de alta frecuencia, este riego se automatizó controlando diariamente el consumo medio del cultivo, aumentando o disminuyendo la frecuencia del riego en función de la demanda de éste. Se emplearon los criterios locales de control de plagas y enfermedades. Los ensayos se llevaron a cabo en ausencia de insectos polinizadores.

Se realizaron dos cultivos por año, uno en otoño e invierno (octubre-febrero 2005 y 2006), con temperaturas que no sobrepasaron los 30°C, y otro en primavera y verano (mayo-julio 2005 y 2006), con temperaturas que alcanzaron más de 40°C en el invernadero. Los datos de temperatura fueron obtenidos con un registrador de temperatura (Hobo temp).

## **2. Aplicación de Etileno y el inhibidor de su síntesis AVG**

Para evaluar el grado de implicación de la fitohormona etileno en el proceso de abscisión floral se diseñaron experimentos con flores escindidas de la planta a la altura del pedúnculo, así como con zonas de abscisión aisladas, separadas de la flor con la ayuda de un escalpelo. A este material se le realizaron los siguientes tratamientos: Uno en el que se aplicó Ethrel®-48, agente liberador de etileno a pH ligeramente básico (Warner y Leopold, 1969; Ben-Tal y Lavee, 1976); y un segundo en el que se trató con AVG (1-aminoetoxivinilglicina), inhibidor de la ACC sintasa y por tanto de la síntesis del etileno (Serek y col., 2006). Los tratamientos se realizaron en las dos variedades de calabacín estudiadas.

### **2.1. Tratamiento de Ethrel y AVG sobre flor completa**

Se trataron flores femeninas en el estadio 4 previo a la antesis (preantesis 4) y antesis, así como flores masculinas en los estadios de preantesis 3 y 4, y en antesis (ver Resultados).

Estas flores de las variedades Cora y Cavili se separaron de la planta a la altura del pedúnculo usando un bisturí y se colocaron sobre agar 1%. Las flores se trataron con AVG 100µM en agua (0.7ml/flor) o con Ethrel®-48 (48g/L ácido 2-cloroetilfosfónico) 0.12% en agua. Ambos productos se aplicaron por pulverización. Como control se utilizaron flores pulverizadas con H<sub>2</sub>O; y también flores sin tratar. Tras el tratamiento se incubaron a 25°C en oscuridad, anotándose los días requeridos por cada flor para abscindir. Las flores se mantuvieron en estas condiciones hasta que aparecieron signos de pudrición (6-7 días). Se utilizaron un mínimo de 12 flores femeninas y 6 masculinas por tratamiento y se realizaron al menos 2 tratamientos independientes.

## **2.2. Tratamiento de Ethrel sobre secciones de zona de abscisión**

Se utilizaron flores femeninas en los estadios de preantesis 2, 3, y 4 y flores masculinas en preantesis 3, 4 y antesis.

Estas flores de las variedades Cora y Cavili se separaron de la planta a la altura del pedúnculo usando un bisturí y se llevaron al laboratorio (en neveras portátiles a 4°C). En el laboratorio se aislaron las ZAs (Figura 34 en Resultados) y se colocaron sobre agar al 1.5% donde se les aplicó el tratamiento de ethrel o control descrito en el apartado anterior. Tras el tratamiento se incubaron a 25°C en oscuridad. En los tratamientos que se realizaron para estudiar la evolución de la abscisión las ZAs se mantuvieron en estas condiciones hasta que aparecieron signos de pudrición (5 o 6 días tras el tratamiento). Se utilizaron un mínimo de 12 ZAs por tratamiento, realizando como mínimo 3 tratamientos independientes.

Para la realización de los análisis fisiológicos y moleculares se trataron ZA de flores femeninas en preantesis 4 y de flores masculinas en preantesis 3, recogándose el material de flores femeninas 48h tras el tratamiento (hpt), y el de flores masculinas 24 hpt. Este material se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

En algunos análisis se tomó como control negativo tejido que no pertenecía a la ZA, al que llamamos no-ZA. Corresponde a tejido del pedicelo de la flor masculina, o del pedúnculo de la flor femenina, y que se encontraba como mínimo a 5 cm de la ZA. Se realizaron cortes transversales de aproximadamente 4mm de grosor, que fueron tratados con ethrel del mismo modo que la ZA. La no-ZA de flores masculinas se congeló en N<sub>2</sub> líquido 24hpt y la de flores femeninas 48hpt.



### **3. Actividades hidrolíticas Celulasa y Poligalacturonasa**

El proceso de extracción se realizó a 4°C. El material vegetal se maceró en N<sub>2</sub> líquido y se homogeneizó con tampón de extracción (Tris 0.1M, Cl<sub>2</sub>Mg 10mM, DTT 10mM, PMSF 0.15mM, Tritón X-100 0.3% y Azida Sódica 0.03%) en proporción 1:3 (p:v). El homogenado se filtró utilizando una gasa de nylon y se centrifugó a 20.000g durante 20 minutos. El sobrenadante se dializó durante 21h a 4°C frente a 800 ml de una dilución 1:9 del tampón de extracción, en una membrana de diálisis con un punto límite de peso molecular (MWCO) de 14KDalton. El extracto enzimático resultante se congeló a -20 °C hasta el momento de realizar los ensayos de actividad endoglucanasa y endopoligalacturonasa.

Ambas actividades hidrolíticas se ensayaron siguiendo el método de viscosimetría descrito por Rejón-Palomares y col., (1996).

Los sustratos utilizados fueron carboximetilcelulosa y poligalacturonato sódico, para los ensayos de actividad celulasa y endopoligalacturonasa respectivamente. La reducción de viscosidad para dichos sustratos, como medida de la actividad, se determinó en un intervalo de 30 minutos. Se anotó el tiempo que tardó el menisco de 0.5 ml de mezcla de reacción en recorrer el espacio entre la marca de 0.7 y 0.2 ml en una jeringa de 1 ml. La mezcla de reacción estaba formada por 1 ml de carboximetilcelulosa al 0.5 % (para la actividad celulasa) ó 1 ml de poligalacturonato sódico al 1% (para la actividad endopoligalacturonasa) en tampón cítrico-fosfato 50 mM (pH 5) y 0.2 ml del extracto enzimático. La reducción de la viscosidad se determinó a 37°C.

Se realizaron dos repeticiones independientes para cada muestra con tres réplicas/muestra en cada ensayo.

La actividad enzimática se expresó como actividad específica (U/mg proteína), siendo una unidad, el tiempo en horas necesario para una pérdida de viscosidad del 50% x 10<sup>3</sup>.

## **4. Actividad Expansina**

Se siguió el protocolo descrito por Belfield y col., (2005)

### **4.1. Extracción de las proteínas de la pared celular**

El material vegetal se maceró con N<sub>2</sub> líquido y se homogeneizó en tampón de homogenización pH 6.8 (HEPES 25mM, EDTA 2mM, metabisulfito sódico 2mM, DTT 2mM, 0.1% Triton X-100 y 1% PVPP) en proporción 1:6 (p:v). El homogenado se centrifugó a 15000g durante 5 minutos a 4°C descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces en tampón de lavado (HEPES 25mM, EDTA 2mM, metabisulfito sódico 2mM y DTT 2mM) en proporción 1:8 (p:v), recogiendo el sobrenadante por centrifugación. El precipitado se resuspendió en tampón de extracción (HEPES 25mM, EDTA 2mM, metabisulfito sódico 2mM, DTT 2mM y NaCl 1M) en proporción 1:1 (p:v). Las paredes se mantuvieron en incubación durante 2h a 4°C o 1h a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 11000g durante 5 minutos, recuperando el sobrenadante.

### **4.2. Precipitación de las proteínas de la PC**

Las proteínas se precipitaron añadiendo lentamente al sobrenadante anterior sulfato amónico en proporción 1:0.4 (v:p). Se incubó durante 1h en hielo con agitación suave. Se centrifugó a 10000g durante 10 minutos y se eliminó totalmente el sobrenadante. El precipitado conteniendo las proteínas de la PC de cada muestra se congeló a -20°C hasta su utilización.

### 4.3. Ensayo de extensometría

Se resuspendió el precipitado de proteínas obtenido en acetato sódico pH 4.5, en proporción 1:0.3 (peso del que se partió:volumen).

Se cortaron tiras de aproximadamente 4mm de grosor y 15mm de longitud, de un material compuesto por celulosa y xiloglucanos sintetizado por *Acetobacter xylinium*. Cada tira de material celulósico se colocó en una pinza del extensómetro (seis réplicas/muestra). Se añadieron 100µl de Acetato Sódico pH 4.5 y se dejó equilibrar el aparato durante 5min, a continuación se reemplazó el Acetato Sódico por 80µl de extracto proteico, que se dejó actuar durante 10min.

Se realizaron dos ensayos independientes con 6 repeticiones/muestra en cada uno.

La actividad expansina se determinó como la diferencia entre la velocidad de extensión del material celulósico después de haber añadido el extracto proteico y antes de añadirlo, expresándose en µm de extensión /min•mg de proteína (µm/min•mg).

## 5. Actividad pectina metil esterasa (PME)

La actividad PME se cuantificó mediante el ensayo de difusión en gel descrito por Downie y col., (1998).

Se preparó un gel compuesto por ácido cítrico 0.1M, fosfato sódico dibásico 0.2M, pectina esterificada en un 90% y agarosa 1%; pH 6.3. La mezcla se llevó a ebullición para disolver la agarosa, y tras dejar enfriar se vertió sobre placas de Petri (25ml/placa). Una vez polimerizado el gel se realizaron en él agujeros de 2mm de diámetro. En cada agujero se añadieron 2µl de extracto proteico de la PC en acetato sódico pH 4.5 (ver apartado 4.1. y 4.2.). Las placas se incubaron durante 16h a 37°C. Se tiñeron con rojo rutenio (*ruthenium red*) 0.02% durante 1h, tras este tiempo las placas se

lavarón con H<sub>2</sub>O hasta eliminar el fondo. El diámetro de las áreas teñidas de rojo se midió con un compás.

Se realizaron dos análisis diferentes para cada muestra con tres réplicas/muestra en cada uno.

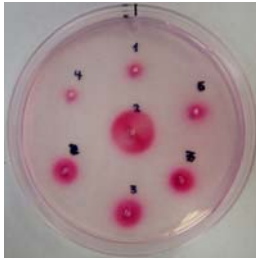


Figura 1: Ejemplo de una placa del ensayo de difusión en gel para la actividad PME.

La actividad se calculó en nanokatales en base a la curva estándar, realizada a partir de la PME comercial de piel de naranja (Sigma-Aldrich) ensayada bajo las mismas condiciones. La curva estándar se generó desde el logaritmo de la actividad comercial de la enzima (Katales) frente al diámetro de la zona teñida.

## **6. Actividad quitinasa**

La actividad quitinasa se determinó con un ensayo colorimétrico con chitin-azure® (Kim y col., 2000), que es un complejo formado por quitina unida covalentemente al colorante Remazol Brilliant Violet5R (Sigma-Aldrich). Los extractos proteicos de la PC (ver apartado 4.1. y 4.2.) se resuspendieron en tampón fosfato 25mM pH 7. La mezcla de reacción contenía 400µl de extracto proteico y 200µl de la suspensión de chitin azure® 5mg/ml en tampón fosfato 0.2M pH 7. Se incubó durante 1h a 37°C, se dejó enfriar, se centrifugó durante 10min a 12000g y se midió la absorbancia del sobrenadante a 550nm.

Se realizaron 2 repeticiones independientes por muestra, y tres réplicas por muestra en cada repetición.

La actividad se expresó como la Absorbancia a 550nm/mg proteína•h ( $A_{550}/\text{mg}\cdot\text{h}$ )

## **7. Cuantificación proteica**

La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976), usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

## **8. Extracción de ADN e hibridación tipo Southern**

### **8.1. Extracción de ADN genómico**

El ADN genómico de calabacín, se extrajo a partir de hojas jóvenes de Cora y Cavilí según el método descrito por Martín-Platero y col., (2007).

Un gramo de material vegetal se maceró en N<sub>2</sub> líquido y se homogeneizó con 6ml de tampón de extracción [Tris-HCl 100mM, EDTA 100mM, NaCl 10mM, 1%SDS (pH 8)]. El homogenado se agitó vigorosamente durante 2 minutos y se incubó durante 1h a 65°C. A continuación se añadieron 30µl de una solución de ARNasa 100mg/ml (Roche), se mezcló por inversión 25 veces, se incubó a 37°C durante 15min y se mantuvo 5min a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 2ml de acetato sódico 3M pH 5.2 se agitó vigorosamente durante 20 segundos y se centrifugó a 13000g durante 5 minutos. Recuperamos el sobrenadante al que se le añadieron 6ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000g durante 1 minuto. Lavamos el precipitado 2 veces con etanol 70% centrifugando cada vez a 13000g durante 1 minuto. El precipitado obtenido del último lavado se dejó secar y se resuspendió en 50µl de H<sub>2</sub>O mQ.

La cantidad y calidad del ADN, se determinó por visualización en gel de agarosa 0.8% teñido con Bromuro de Etidio (BrEt) y comparación con un marcador de peso molecular de concentración conocida, el fago  $\lambda$  digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII.

## **8.2. Análisis genómico: Southern Blot**

El ADN de Cora y Cavili (10 $\mu$ g) se digirió con las enzimas de restricción EcoRI, HindIII y BamHI (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El ADN digerido se separó en geles de agarosa 0.8% en TAE (Tris 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM) a 20V durante 16h. Seguidamente se desnaturizó el ADN en HCl 0.25M durante 20min. El gel con el ADN desnaturizado se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Nitran-N (Scheicher & Schuell) utilizando como solución de transferencia NaCl 0.6M y NaOH 0.4M. La fijación del ADN a la membrana se realizó por calor, a 80°C durante 2h. A continuación la membrana se prehibridó durante 2h a 42°C en tampón de hibridación [Formaldehído 50%, SDS 7%, 5X SSC, Blocking Reagent 2% (Roche), fosfato sódico 50mM, N-laurilsarcosina 0.1% (pH 7)]. La hibridación se realizó durante 16h a 42°C en tampón de hibridación al que se le había añadido la sonda desnaturizada a 100°C durante 5min. El listado de sondas empleadas para cada gen aparece en la Tabla 2, éstas se marcaron mediante PCR por la incorporación de DIG-dUTPs empleando las instrucciones de “PCR DIG Probe Synthesis Kit” (Roche).

Tras la hibridación la membrana se lavó dos veces en 2X SCC y SDS 0.1%, a temperatura ambiente durante 15min, y dos veces en 0.5X SCC y SDS 0.1%, a 68°C durante 30min. Se procedió a la detección inmunológica siguiendo las instrucciones de

“DIG Luminiscent Detecction Kit” (Roche). Por último, las membranas se expusieron por un mínimo de 16h en película KODAK AR X-Omat.

## **9. Extracción y manipulación de ARN e hibridación tipo Northern**

### **9.1. Extracción de ARN total**

Durante todo el proceso de extracción de ARN se mantuvieron las precauciones habituales, necesarias para evitar la contaminación del material con ARNasas que pudieran degradar el ARN: esterilización del material de vidrio en estufa a 180°C durante 3horas, material de plástico de un solo uso y libre de ARNasas, tratamiento del H<sub>2</sub>O y tampones sin residuos –NH<sub>2</sub> con DMPC 0.1% y uso de guantes.

Cuando la cantidad de material fue inferior a 500mg el ARN se extrajo mediante el “RNeasy Plant Mini Kit” de Quiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando la cantidad de material fue superior a 500mg el ARN se extrajo siguiendo el método descrito en Verwoerd y col., (1989). El material vegetal se homogenizó en N<sub>2</sub> líquido. Se tomó 1g de material vegetal macerado y se añadieron 5 ml de tampón de extracción [LiCl 0.1M, Tris 0.1 M pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y SDS 1% (1:1)], previamente calentado a 60°C y 5ml de fenol. La mezcla se homogenizó con agitación durante 30 segundos y se centrifugó a 3000g durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa a la que se le añadió 1 volumen de Cloroformo, se agitó durante 30 segundos y se centrifugó a 3000g durante 5minutos. Se tomó la fase acuosa a la que se añadieron 1/3 volúmenes de LiCl 8 M. El ARN se precipitó a 4°C durante toda la noche y se recogió centrifugando a 8000g durante 10minutos. A continuación se lavó el ARN con EtOH 70% frío (-20°C). Tras eliminar el EtOH se dejó secar el ARN antes de resuspenderlo en 40µl de H<sub>2</sub>O DMPC.

## **9.2. Tratamiento del ARN con ADNasa**

Independientemente del método de aislamiento, el ARN de los diferentes tejidos de Cora y Cavili se trató con ADNasa I (Promega), para eliminar restos de ADN genómico. Para 10µg de ARN se añadieron 40U de ADNasa y 40U de inhibidor de ARNasa, se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguido de 5 minutos a 60°C, y se diluyó en 250µl de H<sub>2</sub>O DMPC para inhibir la enzima. El ARN libre de ADN se extrajo dos veces con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). El ARN se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol 96% frío, y tras una centrifugación a 13000g, se resuspendió en H<sub>2</sub>O DMPC hasta una concentración final de 1 µg/µl.

Para comprobar la calidad y cantidad de ARN total obtenido, se visualizó en gel de agarosa a 0.8% (teñido con BrEt) en tampón TAE realizado con H<sub>2</sub>O DMPC 0.1%. Las cubetas y los peines de electroforesis se incubaron durante 3h en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% y se enjuagaron en H<sub>2</sub>O DMPC. La cuantificación de la cantidad de ARN de cada muestra se realizó en un sistema NanoDrop®.

## **9.3. Análisis de expresión: Northern Blot**

Una vez corregidas las cantidades de ARN por densitometría, 10µg de ARN/muestra se diluyeron en tampón de muestra (formamida 50%, MOPS 1X, formaldehído 6% y tampón de carga 1X), se desnaturalizaron a 65°C durante 5min y se separaron por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante de formaldehído (MOPS 1X, formaldehído 1.5%, agarosa 1%) en tampón MOPS (MOPS 0.5M, acetato sódico 1.2M, EDTA 1mM). El ARN del gel se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Nitran-N (Scheicher & Schuell), utilizando como solución de transferencia 20X SCC (NaCl 3M y citrato sódico 0.3M). La membrana de nylon se fijó por calor a 80°C durante 2h. La prehibridación, hibridación, detección y revelado se realizaron en las



mismas condiciones que para la hibridación tipo Southern (apartado 8.2), con la precaución de que en este caso, todos los productos y materiales empleados estuvieran libres de ARNasas.

#### **9.4. Síntesis de ADNc**

La síntesis de la primera cadena de ADNc a partir del ARN total, se obtuvo mediante la transcriptasa inversa “MultiScribe Reverse Transcriptase” del kit “TaqMan Gold RT-PCR” de Applied Biosystems. Este Kit permite realizar la transcripción inversa del ARN usando una mezcla de oligonucleótidos hexámeros o bien un cebador con una cola d(T)<sub>16</sub>. Cuando el ADNc iba a ser usado para análisis de la expresión (RT-PCR a tiempo real o RT-PCR semicuantitativa) la reacción de transcripción inversa se realizó con la mezcla de oligonucleótidos hexámeros. Para los demás casos se empleó el cebador X<sub>n</sub>-d(T)<sub>15</sub> (45628, ver Tabla 1).

La reacción de transcripción se realizó en un volumen total de 50µl:

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µl)</b>
ARN total	1µg (maximo 19.25µl)
10X Tampón TaqMan RT	5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	11
Mezcla deoxyNTPs 2.5mM	10
Mezcla de hexámeros/45628 (400ng/µl)	2.5
Inhibidor de ARNasa 20U/µl	1
MultiScribe Reverse Transcriptase 50U/µl	1.25
H <sub>2</sub> O DMPC	19.25-volumen ARN

La mezcla anterior se incubó a 25°C durante 10min, seguida de la transcripción inversa a 48°C durante 30min, y por último se inactivó la transcriptasa inversa a 95°C durante 5min. La primera hebra de ADNc obtenida se congeló a -20°C hasta su utilización en reacciones de RT-PCR.

## 10. Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores tanto para la amplificación de fragmentos de ADNc por RT-PCR, como para la síntesis de sondas no radioactivas. En el caso de cebadores degenerados éstos se obtuvieron basándose en regiones conservadas de la secuencia aminoácidica homólogas del gen en cuestión.

## 11. RT-PCR

Empleando los cebadores degenerados y mediante reacción en cadena de la polimerasa desde ADNc de la ZA de flores femeninas y masculinas de Cora en antesis, se obtuvo un primer fragmento para cada uno de los genes (CpPG, CpCL1 y CpEXPA1) de interés. Tras secuenciar varios de estos fragmentos y asegurar la secuencia, se diseñaron cebadores específicos tanto hacia el extremo 3' como hacia el 5', con los que se obtuvo la secuencia completa de CpCL1 y CpEXPA1. El extremo 5' de CpCL1 y los extremos 5' y 3' de CpEXPA1 se obtuvieron mediante RACE-PCR (apartado 12). Las reacciones PCR se realizaron con la enzima Taq DNA Polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus* (Biotools) en un termociclador Hybaid Omnigene. El número de ciclos fue generalmente 35, la temperatura de desnaturalización del ADNc fue 94°C, la de síntesis de 72°C y la temperatura de hibridación de los cebadores fue la específica de cada uno (Tabla 1). El tiempo de síntesis varió dependiendo del tamaño del fragmento esperado y la longitud de los cebadores empleados.

Tabla 1: Relación de cebadores usados en este trabajo.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm °C	Uso
CpCL1	ZCL1	GGNGGNTAYTAYGAYGCNGGNGA	63	RT-PCR
	ZCL2	GTRTCCATRTCYTCNGGNCKYTCCC	69	RT-PCR
	ZCL8.16	GCGACGTCGGTTCCGGGTGTG	62	Sonda Dig
	ZCL8.17	GGAGGTGTTGATGGGCAAAGC	58	
	ZCLrace5'	CGGGTCTCTCCAGCAGTTGTGATCGG	66	5' RACE
	CLisF	TCGAGATACTCCTGAGTCCG	55	RT-PCR semi-cuantitativa
	CLisR	TTCGCGCACCCTACTACTAC	54	
CpExp A1	EXP1	ATGGGNGGNGCNTGYGGNTWYGG	61	RT-PCR
	EXP3R	GGCATNGCNARRTCRAARTGNNG	58	RT-PCR
	Exp.RACE1	CAAGCACCACAGCTGGACCCGTCG	64	5' RACE
	Exp3-1	CCTCCTCGCCCTCACTTCGACCTATCC	65	3' RACE
	fwExp12p	CTGGGGACATTGTGAGTGTG	54	RT-PCR semi-cuantitativa
	revExp12rt	TGGAGCTCTTTCATCATTACCA	52	
CpPG	ZPG1	ACNGGNGAYGAYTGYATHC	50	RT-PCR
	ZPG2	CCANGTYTTDATNCKNACNCCRTT	60	RT-PCR
	8PG2,1	GTGGTAGGAGTTACAGTGAAG	52	RT-PCR semi-cuantitativa
	8PG2,2	CGGAGTGGTCTCAGGTGGCGC	63.5	
	2RTF8PG	AGGGCCAGCTGTGTCTGAGT	59	RT-PCR a
	RTR8PG	GACGGAGTGGTCTCAGGTGG	59	Tiempo Real
18S	P1-18S	TTGTGTTGGCTTCGGGATCGGAGTAAT	65,1	Control RT-PCR semi-cuantitativa
	P2-18S	TGCACCACCACCCATAGAATCAAGAA	62,2	
	RTF18S	CGAAGACGATCAGATACCGTCC	55	Control PCR a
	RTRv18S	CCTTTAAGTTTCAGCCTTGCGACC	59,3	Tiempo Real
	45628	CCGAATTCAATACGACTCACTATAGCG (T) <sub>15</sub>		Síntesis de ADNc
	45027	CCGAATTCAATACGACTCACTATAGCG	58	Completentario de 45628
	ACOisF	TGGAGACCAACTTGAGGTGA	52	RT-PCR semi-

Cp- ACO1	ACOisR	TCTATGCTGTTGCCATTGGA	51	cuantitativa
	ZUCO1	TGGAACAGAGGTTTAAGGAGGC	55	Sonda ACO88 (Northern blot)
	ZUCO2	GTAATCTTCAAACACAACTTGGG	52	
Cp- ACS1	ACSisF	AAATGGGGATCACTTGCTTG	50	PCR semi- cuantitativa
	ACSisR	CGTGTGCGGTGAGTTAAGAA	52.5	
5'-CDS		(T) <sub>25</sub> V N		RACE-PCR
3'-CDS		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) <sub>30</sub> V N		
BD SMART II A oligo		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCG GG		
UPM		CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAACGCAGAGT		

A=Adenina      D=A,G ó T      K=G ó T      V=A, G, ó C  
T=Timina      H=A,C ó T      N=A, C, G ó T      W=A ó T  
G=Guanidina      R= A ó G      Y=C ó T  
C=Citosina

Tabla 2: Relación de sondas marcadas con digoxigenina usadas en este trabajo.

Sonda	Utilización	Plásmido/Amplicón	Cebadores amplificación del plásmido	
8ZPGt-Dig	Southern CpPG	8ZPG/509	8PG2.1	8PG2.2
13ZCL-Dig	Southern CpCL1	13ZCL/444pb	ZCL8.16	ZCL8.17
EXPis-Dig	Southern CpEXPA1	EXPis/330pb	fwExp12p	revExp12rt
ACO88-Dig	Northern CpACO1	CpACO1/683pb	ZUCO1	ZUCO2

## 12. RACE

Los extremos 5' de CpCL1 y los extremos 5' y 3' de CpEXPA1, se obtuvieron mediante RACE-PCR usando el Kit "BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit" (BD Biosciences Clontech). En primer lugar se sintetizó la primera cadena de ADNc con los adaptadores sintéticos que se unen a 5' y/o a 3'. Para ello se tomó 1µg de ARN se prepararon dos alícuotas de reacción para la transcripción inversa, una para la preparación de ADNc para RACE-5' al que se le añadió el cebador 5'-CDS y el cebador BD SMART II A; y otra alícuota con el cebador 3'-CDS para el ADNc RACE-3'. Tras incubar ambas mezclas de reacción 2 minutos a 70°C, se les añadió 1 µl de DTT (20mM), 1 µl de dNTPs (10mM), y 1U de la transcriptasa inversa BD PowerScript en un volumen final de 10µl, incubando las muestras a 45°C durante 90 minutos. La primera cadena de ADNc obtenida se diluyó con H<sub>2</sub>O DMPC, se incubó a 72°C durante 7 minutos y se guardó a -20°C hasta su utilización.

El fragmento del extremo 5' de CpCL1 y CpEXPA1 se obtuvo amplificando el ADNc RACE-5' con el cebador universal UPM y los específicos ZCLRACE5' y Exp.RACE1 respectivamente. El extremo 3' de CpEXPA1 se obtuvo amplificando el ADNc RACE-3' con el cebador universal UPM y el específico Exp3-1.

## 13. Transformación y conservación de estirpes bacterianas

Los fragmentos obtenidos por PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa, desde donde se aislaron mediante el kit MBL-Agarosa Quickclean, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos aislados se ligaron en el plásmido pGEM-T-Easy (Promega) con la enzima T4 ADN ligasa (Promega) en una proporción 3:1 (inserto:plásmido) y se transformaron en células competentes *E.coli* DH5α. La selección de clones bacterianos se realizó en medio Luria-Bertani (LB) suplementado

con ampicilina 50µg/ml, X-Gal e IPTG (Sambrook y col., 1989). Los clones seleccionados se almacenaron a largo plazo en glicerol 15% a -80°C.

### 13.1. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *E.coli* se utilizó el método descrito por Hanahan (1983). Brevemente, se cultivaron células *E.coli* cepa DH5α durante toda la noche en LB líquido (2muestras x 5ml de LB). Al día siguiente se inoculó 100ml de LB suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10Mm, con 4ml del cultivo bacteriano. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.4-0.6 (fase logarítmica), en ese momento se detuvo el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 15minutos. Las células se sedimentaron mediante centrifugación (6000g durante 10minutos) a 4°C. El precipitado se resuspendió suavemente en 32ml de solución RF1 pH 5.8 (1.2g RbCl, 0.99g MnCl<sub>2</sub>, 0.294g acetato potásico, 0.15g CaCl<sub>2</sub>, 11.9ml glicerol todo en un volumen final de 100ml) estéril a 4°C y se incubó en hielo durante 15minutos. Las células se precipitaron por centrifugación (6000g durante 10minutos), resuspendiendo el precipitado en 4ml de solución RF2 pH 6.8 (0.1046g MOPS, 0.06g RbCl, 0.55g CaCl<sub>2</sub>, 5.95ml glicerol en un volumen final de 50ml) estéril a 4°C. La suspensión celular se repartió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

### 13.2. Transformación

Para la transformación de las células competentes con el plásmido pGEM-T-Easy procedente de la reacción de ligación, se añadieron 0.1-1µg de ADN a una alícuota de 200µl de células competentes y se incubó durante 60minutos en hielo. A continuación se les aplicó un choque térmico a 42°C durante 2minutos, se añadió 1ml de LB y se incubó durante 90minutos a 37°C en agitación. Una alícuota de 100µl del cultivo se sembró en LB-ampicilina suplementada con Xgal-IPTG. Las placas se

incubaron durante 24h a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron las colonias positivas, procediéndose a la extracción del ADN plasmídico.

### **13.3. Miniprep**

El ADN plasmídico se aisló mediante el método CTAB. Se tomaron las colonias positivas de forma independiente y se pusieron a crecer en 3ml de LB-ampicilina a 37°C durante 12h con agitación. Se precipitaron 1.5ml de cultivo bacteriano por centrifugación y el precipitado se resuspendió completamente en 250µl de tampón Stett (sacarosa 8%, Tritón X-100 0.1%, EDTA 50mM pH8, Tris HCl 50mM pH8). A la suspensión se le añadió 4µl de lisozima, y se incubó a temperatura ambiente durante 5minutos. Seguidamente se calentó a 100°C durante 45segundos y se centrifugó a 13000g durante 10minutos. Se eliminó el precipitado añadiendo al sobrenadante 20µg/ml (volumen original del cultivo) de ARNasa (Roche), se incubó con la ARNasa a 37°C durante 15minutos. A continuación se añadieron 8µl de CTAB 5% a 37°C, se mezcló por inversión y se centrifugó 5minutos para precipitar los plásmidos. El precipitado obtenido se disolvió en 0.2 volúmenes de NaCl 1.2M y se añadió 0.5 volúmenes de etanol frío 96%. Se recuperó el precipitado por centrifugación (13000g durante 10minutos), y se lavó con etanol frío 70%. El precipitado se dejó secar y se disolvió en 20µl de H<sub>2</sub>O.

## 14. Secuenciación

Una alícuota del ADN plasmídico, aislado de colonias conteniendo el inserto clonado, se secuenció en un equipo 3100-Avant Genetic Analyzer de electroforesis capilar (4 capilares), de Applied Biosystems (HITACHI) del Departamento de Genética de la Universidad de Granada.

## 15. Análisis de expresión mediante técnicas de PCR

### 15.1. RT-PCR a tiempo real

La expresión del CpPG se cuantificó de manera relativa mediante RT-PCR a tiempo real de ADNc procedente de ARN libre de ADN de diferentes tejidos de las variedades Cora y Cavili, en un equipo i-Cycler de BioRad. La RT-PCR a tiempo real se basa en la cuantificación de la fluorescencia emitida en cada ciclo de PCR, siendo el incremento de esta fluorescencia proporcional al aumento de la cantidad de amplicón. Usamos el fluorocromo *SYBER Green I* como sistema de detección de fluorescencia, ya que se une al ADN de doble cadena aumentando su emisión de fluorescencia con cada unión. Los valores que se obtienen son un indicativo del ADNc inicial existente en cada muestra, sin embargo, estos valores son relativos, obteniéndose de la comparación entre la fluorescencia emitida por cada muestra para el gen estudiado y la emitida por la misma muestra para un gen de referencia (gen constitutivo o ribosómico) en cada ciclo. Se ha usado como gen de referencia, el gen ribosómico 18S de *Cucurbita pepo*.

En primer lugar se optimizaron las reacciones RT-PCR a tiempo real para cada pareja de cebadores empleados, comprobando la amplificación de un único amplicón y a continuación se prepararon las reacciones definitivas realizando 3 réplicas por muestra en cada reacción. Usamos el Kit para amplificación y cuantificación de ADN en tiempo real de Biotools “QUANTIMIX EASY SYG KIT”. Tras las reacciones se obtienen unos valores de Ct o número de ciclos, valor que en la fase exponencial de amplificación



presenta una relación directa con la cantidad de ADN inicial y por tanto se puede obtener la proporción de ARN inicial que existía en cada muestra. Los valores Ct del gen diana para cada muestra, se normalizaron restándole el valor Ct de esa muestra para el gen 18S.

## 15.2. RT-PCR semicuantitativa

La expresión de los genes presentados en este trabajo se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Se realizó en ADNc procedente de ARN libre de ADN de diferentes tejidos de las variedades Cora y Cavili. Como control interno de la cantidad de ADNc inicial en cada muestra, usamos el gen ribosómico 18S de *Cucurbita pepo*. Se determinó para cada pareja de cebadores (Tabla 1) las condiciones de PCR óptimas (temperatura y duración de cada paso en el ciclo de amplificación) así como el número de ciclos necesario para detectar señal, sin que ésta llegara a saturarse, obteniendo así una medida semicuantitativa del ADNc inicial del que se partía en cada muestra.

## 16. Análisis de azúcares neutros

El análisis de azúcares se realizó usando el método de metanolisis (Jones y col., 2003).

La sustancia blanca (0.5mg) se secó a 40°C en vacío y se hidrolizó con HCl 2M en metanol seco durante 4 horas a 100°C. Los azúcares se separaron por cromatografía de intercambio iónico de alta fidelidad (HPAEC) en un sistema Dionex Carbopac con columna PA-10 y detección de amperometría integrada (servicios técnicos de la Universidad de York). Los monosacáridos separados se cuantificaron usando una calibración externa con una mezcla equimolar de nueve monosacáridos (arabinosa, mucosa, galactosa, ácido galacturónico, glucosa, ácido glucurónico, manosa, ramnosa y xilosa) que se hidrolizaron en paralelo con las muestras.

