

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



**Desarrollo de herramientas fisiológicas y  
genómicas para mejorar la calidad postcosecha del  
fruto de calabacín**

Development of physiological and genomic tools to improve the  
postharvest quality of zucchini fruit

PROGRAMA DE DOTORADO EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE  
SISTEMAS

**Raquel Jiménez Muñoz**

TESIS DOCTORAL / DOCTORAL THESIS

2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Raquel Jiménez Muñoz  
ISBN: 978-84-1306-695-0  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/64642>



El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias en la línea de investigación: Fisiología de la postcosecha en frutos de interés agronómico.

La doctoranda ha sido financiada por el Ministerio de Economía y competitividad mediante la concesión de un contrato de “Formación de Personal Investigador” (FPI 2015) para la realización de la tesis doctoral (Diciembre 2015 - Diciembre 2019), asociado al Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad y Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER (Project AGL2014-54598-C2-R).

Parte de los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

### CONGRESOS

- **III Workshop de jóvenes biotecnólogos.** Instituto Universitario de Investigación de Biotecnología. Presentación Póster. Fecha: Mayo de 2016. Universidad de Granada.  
SILENCIAMIENTO GÉNICO EN FRUTO DE CALABACÍN MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA. **R. Jiménez-Muñoz**, F. Carvajal, F. Palma, D. Garrido, A. Pulido.
- **IV Workshop de jóvenes biotecnólogos.** Instituto Universitario de Investigación de Biotecnología. Presentación Póster. Fecha: Abril 2017. Universidad de Granada.  
SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS EN CUCURBITA PEPO. **R. Jiménez- Muñoz**, F. Carvajal, F. Palma, D. Garrido y A. Pulido.
- **XIV Reunión Biología Molecular de Plantas.** Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Presentación Oral. 4-6 Julio 2018. Universidad de Salamanca.

USE OF ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS TO EXPRESS COLD RESISTANCE GENES IN CUCURBITA PEPO. **R. Jiménez-Muñoz.**

- **XIV Reunión Biología Molecular de Plantas.** Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Presentación Póster. 4-6 Julio 2018. Universidad de Salamanca.  
INVOLVEMENT OF TWO TRANSCRIPTION FACTORS IN ZUCCHINI FRUIT RESPONSE TO COLD STRESS. **R. Jiménez-Muñoz,** F. Palma, A. Pulido, M. Jamilena, F. Carvajal, D. Garrido.
  
- **XIV Reunión Biología Molecular de Plantas.** Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Presentación Póster. 4-6 Julio 2018. Universidad de Salamanca.  
EFFECT OF ABA APPLICATION ON THE BIOSYNTHESIS OF CUTICULAR WAXES IN POSTHARVEST OF ZUCCHINI FRUIT. F. Palma, F. Carvajal, **R. Jiménez-Muñoz,** A. Pulido, M. Jamilena, D. Garrido.
  
- **XXIII Meeting of the Spanish society of Plant physiology.** Presentación Póster. Junio 2019. Universidad de Pamplona.  
EXPRESSION OF THREE TRANSCRIPTION FACTORS DURING COLD STRESS IN CUCURBITA PEPO. **R Jiménez-Muñoz,** F Palma, A. Pulido, M Jamilena, F Carvajal, D Garrido.
  
- **6 TH International Symposium on Cucurbits. Cross-pollination between North and South.** Presentación Póster. Julio 2019. Universidad de Gante (Bélgica).  
IMPLEMENTATION OF AN AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION AND REGENERATION PROTOCOL IN CUCURBITA PEPO. **R Jiménez-Muñoz,** A Pérez-lorente, F Palma, F Carvajal, A Pulido, M Jamilena, D Garrido.
  
- **II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias.** Octubre 2019. Universidad de Almería.  
USO DEL VIRUS ZYMV PARA EL ESTUDIO DE GENES DE TOLERANCIA AL FRÍO EN CALABACÍN. **R. Jiménez-Muñoz,** F. Carvajal, F. Palma, A. Castro Cegrí, M. Jamilena, A. Gal On, D. Garrido.

## **PUBLICACIONES**

- **Carvajal, F., Palma, F., Jiménez-Muñoz, R., Jamilena, M., Pulido, A., Garrido, D.** Unravelling the role of abscisic acid in chilling tolerance of zucchini during postharvest cold storage. *Postharvest Biology and Technology* (2017). Volume 133, Pages 26–35 DOI: 10.1016/j.postharvbio.2017.07.004. (**Horticulture Q1**)
- **Jiménez-Muñoz, R., Palma, F., Carvajal, F., Castro-Cegrí, A., Pulido, A., Jamilena, M., Romero-Puertas, M.C. & Garrido, D.** Pre-storage nitric oxide treatment enhances chilling tolerance of zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by S-nitrosylation of proteins and modulation of the antioxidant response. *Postharvest Biology and Technology* (2021), 171, 111345. (**Horticulture Q1**)

## **ESTANCIA**

- Department of Plant Pathology and Weed research. The Volcani Center-ARO, Rishon LeTsiyon (Israel). Dr. **Amit Gal-On** (Julio 2017-Noviembre 2017, 4 meses)



# Abreviaturas y acrónimos

## A

AAO	Abscísico aldehído oxidasa
ABA	Ácido abscísico
ABF	ABRE Binding Factor
ABRE	ABA-Responsive Element
ADNc	ADN complementario
ADN-T	ADN de transferencia
AND	Ácido desoxirribonucleico
APX	Ascorbato peroxidasa
AREB	ABA-Responsive Element-Binding Protein
ARN	Ácido ribonucleico
ARNhp	ARN en horquilla
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNsi	ARN pequeño interferente
AS	Ácido salicílico
Asa	Asc

## B

BAP	6-Bencilaminopurina
bZIP	Leucine Zipper Basic

## C

CAT	Catalasa
CN	Cianuro

## D

DF	Daños por frío
DHA	Dehidroascorbato
DO	Densidad óptica
DPI	Días postinoculación

## E

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF-1 $\alpha$	Factor de elongación 1 $\alpha$

## F

FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
FT	Factor de transcripción

## G

GA <sub>3</sub>	Giberelina
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GFP	Proteína de fluorescencia verde
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GUS	Enzima $\beta$ -glucuronidasa

## *Abreviaturas y acrónimos*

### **H**

HA	Hemaglutinin epítipo
HDA6	istona desacetilasa 6
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

### **K**

KAT	3-cetoacil-CoA tiolasa 2
-----	--------------------------

### **L**

LB	Luria-Bernati
----	---------------

### **M**

MDA	Malondialdehído
MDHA	Monodehidroascorbato
MS	Medio Murashige y Skoog
MYB	MYeloBlastosis

### **N**

NADP	Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato oxidado
------	--

NADPH	Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato reducido
-------	---

NBT	Azul de nitrotetrazolio
-----	-------------------------

NCBI	National Center for Biotechnology Information
------	---

NO	Óxido nítrico
----	---------------

NR	Nitrato reductasa
----	-------------------

### **O**

ONOO-	ión peroxinitrito
-------	-------------------

### **P**

PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
------	---

PAL	Fenilalanina amonio-liasa
-----	---------------------------

pb	Pares de bases
----	----------------

PBS	Tampón fosfato salino
-----	-----------------------

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
-----	-------------------------------------

PF	Peso fresco
----	-------------

PG	Poligacturonasa
----	-----------------

PP2C	Proteína fosfatasa 2C
------	-----------------------

PTGS	Post-transcriptional Gene Silencing
------	-------------------------------------