## 17. Análisis de AGPs

La presencia de AGPs se detectó mediante el uso del reactivo Yariv  $\beta$ -Glucosílico ( $\beta$ -GlcY, Biosupplies), mientras que el reactivo Yariv  $\alpha$ -Glucosílico ( $\alpha$ -GlcY) se usó como control negativo, ya que no se une a las AGPs. El material vegetal se incubó en una solución de  $\beta$ -GlcY o  $\alpha$ -GlcY 2mg/ml en NaCl 0.15M durante 1h a temperatura ambiente. A continuación se lavaron con H<sub>2</sub>O un mínimo de 5 veces y se visualizaron en un microscopio Motic BA300 con cámara integrada.

## 18. Electroforesis en geles monodimensionales de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE)

Se siguió el método de Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Este método se basa en cubrir las proteínas con un detergente muy aniónico (SDS) dándoles a todas una carga neta negativa, de manera que migran solo en función de su masa relativa cuando son sometidas a un campo eléctrico.

Se analizaron los extractos proteicos de la PC (apartado 4.1 y 4.2), así como un extracto de proteínas totales de tejido procedente de la ZA inducida con etileno (sustancia blanca, ver Resultados).

Se cargaron 15-20 $\mu$ g de proteína/muestra resuspendidas en tampón de ruptura (SDS 1.5%, Tris-HCl pH 6.8 25mM, azul de bromofenol 0.035%, glicerol 3%, DTT 70mM) y se separaron en electroforesis en geles discontinuos compuestos de un gel concentrador (*stacking*) y otro separador (*resolving*). Las electroforesis se realizaron en tampón TGS (Tris 25mM, glicina 1.92M, SDS 1%, pH 8.3) en un equipo MiniPROTEAN II (BioRad) a 150V durante 1h.

	<b>Concentrador</b>	<b>Separador</b>
<b>Bis-Acrilamida 30%</b>	6%	12%
<b>Tris HCl 1M pH 6.8</b>	0.125M	0
<b>Tris HCl 1M pH 8.5</b>	0	0.25M
<b>SDS 10%</b>	0.1%	0.1%
<b>APS 10% (persulfato amónico)</b>	0.1%	0.1%
<b>TEMED</b>	0.1%	0.05%

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con Coomassie coloidal (Invitrogen) durante una hora con agitación suave, o se procedió a la transferencia para western blot.

## **19. Geles de dos dimensiones**

### **19.1 Preparación de muestras**

El método de electroforesis en dos dimensiones (2DE) está disponible desde mediados de los 70 (O'Farrel, 1975). El método que hemos usado se basa en el citado pero con muchas modificaciones.

Se utilizaron muestras de proteínas extraídas de la PC (apartado 4.1 y 4.2). Estos extractos proteicos se disolvieron en H<sub>2</sub>O y se trataron con el kit “Ready Prep<sup>TM</sup> 2-D Cleanup Kit” (BioRad) para eliminar sales y cualquier compuesto que pudiera interferir en la separación de las proteínas. Se usó un máximo de 500µg de proteína y se siguieron las instrucciones del manual del kit.

A continuación las proteínas se disolvieron completamente en 125µl de tampón de rehidratación R2D2 (dos agentes reductores: DTT y TCEP, y dos agentes detergentes: CHAPS y SB3-10).

Urea	5M
Tiourea	2M
CHAPS	2%
SB3-10 [(Decildimetil-amino) propanosulfonato (Sigma-Aldrich)]	2%
Azul de bromofenol	0.01%
DTT	20mM
TCEP [Tris(2-carboxietil) hidrocloreto fófnico (Sigma-Aldrich)]	5mM
amfolito pH 3.5-10 (BDH Electran®)	0.25%
amfolito pH 4-8 (BDH Electran®)	0.5%

## 19.2. Primera dimensión

Una vez preparada las muestras, se procedió a realizar la primera dimensión, la concentración isoeléctrica, en la cual las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico, (*Isoelectrofocusing* = IEF). El gel estaba fijado en tiras IEF de 7cm con un rango de pH de 3-10 (IPG Strips, ReadyStrip™ de BioRad) y se realizó en un equipo MiniProtean III (BioRad). Las muestras se cargaron sobre una placa de IEF, colocando la tira IPG sobre ella, que se cubrió con aceite mineral. El gel se corrió con un método pasivo durante 12horas o hasta alcanzar un voltaje final de 10000V.

## 19.3. Segunda dimensión

La tira IPG procedente de la primera dimensión se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y se equilibró en solución ES (Urea 6M, Tris 0.15M pH 8.8, Glicerol 30%, SDS 2% y trazas de azul de bromofenol) con DTT 1% a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido de un segundo lavado en solución ES con idoacetamida 4% durante 15 minutos. A continuación se colocó el gel de la primera dimensión sobre el gel de la segunda dimensión, SDS-PAGE. El gel SDS-PAGE era un gel 4-12% Bis-Tris ZOOM®-Gels

(Invitrogen). La electroforesis se realizó en un equipo MiniPROTEAN II (BioRad) en tampón MES-SDS, a 200V durante 30 minutos.

El gel se fijó con metanol 40% y ácido acético 10% durante 30 minutos, se lavó tres veces en H<sub>2</sub>O destilada, se tiñó con Coomassie coloidal (BioRad) durante 16h y se lavó con H<sub>2</sub>O destilada hasta eliminar el fondo.

#### **19.4. Preparación de las muestras para MALDI/MS-MS**

El análisis e identificación de proteínas desde los geles bidimensionales se realizó mediante MALDI/MS-MS (Matriz-assisted laser desorption ionization tandem (MS/MS) mass spectrometers).

Los puntos que nos parecieron adecuados se cortaron del gel y se lavaron en 100µl de una solución de bicarbonato amónico 25mM y Acetonitrilo 50%, durante 20 minutos. A continuación se lavó con 100µl de acetonitrilo, durante 5 minutos, se eliminó el acetonitrilo y se dejaron secar los trozos de gel en una bomba de vacío. Las proteínas de los trozos de gel seco, se digirieron en péptidos añadiendo 10µl de tripsina porcina (Promega) 0.02µg/µl en tampón bicarbonato amónico 25mM. Se incubó en esta solución de tripsina a 37°C durante 16h. Tras la tripsinización, se tomaron 0.5µl de la mezcla de péptidos de cada trozo de gel y se colocaron sobre una placa MALDI. Cuando las muestras de la placa MALDI estuvieron completamente secas, se añadieron 0.5µl de solución de matriz sobre cada muestra y se dejó secar antes de introducirla en el espectrómetro de masas. La solución de matriz está compuesta por ácido a-ciano-4-hidroxicinámico 10mg/ml en solución TFA (acetonitrilo 50%, ácido trifluoroacético 0.1%). Los espectros de los péptidos se obtuvieron un equipo Applied Biosystem 4700 Proteomics Analyzer, es un espectrómetro de masas en tandem (MS/MS) con un analizador cuádruple time-of-flight-time-of-flight (MALDI-TOF/TOF). La

identificación de los péptidos que se consigue es de gran fidelidad, al incluir los datos de los espectros en tandem en la base de búsqueda de datos MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>).

## **20. Western Blot**

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana PVDF (BioRad) usando el sistema de transferencia húmeda de mini-gel (BioRad). Como tampón de transferencia se usó tampón TGS (apartado 18), al que se le añadió metanol 20%. La transferencia se realizó a 110V durante 1hora.

Tras la trasferencia se lavó la membrana en TBS (NaCl 150mM, KCl 150mM, Tris 20mM) durante 5minutos y se incubó con solución de bloqueo (suero de caballo 10% para CsEXPA1, y BSA 1% para LM2 y MAC207, Tween 20 al 0.05% en TBS) 1hora. Seguidamente se añadió el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo 1:1000 para CsEXPA1 y 1:100 para LM2 y MAC207. Tras 1h de incubación a temperatura ambiente, el anticuerpo primario se lavó cuatro veces con TBS durante 5 minutos. Los anticuerpos secundarios fueron la IgG de cabra conjugada con fosfatasa alcalina frente a la IgG de conejo (para CsEXPA1) y la IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina frente a la IgG de rata (para LM2 y MAC207), y se usaron a una dilución 1:1000. Se utilizaron tabletas de Sigma Fast<sup>TM</sup> 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium para desarrollar el color en la reacción de la fosfatasa alcalina.

## 21. Microscopía óptica y procesado de imágenes

### 21.1. Fijación

El material vegetal se fijó en una solución de formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en tampón PBS pH 7.4 (NaCl 0.13M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7mM, NaHPO<sub>4</sub> 3mM). Se añadió la solución fijadora a las muestras y se aplicó vacío varias veces. Se mantuvieron en fijador a 4°C durante tres días, cambiando el fijador por fijador fresco cada 24horas. A las 72horas se eliminó el fijador y se lavó el material tres veces con PBS durante 30minutos a 4°C.

A continuación se procedió a su deshidratación en un gradiente creciente de etanol:

- Etanol 50%
  - Etanol 70%
  - Etanol 90%
  - Etanol 100%
  - Etanol 100%
- } 20minutos  
} Temperatura ambiente

### 21.2. Inclusión en resina Embed 812

Posteriormente el material se infiltró en resina Embed 812 (resina Epoxi), pasando a las muestras por las siguientes soluciones:

- etanol 100%: resina (3:1). 1hora a temperatura ambiente
- etanol 100%: resina (1:1). 1hora a temperatura ambiente
- etanol 100%: resina (1:3). 1hora a temperatura ambiente
- resina pura. 16horas a temperatura ambiente

### **21.3. Polimerización**

Las muestras se montaron en el fondo del molde de inclusión, que contenía una gota de resina y se orientaron en la posición adecuada, añadiendo resina hasta rellenar la cápsula. La polimerización de la resina se realizó a 37°C durante 24 horas y a 60°C durante 24h.

### **21.4. Obtención de cortes semifinos**

Los cortes semifinos de aproximadamente 1.5µm se obtuvieron en un ultramicrotomo R. de Leica. Los moldes de inclusión se tallaron en forma de trapecio que contenía el material vegetal. Los cortes se realizaron con una cuchilla de vidrio sobre cuyo canto caían los cortes de tejido que se recogieron en seco con pincel, debido al gran tamaño de las muestras. Los cortes se iban colocando sobre una gota de agua en un portaobjetos. Los portaobjetos se colocaron en una placa calefactora hasta que los cortes estaban completamente secos y adheridos al portaobjetos.

### **21.5. Tinción de los cortes semifinos**

Para conseguir un mejor contraste de las muestras, éstas se tiñeron con una solución de azul de metileno/azul de toluidina en Borax. Esta solución se preparó disolviendo 0.25g de bórax en 30ml de H<sub>2</sub>O (calentando), se añadieron 0.25g de azul de metileno y 0.25g de azul de toluidina y se completó el volumen a 40ml con H<sub>2</sub>O.

Se añadieron unas gotas del colorante sobre el portaobjetos con las secciones, se dejó uno o dos minutos y se eliminó el exceso de colorante lavando abundantemente con agua. Una vez completamente secos los portaobjetos, se montaron con Merckoglass.



Las muestras se observaron utilizando un microscopio OLYMPUS BX41, acoplado a una cámara digital OLYMPUS DP70, con el que se obtuvieron las fotografías.

#### **21.6. Tinción con el reactivo de Schiff**

Los análisis del contenido en almidón de las células de las ZAs se realizaron tiñendo con el reactivo de Schiff (ácido peryódico-reactivo de schiff) secciones de la ZA obtenidas como se ha descrito en los apartados 23.1-23.4.

En primer lugar los portaobjetos se incubaron en ácido peryódico al 1% durante 10 minutos, y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. A continuación se sumergieron 10 minutos en Reactivo de Schiff en oscuridad, tras lo que se lavaron tres veces en bisulfito sódico al 2% durante 2 minutos. Para eliminar el bisulfito sódico se lavaron los portaobjetos con agua corriente durante 10 minutos y por último se enjuagaron en agua destilada y se dejaron secar.

El reactivo de Schiff se preparó del siguiente modo. Se disolvió 1 g de fuchina básica (clorhidrato de pararosanilina) en 200ml de agua destilada hirviendo, se dejó enfriar hasta los 50°C y se añadieron 2gramos de metabisulfito potásico. Tras alcanzar la mezcla la temperatura ambiente, se añadieron 10ml de HCl 1N, manteniéndose en oscuridad 24horas a 4°C. Al día siguiente se añadieron 0.5gramos de carbón activo y se agitó vigorosamente. Por último se dejó sedimentar y se filtró hasta conseguir una solución incolora.

## 22. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1M, pH7. Se añadió la solución de glutaraldehído a las muestras y se aplicó vacío varias veces. Se mantuvieron en fijador a 4°C durante dos días, cambiando el fijador por otro fresco cada 24horas. A las 48horas se eliminó el fijador y se lavó el material tres veces con tampón cacodilato 0.1M durante 15minutos cada lavado. Se aplicó una fijación posterior con tetróxido de osmio al 1% en oscuridad durante 1hora a temperatura ambiente. El tetróxido de osmio se eliminó lavando las muestras tres veces en agua destilada durante 5minutos.

A continuación se procedió a su deshidratación en un gradiente creciente de etanol:

- Etanol 50%
  - Etanol 70%
  - Etanol 90%
  - Etanol 100% (tres veces)
- } 15min  
} Temperatura ambiente

Las muestras deshidratadas se sometieron a un proceso de desecación por punto crítico (Anderson, 1951) con dióxido de carbono en un desecador Polaron CPD 1501 (servicios técnicos de la Universidad de Granada).

Por último se procedió al proceso de doble recubrimiento de las muestras, en el que se evaporaron con carbón en un evaporador Hitachi y se recubrieron con oro (método del ión sputtering) en un metalizador Polaron Unit SEM Coating E5000 (servicios técnicos de la Universidad de Granada).

Las muestras así preparadas se observaron y fotografiaron en el microscopio electrónico de barrido LEO 1430VP, de los servicios técnicos de la universidad de Granada.

### **23. Herramienta bioinformáticas**

En este trabajo se han empleado numerosas herramientas bioinformáticas. Para la comparación de secuencias nucleóticas y aminoácidas usamos Clustalw, herramienta disponible desde la página de EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)). La obtención de homologías para el diseño de cebadores o para la comparación de las secuencias obtenidas de la secuenciación de nuestros clones se usaron Nucleotide Blast (secuencias nucleotídicas) y Protein Blast (secuencias aminoácidas). Se usaron otras herramientas del banco de datos NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)) como ORF Finder para la traducción a proteína de secuencias nucleotídicas, etc. La idoneidad de los cebadores diseñados se comprobó con la herramienta Oligonucleotide Properties Calculador a partir de la página web de la Northwestern University Medical School ([www.basic.northwestern.edu](http://www.basic.northwestern.edu)). El análisis de las secuencias obtenidas de los diferentes clones se realizó en BioEdit.

Para la realización de los árboles filogenéticos, el alineamiento de secuencias se realizó usando ClustalX versión 1.81 con los parámetros para alineamiento de parejas (gap opening set a 10, gap extensión set a 0.10) y alineamiento múltiple predeterminados por el programa (gap opening set a 10, gap extensión set a 0.20 y retraso de secuencias divergentes en el 30%). Usando estos alineamientos como base, se hicieron los análisis filogenéticos para los que se empleó un árbol Neighbor-Joining con un análisis Bootstrap de 1000 réplicas, seleccionando la exclusión de posiciones con huecos y la corrección de sustituciones múltiples.

RESULTADOS

---



# 1 CARACTERIZACIÓN DE LA ZONA DE ABSCISIÓN PISTILAR EN *Cucurbita pepo*

## 1.1. Definición de estadios florales

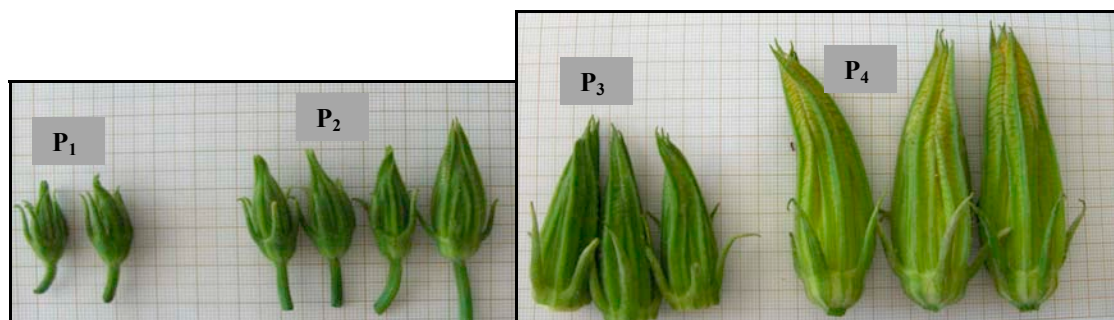
Con el objeto de estudiar las modificaciones producidas a nivel fisiológico y molecular en la zona de abscisión floral de *Cucurbita pepo* se han utilizado una serie de estadios previos a la antesis (preantesis) en flores femeninas y masculinas (Figura 1 y 2), basándonos en el tamaño de la flor y su localización en la planta, a los que designamos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub>. La distancia entre un estadio de preantesis y el siguiente es de dos nudos en la planta, de manera que entre P<sub>1</sub> y P<sub>4</sub> puede haber entre 6 y 7 nudos. P<sub>1</sub> se encuentra dos nudos por encima de P<sub>2</sub> y éste 2 nudos por encima de P<sub>3</sub>. Los estadios P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub> se seleccionaron en función del desarrollo de sus pétalos y anteras (flores masculinas) o estigmas (flores femeninas), así P<sub>3</sub> (dos nudos sobre antesis) presenta los pétalos y las anteras o estigmas de un color verde-amarillento y P<sub>4</sub> mostraba pétalos y anteras o estigma amarillo-anaranjados. Este último estadio de preantesis se encontraba como máximo a 24 horas de antesis, pudiendo aparecer bajo él un nudo con flor en antesis o una flor a un día tras antesis. El estadio de antesis se refiere a flores con los pétalos abiertos, que en flores masculinas coincidió con la dehiscencia de las anteras. En cuanto a los estadios de postantesis, se definieron postantesis 1 ( $\leq$  de 24 horas tras la antesis), 2 y 3, coincidiendo la numeración con los días transcurridos tras la antesis.

En las dos variedades ensayadas en este trabajo en la planta, las flores masculinas solo presentan dos estadios de postantesis, ya que la mayoría de las flores abscinden al tercer día tras la antesis, mientras que en flores femeninas hay tres estadios de postantesis, abscindiendo la flor al cuarto día tras la antesis (Pedro Gómez, comunicación personal).

---

**Figura 1:** a) Estadios de preantesis en flores masculinas, el tamaño en centímetros incluye la flor completa sin el pedúnculo. Preantesis 1 (P<sub>1</sub>: 2-2,8 cm), preantesis 2 (P<sub>2</sub>: 3-4 cm), preantesis 3 (P<sub>3</sub>: 4,5-5 cm) y preantesis 4 (P<sub>4</sub>: 5,5-7,5 cm). b) flor masculina en antesis. c) flor masculina en postantesis 1 (1 día tras la antesis).

**Figura 2:** a) Estadios de preantesis y antesis en flores femeninas; el tamaño en centímetros incluye la flor completa sin pedúnculo. Preantesis 1 (P<sub>1</sub>: 3,8-4,5 cm), preantesis 2 (P<sub>2</sub>: 5.2-7 cm), preantesis 3 (P<sub>3</sub>: 7-9 cm en Cora y 7.8-9.5cm en Cavili), preantesis 4 (P<sub>4</sub>: 9-12cm en Cora y 10-14 en Cavili) y antesis. b) Flores femeninas en postantesis 1 (Post<sub>1</sub>), postantesis 2 (Post<sub>2</sub>) y postantesis 3 (Post<sub>3</sub>). c) Detalle del estigma de las flores 2b, mostrando su estado de senescencia.



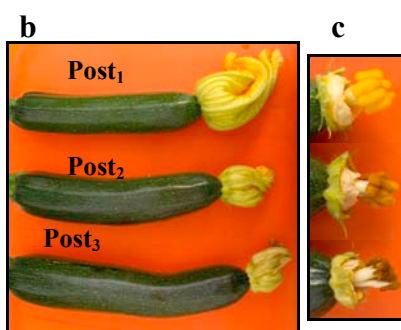
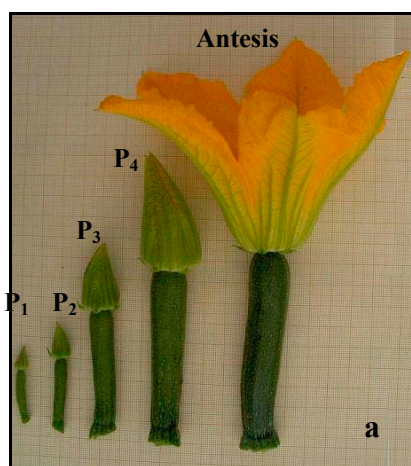
**a**

**Antesis**

**Postantesis 1**



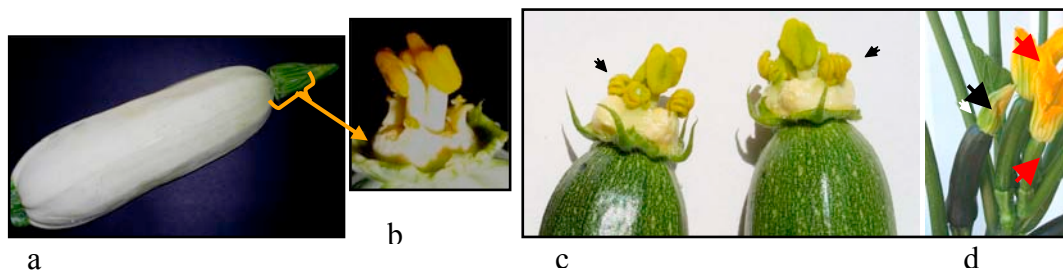
**Figura 1**



**Figura 2**



Como hemos mencionado anteriormente (Justificación y Objetivos), el retraso en la abscisión de flores de calabacín es uno de los problemas más importantes en invernaderos del sudeste español. Las flores que sufren este problema, permanecen unidas al fruto, y se caracterizan por un retraso en su maduración, así como por un fenotipo sexual anómalo. Este retraso en el desarrollo de la corola es muy marcado, apareciendo fruto de tamaño comercial con pétalos verdes y cerrados que no llegarán a abrir (Figura 3a y 3d). Son flores que deberían encontrarse en estadio de postantesis y que sin embargo presentan corolas típicas de flores en preantesis 3 o 4 (Figura 3d). En cuanto a su fenotipo sexual, son flores bisexuales, con estambres en el tercer verticilo, siendo el grado de desarrollo de las anteras muy variable entre flores (Figura 3b y 3c). En los fenotipos más extremos estos estambres pueden producir polen maduro.



**Figura 3:** a) Flor bisexual de la variedad Cavili que presenta el síndrome “flor pegada”. b) Detalle de la flor anterior mostrando anteras con un grado de desarrollo intermedio en el tercer verticilo. c) Flor pegada de la variedad Cora con unas anteras muy desarrolladas (flechas). d) Planta de la variedad Cora con una flor pegada (punta de flecha negra) en nudos inferiores a flores en antesis con abscisión normal (punta flecha roja). Fotos c y d, cedidas por el Dr. Jamilena.

## **1.2. Anatomía de la zona de abscisión**

Con la intención de identificar y caracterizar la ZA floral de *C.pepo* se realizaron análisis a microscopía óptica y a microscopía electrónica de barrido, analizando ZAs de flores femeninas y masculinas en diferentes momentos del desarrollo floral comparándolas con ZAs de flor pegada.

### **1.2.1. Microscopía óptica**

Se hicieron cortes semifinos (1µm de espesor) en ZAs fijadas e incluidas de flores masculinas y femeninas en antesis y postantesis 2 y 3, así como de flor pegada. A continuación se describen las principales características encontradas, haciendo especial hincapié en las diferencias encontradas entre flores femeninas, masculinas y flor pegada.

En flores femeninas, la ZA de flores en antesis (Figura 4) está formada por células similares en tamaño y morfología a las de los tejidos adyacentes, no identificándose claramente hasta postantesis 2, momento en que aparecen los primeros signos de abscisión (Figura 5). En este momento se evidencia el alargamiento de las células de la ZA, acompañado de la disolución de la pared celular de las células de la zona de separación (Figura 5c, d y e). A medida que el proceso de abscisión avanza, la disolución de la pared celular continúa, excepto en la zona de los haces vasculares (Figura 6d); apareciendo grandes huecos entre células vecinas hasta que se separan totalmente (Figura 6).

---

**Figura 4:** a) Flor femenina en antesis (la llave delimita la ZA analizada) b) ZA de una flor femenina en antesis. zd: zona distal; zp: zona proximal. Nótese que este tejido no presenta ninguna característica que lo diferencie del tejido adyacente (barra=500 $\mu$ m). c) Detalle del anterior mostrando los amiloplastos de las células del nectario en la zona distal (barra = 25 $\mu$ m).

**Figura 5:** a) Flor en postantesis 2 (la llave delimita la ZA analizada). b) ZA de una flor femenina en postantesis 2. zd: zona distal; zp: zona proximal (barra=500 $\mu$ m). c) Detalle del anterior, la flecha señala la zona de separación (ZS) (barra=200 $\mu$ m). d) Detalle de las células de la zona de separación con las paredes celulares más delgadas en comparación con las de las células inmediatamente adyacentes (5e) de la zona proximal. (barra = 25 $\mu$ m).

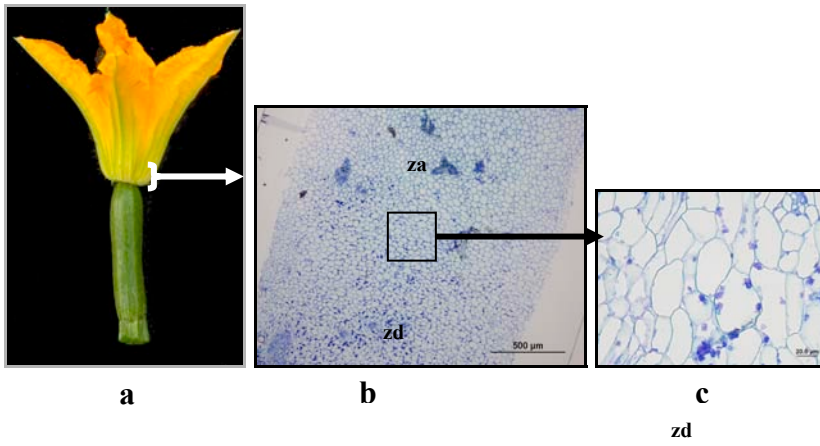


Figura 4

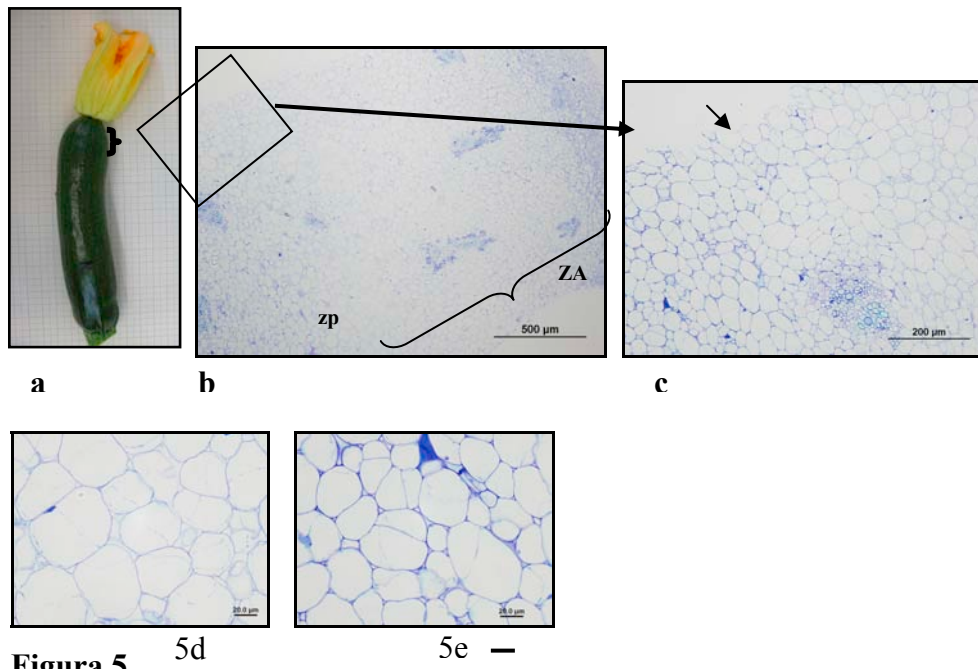


Figura 5

En flores masculinas (Figura 7) sin embargo, las células que componen la zona de separación (ZS) pueden identificarse pocas horas tras la antesis, como células más pequeñas que las células de la zona proximal (pedúnculo) y distal (nectario).

---

**Figura 6:** a) ZA floral en flor femenina en postantesis 3, mostrando una zona en la que está teniendo lugar la abscisión (barra=500 $\mu$ m). Debido a la manipulación del tejido durante la fijación e infiltración, se produjo la separación mecánica de algunas zonas a lo largo del plano de fractura, pero esta separación no es debida en su totalidad al proceso normal de abscisión, por lo que la zona proximal separada aún no se ha sellado (ligno-suberificación producida tras la abscisión). b y c) Detalles de la zona de separación (zs) mostrando el grado de disolución de la pared, observándose algunas células aisladas. d) Detalle de una zona donde se han separando los haces vasculares (v). Barra de b= 200 $\mu$ m . Barra de c y d= 25 $\mu$ m.

**Figura 7:** a) Flor masculina en postantesis 1 (la llave delimita la ZA analizada. b) ZA flor masculina en postantesis 1 (3h tras antesis). zd= zona distal, zp = zona proximal (barra=500 $\mu$ m). c) Células de la zona proximal. d) Células de la ZA. e) Células de la zona distal. Barra en c, d y e=25 $\mu$ m.

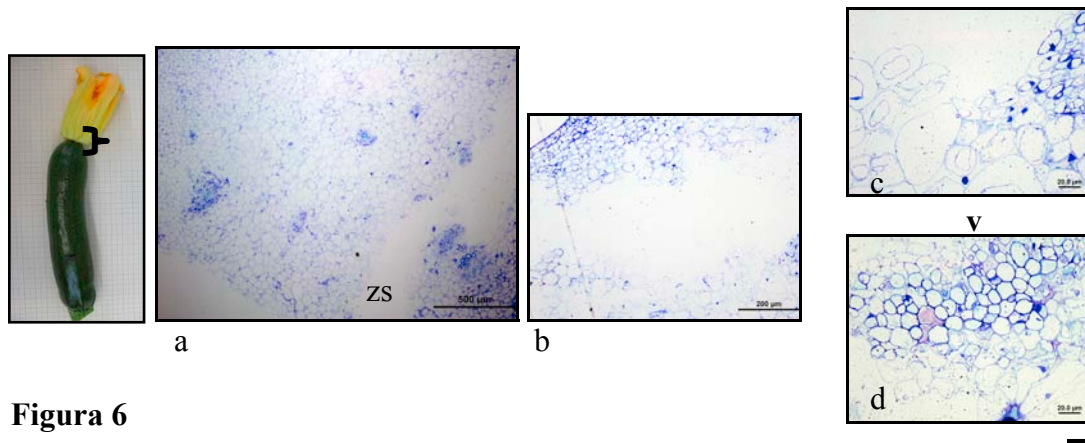


Figura 6

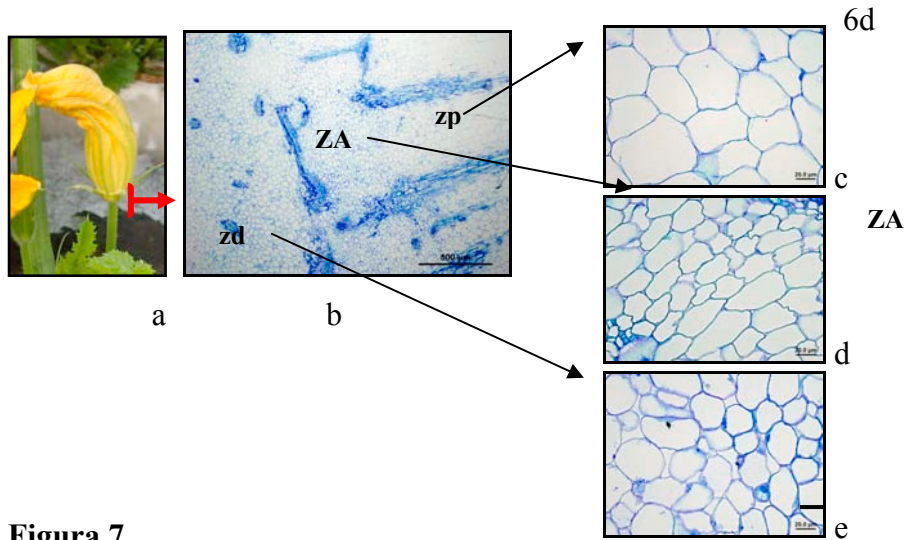
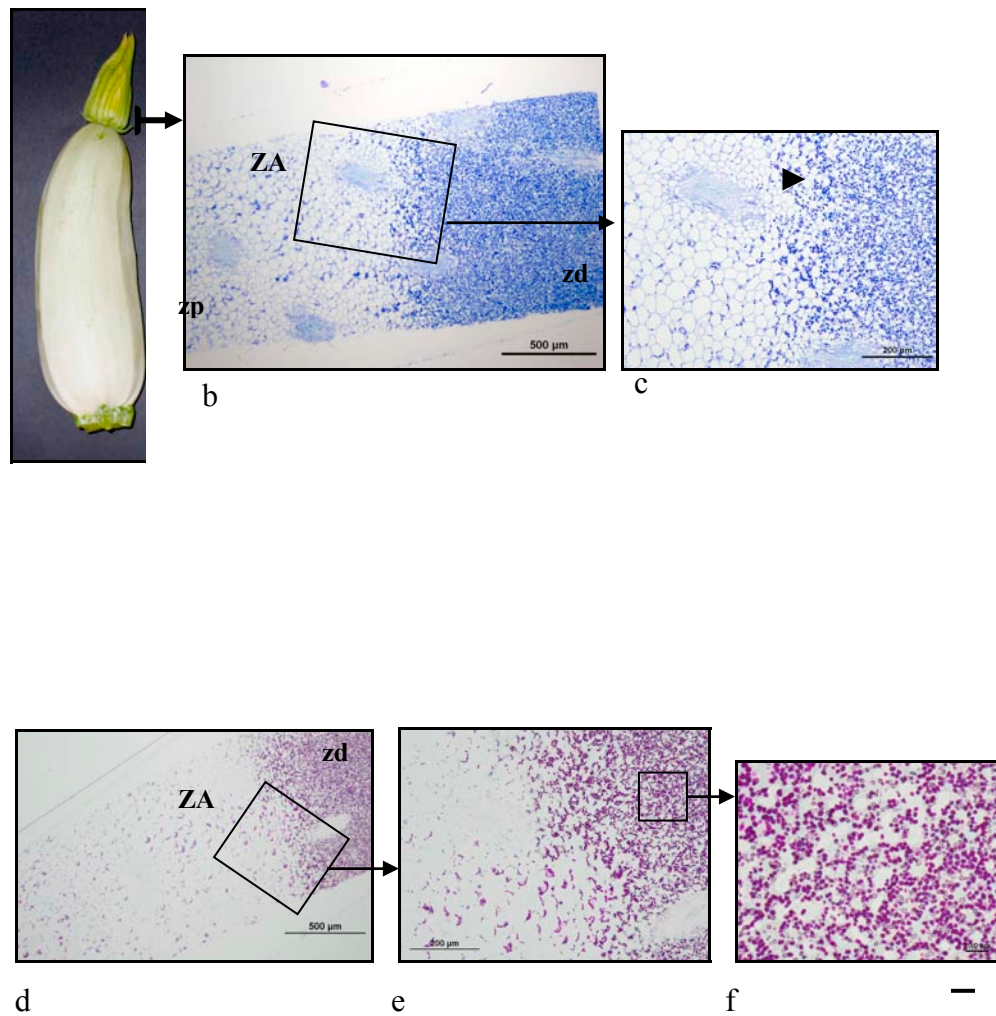


Figura 7

En la figura 8 se muestra la ZA de una flor con síndrome flor pegada, donde lo que más llama la atención son los cúmulos que se tiñen más intensamente con etileno en las células de los nectarios (zona distal) que también aparecen en las de la ZA, aunque mucho menos abundantes. La tinción de Schiff a esos mismos cortes (Figura 8d, e y f), revela que se trata de amiloplastos, muy abundantes en los nectarios y que se van degradando a medida que la flor se desarrolla y va produciendo néctar; por lo que también se observan algunos cúmulos de almidón en las ZA de las flores en antesis (Figura 4b) y no se observan en absoluto en ZA de flores en postantesis. Los nectarios de flores con el síndrome “flor pegada” son tan grandes como los de las flores en preantesis 4, igual de turgentes, y no producen néctar, por tanto no se ha producido hidrólisis de almidón, y éste continúa almacenándose en los amiloplastos. Por otra parte, las células de la ZA son morfológicamente similares a las células de la zona distal y proximal, apareciendo algunas zonas de células con la pared más delgada, de forma parecida a lo observado en cortes de flores femeninas en antesis. Todo esto parece indicar que estas flores presentan una ZA normal pero con un retraso en la evolución del proceso de abscisión, similar al retraso que presentan en el desarrollo de sus órganos florales (periantio y nectarios).