*Abreviaturas y acrónimos*

Put	Putrescina	TBARS	Sustancias reactivas del TBA
PVPP	Polivinil polipirrolidona	TBS	Tampón Tris salino
PYL	PYrabactin resistance-Like	TCA	Ácido tricloroacético
PYR	PYRabactin resistance	TEAC	Capacidad antioxidante equivalente Trolox
<b>R</b>		TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilén-diamina
RCAR	Regulatory Component of ABA Receptor	TGS	Transcripcional Gene Silencing
RISC	RNA-induced silencing complex	TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triacina
ROS	Especies de oxígeno reactivo	Tris	Tris-hidroximetilaminometano
rpm	Revoluciones por minuto	TS	Tungstato sódico
<b>S</b>		<b>U</b>	
SDS	Dodecil sulfato sódico	UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
SNP	Nitroprusiato de sodio	<b>V</b>	
SOD	Superóxido dismutasa	VIGS	Virus Induced Gene Silencing
Spd	Espermidina	Vir	Región de virulencia
Spm	Espermina	<b>X</b>	
<b>T</b>		X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucuronido
TAE	Tampón tris-acético-EDTA		
TBA	Ácido tiobarbitúrico		

*Abreviaturas y acrónimos*

**Z**

ZD Zona distal

ZF-HD Zinc-Finger  
Homeodomain

ZP Zona proximal

ZYMV Zucchini Yellow

Mosaic Virus

ZYMV-AGII Vector vírico  
atenuado

ZYMV-FRNK Virus salvaje

RESUMEN

*SUMMARY*



El calabacín (*Cucurbita pepo* L.) es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia en España, especialmente en el sudeste andaluz. La mayor parte de la producción se destina a la exportación, lo que hace necesario una adecuada conservación postcosecha del fruto para mantener su calidad hasta su llegada al consumidor. El origen subtropical de este fruto lo hace susceptible de desarrollar daños por frío (DF) si se mantiene en un ambiente a baja temperatura, por encima del punto de congelación, hecho que ocurre de manera general durante su almacenamiento y transporte a los mercados de destino. Además, el calabacín es un fruto que se cosecha en estado inmaduro, siendo más propenso a sufrir estos daños que se traducen en una pérdida de peso, ablandamiento y aparición de hundimientos en el exocarpo (pitting), resultado de las numerosas alteraciones fisiológicas y bioquímicas que ocurren en sus tejidos. Estos daños por frío producen el deterioro de la calidad del fruto dando, por tanto, lugar a graves pérdidas económicas.

Para evitar estas pérdidas es necesario por un lado buenos programas de mejora que desarrollen nuevas variedades con frutos más resistentes, así como el desarrollo de técnicas que sean capaces de mejorar la vida útil de los frutos de las variedades existentes en el mercado. A su vez, poner a punto un protocolo de regeneración y editado genético en *C. pepo* es de vital importancia ya que podría suponer el uso de plantas transgénicas de este cultivo para avanzar en la obtención de resistencia o tolerancia a la frigoconservación.

En esta Tesis se ha avanzado en el uso de técnicas de mejora de la vida útil del fruto de *C. pepo*, ya que se han realizado dos tratamientos químicos que han mejorado la conservación en frío de frutos sensibles a este estrés, uno de ácido abscísico (ABA) y otro de óxido nítrico (NO). También se ha trabajado en la puesta a punto de un protocolo de regeneración de plantas de *C. pepo* mediante cultivos *in vitro* de secciones de cotiledón, con el objetivo de utilizar estos protocolos para una posterior puesta a punto de un sistema de transformación y editado genético en esta especie. El uso de un vector

vírico para expresión de genes en calabacín ha sido un abordaje paralelo al sistema de transformación que se ha implementado también en esta Tesis y que puede servir para estudios de expresión transitoria en esta especie. Asimismo, se ha caracterizado un gen que codifica un factor de transcripción que parece ser un buen candidato como activador de tolerancia al frío.

Los tratamientos de ABA y NO se han realizado en las variedades comerciales Natura y Sinatra, la primera es una variedad cuyo fruto resiste bien las bajas temperaturas, mientras que los frutos de Sinatra son muy sensibles a la conservación en frío. Con respecto al ácido abscísico, se ha podido comprobar la importancia de esta hormona en la resistencia de los frutos a las bajas temperaturas postcosecha, ya que los tratamientos con ABA en frutos sensibles al frío mejoraban notablemente la vida útil de los mismos, mientras que en la variedad Natura, tolerante, el uso de un inhibidor de ABA generó sensibilidad en frutos resistentes. En frutos tolerantes se detectó un incremento en los niveles de ABA endógenos que no estaba presente en frutos de la variedad sensible. Este incremento iba acompañado de una mayor transcripción de genes implicados en la vía de señalización de ABA. Los niveles de ABA en fruto mostraron una significativa correlación negativa con la pérdida de peso y los daños por frío.

El NO es una molécula que se ha relacionado con procesos de estrés en otras especies. El tratamiento postcosecha de frutos con NO se llevó a cabo mediante la aplicación de nitroprusiato de sodio (SNP), donador de NO. La aplicación de SNP mejoró la calidad del fruto de calabacín almacenado a baja temperatura, observándose una reducción de la pérdida de peso, daños por frío, fuga de electrolitos, contenido de malondialdehído y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y el aumento de algunas actividades enzimáticas importantes en la respuesta al estrés. La efectividad del tratamiento se pudo determinar mediante la detección de las proteínas S-nitrosiladas, que fueron más abundantes en el exocarpo de los frutos a los que se aplicó NO. El tratamiento con NO tuvo un papel regulador

en el equilibrio antioxidante del fruto de calabacín, prolongando así la calidad del mismo durante la conservación en frío

En la actualidad las herramientas biotecnológicas permiten un mayor conocimiento del genoma, el estudio de la función génica y la selección de marcadores para su uso en técnicas de mejora vegetal, así como la posibilidad de generar nuevas variedades mediante el uso de plantas transgénicas. Nuestro grupo de investigación ha seleccionado, mediante estudios transcriptómicos, una serie de genes candidatos implicados en la tolerancia al frío entre los que destaca el gen *MYB106-like*. Para validar estos datos y realizar la caracterización de este gen se realizaron una serie de estudios de expresión y análisis *in silico*. La expresión del gen en fruto de la variedad tolerante aumentó drásticamente con el almacenamiento en frío. En hojas y meristemas la expresión fue muy baja y se no pudo establecer una relación de la expresión con la tolerancia al estrés por frío en estos tejidos.

En cuanto a las estrategias biotecnológicas relacionadas con la modificación de la expresión de genes de interés, debido a la dificultad que ha mostrado esta especie a la transformación y a la resistencia de la opinión pública al uso de tecnologías con organismos modificados genéticamente, se optó en primer lugar por la utilización de vectores víricos para la sobreexpresión y silenciamiento de genes en calabacín, siendo *MYB106-like* el gen seleccionado para estos estudios. El vector ZYMV-AGII atenuado fue el utilizado, para la evaluación de los efectos causados por la infección en la planta y en última instancia, en el fruto. Las construcciones víricas provocaron un fenotipo de infección no uniforme de la planta. Se detectó en hojas tanto la sobreexpresión como el silenciamiento del gen candidato utilizado (*MYB106-like*). En frutos infectados con vector vírico para la sobreexpresión, se detectó la presencia del virus y el aumento de la expresión del gen en todos los tejidos analizados, aunque el fenotipo no mostró diferencias con el control. Pese a los resultados positivos y las ventajas de esta técnica frente a otras, también presenta limitaciones para su utilización

en el estudio de la postcosecha del fruto. No obstante, puede ser muy útil para los ensayos de expresión en plántulas.