Estos resultados muestran que la ZA floral de *C.pepo*, está formada por numerosas capas de células, que en general presentan una morfología similar a las células adyacentes y que solo son claramente distinguibles cuando el proceso de abscisión ha comenzado, identificándose unas capas de células con la pared celular más delgada debido a la degradación de sus PCs y que aumentan considerablemente de tamaño hasta que finalmente ocurre la abscisión en una zona mucho más estrecha, la zona de separación, formada por unas pocas células que han perdido prácticamente su pared celular y están muy alargadas.



**Figura 8:** a) Flor con el síndrome “flor pegada”. b) ZA de flor pegada (barra=500µm). zd: zona distal, zp: zona proximal. c) Detalle del anterior ampliando la zona de abscisión (barra=200µm). La punta de flecha señala los amiloplastos en las células de la zona distal pertenecientes al nectario de la flor (b y c teñidas con azul de toluidina al 1%). d) ZA teñida con el reactivo de Schiff que pone de manifiesto los gránulos de almidón (barra=500µm). e) Detalle de la imagen anterior donde se aprecia claramente los amiloplastos mucho más abundantes en la zona distal (nectario) que en la ZA (barra=200µm). f) Detalle de la zona proximal (barra = 25µm).



### **1.2.2. Microscopía electrónica de barrido**

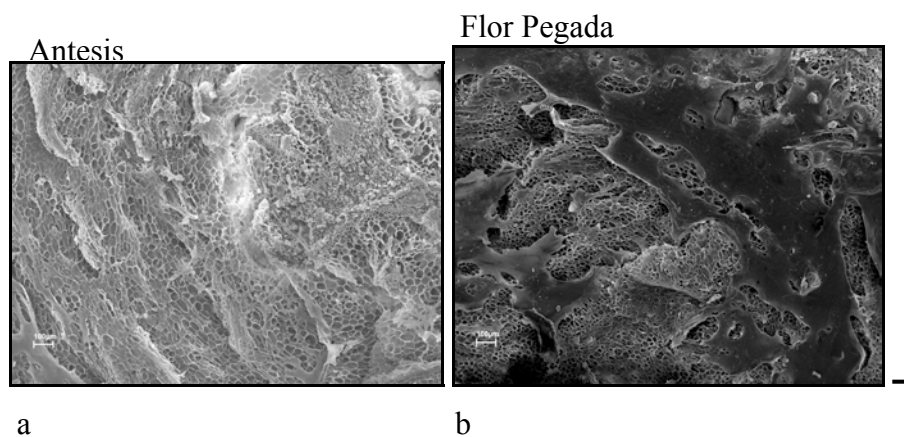
Se estudiaron a microscopía electrónica de barrido (SEM) las ZAs de flores femeninas en antesis, postantesis 1, 2, 3 y tras la abscisión, así como de flores bisexuales con síndrome flor pegada. Las ZAs se separaron cuidadosamente con la mano, ejerciendo una fuerza constante y homogénea a lo largo de toda la zona, e inmediatamente se fijaron para microscopía (Material y Métodos).

Las imágenes obtenidas mediante SEM nos ofrecen información sobre la evolución del plano de fractura a medida que va progresando la abscisión. En antesis (Figura 9a y 10a) las células del plano de fractura aparecen rotas, quedando restos de tejido de la zona distal. Un aspecto muy similar presenta el plano de fractura de flores en postantesis 1 y de flor pegada (Figura 10b y 9b respectivamente). Solo dos días tras la antesis las células del plano de fractura parecen aumentar de tamaño y redondearse, observándose un plano de fractura liso, (Figura 10c, d y e), excepto en torno a los haces vasculares, (punta de flecha en Figura 10c y 11a) y en la zona más externa de la ZA (Figura 11b) donde siguen observándose células rotas. No es hasta postantesis 3, que el plano de fractura aparece formado en toda su superficie, separándose los haces vasculares y el cierre pistilar, de la zona distal de la flor sin rotura celular, cuando se les fuerza a separarse mecánicamente aplicando una fuerza mínima (Figura 10d, 11c y 11d). Sin embargo en los haces vasculares en torno al cierre pistilar, no se observa un aumento del tamaño celular similar al que presentan el resto de células del plano de fractura, ni siquiera tras la abscisión (Figura 10e), lo que nos hace pensar que al igual que en otras especies (Sexton y Redshaw 1981), la elongación de las células de la zona proximal de la ZA antes de la separación del órgano, proporciona el mecanismo hidráulico que separa los haces vasculares de la zona de unión estilo-ovario, que es el único lugar en el que no se produce degradación de la PC (revisado por Roberts y cols., 2002).

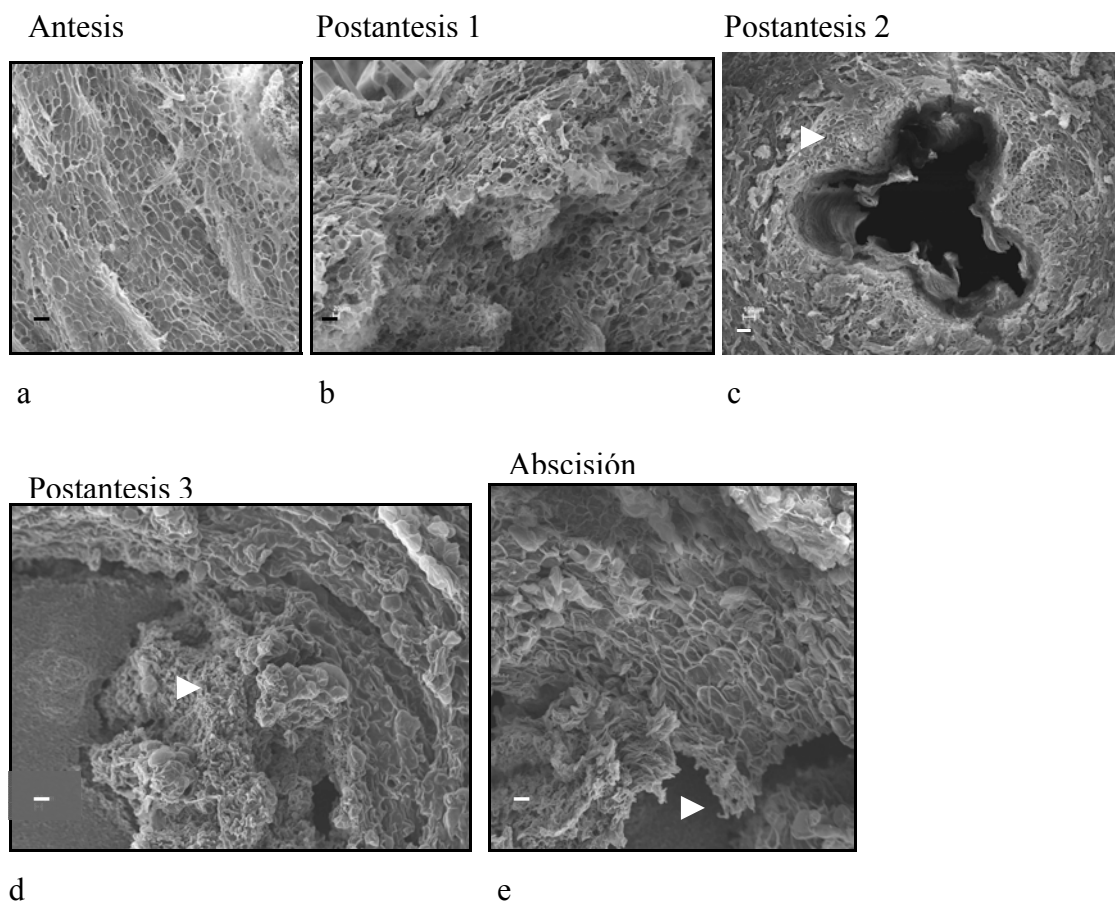
---

**Figura 9:** Imágenes de SEM. a) Detalle de la ZA floral de flores femenina en antesis. b) Detalle de la ZA floral de flores con síndrome flor pegada. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

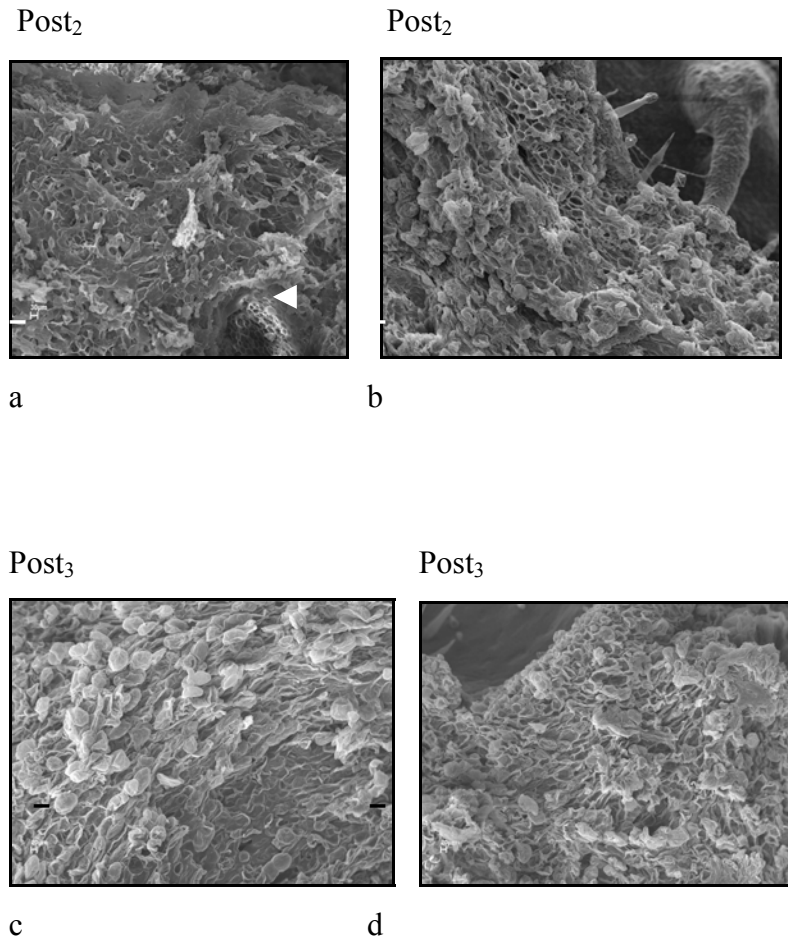
**Figura 10:** Imágenes de SEM. Detalles de ZA de flores femeninas en antesis (a), postantesis 1 (b), postantesis 2 (c), postantesis 3 (d) y tras la abscisión (e). El plano de fractura está prácticamente formado en postantesis 2, completándose en postantesis 3. No se observan diferencias en la morfología de las células de la ZA a partir de este momento. La aparición del plano de fractura se caracteriza por un aumento del tamaño de las células en toda la zona, excepto en la zona de los haces vasculares (punta de flecha blanca), cuyas células incluso tras la abscisión, parecen mantener un tamaño menor al resto de células de la ZA, por lo que parece probable, que esta zona se termine separando debido a la presión mecánica ejercida por el resto de células de la ZA que las rodean y que sí han aumentado de tamaño. Barra = 40  $\mu\text{m}$ , excepto en 10c= 100 $\mu\text{m}$ .



**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11:** Imágenes de SEM. a) Detalles de la zona interna de la ZA de flores femeninas en postantesis 2. b) Detalles de la zona externa de la ZA de flores femeninas en postantesis 2. c) Detalle de zona interna de la ZA de flores femeninas en postantesis 3. d) Detalle de zona externa de la ZA de flores en postantesis 3. Aunque en postantesis 2, casi todas las células de la ZA aparecen redondeadas y sin desgarrar, el plano de fractura no se forma completamente hasta postantesis 3 (Notar punta de flecha apuntando a un grupo de células rotas de los haces vasculares en a). Todas las imágenes tienen los mismos aumentos. Barra = 40µm.

## **2. MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR.**

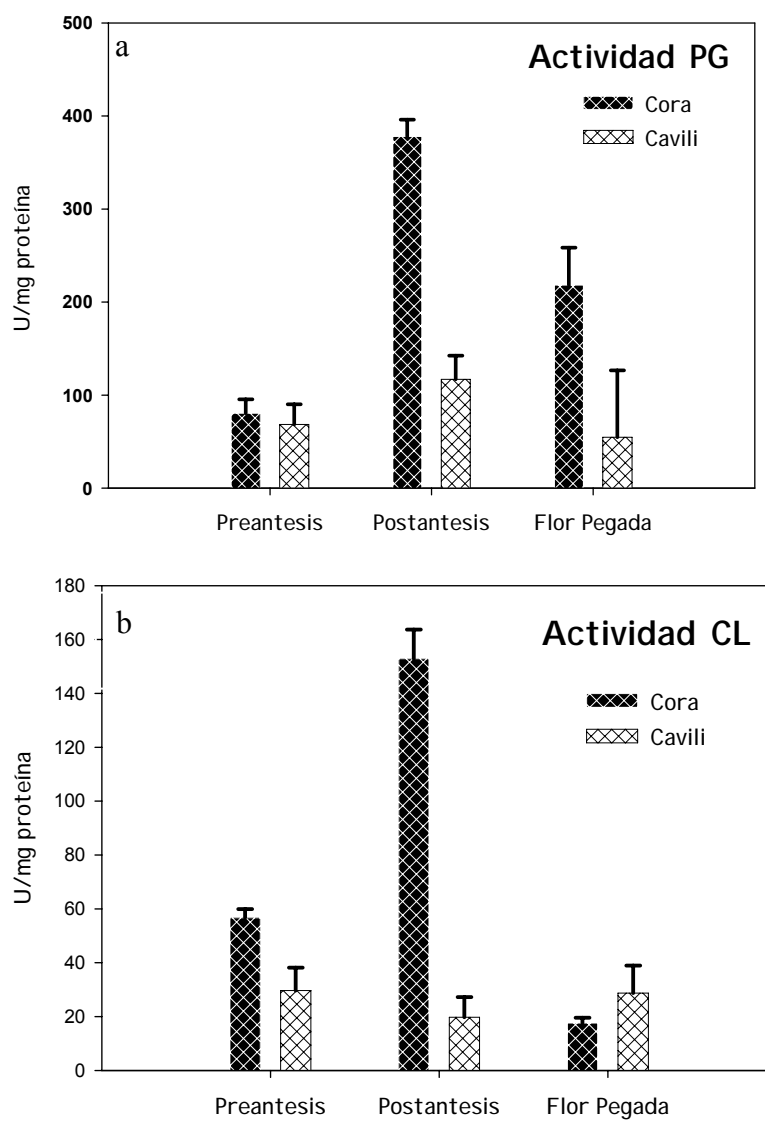
### **2.1. Caracterización fisiológica de enzimas hidrolíticas**

#### **2.1.1. Actividad enzimática Endo-Poligalacturonasa (PG) y Endo-Glucanasa en Calabacín.**

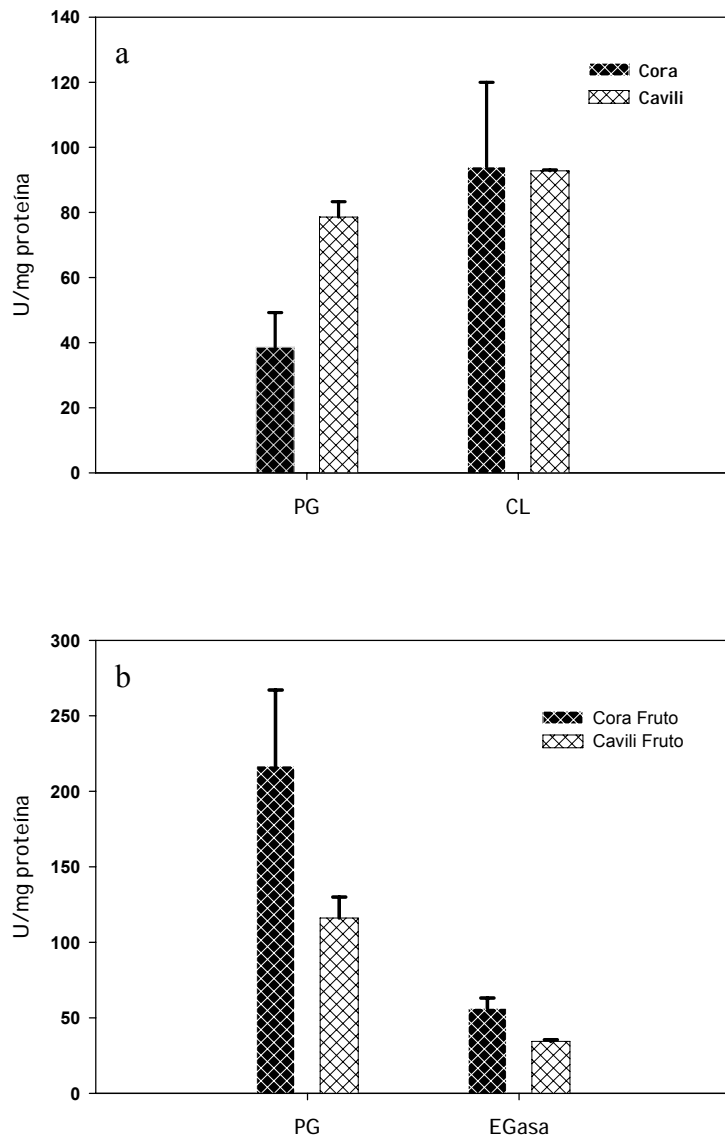
En la caracterización fisiológica de las variedades Cora y Cavili, se analizó la actividad PG y CL en ZA de flores en dos estadios de desarrollo en condiciones de invierno (preantesis 4, postantesis 3); y en flores maduras en condiciones de verano (flor pegada). La actividad PG y CL, aumenta de manera importante cuando el proceso de abscisión está avanzado, excepto en el caso de la actividad CL en Cavili (Figura 12b). La actividad PG y CL en preantesis 4 es comparable a la que existe en ZAs de flor pegada, sugiriendo que en ambas ZAs la hidrólisis de la PC aún no se está produciendo de manera importante. Las flores masculinas en preantesis 4 (<24h para antesis) tienen una actividad CL mayor al de las flores femeninas en ese estadio en las dos variedades (Figura 13a), coincidiendo con la mayor rapidez con que las flores masculinas abscinden una vez que han alcanzado antesis. Por otra parte llama la atención que en casi todos los casos en flores femeninas, la variedad con menor incidencia de flor pegada (Cora), tiene mayor actividad PG y CL que la variedad con mayor incidencia de flor pegada (Cavili).

En cuanto a otros tejidos, se determinó la actividad CL y PG en frutos maduros (Figura 13b), siendo esta última bastante más elevada que la actividad CL. Es lógico, ya que la despolimerización de la pectina, es uno de los procesos clave para el ablandamiento durante la maduración del fruto. Tanto las PGs, como las EGAs pertenecen a familias multigénicas y se han relacionado con numerosos procesos que requieren disminuir la tensión de la PC como, extensión celular, maduración y

abscisión. Se han caracterizado EGasas y PGs específicas de cada proceso (Hadfield and Bennett, 1998; Roberts y cols., 2000).



**Figura 12:** Actividad poligalacturonasa (a) y endoglucanasa (b) en ZAs de flores femeninas en preantesis 4 y postantesis 3, así como de ZA de flores con fenotipo “flor pegada”.



**Figura 13:** a) Actividad PG y CL en ZA de flores masculinas en preantesis 4. Los valores son la media de dos análisis por muestra con tres réplicas cada uno. La barra representa el error estándar. b) Actividad endoglucanasa (CL) y poligalacturonasa (PG) en frutos de Cora y Cavili. Los valores mostrados son la media de dos repeticiones independientes (tres réplicas/repetición). La barra representa el error estándar.



## 2.2. Caracterización molecular de las enzimas hidrolíticas

Como ya se ha mencionado en la introducción, el proceso de abscisión requiere modificaciones muy importantes en la PC y la lámina media de las células de la zona de separación. Está ampliamente estudiado que existen un conjunto de enzimas hidrolíticas y proteínas modificadoras de la PC, que intervienen en la relajación y degradación de la PC durante la separación; de estas enzimas, las PGs, EGAsas (también llamadas celulasas, CL) y expansinas (EXPs) se han visto directamente implicadas en la abscisión, existiendo incrementos en su síntesis y/o en su actividad a lo largo del proceso (Revisado por Roberts y cols., 2002). Las tres enzimas citadas pertenecen a familias multigénicas, habiéndose encontrado isoformas específicas de abscisión.

Con la intención de caracterizar PGs, EGasa y EXPs que intervengan en el proceso de abscisión de *C. pepo*, se procedió a su clonaje mediante RT-PCR con cebadores degenerados diseñados a partir de regiones homólogas de estos genes entre diferentes especies y que se expresan en la ZA, utilizando ADNc procedente de ARN de la ZA.

### 2.2.1. Caracterización molecular del gen *8ZPG* de *Cucurbita pepo*

#### 2.2.1.1. Clonación y caracterización molecular del gen *CpPG*

A continuación presentamos la secuencia parcial de una PG de calabacín, a la que denominamos CpPG. Esta secuencia fue obtenida por RT-PCR, utilizando como molde para la síntesis del ADNc, ARN extraído de ZAs de la variedad Cora (Ver Material y Métodos). Tras solapar las secuencias obtenidas de los diferentes clones se obtuvo una secuencia parcial de 736 nucleótidos (Figura 14). Esta secuencia no contiene el marco de lectura abierto (ORF) completo, faltando parte de la secuencia del extremo

5', incluido el ATG inicial. Al traducirlo a proteína se obtiene un polipéptido de 172 aa hasta el codón de terminación. El análisis de esta secuencia parcial en Protein-Blast, revela una gran homología con la exopoligalacturonasa de *Oenothera organensis*, (72% homología y 58% de aa idénticos), la cual participa en la despolimerización de la pectina durante el desarrollo y germinación del polen y crecimiento del tubo polínico. También presenta un 69% de homología con la poligalacturonasa de *N.tabacum* y la PG de polen de *Turnera subulata*.

La secuencia aminoácidica de CpPG (Figura 14), incluye una región muy homóloga al dominio de la familia 28 glicosil hidrolasa (dominio GH28). Esta familia incluye poligalacturonasas y ramnogalacturonasas. Las glicosil hidrolasas son un grupo muy amplio de enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos entre dos o más hidratos de carbono o entre un hidrato de carbono y una porción que no lo es (CAZy database).

```

3  gggagcncggattgtatatctgtaggatacactaacagaaaaataaccattagcgatggt
   G S X D C I S V G Y T N R K I T I S D V
63  acttgccgaccgggacacggcattagcataggcagcttgggcaagtataaaactgaaaaa
   T C G P G H G I S I G S L G K Y K T E K
123 gaagtggtaggagttacagtgaagaaatgcaaattaatcggtactacaaatgggtgctcagg
   E V V G V T V K K C K L I G T T N G V R
183 atcaaatcatggccagattctgccgtctcataccagcctctgacatgcattttgaagat
   I K S W P D S A V S Y P A S D M H F E D
243 attgaaatggaaaatggttgccaaccctatcatcatagatcaagaatattgtccatggaat
   I E M E N V A N P I I I D Q E Y C P W N
303 caatgcaaccgaaaggttccatccgccattaagattagcaaagttagtttcaagaatctc
   Q C N R K V P S A I K I S K V S F K N I
363 aggggtacatcttctactccgggttgacgtcaaacttgtttgacagtaaaagtaattccatgt
   R G T S S T P V A V K L V C S K S N P C
423 gaggggggtggaaattgctgatattgacctcacttatagtggttaaagaagggccagctgtg
   E G V E I A D I D L T Y S G K E G P A V
483 tctgagtgttcaaagtgaaccgaccatttctggaaagcaaaaccctcccattctgtgct
   S E C S N V K P T I S G K Q N P P I C A
543 aaaccagcgccacctgagaccactccgtcgactgattgaataatcttttaacgccgacaa
   K P A P P E T T P S T D

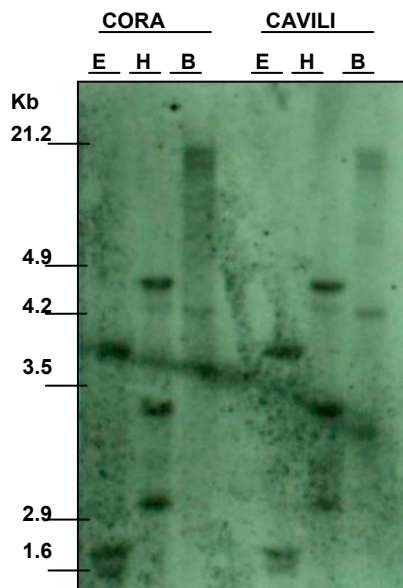
603 atgtttcaaccattcttctctatcatttttatttttagctttcaaaattcgattttacaaca
   tgccatgatgttgggcatgttttcaataattgtatttttttacatttaggagaattaata
   cttgggattataactaaaaaaaaaaaaaaaaa 752

```

**Figura 14:** Secuencia nucleotídica parcial de CpPG y su traducción a proteína. La secuencia homóloga al dominio GH28 aparece subrayada y en negrita, desde el residuo aminoácido 4 al 152. Falta la región N-Terminal del dominio, debido a que la secuencia CpPG no es la secuencia completa de la proteína.

### 2.2.1.2. Análisis genómico: Southern Blot

El análisis genómico de *CpPG* se realizó mediante Southern blot. El ADN genómico se aisló de hojas jóvenes de las variedades Cora y Cavili de calabacín y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI, HindIII y BamHI. Este ADN se hibridó con una sonda de 444pb marcada con digoxigenina, procedente de la amplificación por PCR con los oligos 8PG2.1 y 8PG2.2 (ver Material y Métodos). En ambas variedades aparecen dos señales de hibridación intensas y otra menos intensa en el ADN digerido con EcoRI y BamHI, mientras que con HindIII aparecen tres señales (Figura 15), por lo que deben existir al menos dos copias diferentes del gen que codifican para *CpPG*. En muchas especies la PG pertenece a una familia multigénica, en tomate se han clonado varias isoformas diferentes, 3 específicas de la ZA y al menos otra específica de fruto (Roberts y cols., 2002), en *Arabidopsis* se han identificado más de 75 posibles genes que codifican para PGs (Roberts y cols., 2000), y en maíz se ha clonado una pequeña familia de PG específicas de polen (Niogret y cols., 1991).



**Figura 15:** Análisis tipo Southern de *CpPG*. Cada pocillo corresponde a 10 $\mu$ g de ADN genómico de Cora o de Cavili, digerido con EcoRI (E), HindIII (H) o BamHI (B) e hibridado con 8ZPGt-Dig.

### 2.2.1.3. Análisis de la expresión de *CpPG*: RT-PCR a Tiempo Real y RT-PCR semicuantitativa

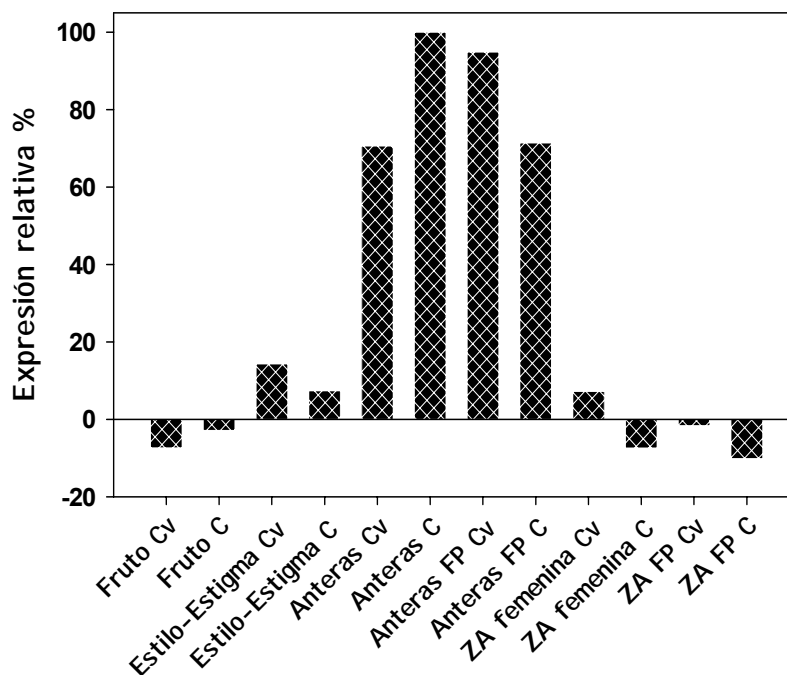
El análisis de expresión del gen *CpPG* se realizó en diferentes tejidos reproductivos mediante PCR a tiempo real y PCR semicuantitativa.

Para la PCR a tiempo real se utilizó ADNc procedente de ARN aislado de frutos y de diferentes órganos florales (flores femeninas, masculinas y flor pegada) de las variedades Cora y Cavili. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con los cebadores 2RTF8PG y RTR8PG. Los valores de expresión del gen se obtuvieron en relación a la expresión del gen ribosómico *18S* de *C. pepo*, amplificado con los cebadores RTF18S y RTRv18S. Las primeras reacciones de PCR a tiempo real se visualizaron en geles de agarosa al 2% para determinar si se estaban produciendo amplificaciones inespecíficas, comprobándose que se estaba amplificando una única banda para cada gen y del tamaño esperado para cada pareja de cebadores, 102pb para *CpPG* y 152pb para el gen *18S*.

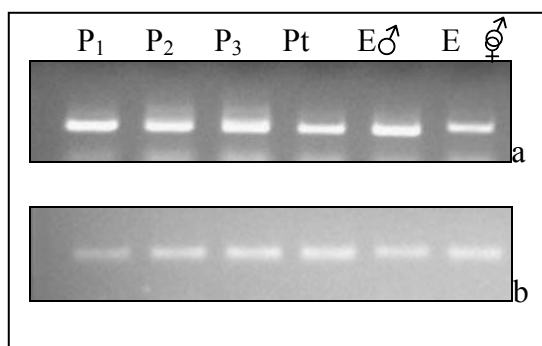
Se detectaron niveles de expresión relativa muy elevados en las anteras de flores masculinas de ambas variedades, así como en las anteras de flores bisexuales (flor pegada), existiendo una expresión muy baja o nula en el resto de tejidos (Figura 16). En las ZAs analizadas la expresión de *CpPG* fue mínima, detectándose exclusivamente en ZAs de flores maduras de la variedad Cavili.

Para confirmar el patrón de expresión de *CpPG* observado con PCR a tiempo real, se realizaron análisis de expresión mediante PCR semicuantitativa en ADNc sintetizado desde ARN extraído de flores femeninas y masculinas en diferentes estadios de desarrollo (preantesis 1, 2, 3 y antesis), así como en flor pegada.