Debido a las limitaciones encontradas en las técnicas con vectores víricos y para establecer técnicas que permitan generar líneas transformadas estables, en la presente Tesis Doctoral se ha trabajado en la puesta a punto de protocolos de regeneración y transformación genética en *C. pepo*. Para ello, en primer lugar, se ha trabajado en la selección de explantes y en la optimización de medios de cultivo para la regeneración de plantas de *C. pepo*, utilizando diferentes variedades de esta especie. De los resultados de los análisis se seleccionaron medios de cultivo para la regeneración que alcanzaron hasta un 40 % de inducción de brote y casi un 90 % de raíz a partir de explantes de cotiledón conteniendo una fracción de hipocótilo. Una vez puesto a punto el sistema de regeneración, se ha trabajado en la transformación utilizando distintas cepas de *Agrobacterium* transformadas con el plásmido pGFPGUSplus como vector control. Se han obtenido resultados que optimizan el proceso, aunque no son definitivos. De entre las distintas cepas usadas, AGL0 fue la que proporcionó mejores resultados, llegando a representar hasta un 16 % de los grupos de células transformadas en los explantes.

Zucchini (*Cucurbita pepo* L.) is one of the most important horticultural crops in Spain, especially in the southeast of Andalusia. Most of the production is destined for export, which makes proper postharvest storage of the fruit necessary to maintain its quality until it reaches the consumer. The subtropical origin of this fruit makes it susceptible to developing chilling injuries (CI) if it is kept at low temperature, above the freezing point, a fact that generally occurs during storage and transport to destination markets. Besides, zucchini fruit is harvested in an immature state, being more susceptible to suffer these damages resulting in weight loss, softening and the appearance of pitting in the exocarp surface, as a result of numerous physiological and biochemical alterations. These chilling injuries result in a decrease in fruit quality, and cause serious economic losses.

To avoid these losses, it is necessary, on the one hand, good breeding programs to introduce new varieties with a more resistant fruit to chilling conditions, as well as the development of techniques capable of improving the fruit shelf life in the existing varieties. At the same time, the implementation of protocols for plant regeneration and genetic editing in *C. pepo* is of vital importance since it could involve the use of transgenic plants of this crop to advance in obtaining resistance or tolerance to cold storage.

In this Thesis, progress has been made in the use of techniques to improve the useful life of *C. pepo* fruit, since two chemical treatments have been carried out that have improved the cold storage of sensitive fruit to this stress, one of abscisic acid (ABA) and another of nitric oxide (NO). Work has also been done on the development of a protocol for the plant regeneration of *C. pepo* using *in vitro* cultures of cotyledon sections, to use these protocols for subsequent development of a transformation and genetic editing system. The use of a viral vector for gene expression in zucchini has been a parallel approach to the transformation system that has also been implemented in this Thesis to be used for transient expression studies in this species. Likewise, a

gene encoding a transcription factor that appears to be a good candidate as an activator of cold tolerance has been characterized.

The ABA and NO treatments have been carried out on the commercial varieties Natura and Sinatra, being the former a cold tolerant variety, whereas Sinatra fruit are very sensitive to cold storage. From the experiments with abscisic acid, it has been possible to verify the importance of this hormone in the resistance of fruit to low storage temperatures, since ABA treatments in cold-sensitive fruit notably improved their shelf life, while in the tolerant variety Natura, the use of an ABA synthesis inhibitor induced cold sensitivity in the previously resistant fruit. In tolerant fruit, an increase in endogenous ABA levels was detected that was not present in fruit of the sensitive variety. This increment in ABA paralleled in an increase in transcription of genes involved in the ABA signalling pathway. The amount of ABA in fruit showed a significant negative correlation with weight loss and cold damage.

The NO is a molecule that has been related to stress processes in other species. The pre-storage NO-treatment of fruit was carried out by applying sodium nitroprusside (SNP), a NO donor. The application of SNP improved the quality of the zucchini fruit stored at low temperature, detecting a reduction in weight loss, cold damage, electrolyte leakage, the content of malondialdehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and induced the activity of several enzymes implicated in the response to stress. The effectiveness of the treatment could be determined by detecting the *S*-nitrosylated proteins, which were more abundant in the exocarp of the NO-treated fruit. The treatment with NO had a regulatory role in the antioxidant balance of the zucchini fruit, thus prolonging its quality during cold storage.

Currently, the use of biotechnological tools in crop species allows a better knowledge of their genomes, permits the study of gene function and the selection of genetic markers to be used in plant breeding techniques, and opens the possibility of generating new varieties through the use of plant transformation. Our research group has selected, through transcriptomic

studies, a series of candidate genes involved in cold tolerance, among which the MYB106-like gene stands out. To validate these data and perform the characterization of this gene, a series of expression studies and *in silico* analyzes were developed. The gene expression in the fruit of the tolerant variety increased dramatically with cold storage. In leaves and meristems, the expression was very low and it was not possible to establish a relationship between the levels of expression and tolerance to cold stress in these tissues.

Regarding the biotechnological strategies related to the expression modification genes of interest, and due to the difficulty that this species has shown to transformation, added to the resistance of public opinion to the use of technologies with genetically modified organisms, the first choice was to use viral vectors for genes overexpression and silencing in zucchini. The gene *MYB106-like* was selected for these studies. The attenuated vector ZYMV-AGII was used for the evaluation of the effects caused by the infection in the plants and ultimately, in the fruit. The viral constructs elicited a non-uniform plant infection phenotype. Both overexpression and silencing of the candidate gene used (*MYB106-like*) were detected in leaves. In infected fruit with the overexpression viral vector, the presence of the virus and the increased expression of the gene were detected in all tissues analyzed, although the phenotype did not show differences with the control. Despite the positive results and the advantages of this technique over others, it also presents limitations for its use in the study of the postharvest fruit. However, it can be very useful for expression assays in seedlings and vegetative tissues.

Due to the limitations found with the use of viral vectors and to establish techniques that allow the generation of stable transformed plant lines, in this Doctoral Thesis protocols for plant regeneration and genetic transformation in *C. pepo* have been set up. To do this, in the first place, we have worked on the selection of the suitable explants and on the optimization of culture media for the regeneration of *C. pepo* plants, using different varieties of this species. The culture media selected for regeneration achieved

## *Summary*

---

up to 40% shoot induction and almost 90% root induction from cotyledon explants containing a hypocotyl fraction. Once the regeneration system was implemented, the transformation was performed using different *Agrobacterium* strains harboring as a control vector the plasmid pGFPGUSplus. Among the different strains used, AGL0 was the one that provided the best results, representing up to 16% of the groups of transformed cells in the explants. Several results that optimize the system of transformation have been obtained, although more work is needed to establish a good transformation protocol for *C. pepo*.

**TABLA DE  
CONTENIDOS**  
*TABLE OF CONTENTS*



## Tabla de contenidos

---

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	XV
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
1.1. EL CALABACÍN.....	3
1.1.1. Origen y taxonomía.....	3
1.1.2. Cultivo del calabacín y su importancia económica .....	5
1.2. DAÑOS POR FRÍO .....	9
1.2.1. Alteraciones en la conformación y estructura de la membrana celular	11
1.2.2. Estrés oxidativo: respuesta secundaria a los daños por frío .	14
1.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES .....	15
1.3.1. Antioxidantes enzimáticos .....	15
1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos .....	19
1.4. TRATAMIENTOS POSTCOSECHA .....	21
1.4.1. Tratamientos con ácido abscísico.....	25
1.4.2. Tratamiento con óxido nítrico.....	26
1.5. ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS POR FRÍO EN <i>C. PEPO</i> .....	27
1.6. IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA MEJORA VEGETAL.....	31
1.7. MANIPULACIÓN GENÉTICA DE CARÁCTER TRANSITORIO	33
1.7.1. Sobreexpresión de genes mediante el uso de vectores virales	33
1.7.2. El silenciamiento génico mediante VIGS y ARNi .....	35
1.8. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA ESTABLE MEDIANTE <i>AGROBACTERIUM</i> .....	39
1.8.1. Regeneración.....	42

<b>2. OBJETIVOS</b> .....	45
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	49
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	51
3.1.1. Estudios de postcosecha y condiciones de almacenamiento	51
3.1.2. Cultivo de plantas de C. pepo .....	52
3.2. ANÁLISIS FISIOLÓGICOS DEL FRUTO DE CALABACÍN .....	53
3.2.1. Pérdida de peso .....	53
3.2.2. Índice de daños por frío .....	53
3.2.3 Textura .....	53
3.2.4. Pérdida de electrolitos.....	53
3.2.4. Tasa de muerte celular .....	54
3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	54
3.3.1. Peroxidación lipídica .....	54
3.3.2. Contenido en peróxido de hidrógeno.....	55
3.3.3. Contenido fenólico total.....	55
3.3.4. TEAC .....	55
3.3.5. FRAP.....	56
3.3.6. Ascorbato total .....	56
3.3.7. Contenido en ácido abscísico.....	57
3.3.8. Determinación de aminoácidos.....	57
3.3.9. Poliaminas.....	58
3.3.10. Pigmentos.....	59
3.3.11. Determinación por fluorescencia de NO.....	59
3.4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS .....	59
3.4.1. Superóxido dismutasa .....	59
3.4.2. Catalasa .....	60

3.4.3. Ascorbato peroxidasa (APX) .....	60
3.4.4. Glutación reductasa (GR) .....	61
3.4.5. Actividad abscísico aldehído oxidasa (AAO).....	61
3.4.6. Fenilalanina amonio-liasa .....	62
3.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS .....	62
3.5.1. Proteínas S-nitrosiladas. Método Biotin-switch .....	62
3.5.2. Detección péptido HA.....	63
3.5.3. Transferencia e inmunodetección .....	63
3.6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	64
3.6.1. Extracción de ARN .....	64
3.6.2. Síntesis de ADNc .....	64
3.6.3. RT-PCR.....	64
3.6.4. Extracción de ADN genómico .....	66
3.6.5. Extracción de DNA plasmídico .....	67
3.6.6. Análisis de restricción de ADN .....	68
3.6.7. Ligación .....	68
3.6.8. Amplificación del ADN por PCR .....	68
3.6.9. Secuenciación del ADN.....	68
3.7. MANIPULACIÓN DE <i>E. COLI</i> .....	69
3.7.1. Preparación de <i>E. coli</i> competentes .....	69
3.7.2. Transformación de <i>E. coli</i> .....	69
3.8. MANIPULACIÓN DE <i>A. TUMEFACIENS</i> .....	70
3.8.1. Preparación de células electrocompetentes.....	70
3.8.2. Transformación por electroporación.....	70
3.9. VECTORES VÍRICOS E INFECCIÓN.....	71
3.9.1. Construcción de los vectores víricos.....	71
3.9.2. Infección a través de biolística.....	73
3.9.3. Transformación con abrasivo.....	73
3.10. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>CUCURBITA PEPO</i> .....	74
3.10.1. Preparación semillas .....	74

3.10.2. Preparación de explantes de cotiledón para regeneración .	75
3.10.3. Regeneración in vitro .....	75
3.11. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE <i>C. PEPO</i> .....	76
3.11.1. Cepa bacteriana y vector binario utilizados .....	76
3.11.2. Preparación de la explantes de cotiledón .....	78
3.11.3. Transformación de explantes cotiledonarios, cocultivo con <i>Agrobacterium</i> y regeneración en medio selectivo .....	78
3.12. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES MARCADORES .....	79
3.12.1. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	79
3.12.2. Evaluación de GFP .....	79
3.13. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS .....	80
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>83</b>
I.1. INTRODUCCIÓN .....	85
I.2. RESULTADOS.....	87
I.2.1. Correlación entre la tolerancia al frío y la producción de ABA en el fruto de calabacín.....	87
I.2.2. Diferencias entre variedades en la expresión de genes relacionados con ABA durante el almacenamiento en frío .....	90
I.2.3. Inducción de la sensibilidad y tolerancia al frío mediante tratamientos con TS y ABA exógenos, respectivamente. ....	94
I.3. DISCUSIÓN .....	98
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>105</b>
II.1. INTRODUCCIÓN .....	107

II.2. RESULTADOS .....	109
II.2.1. Optimización de la concentración de SNP para el tratamiento postcosecha.....	109
II.2.2. Comprobación de la efectividad del nitroprusiato sódico .	110
II.2.3. Efecto del NO en la calidad del fruto .....	112
II.2.4. Efectos del NO sobre los metabolitos antioxidantes.....	115
II.2.5. Cambios en actividades enzimáticas antioxidantes.....	117
II.2.6. Determinación del perfil aminoacídico durante el almacenamiento en frío .....	119
II.2.7. Efecto del tratamiento con SNP en el contenido en poliaminas	119
II.3. DISCUSIÓN .....	123
<b>CAPÍTULO III</b> .....	129
III.1. INTRODUCCIÓN.....	131
III.2. RESULTADOS .....	132
III.2.1. Estudio de la expresión en fruto del gen MYB106-like ..	132
III.2.2. Estudio de la expresión del gen MYB106 en plantas de C. pepo	133
III.2.3. Estado de las plantas durante el almacenamiento en frío	135
III.2.4. Estudio in silico del gen MYB106-like de C. pepo .....	136
III.2.5. Análisis de similitud e identidad para la proteína MYB106-like de C. pepo.....	137
III.2.6. Características de la proteína MYB106-like.....	141
III.2.7. Estudio del interactoma de MYB106.....	142
III.3. DISCUSIÓN.....	143
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	147
IV.1. INTRODUCCIÓN .....	149
IV.2. RESULTADOS .....	150
IV.2.1. Construcción de los vectores víricos .....	150

IV.2.2. Infectividad, expresión y estabilidad de los vectores virales	151
IV.2.3. Efecto de los vectores víricos sobre la expresión del gen MYB106 en plantas de calabacín.....	153
IV.2.4. Fenotipo de las plantas infectadas .....	154
IV.2.5. Análisis de los síntomas provocados por el vector de sobreexpresión en el fruto de calabacín.....	158
IV.3. DISCUSIÓN .....	163
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>167</b>
V.1. INTRODUCCIÓN.....	169
V.2. RESULTADOS .....	171
V.2.1. Selección del tipo de explante para regeneración in vitro	171
V.2.2. Evaluación de la regeneración con distintos medios de crecimiento .....	173
V.2.3. Transformación de Agrobacterium con el plásmido binario pGFPGUSplus .....	179
V.2.4. Transformación de explantes de C. pepo .....	181
V.2.5. Regeneración de explantes transformados de C. pepo.....	188
V. 3. DISCUSIÓN.....	191
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>197</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>211</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>215</b>