Para los análisis de expresión mediante PCR semicuantitativa, *CpPG* se amplificó con los cebadores 8PG2.1 y 8PG2.2, que amplificaban un fragmento de 444pb. Para igualar la cantidad inicial de ADNc, se utilizó (al igual que en la PCR a tiempo real) el gen *18S* de *C. pepo* amplificado con los cebadores P1-18S y P2-18Srev. La banda correspondiente a la amplificación con 8PG2.1 y 8PG2.2, solo apareció en flores masculinas y en anteras de flor pegada (Figura 17), confirmándose que *CpPG* se expresa específicamente en flores masculinas.



**Figura 16:** Expresión relativa del gen *CpPG* en diferentes tejidos de las variedades de calabacín Cora (C) y Cavili (Cv). Los resultados se han obtenido por PCR a tiempo real. Para estandarizar todas las reacciones se ha utilizado el gen constitutivo *18S* como control interno. El 100% de expresión apareció en anteras de flores masculinas en antesis de la variedad Cora, las demás expresiones génicas son relativas a ese valor. FP: Flor pegada.



**Figura 17:** a) Análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa del gen *CpPG* en flores masculinas en Preantesis 1, 2 y 3 ( $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ ), en pétalos (Pt) y estambres (E) de flores masculinas y bisexuales de la variedad Cora. b) Expresión del gen *18S* en los mismos tejidos anteriores.

## **2.2.2. Caracterización molecular del gen *CpCL1* de *Cucurbita pepo***

### **2.2.2.1. Clonación y caracterización molecular del gen *CpCL1***

CpCL1 fue clonada por RT-PCR, utilizando como molde para la síntesis del ADNc, ARN extraído de ZA florales de la variedad Cora (Ver Material y Métodos). Mediante RT-PCR usando los cebadores degenerados ZCL1 y ZCL2 se obtuvo un primer fragmento de 271pb homólogo a otra CL de ZA. Tras comprobar con un análisis en Nucleotide-Blast que la secuencia nucleotídica obtenida presentaba homología con diferentes EGasas de plantas (Cel 1 de *Fragaria annanasa*, Cel 1 de *Arabidopsis thaliana*, etc.) se diseñaron a partir de esa secuencia los cebadores específicos ZCL8.16 y ZCL8.17. Concretamente ZCL8.16 se utilizó para obtener la región 3' del gen, así la amplificación del ADNc de la ZA de Cora con los cebadores ZCL8.16 y 45027 (Ver Material y Métodos) dio lugar a un fragmento de 1272pb hasta el poliA. Por último la región 5' se secuenció a partir del fragmento de 546pb obtenido mediante una reacción RACE-PCR 5' (ver Material y Métodos) con los cebadores UPM y ZCLrace5'. Las tres secuencias obtenidas eran solapantes, de manera que al alinearlas se obtuvo una secuencia de 1706pb que contenía un marco abierto de lectura de 1476pb (Figura 18).

---

**Figura 18:** Secuencia nucleotídica de CpCL1 (1706pb), bajo la que aparece, en mayúsculas, la traducción a proteína del marco de lectura abierto completo de 491aa. El péptido señal de 27 aa aparece subrayado y en negrita. El posible sitio de glicosilación Asn-X-Ser/Thr se indica en negrita, cursiva y subrayado.



1 taagccactcctcatcattcactaatatacacatacctcacacc**atg**tccacctccattcct  
**M S T S I P**  
63 ccattgtttccggccgctgcccgtatttctctcctccttctcttttctcctccggcaaca  
**P L F P A A A A I L L L L L F S P P A T**  
123 gcccaacacgattaccacgatgcctccgaaaatgcatcctcttcttctgaaggccagcgc  
**A** Q H D Y H D A L R K C I L F F E G Q R  
183 tccggcagactccctccggaccaacgcctcaaatggcgtcgcgactccgccgtccatgac  
S G R L P P D Q R L K W R R D S A V H D  
243 ggctccacagtcggaagagatttgagcggcgggtactacgacgccggagacaacataaag  
G S T V G R D L S G G Y Y D A G D N I K  
303 tttgggttccgatggcgttcacgacgacgttgctgctcgtggagcattatcgacttcgga  
F G F P M A F T T T L L S W S I I D F G  
363 cggaacatgggatcggagctggggaaatgcgggttaaggcgggtgaaatgggggacgagcat  
R N M G S E L G N A V K A V K W G T D Y  
423 ctaactgaaggcgacgtcggttccgggtggtgttgtacaagtgggcgatccttactcc  
L L K A T S V P G V V F V Q V G D P Y S  
483 gatcacaactgctgggagagacccgaggacatggatacgttctgactgtttataaaatc  
D H N C W E R P E D M D T L R T V Y K I  
543 gatggagaccaccctgggtctgacgtggcaggcgaaccgccgctgccttggccgctgct  
D G D H P G S D V A G E T A A A L A A C  
603 tccattgtcttcagatcacgtgatccttcttattccagattgctgctgaatcgagcgtt  
S I V F R S R D P S Y S R L L L N R A V  
663 tcggtgttccgagtttctgacagacacagaggagcgtacagcgggagcttgagaaggcgc  
S V F E F A D R H R G A Y S G S L R R A  
723 gtgtgctccgttttactgacgacgtgaacgggttatcaggacgagttgcttggggagcagc  
V C P F Y C D V N G Y Q D E L L W G A A  
783 tggttgcacaaggcgtcaagaaggcgcgtgtacagagaatacattttcaagaacgagtg  
W L H K A S R R R V Y R E Y I F K N E V  
843 gtgctcagagctgggataccatcaacgagtttgggtgggataacaagcacgcgggaatt  
V L R A G D T I N E F G W D N K H A G I  
903 aacgtcctcatttccaaggaggtgtgatgggcaaagcagaatacttctcatctttcagg  
N V L I S K E V L M G K A E Y F S S F R  
963 caaaatgcagatgagttcatttgcctcaatttgcctggaatttctcatcctcaagttcaa  
Q N A D E F I C S I L P G I S H P Q V Q  
1023 tattctcctgggtgggtgatattcaaggctggaggaagtaacatgcagcatggttacctcc  
Y S P G G L I F K A G G S N M Q H V T S  
1083 ctgctcttttctacttctggcttattccaattaccttagccacgccaatcgtaacgtagca  
L S F L L L A Y S N Y L S H A N R N V A  
1143 tgtggcgttcttttagcatccccgctatgctccgccaaactcgccaaacgtcaggtggac  
C G A S L A S P A M L R Q L A K R Q V D  
1203 tatattctaggcgataatccactacggtatgcatacatggttggatacgggtgctgctac  
Y I L G D N P L R M S Y M V G Y G A R Y  
1263 cctctcaggatccatcacccggccagttccttaccgctcgggttcgggcgcacacctggtcga  
P L R I H H R A S S L P S V R A H P G R  
1323 atcggatgcaaggcgggttcgaggtacttctgagtcggaacccgaacccgaatgtgtg  
I G C K A G S R Y F L S P N P N P N V L  
1383 vtgggagcgggtgggtgggcccacgtgacggatgcggtttccagattcgaggccgttt  
V G A P V G G P **N V T** D A F P D S R P F  
1443 tttcaagagtcggagcccactacgtacatcaatgcaccggttggtgggcctgctggctcac  
F Q E S E P T T Y I N A P L V G L L A H  
1503 ttttcggcccacat**tga**tggaaacggagaacgtgacgtgtgtgtaggggtgtaggaaga  
F S A H H \*  
1563 aattattattgtattagtagttagtggtgctgcaagggtcacccctgccgtttgttatttt  
1623 cctaagattattccatagtttctatcaattccgcgattaaaagtgaacgctctcattatt  
1683 ataattattgttttaatttctcaaaaaaaggaaaaa 1727

El marco abierto de lectura de *CpCLI* codifica una proteína de 491 aa que presenta un dominio Glucosil hidrolasa de la familia 9 (desde el aminoácido 30 al 487, Figura 19). Este dominio hidroliza compuestos O-Glicosil, es decir, hidroliza el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y una porción que no lo es. La familia 9 glucosil hidrolasa comprende enzimas de actividad conocida como endoglucanasa, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas, anteriormente conocidas como celulasas de tipo E (Información obtenida en CAZy: Carbohydrate-Active Enzymes database). El análisis en SignalP 3.0 (Bendtsen J.D., y cols., 2004) indica que la proteína contiene un péptido señal de 27 residuos en la región N-terminal, característica de las proteínas que son secretadas. Sin el péptido señal, la proteína tiene un tamaño de 464 aa, un peso molecular teórico de 51.49 kD ([www.bioinfo.unic.fr](http://www.bioinfo.unic.fr)) y un punto isoeléctrico (pI) de 8.92 (ProtParam tool en [www.ExPASy.ch](http://www.ExPASy.ch)). El peso molecular de CpCL1 entra dentro del rango de la mayoría de las EGasa de plantas, que va de 49 a 56 kD. Se ha visto que la mayoría de Egasas relacionadas con abscisión poseen un pI básico, así Cel 2 de tomate o BAC1 de judía, involucradas en abscisión, tienen un pI de 8.2 y 9.5 respectivamente (Lashbrook y cols., 1994; Tucker y cols., 1988).



**Figura 19:** Esquema representativo de la secuencia aminoacídica CpCL1 indicando los diferentes motivos de ésta. La región no codificante aguas arriba tiene 44pb y la no codificante aguas abajo, tiene 189pb. La región codificante (caja azul) contiene el péptido señal (caja amarilla) y el dominio GH9 (caja roja) que ocupa 457aa de los 464 que tendría la proteína madura.

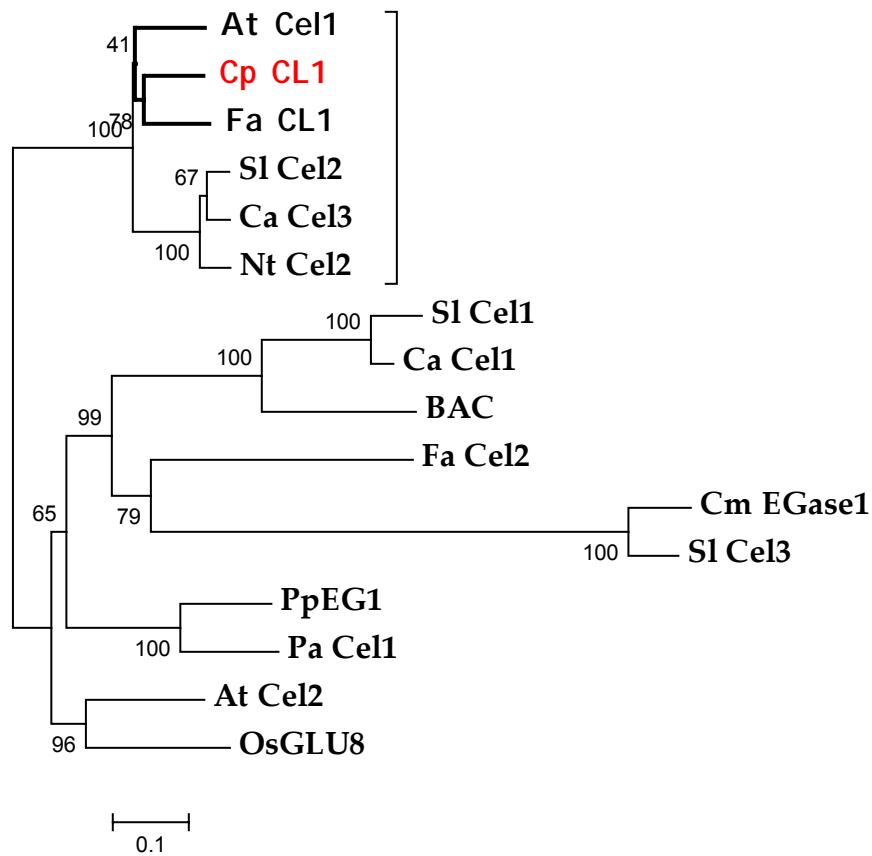
El análisis de esta secuencia aminoacídica en Protein-Blast revela una alta homología de la proteína con otras endo-1,4-beta-glucanasas involucradas en diferentes procesos fisiológicos (Tabla 1) especialmente, con las diferentes isoformas de la endo-1,4-beta-glucanasa Cel 1 de *Fragaria ananassa*, que está relacionada con la maduración de frutos (Llop-Tous y cols., 1999). Con esta EGasa comparte un 86% de aminoácidos idénticos. También presenta gran homología con AtCEL 1 de *Arabidopsis thaliana* (Shani y cols., 1997), así como con Cel 2 de *Nicotiana tabacum* (Goellner y cols., 2001) y Cel 3 de *Capsicum annuum* que está implicada en abscisión. En cuanto a la homología con EGasas de otras cucurbitáceas, CpCL1 tiene una baja homología, de tan solo el 36% con la única endoglucanasa de esta familia que aparece en la base de datos, la EGasa de maduración de melón (BAF30815).

**Tabla 1:** Relación de EGAsas en diferentes especies implicados en maduración de frutos, abscisión floral, extensión celular, etc.

<b>Especie</b>	<b>EGasa</b>	<b>Función Fisiológica</b>	<b>Nº Accesos</b>	<b>% Homología con CpCL</b>
<i>Fragaria ananassa</i>	Cel1	Maduración	AF051346	81
	Cel 2	Maduración	AF054615	48
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cel 1	Extensión celular	X98544	80
	Cel 2		AF034573	58
<i>Nicotiana tabacum</i>	Cel 2	Extensión celular	AF362948	78
<i>Cucumis melon</i>	Egase1	Maduración	AB271851	36
<i>Solanum lycopersicum</i>	Cel 1	Abscisión floral	U13054	47
	Cel 2	Abscisión	U13055	77
	Cel 3	Maduración	U78526	36
<i>Phaseolus vulgaris</i>	BAC	Abscisión	M57400	48
<i>Capsicum annuum</i>	Cel 1	Maduración	X87323	49
	Cel 3	Abscisión	X97189	78
<i>Prunus persica</i>	Cel 10	Abscisión	X96853	56
<i>Persea americana</i>	Cel 1	Abscisión	M17634	54
<i>Oryza sativa</i>	Egasa 3 (OsGLU8)	Flores en desarrollo	AK106887	58

El árbol filogenético fue obtenido con clustalx (ver Material y Métodos), alineando la secuencia aminoacídica de CpCL1 con otras EGAsas de diferentes especies obtenidas en la base de datos SwissProt EMBL.

El árbol filogenético que aparece en la Figura 20, muestra que CpCL1 se encuentra formando parte de un grupo de EGAsas relacionadas con maduración (CL1 de fresa), **abscisión** (Cel 2 de tomate y Cel 3 de pimiento) y extensión celular (Cel 2 de tabaco y Cel 1 de Arabidopsis). Coincidiendo con las homologías obtenidas en Protein-Blast, la proteína que se encuentra más cercana evolutivamente a CpCL1 es la EGasa 1 de fresa.



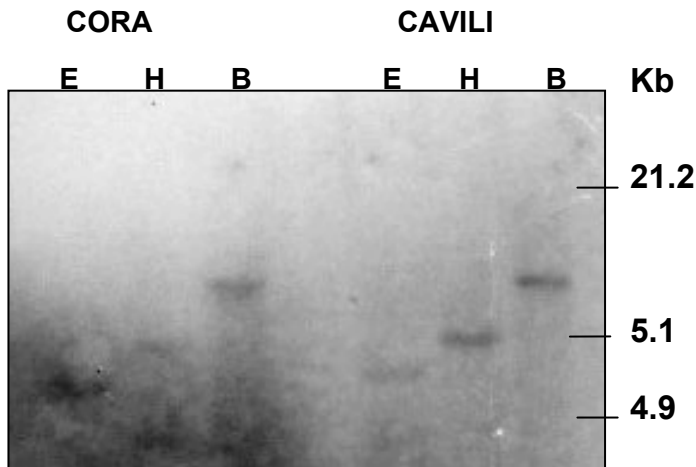
**Figura 20:** Análisis filogenético de EGAsas de las que está disponible la secuencia aminoacídica completa, junto con la EGasa de calabacín (CpCL1). El árbol tipo Neighbor-joining se construyó con un análisis *bootstrap* de 1000 réplicas. Los brazos están dibujados en función de la escala indicada en la barra (0.1 sustitución/1000 residuos). Los números indican los valores de *bootstrap* para 1000 réplicas. At: *Arabidopsis thaliana*, Cp: *Cucurbita pepo*, Fa: *Fragaria ananassa*, Sl: *Solanum lycopersicum*, Ca: *Capsicum annuum*, Nt: *Nicotiana tabacum*, Cm: *Cucumis melo*, Pp: *Prunus persica*, Pa: *Persea americana*, Os: *Oryza sativa*, BAC: Bean abscisión cellulase de *Phaseolus vulgaris*.

---

El árbol filogenético (Figura 20) compara CpCL1 con algunas  $\alpha$ -EGasas,  $\beta$ -EGasas y  $\gamma$ -EGasas típicas, con él se pretende relacionar la EGasa de calabacín con alguno de éstos tres tipos funcionales de EGasa. La mayor relación filogenética de CpCL1 es con las  $\alpha$ -EGasas (AtCel1, SlCel2, etc), mientras que se encuentra muy divergente filogenéticamente de la  $\gamma$ -EGasas (SlCel3). Esto junto con la presencia del péptido señal en posición N-Terminal y su tamaño, parecen indicar que la EGasa de ZA floral de calabacín es una  $\alpha$ -Egasa.

#### 2.2.2.2. Análisis genómico: Southern Blot

El análisis genómico de *CpCL1* se realizó mediante Southern blot. El ADN genómico se aisló de hojas jóvenes de las variedades Cora y Cavili de calabacín y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI, HindIII o BamHI. Este ADN se hibridó con una sonda de 509pb marcada con digoxigenina procedente de la amplificación por PCR del clon 13ZCL con los cebadores específicos ZCL8.16 y ZCL8.17. En ambas variedades la sonda solo hibridó con un único fragmento de restricción independientemente de la enzima de corte empleada (Figura 21), por lo que parece que existe una única copia del gen *CpCL1*, lo que no significa que en *C. pepo* no existan otras isoenzimas divergentes de CpCL1, como ocurre con Cel 1 y Cel 2 en fresa (Llop-Tous, 1999), Cel 1 y Cel 2 en tomate (Brummel y cols., 1999), etc. En muchas especies las EGasa pertenece a una familia multigénica, como es el caso de tomate, en el que se han clonado 8 (Beno-Moualem y cols., 2004), aguacate o melocotón (Trainotti y cols., 2006), etc.

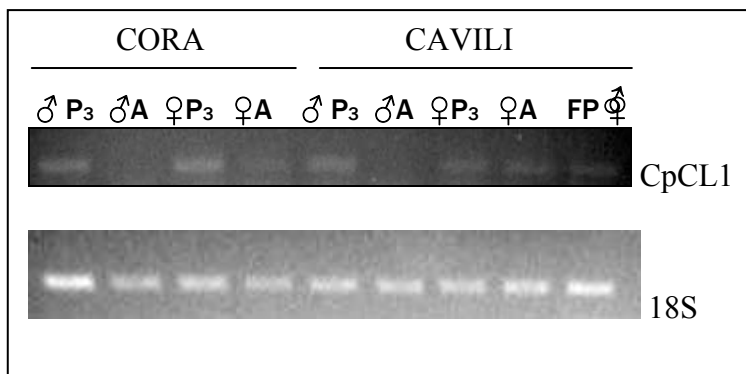


**Figura 21:** Análisis tipo Southern de CpCLI1. Cada pocillo corresponde a 10µg de ADN genómico de Cora o de Cavili, digerido con EcoRI (E), HindIII (H) o BamHI (B) e hibridado con 13ZCL-Dig.

#### 2.2.2.3. Análisis de la expresión de *CpCLI*: RT-PCR semicuantitativa

La expresión de *CpCLI* en ZAs de flores masculinas, femenina y bisexuales (flor pegada) se evaluó mediante RT-PCR semicuantitativa, utilizando como control de la cantidad inicial de ADNc el gen constitutivo *18S* de *C. pepo* (de forma similar a lo descrito en el apartado 2.2.1.3. para la Figura 17). CpCLI se amplificó con los cebadores CLisF y CLisR, que da lugar a un fragmento de 259pb. Desafortunadamente, no hemos encontrado hasta el momento diferencias significativas en la expresión de *CpCLI* en ZA florales en los estadios estudiados. Como se puede observar en la Figura 22 (ejemplo de uno de los patrones de expresión obtenidos) la señal obtenida tras 40ciclos de amplificación para *CpCLI* fue muy baja en todos los casos, variando los niveles de expresión entre los diferentes análisis realizados. Esto parece indicar las ZAs florales analizadas tienen unos niveles de expresión para *CpCLI* muy similares.





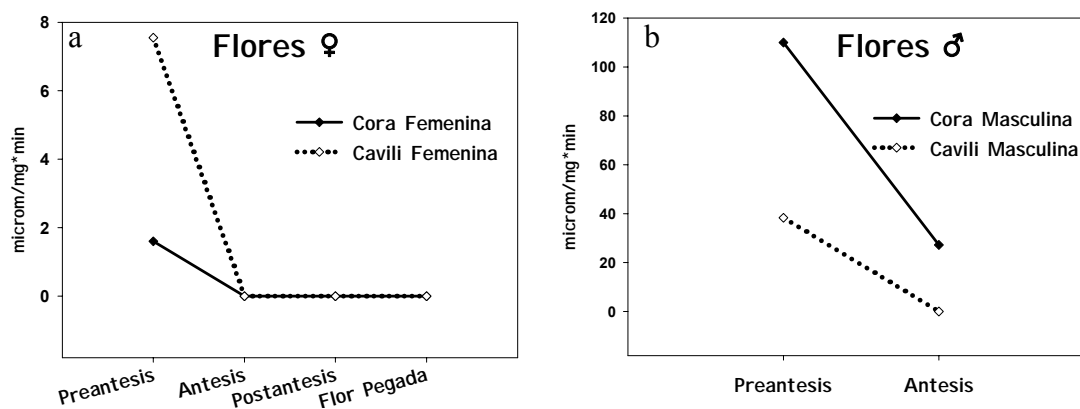
**Figura 22:** Análisis de RT-PCR semicuantitativa del gen *CpCL1* en ADNc de ZAs de flores femeninas y masculinas en preantesis 3 (P<sub>3</sub>) y antesis (A), así como de ZA de flores bisexuales (FP: flor pegada). El nivel de expresión del gen *18S* de *C.pepo*, nos indica la cantidad ADNc inicial existe en cada muestra.

### 2.3. Otras enzimas que modifican la PC

Las principales enzimas hidrolíticas estudiadas en relación con el proceso de abscisión han sido las PGs y CLs. Sin embargo, debido a la complejidad de la PC, es obvio que su desmoronamiento durante la separación debe implicar la acción de otras enzimas y proteínas modificadoras de la pared, como xyloglucano endotransglicosilasas (XET), pectin metil esterasas (PME), expansinas, etc. El papel de estas enzimas en la abscisión aún no está muy claro, tan solo las expansinas se han visto directamente implicadas en el proceso de abscisión, concretamente en hoja de *Arabidopsis* (Cho y Cosgrove, 2000) y de *Sambucus nigra* (Belfield y cols., 2005) y más recientemente en la abscisión de pétalos de *Rosa bourboniana* (Sane y col, 2007). Por todo ello decidimos estudiar el papel que las expansinas y la PME podrían tener en la abscisión de órganos florales en *Cucurbita pepo*.

### 2.3.1. Actividad Expansina en ZAs florales de *Cucurbita pepo*

En primer lugar se determinó la actividad expansina de las ZAs de flores femeninas, masculinas y flor pegada (Figura 23). En ningún caso la actividad expansina incrementó al avanzar el proceso de abscisión, por el contrario, la actividad expansina más elevada se encontró en ZA de flores en preantesis, cuando aún los órganos florales están creciendo. Por ello, nos inclinamos a pensar, que la actividad expansina mayoritaria que hemos detectado en la ZA floral de calabacín, no está relacionada con la abscisión, sino más bien, con el crecimiento del tejido próximo a ella. La menor actividad en flores femeninas con respecto a flores masculinas podría deberse a un efecto de dilución debido al proceso de aislamiento de la ZA, ya que la ZA de flores masculinas está mucho más restringida que la de flores femeninas (Figura 4a, 5a y 7a)



**Figura 23:** actividad expansina en ZAs de flores femeninas (a) y masculinas (b) de las variedades de calabacín Cora y Cavili. Cada valor es la media de dos repeticiones independientes con seis réplicas cada uno.

### 2.3.2. Presencia de Expansinas en ZA: Western Blot

Para confirmar los resultados obtenidos con la determinación de la actividad expansina, se realizó una hibridación tipo Western (Towbin y cols., 1979), detectándose la presencia de la proteína tan solo en los extractos proteicos de ZAs de flores masculinas en preantesis y antesis (Figura 24). Estos resultados junto con los de actividad confirman la acción de las expansinas en el proceso de expansión celular durante el crecimiento del tejido adyacente a la ZA analizada.



**Figura 24:** Análisis tipo Western en extractos proteicos de PC de ZAs de flores masculinas y femeninas de la variedad Cora en preantesis y antesis, así como en ZA tratadas con ethrel y control. Se cargaron 15µm de proteínas de la PC en cada línea. El inmunoblot se hibridó con un anticuerpo frente a la expansina de pepino, CsEXPA1. El marcador de peso molecular se indica a la izquierda en kDaltons. Como control positivo, se utilizó la expansina recombinante CsEXPA1 purificada desde tabaco transgénico (flecha azul en última línea de la Figura).

### **2.3.3. Caracterización molecular del gen *CpEXPA1***

Debido al gran número de expansinas caracterizadas en algunas especies, y a que éstas se encuentran involucradas en procesos que no están relacionados con la extensión, como el ablandamiento de frutos, la iniciación de primordios florales o de raíces, etc.; no abandonamos la idea de que pudiera existir alguna expansina involucrada en abscisión, con una baja actividad de extensión en el tipo de material celulósico (material basado en celulosa que contiene xiloglucanos) empleado en la técnica de determinación de la actividad. Por ello abordamos el clonaje de expansinas a partir de ARN de ZA floral.

#### **2.3.3.1. Clonación y caracterización molecular del gen *CpExpA1***

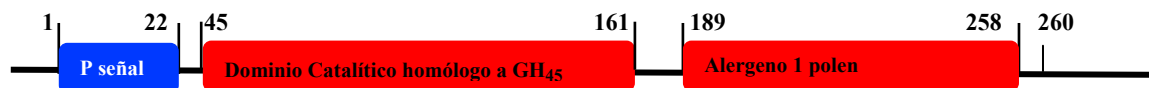
CpExp1 fue clonada por RT-PCR, utilizando como molde para la síntesis del ADNc, ARN extraído de ZA florales de la variedad Cora (Material y Métodos). En primer lugar se obtuvo un fragmento de 608pb procedente de la amplificación del ADNc de la ZA de Cora con los cebadores degenerados CpExp1 y CpExp3R. Mediante el análisis en Nucleotide-Blast de la secuencia nucleotídica obtenida, se comprobó que presentaba una gran homología con expansinas de diferentes especies, especialmente con CpEXPA4 de *Cucumis sativus*. Se diseñaron cebadores específicos a partir de esta secuencia para obtener los fragmentos de la secuencia que faltaban en la región 3' y 5'. Los dos extremos de la posible expansina de calabacín se obtuvieron mediante la reacción RT-PCR RACE. El extremo 3' se amplificó con UPM y Exp3-1. El extremo 5' se amplificó con UPM y ExpRACE1. Tras solapar las secuencias obtenidas de los diferentes clones se obtuvo la secuencia de una posible expansina de *Cucurbita pepo* de 1026 pb (Figura 25). Esta secuencia contiene un ORF de 783 pb, que codifica una proteína de 260 aminoácidos.

```

1 cctccactcctctctgtaatgggcggcaactgtttcaacagcattgctctctttcttgta
      M A A T V S T A L L S F L L
61 ataatgtcgttggccgtggaatgtagacaacataacggagtttacggcggcggcccttgg
      I M S L A V E C R Q H N G V Y G G G P W
121 cagagcggccacgccacattctacggcggcaatgacgcctccggcactatgggagggcgg
      Q S A H A T F Y G G N D A S G T M G G A
181 tgtggctacggcaacttatacagccaggggtacggcgtgaacacggcagcgttgagcaca
      C G Y G N L Y S Q G Y G V N T A A L S T
241 gctctgttcaacgacgggtccagctgtgggtgcttgtttccaaatcaagtgcgtgaatgac
      A L F N D G S S C G A C F Q I K C V N D
301 ccacaatggtgccacgctggaaccctcgattttcgtgacagccaccaacttttgcct
      P Q W C H A G N P S I F V T A T N F C P
361 cccaattatgcactccctaatacacaacggcgggtggtgcaatcctcctcgcctcacttc
      P N Y A L P N D N G G W C N P P R P H F
421 gacctatccatgccatgttctcctcaaaatcgcccagtagccgcccgggatcgccccgtc
      D L S M P M F L K I A Q Y R A G I V P V
481 tcgtttcgagggtgggatgcaagagggagggagggatgaggtttacgatgaatgggttc
      S F R R V G C K R E G G M R F T M N G F
541 aaatatttcaatctggtactgataaccaacgtggcagggcgtggggacattgtgagtgtg
      K Y F N L V L I T N V A G A G D I V S V
601 cgcataaggggtcgaagacaggggtggatgagcatgacacgtaattgggggtcaaaactgg
      R I K G S K T G W M S M T R N W G Q N W
661 cagtcaaacgatgtgttagtgggtcaatcactgtcgttttagtgttaaaggcagcgtatgga
      Q S N D V L V G Q S L S F S V K G S D G
721 agggttttgacttctccaacgttgttcttctcattggcagtttgggtcaaacccttact
      R V L T S S N V V P S H W Q F G Q T F T
781 gccacaatttcagattctaattgctccactttgggtttcaatttttcagaaatttataa
      A N N F R F *
841 actaaagtatgtatgtatgtatgtgggtaagttttaatgttaagtttgggtaatgatga
901 aagagctccatctctactttacacattaccaacttatttatcactacatgatgtattaaa
961 ctttactctaaaaacttagtataagaatgtttatattaataaaaactaaaatttagttggg
1021 cgtgtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1046

```

**Figura 25:** Secuencia de ADNc de *CpExpA1*, donde el ATG inicial y el codón de terminación TAA aparecen en rojo y negrita. Bajo la secuencia nucleótica se muestra la secuencia aminoacídica del ORF completo de CpEXPA1. En verde el péptido señal de 22 aa. El dominio catalítico homólogo a GH45 está representado en azul con las cisteínas conservadas y la caja HFD en cursiva y subrayadas. El dominio homólogo al alerígeno 1 de polen se representa en rosa, con los triptófanos conservados en cursiva y subrayados.



**Figura 26:** Esquema representativo de la secuencia aminoacídica CpEXPA1 indicando los diferentes motivos de ésta. La región no codificante aguas arriba tiene 18pb y la no codificante aguas abajo, tiene 225pb. La región codificante de 260aa contiene el péptido señal (caja azul), el dominio 1 homólogo al dominio GH45 que ocupa 116aa y el dominio 2 homólogo al alergeno 1 de polen de 69aa (cajas rojas).

El análisis en SignalP 3.0 (Bendtsen J.D., y cols., 2004) indica que la proteína contiene un péptido señal de 22 residuos en la región N-terminal, característica de las proteínas que son secretadas. Sin el péptido señal, la proteína tiene un tamaño de 238 aa, para el que se predice un peso molecular de 25.79 kD (<http://www.bioinfo.unic.fr>) y un punto isoeléctrico (pI) de 9.32 (ProtParam tool en <http://www.ExPASy.ch>). Todas estas características coinciden con las características descritas para las expansinas (<http://www.bio.psu.edu/expansins>).

Además, CpEXP1 presenta otras características que identifican tanto a las  $\alpha$ -expansinas como a las  $\beta$ -expansinas (Figura 25 y 26). Estas características son, la presencia de dos dominios precedidos de un péptido señal en posición N-terminal para ser secretadas a la pared celular. El dominio 1 tiene cierta homología con la familia 45 de las endoglucanasas incluyendo una serie de cisteínas conservadas y la caja HFD (His-Phe-Asp) que forman parte de la zona catalítica de la familia 45 glicosido hidrolasa (GH45). A pesar de la presencia del motivo GH45 no se ha detectado actividad endoglucanasa en las expansinas (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995; Verbelen y cols., 2006). El dominio II C-Terminal se relaciona con el grupo 2 de alergenos de hierbas. Este dominio también tiene varios residuos Trp conservados con una espaciación características del dominio de unión a celulosa de algunas celulasas, creyéndose que el dominio II sería el responsable de la unión de las expansinas a la celulosa y otros glicanos de la pared celular.