# 1

INTRODUCCIÓN

GENERAL

*GENERAL*

*INTRODUCTION*





## 1.1. EL CALABACÍN

### 1.1.1. Origen y taxonomía

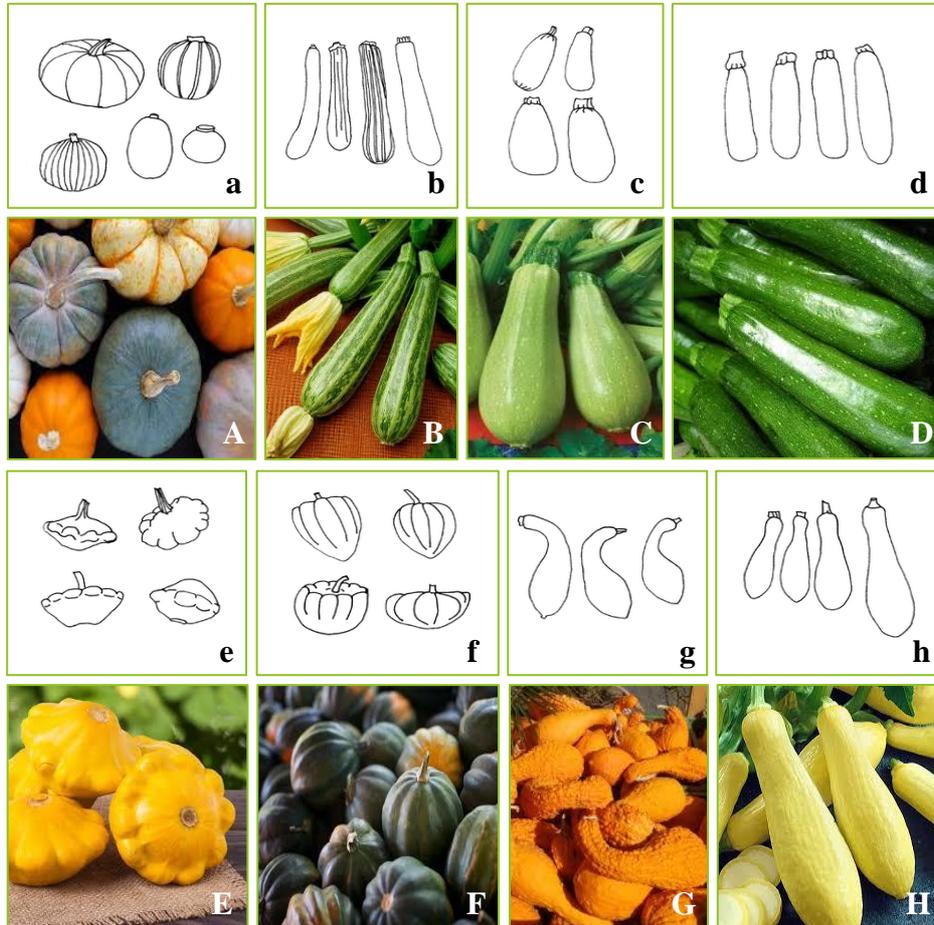
El calabacín (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo*) es una planta herbácea, anual que pertenece a la familia de las Cucurbitáceas. Esta familia, que comprende aproximadamente a 118 géneros y unas 825 especies (Jeffrey, 1990), se caracteriza por ser una de las que mayor diversidad genética presenta y de mayor importancia desde el punto de vista del consumo humano (Robinson & Decker-Walters, 1997).

El género *Cucurbita*, en el que se incluye el calabacín, es uno de los más diversos dentro de la familia *Cucurbitaceae*. Este género está compuesto por 22 especies silvestres y 5 cultivadas, *C. pepo*, *C. máxima*, *C. moschata*, *C. ficifolia* y *C. argyrosperma* (Decker, 1988). Siendo las tres primeras las más ampliamente distribuidas y las más importantes económicamente, destacando *C. pepo* (Paris et al., 2012; Paris & Maynard, 2008).

La mayoría de los estudios sitúan el origen de *Cucurbita pepo* L. en el noreste y sureste de México, y en el este de los Estados Unidos (Nee, 1990; Paris et al., 2012). La domesticación geográficamente alejada se considera como la última fuente de variación de la especie, dando origen a las subespecies *C. pepo* subsp. *pepo* L., *C. pepo* subsp. *ovifera* L. Decker y *C. pepo* subsp. *fraterna* (Bailey) Lira, Andrés y Nee. La clasificación en estas tres subespecies se basó en características morfológicas del fruto y en estudios de polimorfismos de la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) (Gong et al., 2012; Paris et al., 2003). A las subespecies *pepo* y *ovifera* pertenecen las variedades comerciales. En cambio, *C. pepo* subsp. *fraterna* solo incluye especies silvestres.

Existen 8 morfotipos o variedades botánicas cultivables de *C. pepo* (Fig. 1.1) (Paris et al., 2003, 2012) . Dentro de *C. pepo* subsp. *pepo* se incluyen las variedades Pumpkin, Cocozelle, Vegetable Marrow y Zucchini,

mientras que Scallop, Acorn, Crookneck y Straightneck se encuentran dentro de *C. pepo* subsp. *ovifera*.

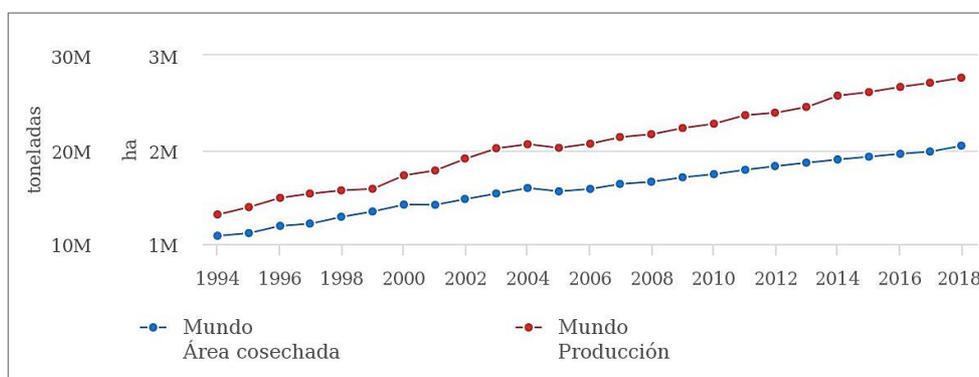


**Figura 1. 1.** Representación esquemática e imágenes de los 8 morfotipos de *C. pepo*. En la primera (a-d) y segunda fila (A-D) aparecen los morfotipos pertenecientes a *C. pepo* subsp. *pepo* y la tercera (e-h) y cuarta fila (E-H) corresponde a *C. pepo* subsp. *ovifera*. aA. Pumpkin, bB. Cocozelle, cC. Vegetable Marrow, dD. Zucchini, eE. Scallop, fF. Acorn, gG. Crookneck, hH. Straightneck. Fuente: Paris et al., (2012)

### 1.1.2. Cultivo del calabacín y su importancia económica

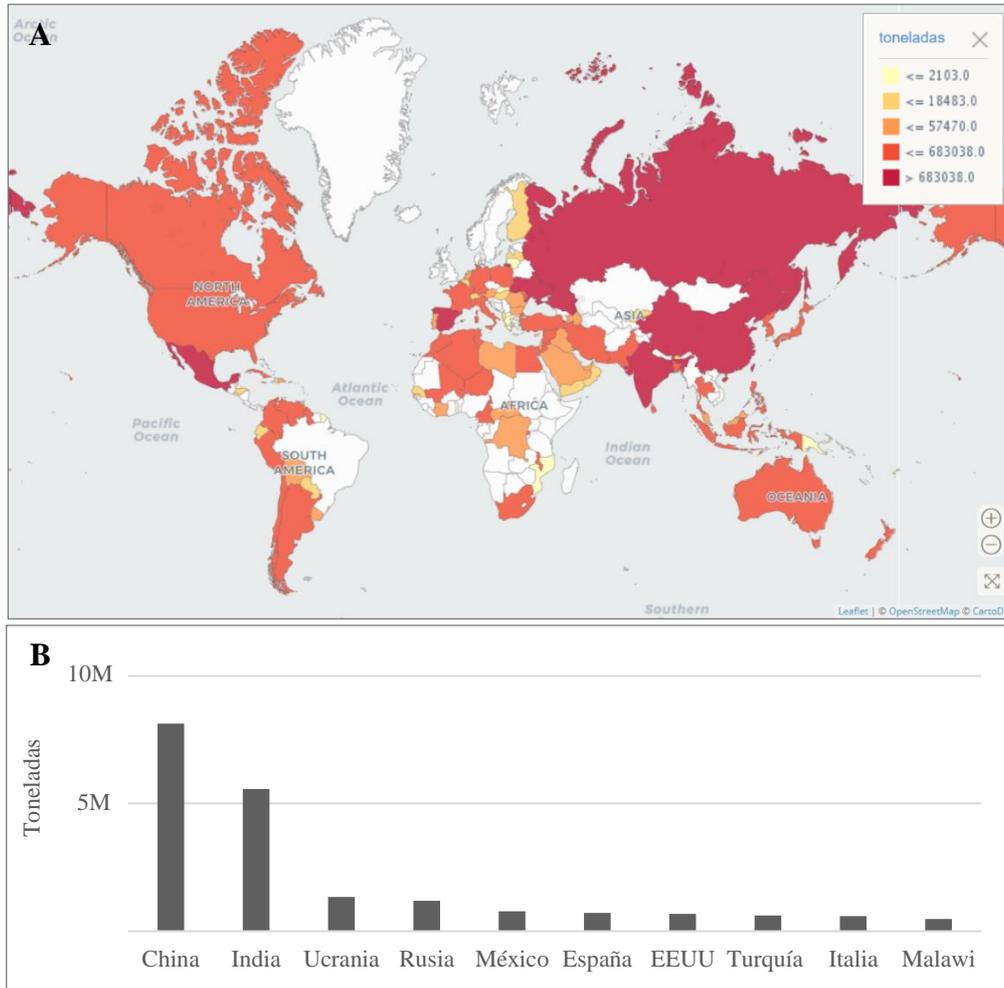
#### 1.1.2.1. Situación a nivel mundial

Durante el año 2018, la producción mundial de calabacín y calabaza alcanzó casi los 25 millones de toneladas según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2019). En las últimas décadas este cultivo ha experimentado una creciente importancia, tanto en su producción como en las áreas dedicadas al mismo (Fig. 1. 2).



**Figura 1. 2.** Evolución del área cosechada y la producción mundial de calabacín y calabaza desde 1994. Fuente: Departamento de estadística de la FAO (FAOSTAT, 2020).

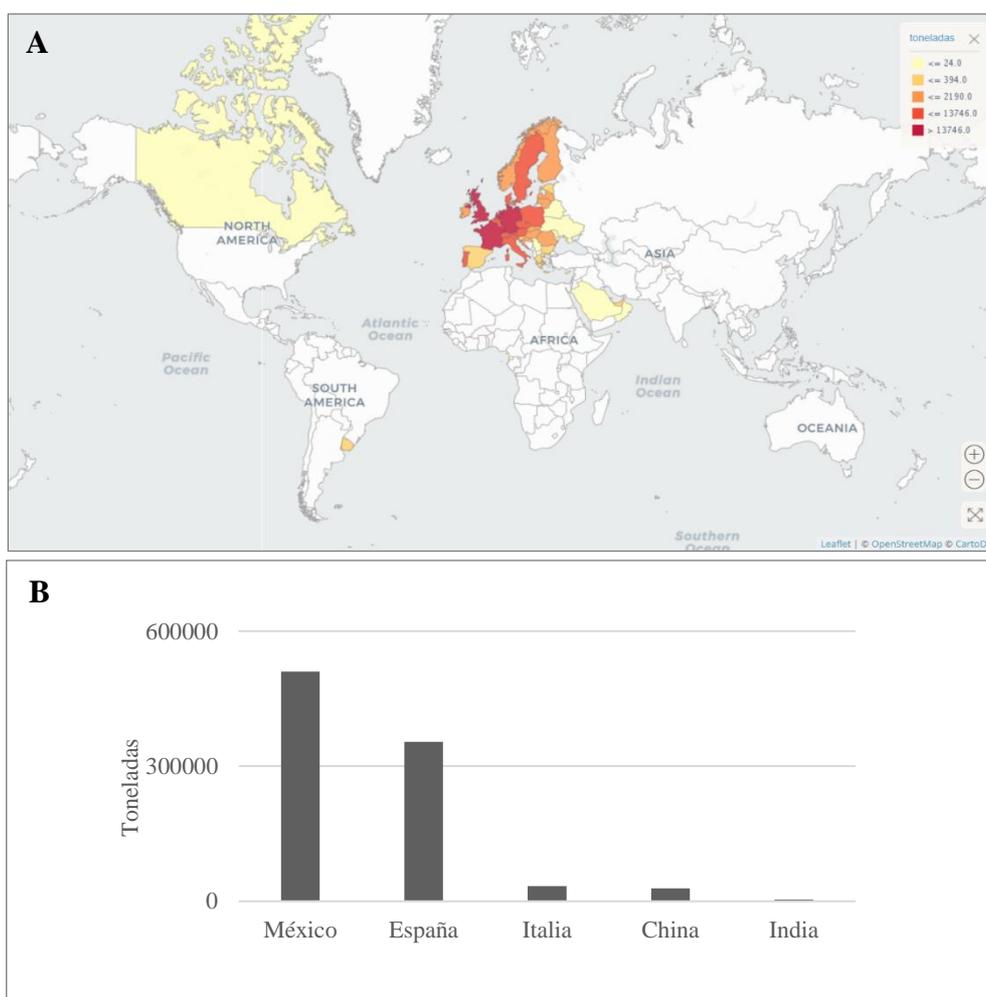
El cultivo de estas especies está extendido a nivel mundial (Fig. 1. 3A). La FAO durante 2018 destaca a China como máximo productor con 8,133,734 t, por delante de India que alcanzó los 5,669,809 t. Dentro de este ranking, España ocupa el sexto lugar con 717,645 t (el 90 % calabacín), por delante de países como Italia o los Estados Unidos de América (EEUU). En Europa, Ucrania ocupa el primer puesto, el único país que superó a España en producción durante el 2018 (Fig. 1. 3B).