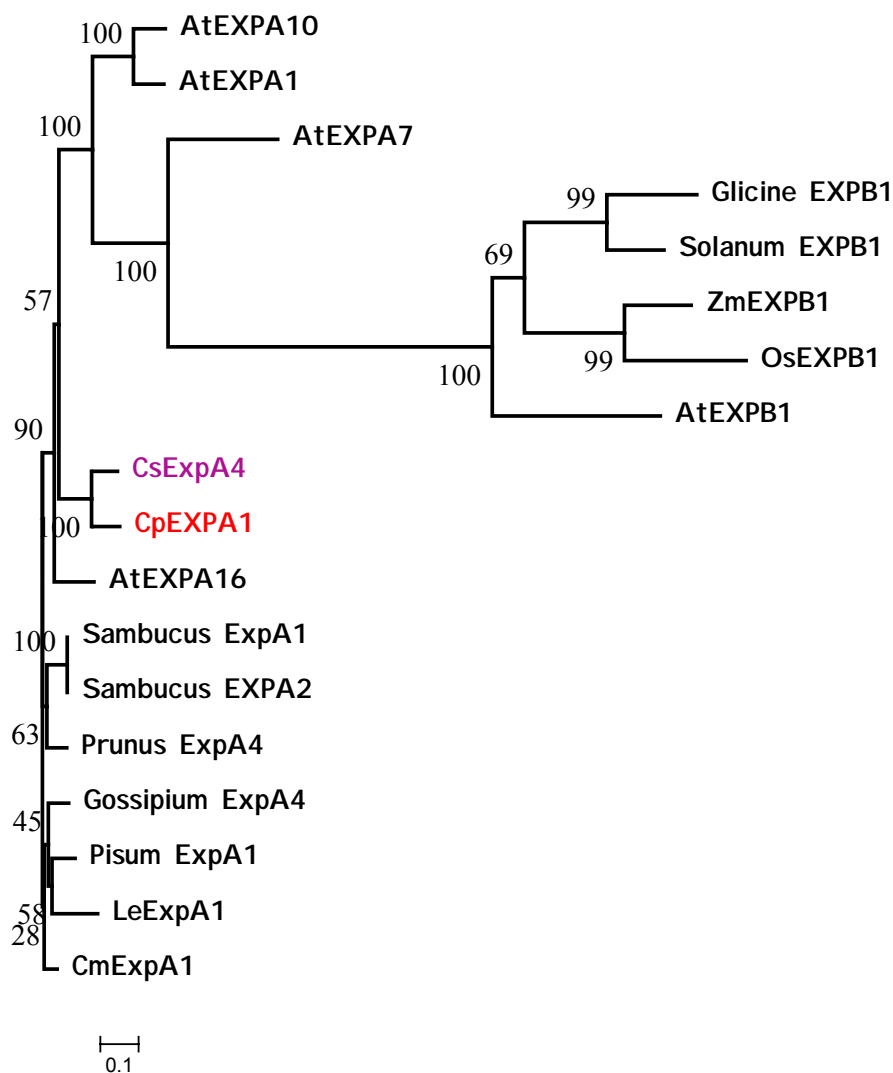
El análisis de la secuencia aminoacídica de CpEXP1 en Protein-Blast reveló homología con expansinas de muchas especies. Especialmente alta, es la homología con la  $\alpha$ -expansina CsEXPA4 de *Cucumis sativus*, con la que comparte un 86% de aminoácidos idénticos; así como con la  $\alpha$ -expansina de *Pupulus tomentosa* (77% de aminoácidos idénticos), SnExp1 de *Sambucus nigra*, o PhEXP1 de *Petunia hybrida*, con las que comparte un 76% y 75% de aminoácidos idénticos respectivamente.

**Tabla 2:** Relación de Expansinas en diferentes especies implicados en elongación celular, maduración, abscisión floral, etc.

<b>Especie</b>	<b>EXP</b>	<b>Función Fisiológica</b>	<b>% Homología con CpEXPA1</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtEXPA1	Expansión celular	66
	AtEXPA7		48
	<b>AtEXPA10</b>	<b>Abscission</b>	<b>66</b>
	AtEXPA16	Expansión celular	72
<i>Cucumis sativus</i>	CsEXPA4	Expansión celular	85
<i>Cucumis melon</i>	CmEXPA1	Maduración	75
<i>Solanum lycopersicum</i>	LeEXPA1	Maduración	<b>71</b>
<i>Prunus persica</i>	PpEXPA4		74
<i>Gossypium hirsutum</i>	GhEXPA4		71
<i>Pisum sativus</i>	PsEXPA1		71
<i>Sambucus nigra</i>	<b>SnEXPA1</b>	<b>Abscisión</b>	<b>76</b>
	<b>SnEXPA2</b>	<b>Abscisión</b>	<b>76</b>



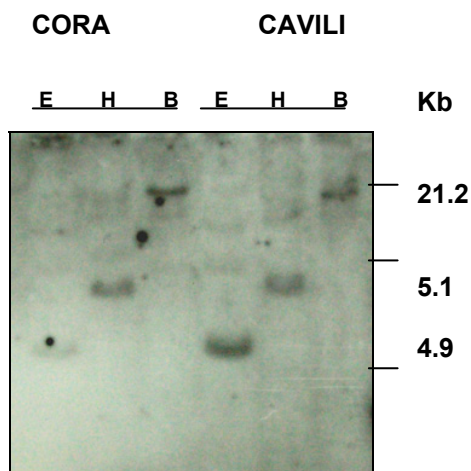
El árbol filogenético obtenido del alineamiento de la secuencia aminoacídica de CpEXP1 con otras  $\alpha$ - y  $\beta$ -expansinas muestra que CpEXP1 está muy relacionada evolutivamente con la  $\alpha$ -expansina de pepino (CsEXPA4), y está muy distante de las  $\beta$ -expansinas típicas como la EXPB1 de *Arabidopsis* o de maíz (Figura 27). Todo esto nos ha llevado a renombrar la expansina de la ZA floral de calabacín como CpEXPA1, según la nomenclatura sugerida por Kende y cols., (2004). CpEXPA1 se encuentra formando parte de un grupo evolutivo que incluye  $\alpha$ -expansinas relacionadas con diferentes procesos fisiológicos como, CsEXPA4 de pepino involucrada en expansión de hipocotilos (Link y cols., 2001), CmEXPA1 de melón implicada en la maduración del fruto, o SnEXPA1 y 2 de *Sambucus nigra* implicadas en abscisión (Belfield y cols., 2005).



**Figura 27:** Análisis filogenético de Expansinas de las que está disponible la secuencia aminoacídica completa, junto con la EXP de calabacín (CpEXPA1). El árbol tipo Neighbor-joining se construyó con un análisis *bootstrap* de 1000 réplicas. Los brazos están dibujados en función de la escala indicada en la barra (0.1 sustitución/1000 residuos). Los números indican los valores de *bootstrap* para 1000 réplicas. Le: *lycopersicum esculentum*=*Solanum lycopersicum*, At: *Arabidopsis thaliana*, Os: *Oryza sativa*, Cm: *Cucumis melo*, Cp: *Cucurbita pepo*, Cs: *Cucumis sativus*. Pisum: guisante, Gossypium: algodón, Prunus: cerezo, Solanum: patata, Glicine: soja.

### 2.3.3.2. Análisis genómico: Southern Blot

En la Figura 28 se muestra el análisis genómico tipo Southern blot realizado para CpEXPA1. ADN genómico de hojas jóvenes de las dos variedades de calabacín usadas en este estudio, se digirió con las enzimas de restricción EcoRI, HindIII o BamHI y se hibridó con una sonda obtenida por PCR del clon EXPis. La sonda EXPis-Dig (330pb) fue marcada con digoxigenina. Solo hibrida con un único fragmento de restricción independientemente de la enzima de corte empleada, por lo que debe existir una única copia del gen *CpEXPA1*, sin embargo las  $\alpha$ -expansinas pertenecen a familias multigénicas bastante numerosas, como en *Arabidopsis*, arroz o tomate, donde se han identificado 26, 33 y 18  $\alpha$ -expansinas respectivamente.

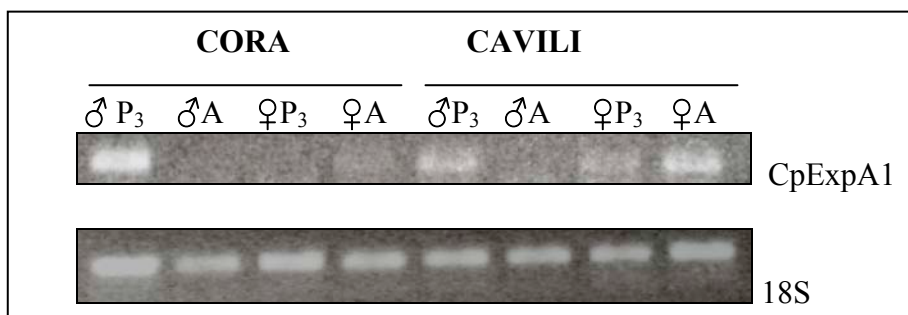


**Figura 28:** Análisis tipo Southern de CpEXPA1. Cada pocillo corresponde a 10 $\mu$ g de ADN genómico de Cora o de Cavili digerido con EcoRI (E), HindIII (H) o BamHI (B). El ADN se hibridó con EXPis-Dig.

### 2.3.3.3. Análisis de la expresión de *CpEXPA1*: RT-PCR semicuantitativa

El análisis de la expresión de *CpEXPA1* en ZAs florales de *C. pepo*, se llevó a cabo mediante PCR semicuantitativa en ADNc sintetizado desde ARN extraído de la ZA de flores femeninas y masculinas en preantesis 3 y antesis.

*CpEXPA1* se amplificó con los cebadores específicos fwEx12q y rvEx12rt, con los que se obtiene un fragmento de 330pb. Para igualar la cantidad inicial de ADNc, se utilizó el gen *18S* de *C. pepo* amplificado con los cebadores P1-18S y P2-18Srev. Coincidiendo con los resultados mostrados en los apartados 2.3.1 y 2.3.2., los niveles de expresión de *CpEXPA1* más elevados aparecen en las ZAs de flores masculinas en preantesis, mientras que la expresión del gen en ZAs de flores masculinas en antesis y flores femeninas en preantesis es prácticamente indetectable.

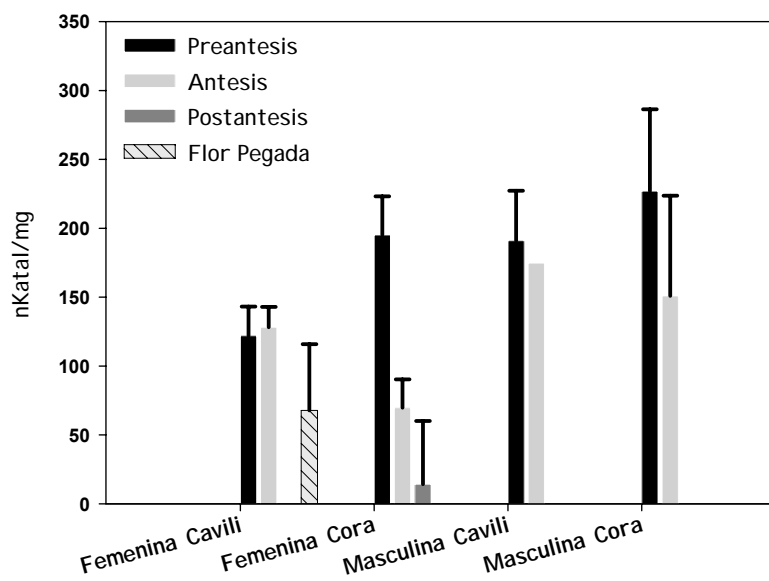


**Figura 29:** Análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de *CpEXPA1* en ZAs de flores femeninas y masculinas en preantesis y antesis de las variedades de *C. pepo*, Cora y Cavili. Los niveles de ADNc iniciales se equilibraron en base a la expresión del gen constitutivo 18S de *C. pepo*, amplificado con P1-18S y P2-18Srev.

#### **2.3.4. Actividad Pectin Metil esterasa**

La pectin metil esterasa (PME) o pectinesterasa es otra enzima que modifica la pared celular, ya que deesterifica los residuos de ácido galacturónico de la pectina que se encuentran metilados. Está muy establecido su papel en la desmetilación de la pectina durante la maduración de frutos, especialmente en tomate (Seymour y Knox, 2002); sin embargo, aún no se ha demostrado que esté implicada en abscisión. Para comprobar que papel juega en la abscisión floral en *C. pepo*, analizamos la actividad PME específica en ZAs de flores masculinas y femeninas en diferentes momentos del proceso de abscisión, y en flores con el síndrome “flor pegada” (Figura 30).

Las diferencias en actividad PME en las ZAs de flores femeninas y masculinas durante la evolución de la abscisión, no son muy grandes, pero la tendencia es claramente a disminuir. En todos los casos, la actividad PME fue menor una vez iniciado el proceso de abscisión (antesis), que antes de que comience (preantesis). De hecho, la actividad PME más baja, aparece en ZA en postantesis, donde la abscisión ya ha progresado mucho. Las flores con síndrome flor pegada, tienen una actividad PME muy parecida a la de las flores femeninas en antesis. El máximo de actividad PME se dio en flores masculinas, probablemente como en el caso de la actividad expansina, debido a la mayor contaminación de los extractos de ZA de las flores femeninas con tejido que no es de la ZA.



**Figura 30:** Actividad PME en ZAs de flores femeninas y masculinas de Cora y Cavili en preantesis, antesis y postantesis (solo en flores femeninas de Cora), además de en flor pegada (de la variedad Cavili). Los valores mostrados son la media de dos repeticiones independientes, con tres réplicas por muestra. La barra indica el error estándar.

---

### 3. EFECTO DEL ETILENO EN EL PROCESO DE ABSCISIÓN DE ÓRGANOS FLORALES EN *Cucurbita pepo*

#### 3.1. Inducción de la abscisión de órganos florales

Para evaluar el efecto del etileno sobre la abscisión floral de calabacín, hemos realizado tratamientos con etileno (en forma de ethrel) y con un inhibidor de su síntesis, el AVG (aminoetoxivinilglicina). Los tratamientos se realizaron en flores femeninas y masculinas de las variedades Cora y Cavili en diferentes estadios de desarrollo, así como en secciones de ZAs.

Datos preliminares de nuestro grupo de investigación indican que las flores femeninas de ambas variedades (Cora y Cavili) de calabacín, en condiciones de cultivo óptimas, abscinden 4 días tras la antesis, mientras que las flores masculinas abscinden a los tres días, e incluso antes (Peñaranda y cols., 2007).

El tratamiento con Ethrel 0.12% en flores femeninas en preantesis 4 y antesis, muestra una clara inducción de la abscisión por acción de esta hormona. En flores en preantesis 4, la abscisión comenzó a los 4 días tras el tratamiento (dpt), y todas las flores se habían separado 5.5 dpt (Figura 31a). Sin embargo las flores control, en la mayoría de los casos, no abscindieron ni mostraron signos de abscisión hasta que finalmente se pudrieron sin abscindir (7 dpt aproximadamente). Un 80% de las flores femeninas en antesis tratadas, abscindieron a 2 dpt, mientras que tan solo un 30% de las flores control lo habían hecho en ese tiempo, no alcanzándose el 100% de abscisión hasta los 4.5 dpt, de manera similar a lo observado en campo.

Nos ha llamado la atención la aparición de ZAs en pétalos y sépalos (Figura 32), que no se observan en campo y que sólo aparecen al tratar con ethrel o en flores control

que han sido manipuladas en exceso, por lo que estas ZAs podrían ser ZAs latentes que se activan por etileno.

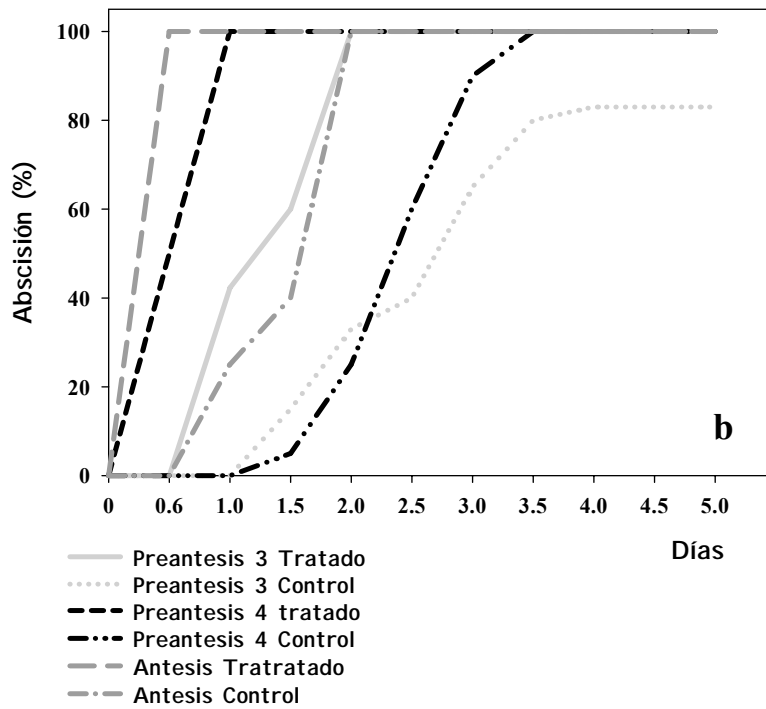
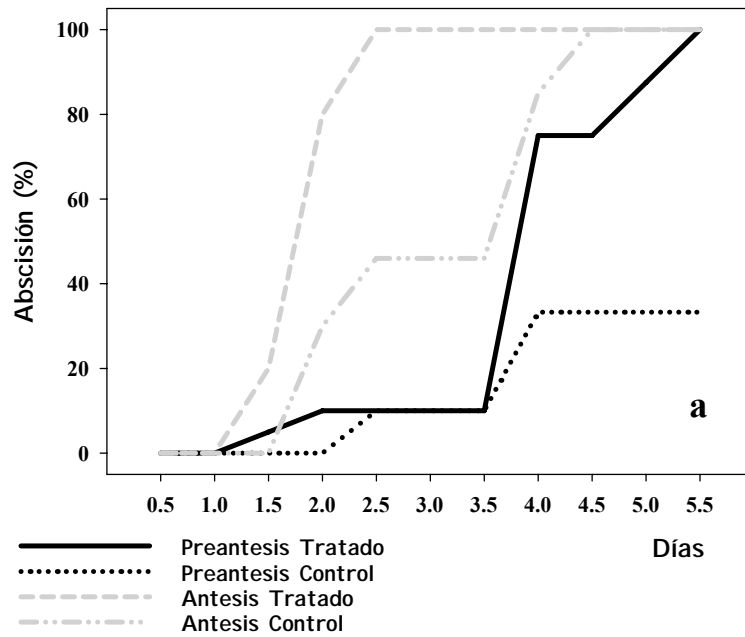
Como puede verse en la Figura 31b, el etileno también aceleró la abscisión de flores masculinas. Las flores masculinas en antesis abscindieron a las 16h tras el tratamiento con ethrel, mientras que las flores control, abscindieron a las 48hpt, que como se ha mencionado anteriormente, es el tiempo al que normalmente abscinde la flor masculina en la planta tras la antesis. En flores masculinas en preantesis 4, el etileno redujo en 2.5 días el tiempo de abscisión. Por último en flores masculinas en preantesis 3, esta reducción del tiempo para abscindir provocada por el etileno, fue más dramática, ya que algunas de las flores control en preantesis 3, no llegaron a abscindir incluso 6 días tras el tratamiento, mientras que las tratadas con ethrel abscindieron 2días después de ser tratadas.

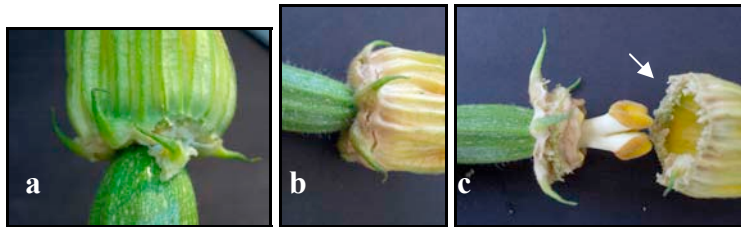
Con respecto a la inhibición de la síntesis de etileno, el tratamiento con AVG 100 $\mu$ M en flores femeninas en estadio de preantesis 4 y antesis, muestra un retraso de la abscisión en flores tratadas, y una supresión total de la abscisión de sépalos o pétalos, no apareciendo signos de estas ZAs (Figura 33). Tanto las flores en preantesis 4, como las flores en antesis tratadas con AVG no abscindieron (Figura 34), ni mostraron signos de abscisión durante los 7 días que se mantuvieron en incubación; finalmente las flores se pudrieron y no fue posible continuar con el ensayo.

---

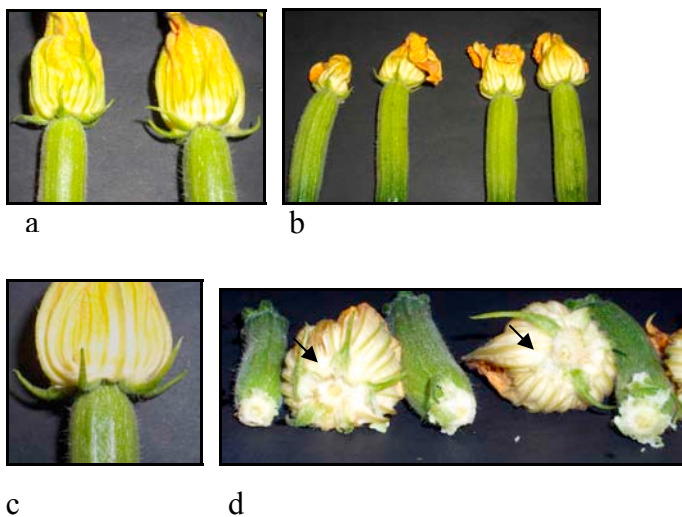
**Figura 31:** a) Días que tardan en abscindir, flores femeninas en preantesis 4 y antesis, escindidas de la planta y tratadas con ethrel 0.12%. Los valores mostrados son la media de un mínimo de 12 flores b) Días que tardan en abscindir, flores masculinas en preantesis 3, 4 y antesis, escindidas de la planta y tratadas con ethrel 0.12%. Los valores mostrados son la media de un mínimo de 6 flores.







**Figura 32**



**Figura 33**

**Figura 32:** Flores femeninas en preantesis tratadas con ethrel 0.12% mostrando la ZA de sépalos (a) y pétalos (b). c) Flor 32b tras retirar los pétalos, puede apreciarse una sustancia blanca a lo largo de toda la ZA de los pétalos (flecha blanca).

**Figura 33:** Flores femeninas tres días tras haber realizado el tratamiento con AVG. a y b) Flores tratadas con AVG 100 $\mu$ M, en preantesis 4 y antesis respectivamente. c y d) Flores control, en preantesis 4 y antesis respectivamente. Las flechas en d, apuntan a sépalos abscindiendo o ya caídos.

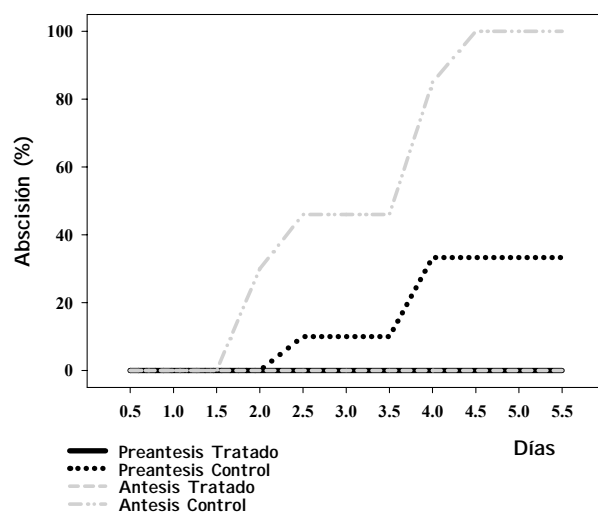


Tabla 3: Días que tardan en abscindir, flores femeninas en preantesis 4 y antesis tratadas con AVG 100 $\mu$ M.

	Tratadas	Control
Preantesis 4	ND	ND
Antesis	ND	4

**Figura 34:** Efecto del inhibidor del etileno AVG en el tiempo necesario para abscindir en flores femeninas en preantesis 4 y antesis.

Tabla 4: Días que tardan en abscindir secciones de ZA de flores femeninas y masculinas tratadas con ethrel 0.12%. Los valores mostrados son la media de un mínimo de 12 flores. ND=Abscisión No Detectada

ZAs de flores masculinas	Tratadas	Control
Preantesis 3	1.5	4.2
Preantesis 4	1.5	3.3
Antesis	1.25	2.8
ZAs de flores femeninas	Tratadas	Control
Preantesis 2	ND	ND
Preantesis 3	ND	ND
Preantesis 4	2.65	ND
ZAs de flor pegada	Tratadas	Control
Fruto calibre comercial	2	4

También se realizaron tratamientos sobre ZAs aisladas cuyos resultados se presentan en la Tabla 4. De los datos mostrados se desprende que la abscisión, en flores femeninas al menos, se acelera al eliminar los órganos florales (2.7 días en secciones de ZA de flores en preantesis 4 frente a los 5.5 días de la flor completa), lo que podría deberse al etileno desprendido por el estrés causado en la manipulación del tejido, o bien, a que los órganos florales produzcan algún inhibidor que actúe retrasando la abscisión. Por otra parte estos resultados indican que el etileno no es capaz de inducir la abscisión hasta que las flores no han alcanzado el estadio de preantesis 4 en flores femeninas y preantesis 3 en flores masculinas. La ZA de flores en estadio de desarrollo inferior a los citados, no responde a etileno, incluso cuando se aplican dosis elevadas de la hormona (datos no mostrados).

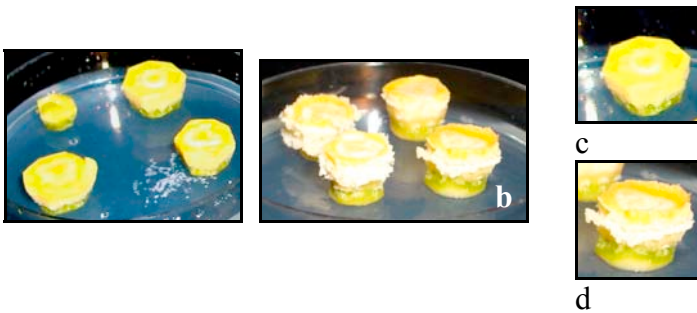
Quizás lo más interesante sea la capacidad del etileno de inducir la abscisión de ZAs aisladas de flores con el síndrome flor pegada. La gran mayoría de las ZAs de flores pegadas abscindieron 48h tras haber sido tratadas con ethrel y las control también abscindieron aunque una media de dos días más tarde que las tratadas. La abscisión de ZAs de flor pegada tratada y control, pone de nuevo de manifiesto el efecto inhibidor que supone la región distal de la flor sobre la abscisión, ya que, como se ha comprobado en campo, la flor completa con síndrome flor pegada no llega a abscindir nunca.

### **3.2. Modificaciones morfológicas inducidas por etileno en ZAs de *C.pepo***

Al realizar los tratamientos de ethrel en ZAs aisladas, se observaron algunas modificaciones en las ZAs a las que se les había aplicado ethrel con respecto a las control (Figuras 35 y 36). En primer lugar, se apreció una pérdida de coloración a las pocas horas tras el tratamiento, seguidamente aparecía la línea de separación (1 día en flores masculinas en preantesis 3 y 2 días en femeninas en preantesis 4) a medida que iba apareciendo una sustancia blanca a lo largo del contorno de la línea de separación, hasta que finalmente las ZAs abscindían existiendo una acumulación importante de esta sustancia blanca.



**Figura 35**



**Figura 36**

Figura 35: ZA de flores masculinas en preantesis 3, 36h tras ser tratadas con ethrel 0.12%, o con H<sub>2</sub>O (Control). a) ZAs control. b) ZAs tratadas con ethrel. c) Corte longitudinal de una ZA tratada con ethrel. La flecha indica la longitud y dirección del corte.

Figura 36: ZA de flores femeninas en preantesis 4, 60h tras ser tratadas con ethrel 0.12%, o con H<sub>2</sub>O (Control). a) ZAs control. b) ZAs tratadas con ethrel. c y d) Detalle de la figura a y c respectivamente.

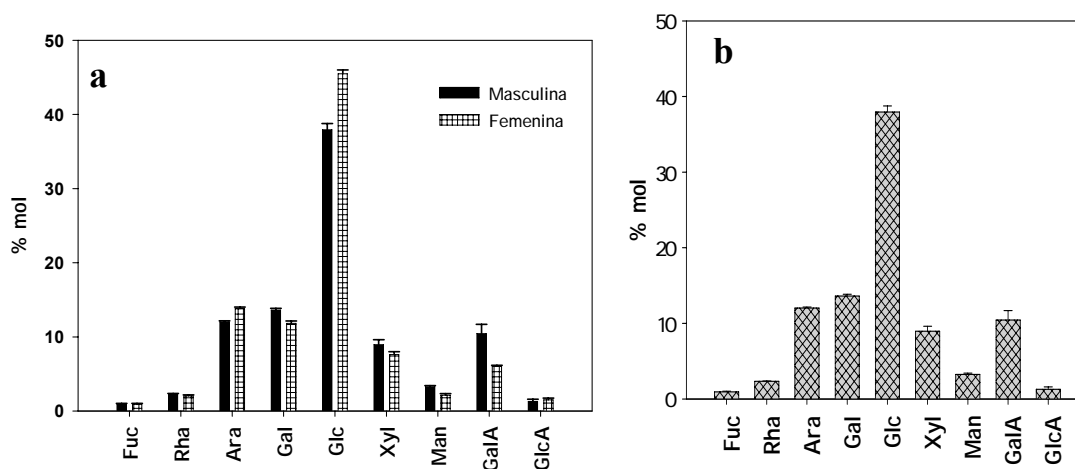
### **3.3. Modificaciones a nivel fisiológico y molecular**

#### **3.3.1. Análisis de la sustancia blanca**

##### **3.3.1.1. Detección de azúcares neutros**

En el apartado anterior, se pone de manifiesto cómo el etileno acelera el proceso de abscisión tanto en flores femeninas como en masculinas de calabacín y cómo, en el progreso de esta separación se acumula una sustancia blanca, muy fácilmente disgregable, de composición desconocida (flecha blanca en Figura 38a). Esta misma sustancia también aparece en la ZA de flores que abscinden normalmente en la planta, pero en cantidades tan pequeñas que es inapreciable.

El análisis de la composición en azúcares neutros de dicha sustancia (Figura 37) revela que un alto porcentaje de ella está formado por glucosa, arabinosa y galactosa y en menor grado por ácido galacturónico (10,4% en flores masculinas y 6% en femeninas) y xilosa (8,9% y 7,6% en flores masculinas y femeninas respectivamente). La sustancia blanca procedente de la ZA de flores masculinas contiene un 37,6% de glucosa, seguido de un 13,6% de galactosa y un 12% de arabinosa. La composición en azúcares neutros de la sustancia blanca de ZAs de flores femeninas es muy similar a la de las flores masculinas. Parece por tanto, que una parte importante de la sustancia blanca está compuesta por arabinogalactanos.



**Figura 37:** Porcentaje en moles de azúcares neutros en la sustancia blanca inducida por la aplicación de etileno en ZAs florales. a) Comparación de la composición en azúcares neutros de la sustancia blanca proveniente de ZAs de flores femeninas y masculinas. b) Porcentaje molar de azúcares neutros en la sustancia blanca de ZAs de flores masculinas. Las flores femeninas fueron tratadas con ethrel en estadio de preantesis 4 y las flores masculinas en preantesis 3. La sustancia blanca se recogió cuando la ZAs habían abscindido completamente a 36hpt (ZA de flores masculinas) y 60hpt (ZA de flores femeninas). Cada valor proviene de la media de dos repeticiones con tres réplicas cada uno, indicándose el error estandar.



### 3.3.1.2. Precipitación de AGPs con $\beta$ -GlcY

En ZAs florales de líneas *35S:IDA* de *Arabidopsis* que sobre-expresan el gen *IDA*, se ha descrito la acumulación de una sustancia blanca muy similar a la detectada en ZA florales de *C. pepo* tratadas con etileno. Esta sustancia en las líneas *35S:IDA* está compuesta en una parte importante por arabinosa, galactosa, y AGPs (Stenvik y cols., 2006). Los resultados obtenidos en *Arabidopsis*, junto con la degradación tan intensa de la PC de las células de la ZA a causa del etileno, y la composición en azúcares neutros de la sustancia blanca rica en arabinosa y galactosa, nos hizo pensar que ésta también podría contener AGP. Al analizar la sustancia (procedente de ZA de flores masculinas tratadas con ethrel) al microscopio óptico, observamos que se trataba de fibras, algunos restos de epidermis, pero sobre todo estaba compuesto por células libres (sin contacto con otras células) sin pared en forma de protoplastos. Teñimos dicha sustancia con el reactivo Yariv  $\beta$ -D-Glucosílico ( $\beta$ -GlcY). Tal reactivo glucosílico se emplea para la detección y cuantificación de AGPs ya que se une específicamente a ellas y las precipita. Como control se usa el reactivo de Yariv  $\alpha$ -D-Glucosílico ( $\alpha$ -GlcY), que no se une a las AGPs. La tinción se realizó en la sustancia blanca desprendida por ZA de flores masculinas en preantesis 3 tratadas con ethrel y en ZA de flores abscindidas normalmente, para comprobar si efectivamente contenían AGPs.

Con el reactivo Yariv efectivamente, pudimos detectar la presencia de AGPs en la sustancia blanca, que en el caso de la abscisión inducida por etileno, aparece como un precipitado rojo (Figura 38) y en el caso de la abscisión natural aparece más difuso, dando la impresión de que está dentro de los protoplastos (figura 39).

La presencia de AGPs parece existir tanto en la abscisión natural, como en la inducida por etileno, aunque aparecen de forma diferente. En ZAs tratadas con etileno, está más clara su secreción al medio por las células de la ZAs.

---

Figura 38: a y b) ZA de flores masculinas tratadas con ethrel 36hpt. Las flechas blancas señalan la sustancia blanca. c) Imagen de microscopía óptica “*in vivo*” de la sustancia blanca (4X). d y e) Imágenes de microscopía óptica (d: 10X; e: 40X) de la sustancia blanca tras haber sido incubada 1h con el reactivo  $\beta$ -GlcY. f y g) Imágenes de microscopía óptica (f: 4X; g: 10X) de la sustancia blanca tras haber sido incubada 1h con el control negativo del reactivo, es decir, con  $\alpha$ -GlcY.

Figura 39: Sustancia blanca procedente de ZAs abscindidas de forma natural y tras haber sido incubadas con  $\beta$ -GlcY (a: 4X; b: 40X) o con  $\alpha$ -GlcY como control negativo (c).