**Figura 1. 3.** Principales países productores de calabacín y calabaza. **A.** Mapa FAO, **B.** Los diez países con mayor producción. Fuente: FAOSTAT, 2020

Al igual que la producción y el área cosechada de calabacín, la comercialización también ha aumentado. España es el primer exportador de calabacín y calabazas a nivel europeo, y el segundo a nivel mundial, solo por detrás de México (Fig. 1. 4B). Estos dos países llegaron a exportar un 50 % y 70 % respectivamente del total de su producción durante el 2017. En 2019, según *FEPEX - Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas...* (2020) se llegó a exportar el 70 % de la producción española. España exporta principalmente dentro de Europa, las

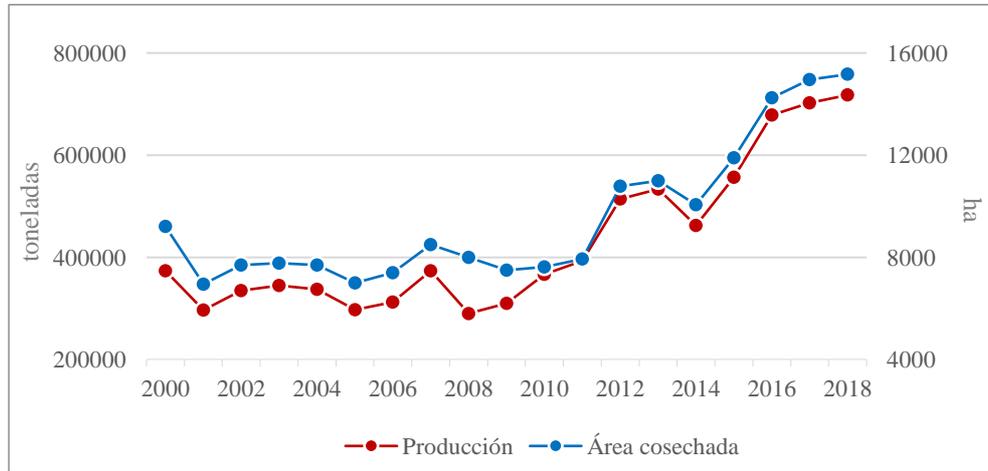
exportaciones fuera de esta zona son muy reducidas (Fig. 1. 4A). Los países que más calabacín importan desde España son Francia, Alemania, Países Bajos y Reino Unido. En el caso de México, casi el 70 % de la producción total en 2017 fue importado por los EEUU. En todos los casos el transporte del producto desde su origen hasta estos países se realiza mediante transporte refrigerado a una temperatura de entre 4 y 7 °C. De ello nace la necesidad de mantener la calidad y prolongar la vida comercial de los frutos para evitar las pérdidas económicas derivadas del transporte y comercialización.



**Figura 1. 4. A.** Países importadores de la producción de calabacín de origen español durante 2017. **B.** Principales países exportadores de calabacín y calabaza en el mundo durante 2017. Fuente: FAOSTAT, 2020.

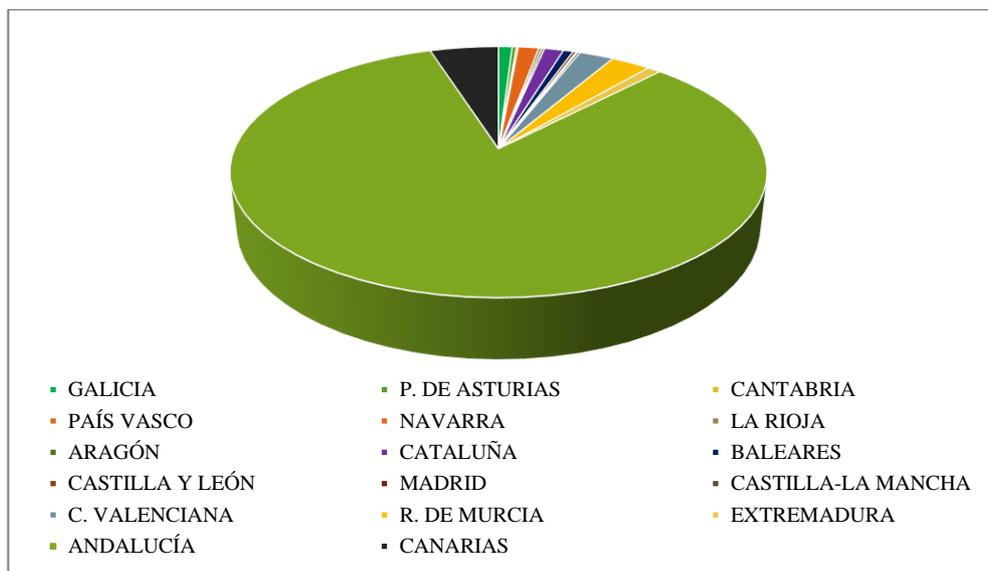
### 1.1.2.2. Situación a nivel español

En España la producción y área cosechada de calabacín han aumentado progresivamente durante los últimos 20 años, llegando a alcanzar máximos históricos en el 2018 (Fig. 1. 5) (FAO).



**Figura 1. 5.** Evolución del área cosechada y la producción de calabacín en España desde el año 2000. Fuente: FAOSTAT, 2020.

En cuanto a su producción por comunidades autónomas, destaca Andalucía con casi el 83 % de la producción en 2018, seguida de las Islas Canarias y Murcia que alcanzan un 5 % y 3 % respectivamente (Fig. 1. 6). Dentro de Andalucía, Almería es la provincia líder con el 92 % de la producción de calabacín.



**Figura 1. 6.** Producción en las distintas comunidades autónomas durante el 2018. (MAPA, 2020)

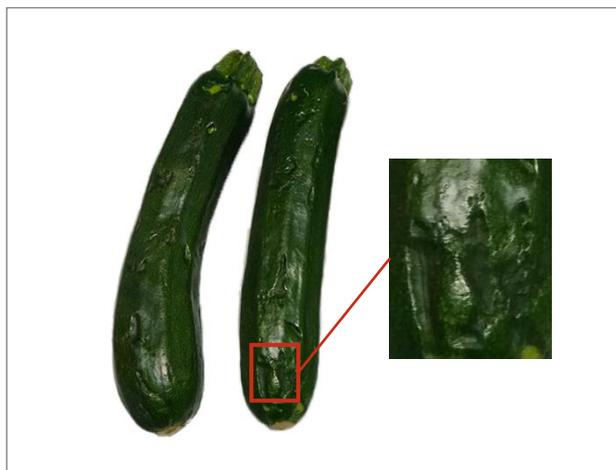
## 1.2. DAÑOS POR FRÍO

Los frutos y vegetales son productos muy perecederos, por lo que su almacenamiento en condiciones de baja temperatura es una tecnología utilizada de forma generalizada para evitar su rápida descomposición y pérdida de calidad. Este tipo de almacenamiento ralentiza los procesos metabólicos responsables del deterioro del producto. Sin embargo, los frutos subtropicales y tropicales, incluido el calabacín, son sensibles al frío pudiendo desarrollar lo que se conoce como daños por frío (DF) cuando se conservan a bajas temperaturas, lo que ocurre durante su transporte y almacenamiento. La vida útil de los frutos está condicionada tanto por su fisiología particular como por la etapa de desarrollo en la que se cosechan (Toivonen, 2016). El calabacín es un fruto no climatérico que se cosecha en estado inmaduro, lo que lo hace que sea aún más propenso a sufrir estos daños, que se acompañan con pérdida de peso y ablandamiento (Carvajal et al., 2011; Martínez-Téllez

et al., 2002). Al cosecharse en una fase previa a la madurez, la epidermis de este fruto aún no está completamente desarrollada y los compuestos de almacenamiento no se han acumulado en su totalidad. Además, están en una fase de desarrollo en la cual el metabolismo, y por lo tanto la tasa de respiración y transpiración, es muy alto (Valenzuela et al., 2017).