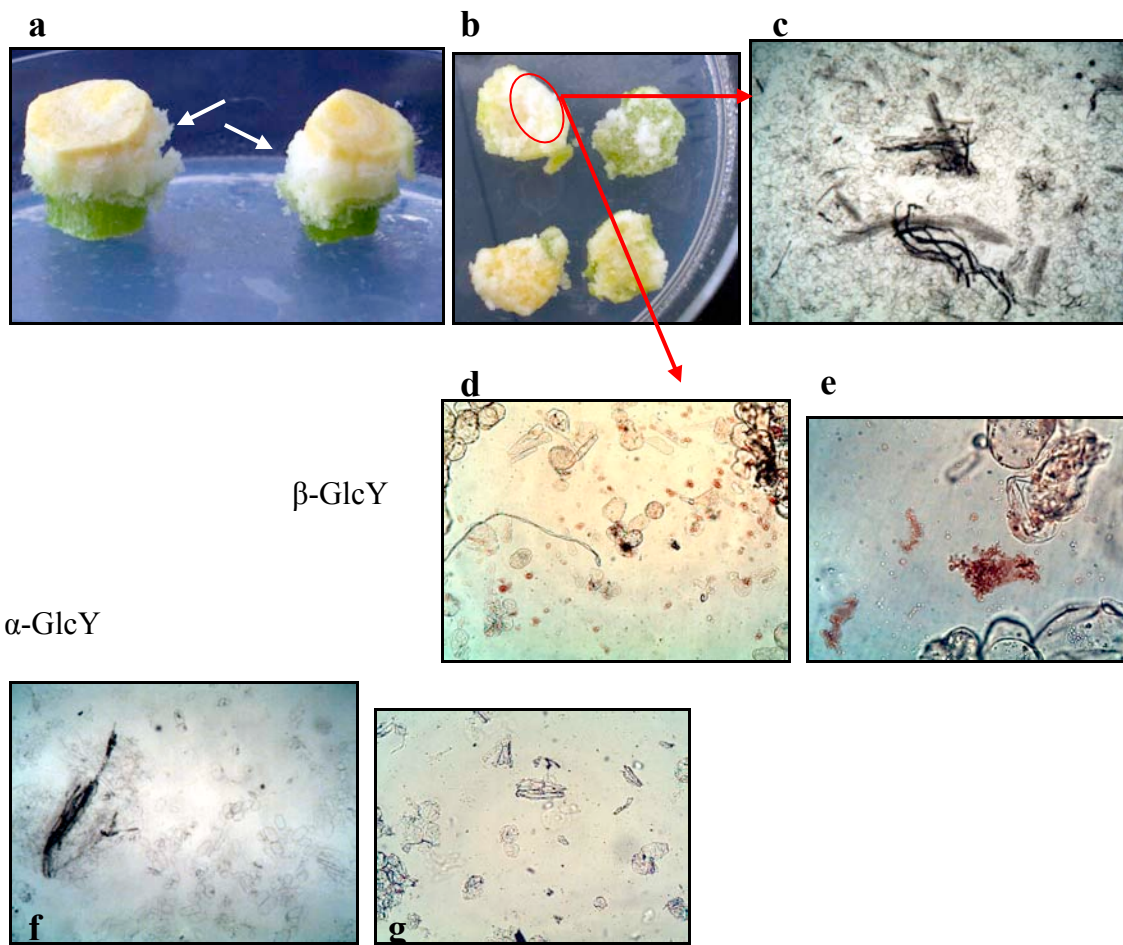


Figura 38



Figura 39

### 3.3.1.3. Presencia de AGPs en la ZA: Western Blot

Para confirmar definitivamente la presencia de AGP en la sustancia blanca se realizó un análisis tipo Western con dos anticuerpos frente a dos epítomos diferentes para AGP, LM2 y MAC207 (Yates y cols., 1996). En la Figura 40, se aprecia claramente la acumulación de la proteína, con los dos Anticuerpos (Ab) usados, siendo más intensa la señal en el caso de LM2. El tamaño tan grande de las AGPs detectadas, así como el fondo que aparece en los blots, es normal para estas proteínas, debido a su alto grado de glicosilación.

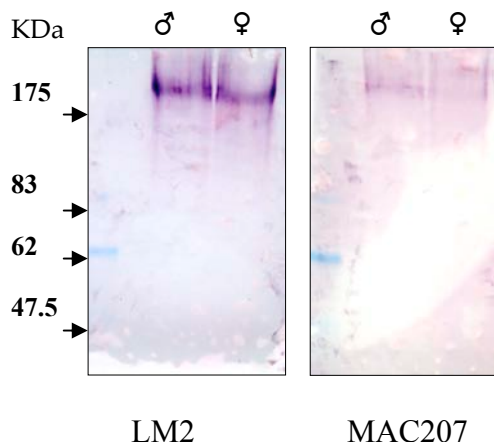
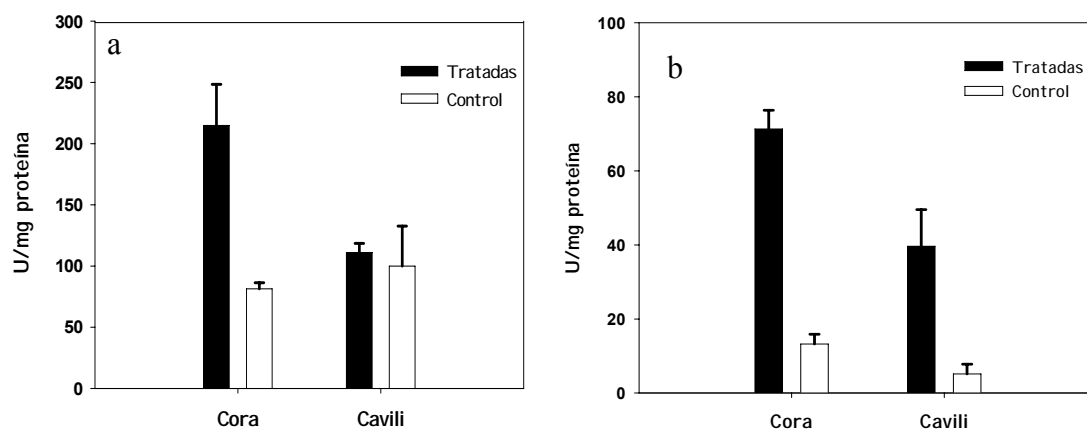


Figura 40: Detección de AGP en análisis de proteínas Western-blot. La hibridación se realizó con dos anticuerpos frente a dos epítomos de la región glucosídica de las AGPs diferentes, LM2 y MAC207. Se utilizaron 20µg/pocillo de proteínas totales de la sustancia blanca procedente de ZA de flores masculinas (♂) y femeninas (♀) en preantesis 3 y 4 respectivamente, tratadas con ethrel.

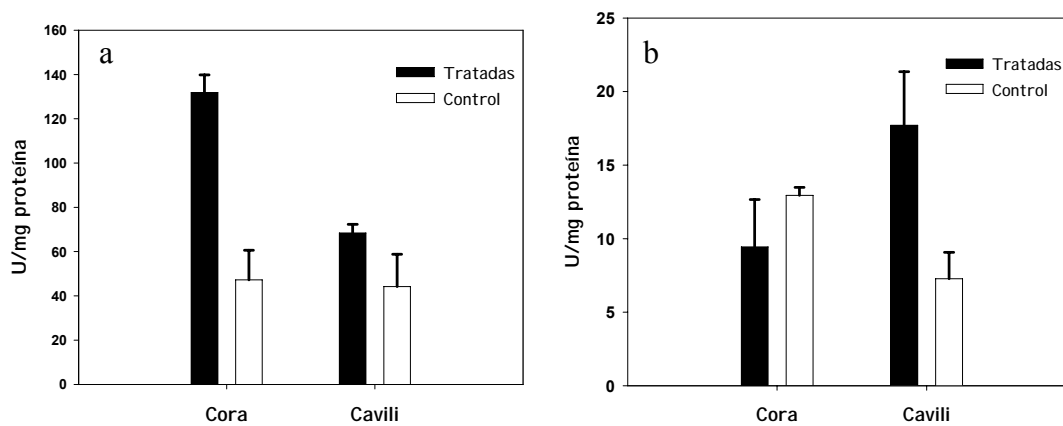
### 3.3.2. Actividad endo-glucanasa y endo-poligalacturonasa

Para conocer como participan las enzimas estudiadas en la abscisión natural de flores de *C. pepo*, en la abscisión inducida por etileno en estas flores, analizamos estas mismas enzimas y proteínas modificadoras de la PC, en ZAs que habían sido tratadas con ethrel, comparándolas con las control (ZAs tratadas con H<sub>2</sub>O).

La actividad PG y CL en ZA tratadas con ethrel fue, en la mayoría de los casos, marcadamente más elevada que en las ZAs control (Figura 41 y 42). Cuando no fue así, la actividad PG y CL fue la misma en las ZAs tratadas y control (Actividad PG de ZAs de flores femeninas y masculinas en Cavili, y la actividad CL de ZAs de flores masculinas de Cora). Las ZAs de flores femeninas de la variedad Cora presentaron una mayor actividad de las dos enzimas hidrolíticas con respecto a Cavili (Figura 41), lo que coincidiría con el hecho del menor porcentaje de flor pegada que presenta la primera variedad. Las ZAs analizadas proceden de flores recogidas en verano, por lo que muy posiblemente la muestra de la variedad Cavili contuviera una mayor proporción, que la muestra de Cora, de flores con el síndrome flor pegada, es decir, con flores con retraso en su desarrollo.



**Figura 41**



**Figura 42**

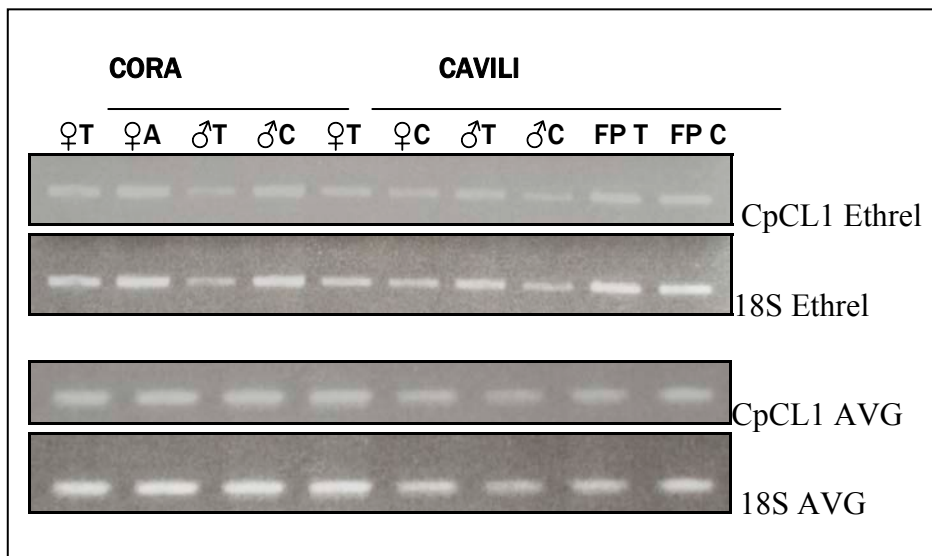
**Figura 41:** ZAs de flores femeninas tratadas con ethrel 0.12%. a) actividad PG. b) Actividad CL

**Figura 42:** ZAs de flores masculinas tratadas con ethrel 0.12%. a) Actividad PG. b) Actividad CL.

Los valores representados en cada columna son la media de dos repeticiones independientes. La barra indica el error estándar

### 3.3.3. Análisis de la expresión de *CpCLI*

Tras comprobar que la actividad de las enzimas hidrolíticas CL y PG se incrementaba en la abscisión inducida por etileno, quisimos evaluar el efecto de esta fitohormona a nivel molecular en el proceso de abscisión. Para ello se estudió la expresión de *CpCLI* mediante RT-PCR semicuantitativa (ver apartado 2.2.2.3.) en ZAs de flores masculinas, femeninas y flor pegada; que habían sido tratadas con ethrel o con el inhibidor de su síntesis AVG. En contraposición a lo observado en la actividad de la enzima, la expresión de *CpCLI* en ZAs no se vio afectada por etileno, ni por AVG, apareciendo un patrón de expresión muy homogéneo entre ZAs tratadas con ethrel, AVG y control; o entre ZAs masculinas, femeninas y flor pegada (Figura 43). Por lo tanto, con los datos obtenidos hasta el momento, parece que la expresión de *CpCLI* no está afectada por etileno, al menos no de forma evidente.



**Figura 43:** Análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de *CpCLI* en ZAs de flores femeninas, masculinas y flor pegada (FP) en las variedades Cora y Cavili, tratadas con ethrel y control. Los niveles de ADNc iniciales se equilibraron en base a la expresión del gen constitutivo *18S* de *C. pepo*, amplificado con P1-18S y P2-18Srev.

### 3.3.4. Actividad Expasina

Como puede observarse en la Tabla 5, el etileno no indujo la actividad expansina en ningún caso, siendo ésta muy próxima a cero en todas las ZAs tratadas y muy inferior a la actividad expansina de ZAs sin tratar con ethrel en preantesis, que es el estadio floral en el que se realizan los tratamientos de ethrel (Figura 23, apartado 2.3.1.). Estos datos coinciden con los obtenidos en ZAs sin tratar, apuntando a que las expansinas con actividad de extensión en el material celulósico empleado, no intervienen en la abscisión natural de flores de *Cucurbita pepo*, ni se induce por etileno.

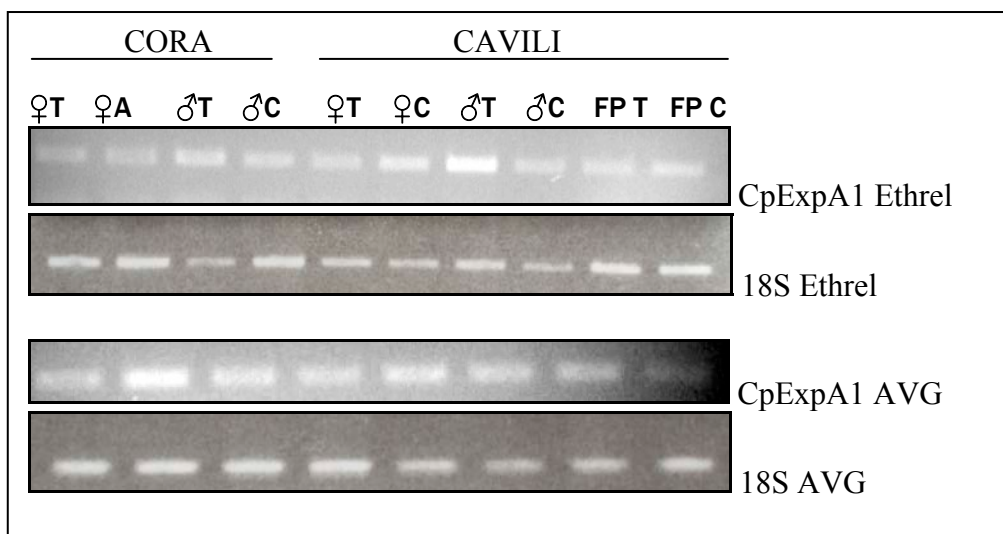
Tabla 5: Actividad expansina en ZA de flores femeninas, masculina y flor pegada, tratadas con ethrel 0.12% y control. Cada valor es la media de dos repeticiones independientes con seis réplicas cada uno.

$\mu\text{m}/\text{mg}\cdot\text{min}$	ZA Flores Masculinas		ZA Flores Femeninas		ZA Flor Pegada	
	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control
<b>CORA</b>	<b>3,23 ± 5,75</b>	<b>0</b>	<b>3,89 ± 2,05</b>	<b>0</b>		
<b>CAVILI</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>



### 3.3.5. Análisis de la expresión de *CpEXPA1*

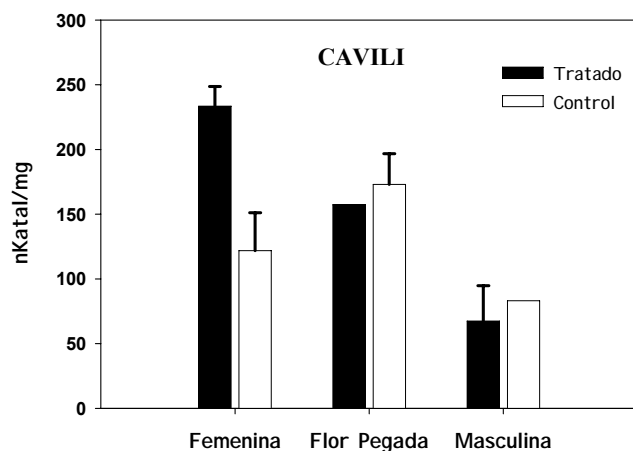
El patrón de expresión de *CpEXPA1* en ZAs florales tras haber sido tratadas con etileno o con AVG, se evaluó mediante RT-PCR del mismo modo al descrito en el apartado 2.3.3.3. A nivel molecular no se ha observado ningún efecto del etileno sobre *CpEXPA1*, apareciendo unos niveles de expresión muy similares entre ZAs tratadas con ethrel y control o tratadas con AVG y control, atribuyéndose en general, las pequeñas variaciones de intensidad de la señal observadas a diferencias en la cantidad de ADNc inicial que contenía cada muestra (Figura 44).



**Figura 44:** Análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de *CpEXPA1* en ZAs de flores femeninas, masculinas y flor pegada (FP) de las variedades Cora y Cavili, tratadas con ethrel o AVG y control. Los niveles de ADNc iniciales se equilibraron en base a la expresión del gen constitutivo *18S* de *C. pepo*, amplificado con P1-18S y P2-18Srev.

### 3.3.6. Actividad PME

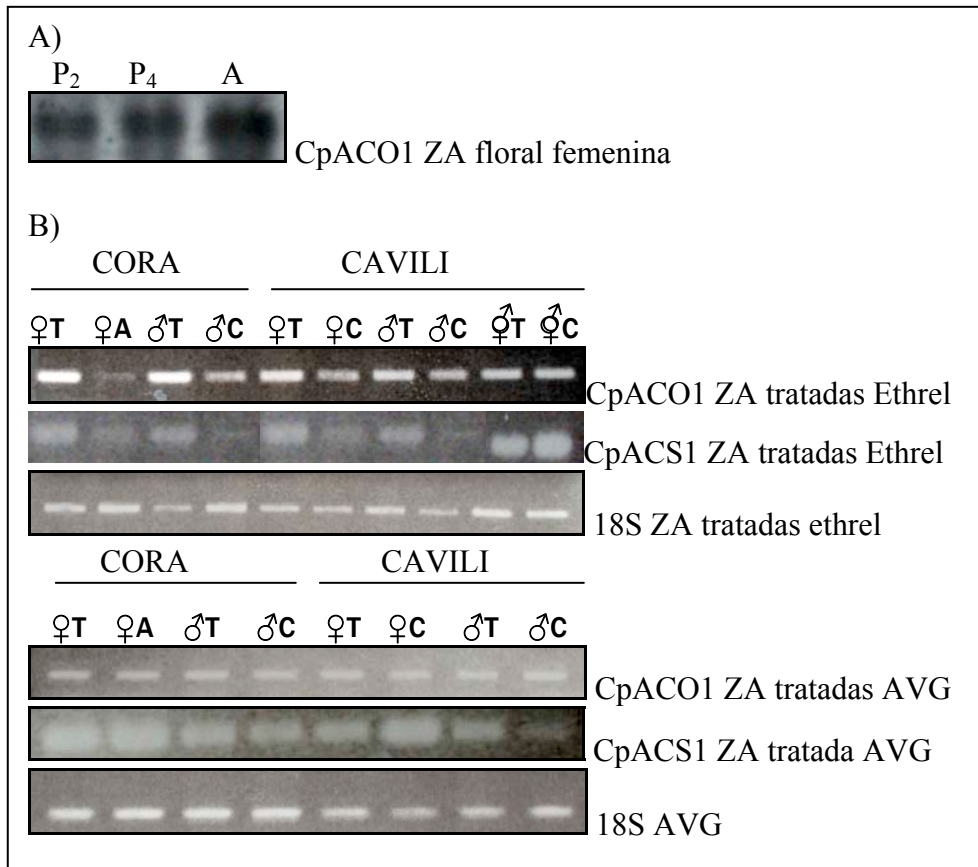
En el apartado 2.3.4. de este trabajo, se vio que la actividad PME disminuía a medida que avanzaba el proceso de abscisión, por lo que dedujimos, que esta enzima no estaba implicada en este proceso. Las ZAs florales de la variedad Cavili tratadas con ethrel presentaron la misma actividad que las ZAs control, excepto en el caso de las ZAs de flores femeninas, que mostraron el doble de actividad que en las control (Figura 45). La variedad Cora tuvo un comportamiento muy similar en cuanto a la actividad PME (datos no mostrados). Si atendemos el resto de resultados obtenidos tanto en ZAs sin tratar (Figura 30), como en ZAs de flores masculinas y flor pegada (Figura 44), parece que las PME no están implicados en este proceso de abscisión.



**Figura 45:** Actividad específica PME en ZA florales de la variedad Cavili tratadas con ethrel 0.12%. Los valores son la media de dos repeticiones independientes con tres réplicas cada una, indicándose el error estándar.

### 3.3.7. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de etileno

Parece claro que la aplicación de ethrel acelera el proceso de abscisión floral en *C. pepo*, pero no sabemos si este efecto se debe a la acción del etileno exógeno o si como se ha descrito para muchos otros sistemas, la aplicación de ethrel o etileno, induce la producción endógena por parte de la planta de esta hormona. Para comprobar esto, se realizaron análisis de expresión en *CpACOI* y *CpACSI*, genes que codifican para ACC (ácido 1-aminociclopropano-1carboxílico) Oxidasa (ACCO) y ACC Sintasa (ACCS) en *C. pepo*. En primer lugar se determinó mediante Northern-Blot que la expresión de *CpACOI* se incrementaba al avanzar el proceso de abscisión en ZAs de flores femeninas (Figura 46A). El Northern-Blot se realizó hibridando ARN de ZAs de flores en preantesis 2, 4 y antesis con la sonda ACO88-Dig que contiene un fragmento de 683pb de la región codificante de *CpACOI*. ACO88-Dig se obtuvo mediante PCR con los cebadores ZUCO1 Y ZUCO2. El resto de análisis de expresión se realizaron mediante RT-PCR semicuantitativa. *CpACOI* se amplificó con los cebadores específicos ACOisF y ACOisR; y *CpACSI* se amplificó con ACSisF y ACSisR, con los que se obtuvieron un único fragmento para cada gen de 378pb para *CpACOI* y de 211pb para *CpACSI*. El patrón de expresión de *CpACOI* y *CpACSI* muestra una inducción de su expresión en ZAs tratadas con etileno con respecto a las control, excepto en el caso de flor pegada, donde el incremento de expresión no es tan evidente. Sin embargo el AVG parece no afectar la expresión de ninguno de los dos genes involucrados en la síntesis de etileno en la ZA (Figura 46B).



**Figura 46:** A) Análisis de expresión mediante Northern blot de CpACO1 en ZA florales en preantesis 2, 4 y antesis (P<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y A, respectivamente). B) Arriba RT-PCR semicuantitativa de CpACO y CpACS en ZAs de flores femeninas, masculinas y bisexuales (flor pegada) de las variedades Cora y Cavili, tratadas con ethrel y control. Abajo RT-PCR semicuantitativa de CpACO1 y CpACS1 en ZAs de flores femeninas y masculinas de Cora y Cavili, tratadas con AVG y control. Los niveles de ADNc iniciales se equilibraron en base a la expresión del gen constitutivo 18S de *C. pepo*, amplificado con P1-18S y P2-18Srev.

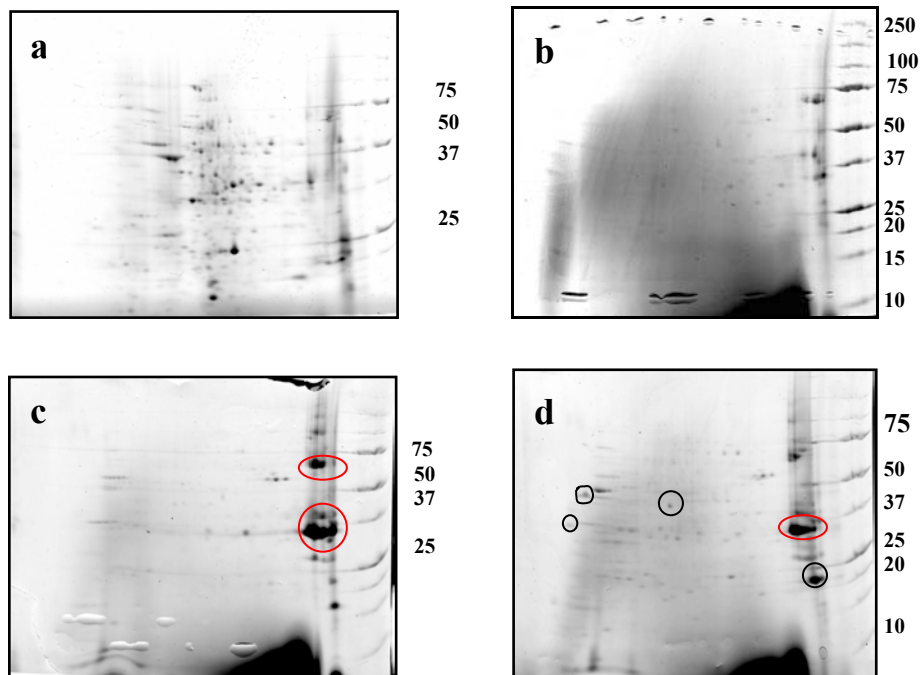
### **3.4. Cambios en el patrón proteico inducidos por etileno en la ZA floral de *C. pepo***

Si el etileno es capaz de inducir modificaciones morfológicas en la ZA es posible suponer que también pueda inducir debía cambios en la transcripción génica y la síntesis de proteínas. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron una serie de electroforesis bidimensionales, y se comparó el patrón proteico de ZA de flores femeninas antes de la inducción de la abscisión (antesis), con el de flores en las que el proceso de abscisión se encontraba bastante avanzado, tanto de forma natural (flores en postantesis), como por inducción con etileno (flores en preantesis 4 tratadas con ethrel). Para saber que proteínas se inducen específicamente en la ZA, se empleó como control, una zona alejada de la ZA (tejido del pedúnculo = no-ZA) tratada con ethrel de forma similar a las ZAs.

#### **3.4.1. Electroforesis en dos dimensiones**

Una vez realizados la electroforesis en geles bidimensionales, se buscaron las diferencias en el patrón proteico de ZAs tratadas con ethrel con respecto a los controles (ZA sin ethrel y no-ZA tratada con ethrel), buscando identificar proteínas inducidas en la ZA por etileno que por tanto tendrían muchas opciones de estar implicadas en el proceso de abscisión. En los geles teñidos con Coomassie que aparecen en la Figura 47 pudimos detectar una serie de proteínas de carácter básico inducidas por etileno (círculos rojos en la Figura 47d) que también empezaban a acumularse en ZA en las que el proceso de separación estaba bastante avanzado de forma natural (flores en postantesis 3. Figura 47b), por lo que era muy probable que esas proteínas estuvieran implicadas en el proceso de abscisión y se indujeran por etileno, sin embargo, estas mismas proteínas se acumulaban y de manera muy evidente en pedicelos (no-ZA) que habían sido tratados con ethrel (Figura 47c), por lo tanto, esas proteínas parecían inducidas por etileno, pero no dependientes de abscisión. Solo cuatro proteínas parecían

específicas de abscisión e inducidas por etileno, ya que no aparecían en los geles de no-ZA ni en las ZA sin tratar con etileno. Mediante MALDI-MS (Matriz Assisted Laser Desorption Ionisation-Mass Spectrometry) asociado a espectrometría de masas en tandem (MS/MS) se identificaron las proteínas que se acumulaban en los geles de tejidos tratados con etileno (círculos rojos en Figura 47 c y d), identificándose como una misma proteína, diferentes isoformas de una quitinasa. En la Tabla 6 aparece el listado de péptidos identificados por MS/MS, todos ellos presentan una alta homología a péptidos de la quitinasa de *Cucurbita sp.* T07838. Se ha visto que las quitinasas se inducen en ZAs tratadas con etileno (del Campillo y Lewis, 1992; Bleecker y Patterson, 1997). En nuestro caso estaría relacionada con una función de defensa frente a la entrada de patógenos, en el tejido proximal que queda expuesto tras la abscisión, de ahí que también aparezca en ZA que están muy próximas a abscindir de forma natural. Desgraciadamente, hasta el momento no ha sido posible identificar el resto de proteínas.



**Figura 47:** Geles bidimensionales teñidos con Coomassie. Patrón de proteínas de la ZA de flores femeninas en anthesis (a) y en postanthesis (b), así como de la no-ZA (pedúnculo de flor femenina) tratada con ethrel (c) y de la ZA de flores femeninas en preanthesis 4 tratadas con ethrel (d). Se identificaron mediante MALDI-MS y MS/MS las proteínas delimitadas con círculos rojos y negros tras haber sido tripsinizadas.

Tabla 6: Secuencias aminoacídicas de los péptidos obtenidos de fragmentos proteolíticos por MALDI-MS e identificadas usando espectrometría en tandem (MS/MS). Las homologías con proteínas se buscaron en la base de datos NCBI y la identificación se confirmó en la base de búsqueda de datos MASCOT (Matrix Science, v1.9.0, Londres. [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

Identificación	Secuencia Péptido	Posición en la secuencia	Homología %
Chitinasa de	<b>WQPSAADSAGR</b>	<b>245-256</b>	<b>100</b>
<b>Cucurbita sp.</b>	<b>YDLLGIGYGNNLDCNNQR</b>	<b>291-309</b>	<b>85</b>
Nº Acceso: T07838	<b>GPIQLTHNYNYGPAGR</b>	<b>184-199</b>	<b>77</b>
	<b>VPGYGVITNIINGGLECG</b>	<b>257-275</b>	<b>66</b>

### 3.4.2. Actividad Quitinasa

Se determinó la actividad quitinasa de ZAs florales tratadas con ethrel y control, así como de tejido de la no-ZA tratado con ethrel, intentando elucidar si la quitinasa que se acumula por la acción del etileno, tiene algún papel en el proceso de abscisión floral en *C.pepo*. En ZAs sin tratar con etileno, coincidiendo con los resultados de los geles bidimensionales, solo se pudo detectar actividad en ZA de flores en postantesis 3 (Tabla 7), aunque fue inferior a la que presentaban las ZAs procedentes de flores femeninas tratadas con ethrel. Tanto en ZAs como en no-ZAs tratadas con ethrel (Figura 48 y 49), la actividad quitinasa fue más elevada que en ZAs sin tratar o control, por lo que podemos afirmar, que el etileno induce la actividad quitinasa, aunque ésta no sea específica de la ZA. No podemos obviar que en ZA de flores en preantesis tratadas con ethrel, y de flores en postantesis 3 sin tratar, en las que la abscisión ha progresado mucho, la actividad quitinasa es elevada; es decir, tanto en la abscisión natural como en la inducida por etileno, la actividad quitinas aumenta al progresar el proceso de



separación. Por todo esto, creemos que esta enzima, sí que tendría un papel en la abscisión aunque no intervenga directamente en el proceso de separación.

Tabla 7: Actividad quitinasa en ZA de flores femeninas en diferentes estadios de desarrollo.

<b>ZA floral femenina</b>	<b>Actividad Específica [A550/mg*h]</b>
Cora Preantesis	<b>0</b>
Cora Antesis	<b>0</b>
Cora Postantesis	<b>0,049 ± 0,007</b>
Cavili Preantesis	<b>0</b>
Cavili Antesis	<b>0</b>
Flor Pegada	<b>0</b>

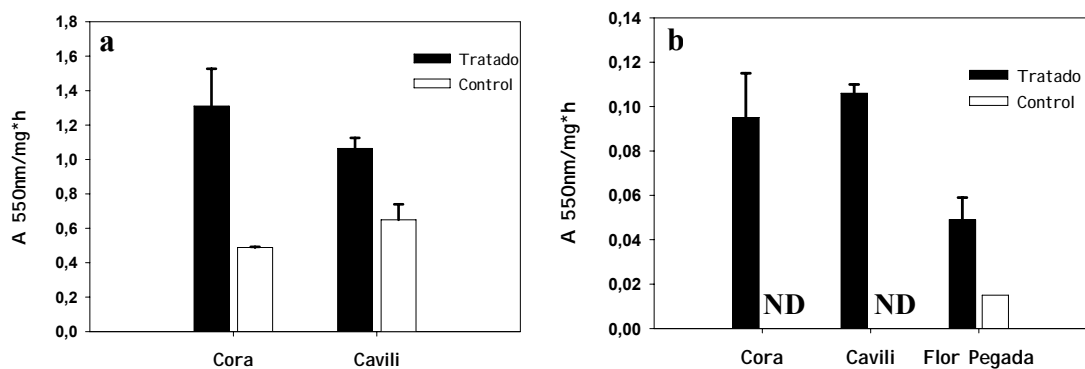


Figura 48

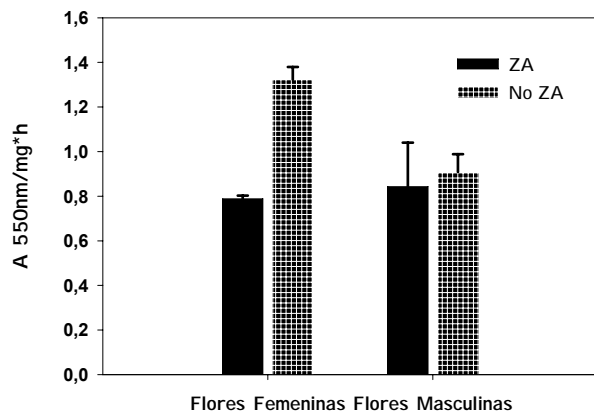


Figura 49

**Figura 48:** Actividad Quitinasa en ZA florales tratadas con ethrel 0.12%. a) ZA de flores masculinas. b) ZA de flores femeninas. ND: no detectado. Los valores presentados provienen de la media de tres repeticiones independientes (tres réplicas/repetición). La barra muestra el error estándar.

**Figura 49:** Actividad Quitinasa en zonas de abscisión y pedúnculo de flores femenina y masculinas. Ambos materiales (ZA y no-ZA) fueron tratados con ethrel 0.12%. Los valores presentados provienen de la media de tres repeticiones independientes (tres réplicas/repetición). La barra muestra el error estándar.



DISCUSIÓN

---



## 1. ANATOMÍA DE LA ZONA DE ABSCISIÓN EN *Cucurbita pepo*

A pesar de que la abscisión es un proceso ampliamente estudiado por numerosos científicos desde hace más de un siglo, sólo unas pocas especies y órganos han sido utilizados para describirlo. Como modelos para el estudio de la ZA foliar clásicamente se han utilizado las ZAs de pedicelos de *Phaseolus vulgaris* (Jackson y Osborne, 1970; Wright y Osborne, 1974) e *Impatiens sultani* (Sexton y Redshaw, 1981), y las ZAs de foliolos de *Sambucus nigra* (Osborne y Sargent, 1976a; 1976b); mientras que el estudio de la abscisión floral se ha basado principalmente en ZAs de flores de tomate y tabaco (Jensen y Valdovinos, 1967). Desde hace unos 10 años se ha comenzado a estudiar la ZA de los órganos florales de *Arabidopsis thaliana* (Bleecker y Patterson, 1997), de manera que la mayor parte de la información referente a genes que controlan el proceso de abscisión se basa en la obtención de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que muestran un fenotipo de inhibición o aceleración de la abscisión. En la mayor parte de las especies analizadas la ZA se caracteriza por ser una zona anatómicamente identificable que se diferencia incluso antes de que se inicie el proceso de abscisión, por lo que en la mayoría de los casos se generaliza y se describe la ZA como una región compuesta por unas pocas capas de células (células diana tipo II) pequeñas, isodiamétricas y de contenido citoplasmático denso, que parecen haber perdido la capacidad de alargarse y vacuolarse durante el crecimiento del tejido, aunque durante la abscisión son capaces de alargarse en respuesta a etileno y auxinas (Osborne, 1989).

En *C.pepo* y a diferencia de lo que se describe en la bibliografía la ZA floral, observada a microscopía óptica y electrónica de barrido, no es distinguible morfológicamente de los tejidos adyacentes hasta que no se ha iniciado el proceso de abscisión. Los análisis de microscopía realizados en la zona de abscisión de flores femeninas de *C.pepo*, revelan una ZA muy poco definida, compuesta por un número elevado de capas celulares que no se diferencian en tamaño o forma de las células

vecinas antes del inicio del proceso de abscisión. A pesar de que la mayoría de las ZAs estudiadas se ajustan a la generalidad descrita anteriormente, existen ejemplos de ZAs, que al igual que la ZA floral de calabacín, no son anatómicamente distinguibles antes de iniciarse el proceso de separación, es el caso de la ZA distal de la inflorescencia de olivo (Kitren y cols., 2006).

La ZA floral masculina, por el contrario, se asemeja más a una ZA típica, apareciendo a microscopía óptica como una región estrecha, formada por unas pocas capas de células más pequeñas que las células de la región distal y proximal adyacentes. Esta diferencia en la anatomía de la ZA entre flores femeninas y masculinas puede entenderse si tenemos en cuenta que la abscisión de flores femeninas se produce entre el periantio y el ovario o fruto, formando el cierre pistilar; mientras que la abscisión de flores masculinas se produce en el pedicelo de la flor. Se ha descrito que la abscisión floral a nivel de pedicelo es muy similar a la abscisión foliar, mientras que la abscisión de órganos florales presenta una mayor heterogeneidad entre especies, tanto en su anatomía como en su respuesta a señales hormonales reguladoras de la abscisión (van Doorn y Stead, 1997). Por lo tanto, aunque en este trabajo se emplee el término abscisión floral para designar la abscisión de flores masculinas y femeninas, debemos aclarar que sólo en el caso de flores masculinas se produce abscisión floral propiamente dicha, mientras que en flores femeninas se trata de la abscisión de los órganos florales distales al ovario o fruto, separándose de manera conjunta (fusionados) los pétalos, sépalos, nectarios y estilo y estigma; no habiéndose observado la abscisión floral a nivel de pedicelo en flores femeninas de *C.pepo*, incluso en ausencia de polinización.

Las primeras señales de que el proceso de abscisión ha comenzado se observan principalmente a nivel de la PC. Se hace evidente una degradación de la pared en las células de la zona central de la ZA, degradación que se va extendiendo hacia el exterior,

siendo las células de la zona más externa las últimas en separarse, sin que exista rotura celular. Junto a la disolución de la PC, se observa un alargamiento de las células de la ZA, que incrementan de tamaño con respecto a las células vecinas. Este aumento de tamaño celular presenta un patrón similar al de la degradación de la pared, así, las células de la zona próxima a la epidermis son las últimas en aumentar de tamaño. Las únicas células en las que no se observa disolución de la pared ni incremento de tamaño, son las células de los haces vasculares, que permanecen unidas en todo momento, de manera que en las preparaciones para microscopía de barrido las células siempre se rompen al separar manualmente los órganos florales para la fijación de la ZA (ver Material y Métodos).

Sexton y Redshaw (1981), describen un modelo de progresión de la abscisión en hojas de *Impatiens sultani* muy similar al observado en la abscisión floral de *C.pepo*. En este modelo las células del plano de fractura se van redondeando, y la separación avanza desde la región próxima a los haces vasculares hacia la zona externa. Al final del proceso la única unión entre la zona distal y proximal son los vasos xilemáticos. El aumento de volumen de las células de la ZA se ha descrito por otros autores como Osborne y Sargent, (1976a) o Wright y Osborne, (1974); autores que proponen que este incremento de tamaño de las células de la zona proximal proporcionaría el mecanismo hidráulico que separa los haces vasculares, el único lugar en el que no se produce degradación de la PC (revisado por Roberts y cols., 2002). Sin embargo en muchas especies no está claro si la expansión de las células de la ZA es un requisito para que tenga lugar la abscisión o es una consecuencia de la misma. En la abscisión floral de calabacín parece que es un paso previo a la separación, ajustándose por tanto al modelo anterior.



A medida que la abscisión avanza, la degradación de la PC de las células de la zona de separación también progresa, hasta el punto que hacia el final del proceso aparecen células completamente separadas, sin ninguna conexión con las células adyacentes. El grado de disolución de la PC durante la abscisión es variable entre especies, habiéndose encontrado un grado de disolución de la pared similar al observado en flores de *C.pepo* en otras especies, como en folíolos de *Sambucus* o en frutos de algodón (revisado por Sexton y Roberts, 1982).

Peñaranda y cols., (2007) en estudios con plantas de calabacín crecidas en invernaderos han observado una menor duración en el tiempo de maduración para flores femeninas que para flores masculinas. En el caso de flores femeninas que presentan el problema de flor pegada, éste siempre ha ido acompañado de un retraso en la maduración de flores femeninas, junto con un desarrollo de los estambres en el tercer verticilo. Estos autores concluyen que la inhibición del desarrollo que se observa en flores femeninas que presentan flor pegada es debido a la masculinización de dichas flores. La información obtenida de los estudios de microscopía parece indicar que la ZA floral de la flor pegada, no es demasiado diferente a la de las flores femeninas, pero que ha retenido su evolución antes de iniciarse el proceso de abscisión, viéndose afectada por el mismo retraso que presenta el desarrollo de la flor. A microscopía óptica dicha ZA es muy similar a la de flores en antesis, si nos referimos al tamaño de las células que la componen y al grado de disolución de la pared. A microscopía de barrido se puede observar también la rotura celular a lo largo de todo el plano de fractura producida durante la preparación de las muestras, lo que indica que no ha habido disolución de la pared, por lo que al separar los órganos florales del fruto para obtener la zona de abscisión para microscopía de barrido, ha habido que romper las células de la ZA. Una característica encontrada en las células de la parte proximal de la zona de abscisión de flor pegada, las cuales pertenecen al tejido de los nectarios, es la abundancia de

almidón, observado en los cortes granos rosas debido a la tinción de Schiff positiva. Esta abundante presencia de almidón en los nectarios es característica de flores en estadio previo al de antesis, ya que una vez en antesis el almidón de estas células se hidroliza para formar el néctar (Nepi y cols., 1996), lo que apoya la idea expuesta por Peñaranda y sus colaboradores, de que la ausencia de abscisión de la flor pegada se debe a una inhibición en el desarrollo de la flor.

En muchas especies se ha descrito degradación de almidón asociada al progreso de la abscisión, como por ejemplo en hojas de soja (Kuang y cols., 1992) y *Sambucus nigra* (Osborne y Sargent, 1976a); o en órganos florales en *Citrus unshiu* Marc. (Shiraishi y Yanagisawa, 1988). El almidón que se acumula en la ZA durante el desarrollo se hidroliza una vez inducida la abscisión, liberándose los azúcares solubles que generarían los cambios de turgor en la zona, necesarios para el crecimiento de las células (Osborne, 1989). Sin embargo en *C.pepo*, al igual que en otras especies, no se acumula almidón en las células de la ZA o no se detectan diferencias a lo largo del proceso de abscisión, como ocurre en la abscisión de ramas de *Quercus cerris*. L (Bellani y Bottacci, 1995)

## **2. IMPLICACIÓN DEL ETILENO EN LA ABSCISIÓN FLORAL DE *C. PEPO***

### **2.1. El etileno acelera la abscisión floral de *C. pepo***

Los tratamientos con ethrel y AVG en flores de calabacín, así como los tratamientos con ethrel sobre ZAs aisladas, indican que la abscisión de flores femeninas, masculinas y flor pegada está regulada por etileno a algún nivel. Si esta fitohormona es el regulador principal de la abscisión o simplemente acelera el proceso, es lo que intentamos descubrir en este trabajo.

El etileno exógeno acelera la abscisión de flores femeninas, masculinas y flor pegada, mientras que el inhibidor de su síntesis, el AVG, la retrasa. Si además la aplicación de etileno no se realiza en flor completa, sino sobre ZAs aisladas, la abscisión se induce más rápidamente aún, especialmente en flores femeninas. Esto sugiere una acción inhibidora de la abscisión por parte del tejido distal a la ZA, que ya ha sido descrita anteriormente en otras especies (Roberts y cols., 1984) y que podría deberse a las auxinas procedentes del periantio o a otras sustancias inhibidoras que estaría produciendo la flor.

Proponemos que la abscisión floral de *C.pepo* al igual que la abscisión foliar y floral de otras muchas especies (revisados por Osborne, 1989; Taylor y Whitelaw, 2001), está activada por etileno y muy posiblemente inhibida por auxinas. En muchas especies se ha descrito cómo el transporte polar de auxinas desde los pétalos a la ZA, disminuye la sensibilidad de dicha zona al etileno, retrasando la entrada en la fase II del proceso de abscisión. Actualmente estamos evaluando más profundamente el efecto de las auxinas en la abscisión floral de calabacín, concretamente se está estudiando el efecto de la aplicación de auxinas e inhibidores de su transporte polar, en flores femeninas. Los datos preliminares indican un retraso en la abscisión de flores femeninas por la aplicación de AIA (ácido indol acético) 100 $\mu$ M, así como un efecto muy similar al que produce el etileno, al tratar estas flores con TIBA (ácido triyodobenzoico) 10mM (datos no mostrados).

Los tratamientos en flores, en estadios de preantesis muy tempranos, ponen de manifiesto la necesidad de que la flor alcance cierto grado de desarrollo para que el etileno induzca su abscisión, es decir, la ZA floral no es sensible a la acción inductora del etileno hasta que no se ha alcanzado cierto nivel de desarrollo. Este hecho se ha descrito en otras especies, tanto para abscisión foliar como floral, habiéndose propuesto

que se debe a la necesidad de que en la ZA se hayan diferenciado las células diana tipo II (Osborne y Sargent, 1976b). Una vez que aparecen las células diana tipo II, éstas son sensibles al etileno, alargándose y vacuolándose por acción de esta hormona, e iniciándose así el proceso de abscisión.

El etileno no solo acelera la abscisión floral de calabacín, sino que activa ZAs adventicias en pétalos y sépalos de flores femeninas en preantesis 4. Estas estructuras florales abscinden completamente después de 2.5 días tras la aplicación de ethrel. La abscisión de pétalos y/o sépalos no aparece en condiciones normales en *C. pepo* y sólo se manifiesta en flores femeninas tratadas con ethrel y de forma muy excepcional se ha visto en flores control que han sido manipuladas en exceso. Las ZAs de pétalos y sépalos podrían ser ZAs secundarias o bien ZAs latentes que se activan por etileno. Las ZAs adventicias o secundaria aparecen en regiones donde normalmente no se formarían en plantas intactas y están inducidas por etileno, daño o herida (Osborne, 1989). Sin embargo las ZAs de pétalos y sépalos en flores de *C. pepo*, aparecen donde se esperaría que estuvieran en el caso de que existieran. Por otra parte, todos los estudios sobre la formación de ZAs secundarias se han realizado en pedicelos de algunas especies (judía, melocotón, cítricos, *Kalanchoe*, etc.), sin que exista ninguna información sobre la aparición de ZA en pétalos y sépalos en especies que normalmente no presentan abscisión de estos órganos, como es el caso de las cucurbitáceas (van Doorn y Stead, 1997). Por tanto, parece que lo más probable es que se trate de ZAs vestigiales, es decir, ZAs que ya estuvieran presentes, pero cuyas células se encontraran en estado latente, y que solo el etileno aplicado de forma exógena o producido por la planta en respuesta a daño mecánico, fuera capaz de hacerlas pasar de la fase lag a la fase de separación del proceso de abscisión. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que la abscisión de sépalos y pétalos en *C. pepo*, cuando se produce, es muy rápida, (1.5 días para sépalos y 2.5 días para pétalos), por lo que sería muy difícil que en tan pocas horas se diferenciara

y se activara la ZA hasta producirse la separación del órgano correspondiente. Algo parecido se propone para la abscisión en numerosas partes de ramas y raíz del helecho acuático *Azolla* (Uheda y Nakamura, 2000). También se ha descrito abscisión ectópica del pedicelo, inserción de la inflorescencia y hojas caulinares de plantas de *Arabidopsis* que sobrepresan el gen *IDA* (Stenvik y cols., 2006). En estas líneas *35S:IDA* se han encontrado ZAs vestigiales en la base del pedicelo, las ramas de las inflorescencias y las hojas caulinares, que presentan una morfología y una evolución del proceso de abscisión muy similar al de la abscisión floral de *Arabidopsis*. Queda por saber si en el caso de la abscisión de sépalos y pétalos de *C. pepo* promovida por etileno, también se trata de una ZA normal, que presenta la misma estructura y sigue la misma evolución que la ZA del pistilo.

## 2.2. Cambios morfológicos en la ZA inducidos por etileno

Hemos observado que la aplicación de etileno, produce una serie de alteraciones morfológicas en la ZA, algunas asociadas a senescencia, como la pérdida de coloración (degradación de clorofilas) en ZAs aisladas, o el rápido marchitamiento de pétalos de flores completas tratadas con ethrel, comparadas con las control. Además en ZAs aisladas tratadas con ethrel aparece una secreción blanca (sustancia blanca) bastante abundante. Al analizar con detenimiento la ZA tras la abscisión natural, se puede apreciar una sustancia muy similar aunque menos abundante tanto en la zona distal como en la proximal de la ZA. La observación a microscopía óptica de la sustancia blanca “in vivo” procedente de ZAs tratadas con ethrel y de ZAs que han abscindido de manera natural, nos permite apreciar que ambas están compuestas por protoplastos (células sin pared), fibras y restos de epidermis. Por tanto, aunque durante la abscisión natural se produzca esta sustancia en cantidades muy inferiores a la que se produce en la abscisión inducida con etileno, parece que se trata de la misma secreción.

Se ha realizado el análisis de la composición de azúcares neutros de la sustancia blanca de ZAs tratadas con ethrel. Ésta contiene un alto porcentaje de glucosa, arabinosa y galactosa. El alto contenido en glucosa puede reflejar una despolimerización de las microfibrillas de celulosa, así como de hemicelulosas (xiloglucanos) de la PC; mientras que el elevado porcentaje de arabinosa y galactosa indicaría que una parte importante de la sustancia blanca está compuesta por arabinogalactanos. Recordemos que existen dos tipos de arabinogalactanos: los tipo I, que se encuentran unidos a pectinas (a los residuos ramnosa de los ramnogalacturanos I); y los tipo II, que se encuentran formando parte del esqueleto hidrocarbonado de las proteínas arabinogalactanos (AGP = arabinogalactan protein). Debido al bajo porcentaje en ácido galacturónico de la sustancia blanca, lo más probable es que la arabinosa y galactosa procedan de arabinogalactanos tipo II. La presencia de AGPs en la sustancia blanca de ZAs tratadas con etileno, se detectó mediante el uso del reactivo  $\beta$ -Yariv y se confirmó mediante Western blot con dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epítomos diferentes de la porción hidrocarbonada de las AGPs (Yates y col., 1996).

Estos resultados ponen de manifiesto la degradación de la PC durante el proceso de abscisión en el que se liberan residuos de glucosa, AGPs y los arabinogalactanos tipo II que forman parte de su porción hidrocarbonada, intensificándose la degradación de la PC en el proceso de abscisión inducido por etileno. Las AGPs podrían ser liberadas simplemente debido a la degradación de las pectinas de la PC, sin embargo actualmente se está asociando a estas proteínas a procesos de señalización, con funciones clave en el crecimiento y desarrollo vegetal, como muerte celular programada, embriogénesis somática, formación de patrones de desarrollo, direccionalidad del crecimiento del tubo polínico, abscisión, etc. (Seifert y Roberts, 2007). Con respecto a su implicación en abscisión, se ha detectado una elevada producción de AGPs en la ZA de mutantes de *Arabidopsis* que sobrexpresan el gen *IDA* (Stenvik y cols., 2006). Se detectaron AGPs

en la ZA al final del proceso natural de abscisión y además estos AGPs se acumulaban en la zona abscisión de las líneas *35S:IDA*, mientras que se detectaban en mutantes que tenían alterada la expresión de dicho gen y por tanto tienen bloqueada la abscisión (mutantes *ida*). Estos resultados, junto con la correlación entre los niveles de expresión del gen *AGP24* de *Arabidopsis*, la expresión de *IDA* y los niveles de AGPs, implican a las AGPs en el proceso de abscisión de órganos florales en *Arabidopsis*.

A falta de profundizar más en la presencia de AGPs en la abscisión floral de calabacín inducida por etileno, proponemos un posible papel de estas proteínas en el proceso de señalización que da lugar a la abscisión floral. Butenko y sus colaboradores (2006) proponen una ruta reguladora independiente de etileno, pero reconocen que el gen *IDA* está regulado por etileno a algún nivel. Si se confirma la inducción de la secreción de AGPs por etileno durante la abscisión floral de *C.pepo*, aparecería una relación entre el gen *IDA* y el etileno en la regulación de la abscisión floral.

### **2.3. Efecto en las enzimas hidrolíticas**

Como hemos mencionado anteriormente, el proceso de abscisión requiere de la disolución de la pared celular, observándose los primeros signos de esta degradación en la lámina media, por ello muchos estudios se han centrado en la búsqueda de las enzimas que provocan la disolución de la pared, encontrándose que las principales implicadas son endoglucanasas (EGasas) o celulasas, y exo y endopoligalacturonasas (PGs). Ambos tipos de enzimas pertenecen a familias multigénicas en muchas especies, habiéndose descrito EGasa y PGs específicas de la ZA cuya actividad y/o expresión se correlaciona con la pérdida de fuerza de la ZA y son clave para que se lleve a cabo el proceso (revisado por González-Carranza y cols., 1998).

### 2.3.1. Inducción por etileno de la actividad CL y PG

Los resultados de actividad PG y CL en la ZA floral nos ofrecen información sobre el papel de estas dos enzimas en el procesos de abscisión de flores masculinas, femeninas y flor pegada. La actividad PG aumenta en las dos variedades analizadas con el avance de la abscisión natural en ZAs de flores femeninas, y se induce por etileno en ZAs de flores femeninas y masculinas. La ZAs con síndrome flor pegada, muestran una actividad PG muy similar al de las flores en preantesis 4, e inferior al de las ZAs de flores en postantesis 3, apoyando la hipótesis de que estas ZAs, se encuentran en un estadio de desarrollo inferior al que le corresponde por su edad en la planta. La actividad CL también se correlaciona con el progreso de la abscisión y se induce claramente por etileno, mostrando la ZA de flor pegada una actividad basal similar a la de las flores en preantesis 4. Nos encontramos con una excepción, la actividad CL de flores de la variedad Cavili, que en postantesis 3 es ligeramente inferior a la de las flores en preantesis 4, sin embargo sí que aumenta de manera importante en la abscisión inducida por etileno, probablemente debido a un error experimental.

En líneas generales podemos decir que la actividad de ambas enzimas aumenta durante la abscisión y su actividad se ve incrementada mediante la aplicación de etileno en la abscisión floral de *C.pepo*. Del mismo modo, se ha descrito para muchas especies y sistemas diferentes (abscisión foliar, floral y de órganos florales), PGs y CLs específicas de la ZA, cuya actividad y/o expresión génica aumenta durante el proceso de abscisión, además de estar reguladas positivamente por etileno en la inducción del proceso (Wang y cols., 2005; González-Carranza y cols., 2002; Tucker y cols., 1988; del Campillo y Bennett, 1996). Parece por tanto, que ambas enzimas están involucradas en el proceso de abscisión floral de *C.pepo*, posiblemente las CLs participen principalmente en la degradación de hemicelulosas de la PC y las PGs en la degradación de las pectinas de la lámina media que mantiene unidas a las células de la ZA.



Los análisis de expresión de la poligalacturonasa aislada desde ADNc de la ZA, CpPG, revelaron lo que ya sospechábamos por los datos de homología. Este gen se expresa específicamente en anteras de flores masculinas y bisexuales (flor pegada). Como detallaremos más adelante, lo más probable es que se trate de una PG específica de polen, por lo que debió producirse una contaminación de la ZA de las flores masculinas desde las que se extrajo el ARN para la síntesis del ADNc, con polen procedente de las anteras de la misma flor. Aunque actualmente se está clonando una PG desde ADNc de ZAs de flores femeninas, no se ha realizado aún ningún análisis de expresión en ZAs.

En cuanto a la expresión de la celulasa de ZA, CpCL1, su expresión se detecta en ZAs, pero no parece acumularse en ZA tratadas con ethrel, ni se inhibe por AVG. Con los datos que tenemos hasta el momento no podemos relacionar el aumento de actividad CL durante la progresión de la abscisión o en la abscisión inducida por etileno, con una inducción de la expresión de CpCL1. Sin embargo tampoco podemos afirmar que la expresión de CpCL1 no se correlaciona con la abscisión natural o inducida por etileno, hasta que no realicemos nuevos análisis de expresión con ZAs en estadios del proceso más avanzados, tanto de forma natural (postantesis 2 y 3), como inducidos por etileno (ZAs tratadas a 42hpt para flores masculinas y 60hpt para flores femeninas).

### 2.3.2. Caracterización molecular de CpPG

CpPG es una secuencia parcial de 172aa que codifica una PG en *C.pepo*. Presenta las homologías más importantes con exopoligalacturonasas (exo-PG) específicas de polen de varias especies como las PGs de polen de *Oenothera organensis*, *Nicotiana tabacum*, o *Turnera subulata*. Las dos primeras son exo-PGs

tardías (se expresan después de la primera mitosis del gametofito masculino), involucradas en la despolimerización de pectinas durante la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico (Brown y Crouch, 1990; Tebbutt y cols., 1994), mientras que aún no está muy claro el papel de la PG de *Turnera subulata*. Según los resultados del análisis genómico tipo Southern, existe más de una copia del gen que codifica a CpPG. Se han descrito pequeñas familias multigénicas de poligalacturonasas de polen muy homólogas, para muchas monocotiledóneas y dicotiledóneas, entre ellas las tres PGs citadas anteriormente (Athanasiou y cols., 2003). Todo esto junto con el patrón de expresión de *CpPG*, específico del gametofito masculino, presenta a esta poligalacturonasa de *C.pepo* como una poligalacturonasa específica de polen.

Actualmente se está clonando la secuencia completa del gen y se están realizando análisis de expresión a lo largo del desarrollo de las anteras en flores de *C.pepo*, con la intención de determinar si se trata de una PG de polen temprana (se expresa antes de la primera mitosis), implicada en la síntesis de la PC y acumulación de almidón, o una PG de polen tardía (Hadfield y Bennett, 1998) implicada en la germinación del grano de polen.

### 2.3.3. Caracterización molecular de CpCL1

En plantas, algunas endo-1,4- $\beta$ -glucanasas están implicadas en la despolimerización de la celulosa cristalina, pero la gran mayoría no degradan celulosa, sino que despolimerizan otros glucanos no cristalinos. Por tanto, se ha implicado a las EGAsas en muchos procesos de desarrollo en los que se produce modificación de la pared celular, como expansión celular (Shani y cols., 1997), diferenciación celular, maduración de frutos (Llop-Tous y cols., 1999) y abscisión (Burns y cols., 1998). Por ello existen numerosos trabajos en especies de interés agrícola en los que se han clonado y caracterizado EGAsas, como fresa, tomate, judía, naranjas o melocotón. Sin embargo

hasta el momento en las bases de datos sólo aparece una EGasa en Cucurbitáceas, la EGase 1 de *Cucumis melo* (nº de acceso: AB271851. Sin publicar).

CpCL1 es una EGasa de 491aa, cuya estructura y homologías la agrupan dentro de las  $\alpha$ -EGasas según la clasificación de Libertini y colaboradores (2004), que agrupa las EGasas en  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -EGasas (ver Introducción). La estructura proteica de CpCL1 se ajusta a la de una  $\alpha$ -EGasa, ya que posee un péptido señal no demasiado largo de 27 residuos (lo que las diferencia de las  $\beta$ -EGasas), con el que sería secretada a la PC, además de no tener el dominio transmembrana N-terminal, característico de las  $\gamma$ -EGasas. En cuanto a las homologías con otras  $\alpha$ -,  $\beta$ -, o  $\gamma$ -EGasas, los análisis filogenéticos (Figura 20 y otro árbol filogenético entre  $\gamma$ -,  $\alpha$ -, y  $\beta$ -EGasas típicas no presentado en esta memoria) también agrupan a CpCL1 en un conjunto de  $\alpha$ -EGasas entre las que se encuentra AtCel1 de *Arabidopsis* y SlCel2 de tomate y que no poseen dominio de unión a celulosa. Por tanto CpCL1 sería una  $\alpha$ -EGasa, sin capacidad de degradar celulosa cristalina, sino que intervendría en la despolimerización de glucanos no cristalinos, como los xiloglucanos (una de las hemicelulosas más abundantes en la PC).

En muchas especies, las EGasas pertenecen a familias multigénicas, como es el caso de tomate, en el que se han clonado 8 (Beno-Moualem y cols., 2004), aguacate o melocotón (Trainotti y cols., 2006). Algunas de esas familias multigénicas presentan isoenzimas muy divergentes entre sí, como Cel 1 y Cel 2 en fresa (Llop-Tous, 1999), o Cel 1 y Cel 2 en tomate (Brummel y cols., 1999). En el análisis genómico tipo Southern de *CpCLI*, aparece una señal única que correspondería con una única copia del gen, pero no descartamos que existan otras isoenzimas divergentes a *CpCLI*.

Hasta el momento no tenemos datos de expresión que confirmen que *CpCLI* se exprese ni temporal ni espacialmente de forma específica en la ZA durante el proceso de separación. Sin embargo esta EGasa de calabacín muestra una elevada homología con EGasas implicadas en abscisión, como la proteína Cel 2 de tomate (Brummell y col, 1999) y Cel 3 de pimiento (sin publicar). Por otra parte puede que estemos subestimando la expresión de *CpCLI* en la ZA, ya que las secciones de la ZA contienen bastante tejido de la zona proximal y distal y no sólo las células de la ZA involucradas en la separación, si a esto le unimos que probablemente las ZAs en las que se ha evaluado la expresión de *CpCLI* se encontraban en un momento del proceso de abscisión demasiado temprano, es posible que la expresión de *CpCLI* sea más elevada en las células de la ZA de lo que hasta el momento hemos detectado.

## **2.4. Efecto del etileno en otras enzimas que modifican la PC**

### **2.4.1. Expansinas**

La función más importante de las expansinas se ha encontrado en el proceso de extensión celular a pH ácido en diferentes especies, por ejemplo, se ha demostrado que su expresión es clave para la elongación celular en hipocotilos de pepino, en la región internodal de arroz, en la aparición de los pelos radiculares de *Arabidopsis*, etc. (revisado por Cosgrove y cols., 2002). Debido a su mecanismo de acción se ha propuesto que pueden intervenir en otros procesos en los que es necesario que se produzca una relajación de la PC, ya que parece que las expansinas actúan rompiendo los enlaces no-covalentes entre xiloglucanos y las microfibrillas de celulosa, abriendo el complejo de hemicelulosas-celulosa, permitiendo así la extensión de la PC y el acceso de otras enzimas hidrolíticas como las EGasa y XET (Cosgrove, 2000a). Se han visto implicadas, por ejemplo, en el ablandamiento del fruto en tomate (revisado por Cosgrove, 2000b) y en la abscisión floral de *Arabidopsis* (Cho y Cosgrove, 2000), en la

de *Rosa bourboniana* (Sane y cols., 2007), y en la de foliolos de *Sambucus* (Belfield y cols., 2005).

Las expansinas pertenecen a familias multigénicas muy numerosas, habiéndose identificado en *Arabidopsis* 26 $\alpha$ -expansinas y 6 $\beta$ -expansinas, en arroz 33 $\alpha$ -expansinas y 18 $\beta$ -expansinas, en tomate 13 $\alpha$ -Expansinas, etc. (ver Introducción para la clasificación de las expansinas). Con respecto a cucurbitáceas, se han identificado al menos 9 $\alpha$ -expansinas de extensión celular en pepino (CsEXPA1 y CsEXPA2, McQueen-Mason y cols., 1992; Link y cols., 2001) y una  $\alpha$ -expansina implicada en maduración en melón (CmEXPA1, sin publicar).

En este trabajo hemos clonado la expansina CpEXPA1 en calabacín, a partir de ADNc de la ZA floral de la variedad Cora. La estructura primaria de la proteína codificada por *CpEXPA1*, junto con los datos de homología con otras  $\alpha$ - y  $\beta$ -Expansinas, agrupan a la expansina de la ZA de calabacín como una  $\alpha$ -Expansina, muy cercana evolutivamente a CmEXPA1 (maduración en melón), AtEXPA16 de *Arabidopsis* (sin caracterizar) y SnEXPA1, SnEXPA2 de la ZA de foliolos de *Sambucus* (Belfield y cols., 2005).

El análisis genómico nos dice que existe una única copia de *CpEXPA1* en calabacín, sin embargo las  $\alpha$ -Exp pertenecen a familias multigénicas muy abundantes en dicotiledóneas, además hemos comprobado mediante alineamiento de secuencias en Clustalw (datos no mostrados), que en otra especies, como en la cucurbitácea *Cucumis sativus*, algunas de las expansinas caracterizadas no son demasiado homólogas. Por ejemplo CsEXPA1 y CsEXPA2 presentan un 64% de homología y CsEXPA2 y CsEXPA4 un 61%. Creemos que es posible que ocurra lo mismo en calabacín, por lo que para detectar otras expansinas no demasiado homólogas que pudieran existir en esta

especie, se debe realizar otra hibridación tipo Southern usando una sonda de una zona muy homóloga a otras expansinas.

Los datos ofrecidos parecen apuntar a que CpEXPA1 es una expansina relacionada con abscisión, sin embargo ni los análisis de expresión, ni los de actividad expansina realizados en la ZA floral de *C.pepo*, confirman esta hipótesis. Por el contrario, los datos de expresión y actividad tanto en ZA en preantesis y antesis, como en ZA tratadas con ethrel, así como los resultados del Western con el anticuerpo de pepino CsEXPA1 (Shcherban y col., 1995), apuntan a que las expansinas con actividad de extensión en el material celulósico empleado, no intervienen en la abscisión natural de flores de *Cucurbita pepo*, ni se inducen por etileno; sino más bien, con el crecimiento del tejido próximo a ella. Sin embargo, no podemos descartar, que exista alguna expansina relacionada con abscisión, cuya actividad se vea enmascarada por la actividad de otras expansinas más activas en procesos de elongación y crecimiento celular y no presente una señal tan fuerte con CsEXPA1. De hecho CpEXPA1 tiene un 68% de homología con CsEXPA1, una divergencia suficiente para que el anticuerpo de CsEXPA1 hibride con otras expansinas de la región proximal o distal de la ZA, pero no con CpEXPA1 de la ZA. Creemos necesario seguir profundizando en el estudio de CpEXPA1, ya que su mensajero se encuentra presente en la ZA y sería muy interesante comprobar si la proteína activa también se encuentra en ZAs florales y si tiene actividad en el proceso de abscisión. Posiblemente, el uso de técnicas de inmunocitoquímica y Western con un anticuerpo específico para CpEXPA1 u otra expansina muy homóloga a ella, podríamos evitar el problema de la contaminación de la ZA con tejido de las zonas adyacentes y aumentar la especificidad de la señal.

#### 2.4.2. Pectina metil esterasa

Debido a la acción de esta enzima en la desmetilación de la pectina, se propuso que podría participar en procesos donde es necesaria la disolución de la PC y/o de la lámina media, sin embargo hasta el momento, ha sido muy difícil establecer su función en este proceso. Estudios de los años 60 revelan una disminución de la actividad PME en la porción distal de hojas abscindidas en *Coleus* y *Phaseolus*, y en la ZA floral de tabaco (LaMotte y cols., 1969; Yager, 1960), sin que pudieran clarificar la relación de esta disminución de la actividad PME con la abscisión. Sin embargo una re-evaluación de la actividad PME con técnicas más sensibles, en ZAs de 8 especies que incluían judía y *Coleus*, no encontraron ningún tipo de asociación entre abscisión y la actividad PME en ninguna de las especies analizadas, excepto en *Coleus blumei*, donde detectaron una reducción importante de la actividad PME en la porción distal de la ZA, reducción de la que se desconoce su significado fisiológico (Moline y cols., 1972). Además, la mayoría de los estudios realizados en ZAs, no han encontrado cambios en la actividad de esta enzima, es el caso de abscisión en hojas de naranja (Ratner y col., 1969), existiendo algunas evidencias del aumento de la expresión o síntesis de PMEs durante la abscisión de algunas especies como en ZAs de hojas en *citrus sinensis* (revisado por Tiznado-Hernández y cols., 2004) o en la ZA floral de tomate (Wang y cols., 2005). Se ha comprobado que las ZAs son regiones pobres en  $\text{Ca}^{+2}$  y con muy poca afinidad por él, de manera que al adicionar  $\text{Ca}^{+2}$  a la ZA se inhibe la abscisión (Poovaiah y Rasmussen, 1973). Parece que la PME actúa relajando los enlaces entre cadenas de homogalacturanos de las pectinas al reducir el grado de metilación de este polisacárido en zonas donde los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  son muy bajos y por tanto los ácidos carboxílicos generados no se bloquearían con calcio y no se formarían las regiones de empalme de homogalacturanos, aumentando la solubilización de la pectina y permitiendo el acceso de pectinasas como la PG. Actualmente parece aceptarse que la implicación de la PME

en la abscisión, si la hubiera, se debería a un aumento de su actividad asociada a una disminución en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  que participaría en la solubilización de la pectina.

En el caso de la ZA floral de calabacín, la actividad PME no aumenta a lo largo del proceso en la ZA de ninguna de las dos variedades, ni se induce por etileno. Los datos obtenidos tanto en ZAs sin tratar, como en ZAs de flores masculinas y flor pegada, parecen indicar que las PME no están implicadas en este proceso de abscisión, sin embargo si que parece estar implicada en la extensión celular en el tejido de la región proximal de la ZA en crecimiento. Al igual que en otras especies (Moline y cols., 1972), no queda claro el papel de la PME en la abscisión floral de *C.pepo*, sin que parezca imprescindible un incremento de la actividad de esta enzima para que tenga lugar la separación.

## **2.5. Efecto del etileno en las enzimas involucradas en su síntesis**

El etileno se sintetiza en tres pasos a partir de las reservas celulares de metionina, siendo las enzimas clave de la ruta, la enzima ACC sintasa (ACCS), que cataliza el paso del intermediario SAM (S-adenosilmetionina) en ACC (1-aminociclopropano 1-carboxílico), y la ACC oxidasa (ACCO), enzima que convierte el ACC en etileno.

En este trabajo se ha comprobado la afectación de estas dos enzimas por la aplicación de etileno exógeno en la ZA floral de calabacín, para determinar si el efecto del etileno acelerando la abscisión en esta especie está mediada por un aumento de los niveles de esta hormona en este tejido de la planta.

La aplicación de etileno induce la expresión en la ZA tanto de la ACCS, como de la ACCO en flores femeninas y masculinas, coincidiendo con el efecto del etileno



sobre la abscisión de estas flores. Sin embargo, a pesar de que el etileno exógeno induce la abscisión floral de frutos con el síndrome flor pegada, no aparece un incremento de la expresión de ninguno de estos dos genes en la ZA de estas flores. Por otra parte los niveles de ACCO aumentan en la ZA a lo largo del desarrollo de la flor, y la producción de etileno de flores femeninas y masculinas incrementa a medida que las flores se desarrollan, desde estadios de preantesis a antesis y especialmente tras la polinización. Se ha visto, que la producción interna de etileno regula la abscisión de flores que muestran un incremento de la síntesis de etileno durante el desarrollo o tras la polinización, por ejemplo en *Digitalis*, petunia, *Pelargonium*, manzana y cereza (revisado por Brown, 1997). Nuestros datos apoyan la teoría de que algo similar ocurra en la abscisión floral de *C. pepo*.

## **2.6. Cambios en el patrón proteico de las ZAs inducidas por etileno**

### **2.6.1. Geles bidimensionales**

Los análisis de proteínas mediante electroforesis de dos dimensiones nos han permitido comprobar que la aplicación de etileno produce en la planta una serie de cambios en la expresión génica que son comunes para la ZA y para otros tejidos.

En los geles bidimensionales de ZAs así como en la no-ZA, el etileno induce la formación de una serie de polipéptidos de carácter básico y con pesos moleculares entre 35 y 75KDa. Mediante análisis MALDI/MS/MS se ha podido microsecuenciar un fragmento de una quitinasa PRP (proteínas relacionadas con patogénesis), que no aparece en extractos proteicos de ZA de flores en antesis o flores control. Está ampliamente descrita la inducción de la expresión por etileno de genes que codifican PRPs en la ZA de diferentes especies. Con respecto a las quitinasas, del Campillo y Lewis (1992) muestran la acumulación de varias isoformas de quitinasa en ZAs de hojas

de judía tratadas con etileno, y Coupe y colaboradores (1997) identifican dos quitinasas en bibliotecas de ADNc proveniente de ZAs de folíolos de *Sambucus*, que habían sido tratados con etileno. Además, una de esas quitinasas, la quitinasa tipo IV, presentaba un requerimiento exclusivo de etileno, no apareciendo en ZAs sin tratar.

A pesar de no haber detectado dichas proteínas en ZA sin tratar con etileno de flores en estadios de antesis o previos a la antesis, en estadios de desarrollo más avanzados (postantesis 3), se ha observado la presencia de polipéptidos que se distribuyen en los geles con el mismo patrón de pI (básico) y peso molecular (35-75 KDa) lo que parece indicar la presencia de quitinasas en este estadio de abscisión. La presencia de este tipo de proteínas podría indicar un aumento en la cantidad de etileno endógeno a medida que avanza la abscisión (en el estadio de postantesis 3 la abscisión floral se produce en no más de 24h) y este etileno induce la síntesis de proteínas relacionadas con el proceso, como son las quitinasas. Puesto que también hemos visto que el etileno es capaz de inducir la síntesis de los ARNm de la ACC oxidasa y ACC sintasa, la aplicación de etileno induciría la síntesis de etileno en la planta, estimulando la expresión de una serie de genes implicados en defensa frente a patógenos, de una manera similar a como lo hace el etileno endógeno producido por la planta en condiciones normales.

#### 2.6.2. Actividad quitinasa

Con respecto a la actividad quitinasa en ZAs florales de las variedades Cora y Cavili de calabacín, se ha observado que tanto en la abscisión natural como en la inducida por etileno, la actividad quitinasa aumenta al progresar el proceso de separación, aunque la inducción de la actividad quitinasa por etileno no es exclusiva de la ZA.

Por todo ello creemos, que esta enzima sí tendría un papel en la abscisión aunque no intervenga directamente en el proceso de separación, protegiendo frente a la infección por patógenos, la región proximal de la ZA que queda expuesta inmediatamente tras la caída de los órganos florales.

### **3. ¿CÓMO REGULA EL ETILENO LA ABSCISIÓN FLORAL?**

Los tratamientos con etileno sobre zonas de abscisión floral, tanto de flores como de zonas aisladas son capaces de acelerar el proceso de abscisión, posiblemente mediante la autorregulación de su propia síntesis, ya que hemos observado la inducción de los ARNm de la ACC oxidasa y ACC sintasa. El etileno por tanto acelera la abscisión en calabacín mediante la inducción de las actividades enzimáticas hidrolíticas poligalacturonas y endoglucanasas, y además produce una secreción en la que se ha detectado una alta concentración de proteínas tipo arabinogalactanos, similares a las encontradas en plantas de *Arabidopsis* que tienen sobreexpresado el gen *IDA*. Concluimos que el etileno es un inductor y regulador fundamental del proceso.

CONCLUSIONES

---



PRIMERA. El proceso de abscisión floral en *C. pepo* se caracteriza por un incremento en el tamaño de las células de la ZA, junto con la disolución de las paredes celulares de dichas células. El aumento en las actividades de las enzimas hidrolíticas PGs y CLs sugiere que son estas enzimas las principales responsables de la disolución de la pared, sin ser necesario un incremento de las actividades expansinas y pectinmetilesterasas.

SEGUNDA. La ZA floral de *Cucurbita pepo* es dependiente de etileno, ya que el etileno exógeno reduce el tiempo hasta abscisión y el inhibidor de su síntesis AVG retrasa la caída de los órganos florales. El etileno actúa induciendo la actividad de las enzimas hidrolíticas de la PC endoglucanasas y endopoligalacturonasas, así como la expresión de las enzimas de su propia ruta biosintética ACC oxidasa y ACC sintasa. Además la expresión de la enzima clave de su síntesis, ACCO aumenta en la ZA a lo largo de su desarrollo. La abscisión se induce más rápidamente en ZAs aisladas respecto a flores completas, posiblemente debido al efecto inhibidor de las auxinas en el proceso, provenientes de la región distal.

TERCERA. El etileno también participa en las últimas etapas del proceso de abscisión, induciendo la síntesis y actividad de una proteína relacionada con patogénesis, una quitinasa, aunque esta inducción no es exclusiva de las células de la ZA.

CUARTA. Un aumento en la concentración de etileno es capaz de provocar la caída de pétalos y sépalos, mediante la activación de ZAs vestigiales que normalmente no se manifiestan en estos órganos. En condiciones normales no se ha observado abscisión de dichos órganos en *C. pepo* morfotipo zucchini.

QUINTA. De acuerdo con los resultados obtenidos a microscopía óptica y electrónica de barrido, la ZA de las flores con síndrome flor pegada presenta una morfología similar

a la de flores femeninas previas al inicio del proceso de abscisión, incluida la ausencia de hidrólisis de almidón en los nectarios. Estos resultados, unidos a los obtenidos con los análisis de las actividades de las enzimas relacionadas con el proceso, PG, EGasa, Expansina y PME, indican que la abscisión en estas flores presenta un retraso similar al observado en el desarrollo del resto de sus órganos florales, con la excepción de las anteras y el ovario, que inicia la formación del fruto de manera partenocárpica.

SEXTA. La zona de abscisión en flores que presentan el fenotipo “flor pegada” es capaz de responder a etileno iniciando y completando el proceso de abscisión en presencia de este activador.

SÉPTIMA. El proceso de abscisión produce una secreción enriquecida en proteínas tipo arabinogalactanos, que podrían estar relacionadas en la ruta de señalización de la abscisión.

## BIBLIOGRAFÍA

---





**Abeles F.B.** 1968. Role of RNA and protein synthesis in abscission. *Plant Physiology* **43**, 1577-1586.

**Anderson T.F.** 1951. Techniques for the preservation of three dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope. *Transactions of the New York Academy of Sciences*. **13**, 130–133.

**Aneja M., Gianfagna T., Edward Ng.** 1999. The roles of abscisic acid and ethylene in the abscission and senescence of cocoa flowers. *Plant Growth Regulation* **27**, 149-155.

**Athanasiou A., Khosravi D., Tamari F., Shore J.S.** 2003. Characterization and localization of short-specific polygalacturonase in distylous *Turnera subulata* (Turneraceae). *American Journal of Botany* **90** (5), 675-682.

**Bauer S., Vasu P., Persson S., Mort A.J., Somerville C.R.** 2006. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **103** (30), 11417-11422.

**Belfield E.J., Ruperti B., Roberts J.A., McQueen-Mason S.J.** 2005. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *Journal of Experimental Botany* **56**, 817-823.

**Bellani L.M., Bottacci A.**, 1995. Anatomical studies of branchlet abscission related to crown modification in *Quercus cerris* L. *Trees* **10** (1), 20-23

**Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S.** 2004. Improved prediction of signal peptides — SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**, 783-795.

**Beno-Moualem D., Gusev L., Dvir O., Pesis E., Meir S., Lichter A.** 2004. The effects of ethylene, methyl jasmonate and 1-MCP on abscission of cherry tomatoes from the bunch and expresión of endo-1,4-  $\beta$ -glucanases. *Plant Sciences* **167**, 499-507.

**Ben-Tal Y., Lavee S.** 1976. Increasing effectiveness of ethephon for olive harvesting. *HortoScience* **11**, 489-490.

**Bleeker A.B., Patterson S.E.** 1997. Last exit: Senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. *The Plant Cell* **9**, 1169-1179.

**Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.

- Brown KM.** 1997. Ethylene and abscission. *Physiol Plant* **100**, 567-576.
- Brown S. M., Crouch M. L.** 1990. Characterization of a Gene Family Abundantly Expressed in *Oenothera organensis* Pollen That Shows Sequence Similarity to Polygalacturonase. *The Plant Cell* **2**(3), 263-274.
- Brummell D.A., Bradford D.H., Bennett A.B.** 1999. Antisense suppression of tomato endo-1,4- $\beta$ -glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Molecular Biology* **40**, 615-622
- Burns J.K., Lewandowski D.J., Nairn C.J., Brown G.E.** 1998. Endo-1,4- $\beta$ -glucanase gene expression and cell wall hydrolase activities during abscission in Valencia orange. *Physiologia Plantarum* **102**, 217-225.
- Butenko M.A., Patterson S.E., Grini P.E., Stenvik G.E., Amundsen S.S., Mandal A., Aalen R.B.** 2003. INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION Controls Floral Organ Abscission in *Arabidopsis* and Identifies a Novel Family of Putative Ligands in Plants. *The Plant Cell* **15**, 2296-2307.
- Butenko M.A., Stenvik G-E., Alm V., Saether B., Patterson S., Aalen R.B.** 2006. Ethylene-dependent and -independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter::reporter gene constructs in the *ida* abscission mutant. *Journal of Experimental Botany*, **57** (14), 3627-3637.
- Byers R.E., Baker L.R., Sell H.M., Herner R.C., Dilley D.R.** 1972. Ethylene: A Natural Regulator of Sex Expression of *Cucumis melo* L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69** (3) 717-720.
- Carpita N., McCann M.** 2000. The Cell Wall. En B.Buchanan, W.Gruissem, R. Jones, Eds. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 52-108.
- Chanasut U., Rogers H.J., Leverentz G., Griffiths G., Thomas B., Wagstaff C., Stead A.D.** 2002. Increasing flower longevity in *Alstroemeria*. *Postharvest Biology and Technology* **29**, 324-332.
- Cho H-T., Cosgrove D.J.** 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **97** (17), 9783-9788.

- Clements J.C., Atkins C.A.** 2001. Characterization of a Non-abscission Mutant in *Lupinus Angustifolius* L.: Physiological Aspects. *Annals of Botany* **88**, 629-635.
- Cosgrove D.J.** 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 171-201.
- Cosgrove D.J.** 2000a. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-326.
- Cosgrove D.J.** 2000b. New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 73-78.
- Cosgrove D.J.** 2003. Cell wall extension. En: *The Plant Cell Wall*. Rose J.K.C., Ed. Blackwell Publishing. CRC.Press.
- Cosgrove D.J.** 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 850-861.
- Cosgrove D.J., Li L.C., Cho H-T., Hoffmann-Benning S., Moore R.C., Blecker D.** 2002. The growing world of Expansins. *Plant and Cell Biology* **13** (12), 1436-1444.
- Coupe S.A., Taylor J.E., Roberts J.A.** 1997. Temporal and spatial expression of mRNAs encoding pathogenesis-related proteins during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *Plant Cell and Environment* **20**, 1517-1524.
- Dal Cin V., Danesin M., Boschetti A., Dorigoni A., Ramina A.E.** Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L.Borck). *Journal of Experimental Botany* **56**(421), 2995-3005.
- Darley C.P., Forrester A.M., McQueen-Mason S.J.** 2001. The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Molecular Biology* **47**, 179-195.
- Decker D.S.** 1988. Origin(s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* **42**(1), 4-15.
- del Campillo E.** 1999. Multiple endo-1,4- $\beta$ -glucanases (Cellulase) genes in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* **46**, 39-61.
- del Campillo E., Bennett A.B.** 1996. Pedicel breakstrength and cellulase gen expresión durin tomato flower abscisión. *Plant Physiology*. **111** (3), 813-820.

**del Campillo E., Lewis L.N.** 1992a. Identification and Kinetics of Accumulation of Proteins Induced by Ethylene in Bean Abscisión Zones. *Plant Physiology* **98**, 955-961.

**del Campillo E., Lewis L.N.** 1992b. Occurrence of 9.5 Cellulase and Other Hydrolases in Flower Reproductive Organs Undergoing Major Cell Wall Disruption. *Plant Physiology* **99**, 1015-1020.

**Downie B., Dirk L.M., Hadfield K.A., Wilkins T.A., Bennett A.B., Bradford K.J.** 1998. A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Analytical Biochemistry* **264**, 149-157.

**Dupille E., Zacarias L.** 1996. Extraction and biochemical characterization of wound-induced ACC oxidase from Citrus peel. *Plant Science* **144**, 53-60.

**Ellis C.M., Nagpal P., Young J.C., Hagen G., Guilfoyle T.J., Reed J.W.** 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4563-4574.

**Esaka M., Enoki K., Kouchi B., Sasaki T.** 1990. Purification and Characterization of Abundant Secreted Protein in Suspension-Cultured Pumpkin Cells. *Plant Physiology* **93**, 1031-1041.

**Fang S., Fernandez D.E.** 2002. Effect of regulated overexpression of the MADS domain factor AGL15 on flower senescence and fruit maturation. *Plant Physiology* **130**, 78-79.

**Fernandez D.E., Heck G.R., Perry S.E., Patterson S.E., Bleecker A.B., Fang S.** 2000. The Embryo MADS Domain Factor AGL15 Acts Postembryonically: Inhibition of Perianth Senescence and Abscission via Constitutive Expression. *The Plant Cell* **12**, 183-197.

**García Garrido J.M., Tribak M., Rejón-Palomares A., Ocampo J.A., García-Romera I.** 2000. Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots. *Journal of Experimental Botany* **51** (349), 1443-1448.

**Gaspar Y., Johnson K.L., Mckenna J.A., Bacic A., Schultz C.J.** 2001. The complex structures of arabinogalacta-proteins and the journey towards understanding function. *Plan Molecular Biology* **47**, 161-176.

- Gómez P, Peñaranda A, Garrido D, Jamilena M.** 2004. Evaluation of flower abscission and sex expression in different cultivars of zucchini squash (*Cucurbita pepo*). A. Lebeda and H.S. Paris (Eds). Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research.
- González-Bosch C., del Campillo E., Bennett A.B.** 1997. Immunodetection and Characterization of Tomato Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase Cell Protein in Flower Abscission Zones. *Plant Physiology* **114** (4), 1541-1546.
- González-Carranza Z.H., Loyola-Gloria E., Roberts J.A.** 1998. Recent developments in abscisión: Shedding Light on the shedding process. *Trends in Plant Science* **3**, 10-14.
- González-Carranza Z.H., Whitelaw C.A., Swarup R., Roberts J.A.** 2002. Temporal and Spatial Expression of a Polygalacturonase during Leaf and Flower Abscission in Oilseed Rape and Arabidopsis. *Plant Physiology* **128**, 534-543.
- Hadfield K.A., Bennett A.B.** 1998. Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function. *Plant Physiology* **117**, 337-343.
- Hall W.C.** 1952. Evidence on the Auxin-Ethylene Balance Hypothesis of Foliar Abscission. *Botanical Gazette*. **113** (3), 310-322.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **167**, 557-580.
- Henderson J., Davies H.A., Heyes S.J., Osborne D.J.** 2001. The study of a monocotyledon abscission zone using microscopic chemical, enzymatic and solid state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR analyses. *Phytochemistry* **56**, 131-139.
- Hestrin S., Schramm M.** 1954. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biochemistry Journal* **58**, 345-352.
- Hong S., Sexton R., Tucker M.L.** 2000. Analysis of Gene Promoters for Two Tomato Polygalacturonases Expressed in Abscission Zones and the Stigma. *Plant Physiology* **123**, 869-881.
- Iwahori S., Lyons J.M., Smith O.E.** 1970. Sex Expression in Cucumber Plants as Affected by 2-Chloroethylphosphonic Acid, Ethylene, and Growth Regulators. *Plant Physiology* **46**, 412-415.

- Jackson M.B., Osborne D.J.** 1970. Ethylene, the Natural Regulator of Leaf Abscission. *Nature* **225**, 1019-1022.
- Jensen T.E., Valdovinos J.G.** 1967. Fine structure of abscission zones. I. Abscission zones of the pedicels of tobacco and tomato flowers at anthesis. *Planta* **77**, 298-318.
- Jensen T.E., Valdovinos J.G.** 1968. Fine structure of abscission zones. III. Cytoplasmic changes in abscising pedicels of tobacco and tomato flowers. *Planta* **83**, 303-313.
- Jinn T.L., Stone J.M., Walker J.C.** 2000. HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes and Development*. **14** (1), 108-117.
- Jones L., Milne J.L., Ashford D., McQueen-Mason S.J.** 2003. Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**(20), 11783-11788.
- Kandasamy K.M., McKinney E.C., Deal R.B., Meagher R.B.** 2005. Arabidopsis ARP7 is an essential Actin-Related Protein required for normal embryogenesis, plant architecture, and floral organ abscission. *Plant Physiology* **138**, 2019-2032.
- Kardolus J.P., Bezem N.** 1998. The floral abscission zone in series Acaulia and related taxa of *Solanum* section Petota. *Canadian Journal of Botany* **76**, 1424-1432.
- Kim Y.S., Lee J.H., Yoon G.M., Cho H.S., Park S-W., Suh M.C., Choi D., Ha H.J., Liu J.R., Pai H-S.** 2000. CHRK1, a Chitinase-Related Receptor-Like Kinase in Tobacco. *Plant Physiology* **123**, 905-915.
- Kuang A., Peterson C.M., Dute R.R.** 1992. Leaf abscission in soybean: citochemical and ultrastructural changes following benzylaminopurine treatment. *Journal of Experimentl Botany* **43**(257), 1611-1619.
- Kuroda S., Hakata M., Hirose Y., Shiraishi M., Abe S.** 2003. Ethylene production and enhanced transcription of an ethylene receptor gene, ERS1, in *Delphinium* during abscission of florets. *Plants Physiology and Biochemistry* **41**, 812-820.
- Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the ead of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- LaMotte C.E., Cochnauer C., LaMotte L.R., Mathur J.R., Davies L.L.R.** 1969. Pectin sterase in relation to leaf abscission in *Coleus* and *Phaseolus*. *Plant Physiology* **44**, 21-26.
- Lashbrook C.C. Gonzalez-Bosch C., Bennett A.B.** 1994. Two divergent endo- $\beta$ -1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* **6**, 1458-1493.
- Lashbrook C.C., Tieman D.M., Klee H.J.**, 1998. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *The Plant Journal* **15** (2), 243-252.
- Lewis M.W., Leslie M.E., Liljegren S.J.** 2006. Plant separation : 50 ways to leave your mother. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 59-65
- Libertini E., Li Y., McQueen-Mason S.J.** 2004. Phylogenetic Analysis of the Plant Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase Gene Family. *Journal of Molecular Evolution* **58**, 506-515.
- Lieberman S.J., Valdovinos J.G., Jensen T.E.** 1983. A morphometric study on the effects of ethylene treatment in promoting abscission of tobacco flower pedicels. *Plant Physiology* **72**, 583-585.
- Link B.M., Wagner E.R., Cosgrove D.J.** 2001. The effect of a microgravity (space) environment on the expression of expansins from the peg and root tissues of *Cucumis sativus*. *Physiologia Plantarum* **113**(2), 292-300.
- Lizada C., Yang S.F.** 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem* **100**, 140-145.
- Llop-Tous I., Domínguez-Puigjaner E., Palomer X., Vendrell M.** 1999. Characterization of two divergent endo- $\beta$ -1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiology* **119**, 1415-1421.
- Macnish A.J., Irving D.E., Joyce D.C., Vithanage V., Wearing A.H.** 2005. Anatomy of ethylene-induced floral organ abscission in *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Australian Journal of botany*. **53**(2), 119-131.
- Mao L., Begum D., Chuang H., Budiman M.A., Szymkowiak E.J., Irish E.E., Wing R.A.** 2000. JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* **406**, 910-913.



**Martín-Platero A.M., Valdivia E., Maqueda M., Martín-Bueno M.** 2007. Fast, convenient, economical method for isolating genomic DNA from lactic-acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. *Analytical Biochemistry* **366** (1), 102-104.

**McQueen-Mason S.J., Cosgrove D.J.** 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**, 6574-6578.

**McQueen-Mason S.J., Durachko D.M., Cosgrove D.J.** 1992. Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. *The Plant Cell* **4**, 1425-1433.

**Moline H.E., LaMotte C.E., Gochnauer C., McNomer A.** 1972. Further comparative studies of pectin esterase in relation to leaf and flower abscission. *Plant Physiology* **50**, 655-659.

**Nee M.** 1990. The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* **44** (3 supplement), 56-68.

**Nepi M., Ciampolini F., Pacini E.** 2006. Development and ultrastructure of *Cucurbita pepo* nectaries of male flowers. *Annals of Botany* **78**, 95-104.

**Niogret M.F., Dublad M., Mandaron P., Mache R.** 1991. Characterization of pollen polygalacturonase encoded by several cDNA clones in Maize. *Plant Molecular Biology* **17**, 1155-1164.

**O’Farrel P.H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007-4021.

**Osborne D.J.** 1989. Abscission. *Critical Reviews in Plants Sciences* **8**(2), 103-129.

**Osborne D.J., Sargent J.A.** 1976a. The positional differentiation of ethylene-responsive cells in rachis abscission zones in leaves of *Sambucus nigra* and their growth and ultrastructural changes at senescence and separation. *Planta* **130**, 203-210.

**Osborne D.J., Sargent J.A.** 1976b. The positional differentiation of abscission zones during the development of leaves of *Sambucus nigra* and the response of the cells to auxin and ethylene. *Planta* **132**, 197-204.

**Paris H.S.** 1989. Historical records,, origins, and development of edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* **43**(4), 423-443.

- Paris H.S.** 2001. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews* **25**, 71-170.
- Paris H.S., Janick J.** 2005. Early evidence for the culinary use of squash flowers in Italy. *Chronica Horticulturae* **45**(2), 20-21.
- Paris H.S., Yonash N., Portnoy V., Mozes-Daube N., Tzuri G., Katzir N.** 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 971-978.
- Patterson S.E.** 2001. Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**, 494-500.
- Patterson S.E., Bleecker A.B.** 2004. Ethylene-Dependent and -Independent Processes Associated with Floral Organ Abscission in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 194-203.
- Payán, M.C.** 2006. Análisis de los factores genéticos y hormonales que controlan el sexo en calabacín (*Cucurbita pepo*). Tesis Doctoral, Universidad de Almería.
- 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. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **82**(4), 579-584.
- Peterson M., Sander L., Child R., van Onckele H., Ulvskov P., Borkhardt B.** 1996. Isolation and characterisation of a pod dehiscence zone-specific polygalacturonase from *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **31**, 517-527.
- Poovaiah B.W., Rasmussen H.P.** 1973. Calcium distribution in the abscission zone of bean leaves. Electron microprobe X-Ray analysis. *Plant Physiology* **52**, 683-684.
- Ratner A., Goren R., Monselise S.P.** 1969. Activity of pectin esterase and cellulase in the abscission zone of citrus leaf explants. *Plant Physiology* **44**, 1717-1723.
- Rejón-Palomares A, García-Garrido JM, Ocampo JA, García-Romera I.** 1996. Presence of xyloglucan-hydrolyzing glucanases (xyloglucanases) in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* **21**, 249-261.
- Roberts J.A., Elliot K.A., González-Carranza Z.H.** 2002. Abscission, Dehiscence, and Other Cell Separation Processes. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 131-158.

**Roberts J.A., Schindler B., Tucker G.A.** 1984. Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor. *Planta* **160**, 159-163.

**Roberts J.A., Whitelaw C.A., González-Carranza Z.H., McManus M.T.** 2000. Cell separation processes in plants: models, mechanisms and manipulation. *Annals of Botany* **86**, 223-235.

**Rodríguez-Gacio M.C., Nicolás C., Matilla A.J.** 2004. Cloning and análisis of a cDNA encoding an endo-polygalacturonase expressed during the desiccation period of the silique-valves of turnip-tops (*Brassica rapa* L. cv.Rapa). *Journal of Plant Physiology* **161**, 219-227.

**Rose J.K.C., Catalá C., González-Carranza Z.H., Roberts J.A.** 2003. Cell wall disassembly. En: The Plant Cell Wall. Rose J.K.C., Ed. Blackwell Publishing. CRC.Press.

**Rupertí B., Cattivelli L., Pagni S., Ramina A.** 2002. Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *Journal of Experimental Botany* **53**(368), 429-437.

**Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual. Ed. 2. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour. New York

**Sane A.P., Tripathi S.K., Nath P.** 2007. Petal abscission in rose (*Rosa bourboniana* var Gruss an Teplitz) is associated with the enhanced expression of an alpha expansin gene, RbEXPA1. *Plant Science* **172**, 481-487.

**Sanjur O.I., Piperno D.R. Andres T.C., Wessel-Beaver L.** 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**(1), 535-540.

**Schumacher K., Schmitt T., Rossberg M., Schmitz G., Theres K.** 1999. The *Lateral suppressor* (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **96**(1), 290-295.

**Seifert G.J., Roberts K.** 2007. The Biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 137-161.

- Serek M., Woltering E.J., Sisler E.C., Frello S., Sriskandarajah S.** 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnology Advances* **24**, 368-381.
- Sexton R.** 1976. Some Ultrastructural observations on the nature of foliar abscission in *Impatiens sultani*. *Planta* **128**, 49-58.
- Sexton R., Redshaw A.J.** 1981. The role of cell expansion in the abscission of *Impatiens sultani* leaves. *Annals of Botany* **48**, 745-756.
- Sexton R., Roberts J.A.** 1982. Cell Biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology* **33**, 133-162.
- Seymour G. B., Knox J.P.** 2002. Pectins and their manipulation. Eds. Oxford, UK: Blackwell publishing. CRC Press.
- Shani Z., Dekel M., Tsabary G., Shoseyov O.** 1997. Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4- $\beta$ -glucanase (cell) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **34**, 837-842.
- Shcherban T.Y., Shi J., Durachko D.M., Guiltinan M.J., McQueen-Mason S.J., Shieh M., Cosgrove D.J.** 1995. Molecular cloning and sequence analysis of expansins—a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 9245-9249.
- Shiraishi M., Yanagisawa T.,** 1988. Anatomical and histochemical studies of starch distribution during abscission, in filaments and petals of Wase Satsuma Mandarin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. **56**(4), 365-374.
- Smith B.D.** 2006. Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**(33), 12223-12228.
- Stenvik G.E., Butenko M.A., Urbanowicz B.R., Rose J.K.C., Aalen R.B.** 2006. Overexpression of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION Activates Cell Separation in Vestigial Abscission Zone in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**, 1567-1476.
- Stepanova A.N., Ecker J.R.** 2000. Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 353-360.

- Szymkowiak E.J., Irish E.E.** 1999. Interactions between jointless and wild-type tomato tissues during development of the pedicel abscission zone and the inflorescence meristem. *The Plant Cell* **11**, 159-175.
- Taylor J.E., Whitelaw C.A.** 2001. Signals in abscission. *New Phytologist* **151**, 323-339.
- Tebbutt S.J., Rogers H.J., Lonsdale D.M.** 1994. Characterization of a tobacco gene coding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Molecular Biology* **25**, 283-297.
- Tiznado-Hernández M.E., Gaffe J., Handa A.K.** 2004. Isolation and study of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase regulatory region. *Electronic Journal of Biotechnology* **7**(1), 9-29.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **76**(9), 4350-4354.
- Trainotti L., Spolaore S., Ferrares L., Casadoro G.** 1997. Characterization of ppEG1, a member of a multigen family which encodes endo- $\beta$ -1,4-glucanase in peach. *Plant Molecular Biology* **34**, 791-802.
- Trainotti L., Pavanello A., Zanin D.** 2006. PpEG4 is a peach endo-  $\beta$ -1,4-glucanase gene whose expression in climateric peaches does not follow a climateric pattern. *Journal of Experimental Botany* **57**(3) 589-598.
- Tucker G.A., Schindler B., Roberts J.A.** 1984. Flower abscission in mutant tomato plants. *Planta* **160**, 164-167.
- Tucker M.L., Sexton R., del Campillo E., Lewis L.M.** 1988. Bean abscission cellulase: Characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin. *Plant Physiology* **88**, 1257-1262.
- Tucker M.L., Whitelaw C.A., Lyssenko N.N., Nath P.** 2002. Functional Analysis of Regulatory Elements in the Gene Promoter for an Abscission-specific Cellulase from Bean and Isolation, Expression, and Binding Affinity of Three TGA-Type Basic Leucine Zipper Transcription Factors. *Plant Physiology* **130**, 1487-1496.
- Ujeda E., Nakamura S.** 2000. Abscission of Azolla branches induced by ethylene and sodium azide. *Plant Cell Biology* **41**(12), 1365-1372.

- Valdovinos J.G., Jensen T.E.** 1968. Fine structure of abscission zones. II. Cell-wall changes in abscising pedicels of tobacco and tomato flowers. *Planta* **83**, 295-302.
- Valdovinos J.G., Jensen T.E., Sicko L.M.** 1971. Ethylene-induced rouge endoplasmic reticula in abscission cells. *Plant Physiology* **47**, 162-163.
- van Doorn W.G.** 2002. Effect of Ethylene on Flower Abscission: a Survey. *Annals of Botany* **89**, 689-693.
- van Doorn W.G., Stead A.D.** 1997. Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental Botany* **48**(309), 821-837.
- Verwoerd TC, Dekker BM and Hoekema A.** 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res* **17**(6), 2362.
- Vlasenko E.Y., Ryan A.I., Shoemaker C.F., Shoemaker S.P.** 1998. The use of capillary viscometry reducing end-group analysis, and size exclusion chromatography combined with multi-angle laser light scattering to characterize endo-1,4-  $\beta$ -glucanase on carboxymethylcellulose: A comparative evaluation of the three methods. *Enzyme and Microbial Tecnology* **232**, 350-359.
- Wang Y., Li T., Meng H., Sun X.** 2005. Optimal and spatial analysis of hormones, degrading enzymes and isozyme profiles in tomato pedicel explants during ethylene-induced abscission. *Plant Growth Regulation* **46**, 97-107.
- Warner H.L., Leopold A.C.** 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiology* **44**, 156-158.
- Weis K.G., Webster B.D., Goren R., Martin G.C.,** 1991. Inflorescence Abscission in Olive: Anatomy and Histochemistry in Response to Ethylene and Ethephon. *Botanical Gazette* **152**(1), 51-58.
- Whitney S.E.C., Gidley M.J., Mcqueen-Mason S.J.** 2000. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *The Plant Journal* **22**, 327-334.
- Wright M., Osborne D.J.** 1974. Abscission in *Phaseolus vulgaris*. The positional differentiation and ethylene-induced expansion growth of specialised cells. *Planta* **120**, 163-170.
- Yager R.E.** 1960. Possible role of pectin enzymes in abscission. *Plant Physiology* **35**(2), 157-162.

**Yates E.A., Valdor J-F., Haslam S.M., Morris H. R., Dell A., Mackie W., Knox J.P.** 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* **6**(2), 131-139.

**Zheng X.Y., Wolff D.W., Crosby K.M.** 2002. Genetics of ethylene biosynthesis and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of ACC oxidase and synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* **105**, 397-403.