Los DF son desórdenes que involucran diversos eventos fisiológicos, así como síntomas característicos y reconocibles de los frutos que aparecen cuando son expuestos a bajas temperaturas, aunque por encima del punto de congelación (Lyons, 1973). El tipo y la extensión de estos daños puede variar según la especie, la variedad, las condiciones de almacenamiento en frío (temperatura y tiempo de exposición), y otros factores como el estado de maduración e incluso variables previas a la cosecha (Ferguson et al., 1999).

Una de las alteraciones más importantes asociadas con los DF es la que afecta a la apariencia externa del fruto e incluye daños en el exocarpo, incluyendo picaduras, grandes áreas hundidas, decoloración y lesiones profundas que pueden llegar a los tejidos subepidérmicos (Fig. 1. 7). Estas alteraciones se deben a daños a nivel de los lípidos de membrana, lo que resulta en una alteración de las mismas, lo que da lugar a una fuga de electrolitos y, por tanto, el inicio del deterioro (S. Sharma et al., 2020) (Fig. 1. 8). En el caso del calabacín, los síntomas de DF más comunes incluyen pérdida de peso, firmeza y daños apreciables en la superficie del fruto, como los hundimientos y picado de la superficie. Todos estos cambios macroscópicos se usan para evaluar la gravedad de los DF (Carvajal et al., 2011; Fernández-Trujillo & Martínez, 2006; Martínez-Téllez et al., 2002; Megías et al., 2014, 2015). El análisis microscópico de este picado ha demostrado que las depresiones de la superficie son causadas por la muerte y el colapso celular en el exocarpo, asociado con la solubilización de las pectinas y la degradación de la pared celular (Carvajal et al., 2015).



**Figura 1. 7.** Daños por frío en frutos de calabacín tras 14 días de almacenamiento a 4 °C. Zona ampliada con hundimientos y pundeaduras en la superficie.

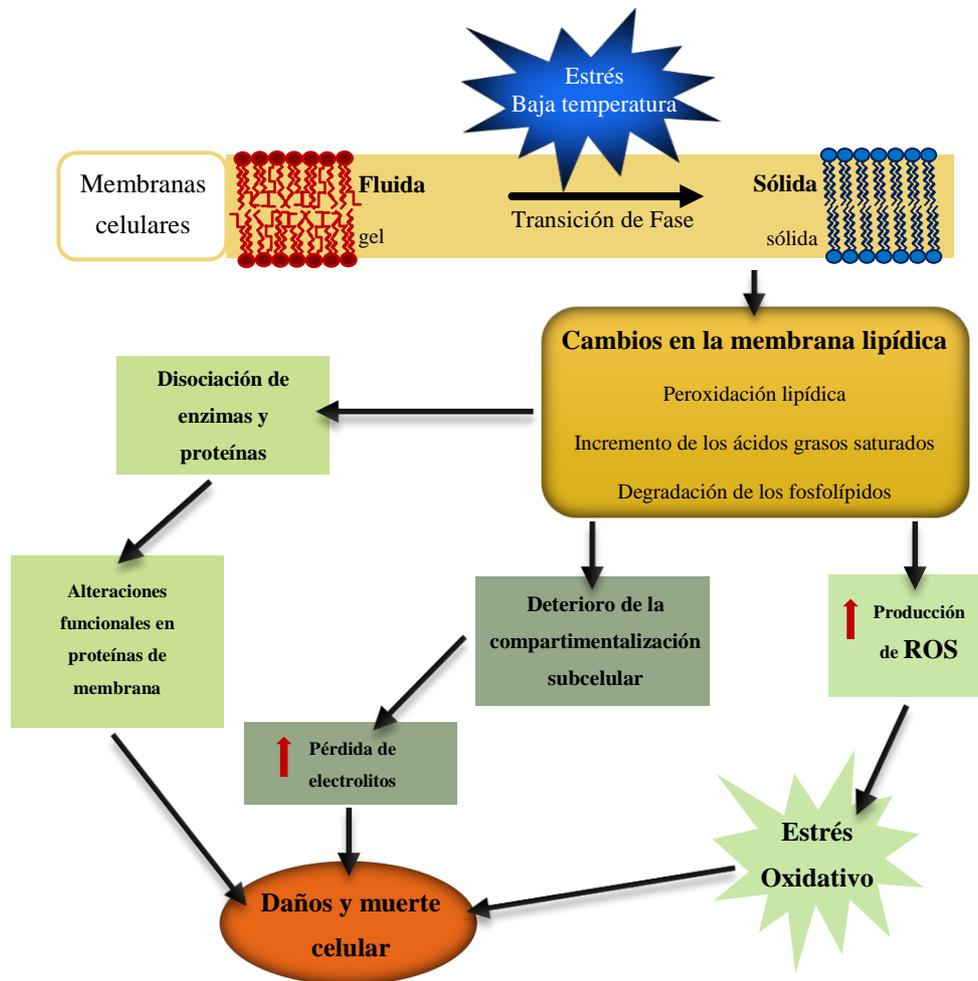
Para que los DF se desarrollen, tienen que producirse numerosas alteraciones fisiológicas y bioquímicas que afectan a todo el metabolismo celular. Estas incluyen modificaciones en la conformación y estructura de la membrana celular, inducción de estrés oxidativo, y cambios en los niveles de fitohormonas, reguladores del crecimiento y metabolitos relacionados con la respuesta al estrés (Carvajal et al., 2011, 2015).

### ***1.2.1. Alteraciones en la conformación y estructura de la membrana celular***

El almacenamiento a baja temperatura provoca alteraciones en la conformación y la estructura de la membrana que afectan a su permeabilidad, considerándose estas alteraciones como una respuesta fisiológica a nivel molecular de los DF (Lyons, 1973; Sevillano et al., 2009). Entre las modificaciones en la composición lipídica de las membranas destaca la

peroxidación lipídica, el aumento del índice de saturación de ácidos grasos, la degradación de fosfolípidos y el aumento de la relación esteroles / fosfolípido (Campos et al., 2003; Carvajal et al., 2011; Matsuo et al., 1992; Whitaker, 1995). Todos estos cambios en la composición lipídica de la membrana causan una disminución en la fluidez que finalmente se traduce en una disminución en la funcionalidad de la misma. El grado de saturación de los lípidos de la membrana es uno de los parámetros más significativos en la evaluación de la funcionalidad de las membranas biológicas y, por lo tanto, en la supervivencia de los organismos a bajas temperaturas.

Se ha observado que los organismos se adaptan a las bajas temperaturas aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados, que hace que se incremente la fluidez de las membranas. Sin embargo, si no se produce esta adaptación, a las bajas temperaturas, puede darse un cambio de fase en los lípidos de la membrana, de gel a un estado de sólido (Madani et al., 2019). Al aumentar los ácidos grasos saturados frente a los ácidos grasos insaturados, se dificulta la fluidez y produce la rotura y la mezcla de enzimas y sustratos, lo que provoca la pérdida de compuestos fenólicos, el desarrollo de un sabor desagradable y un sistema de defensa celular debilitado. Además, el aumento de la fuga de electrolitos y las actividades enzimáticas conduce a la pérdida de firmeza y aumenta la susceptibilidad al ataque de patógenos secundarios (Sevillano et al., 2009), lo que puede ocasionar finalmente la muerte de las células (Lyons, 1973) (Fig. 1. 8).



**Figura 1. 8.** Representación simplificada de las respuestas de los frutos recién cosechados al estrés por frío durante el almacenamiento a baja temperatura. Modificado de (S. Sharma et al., 2020).

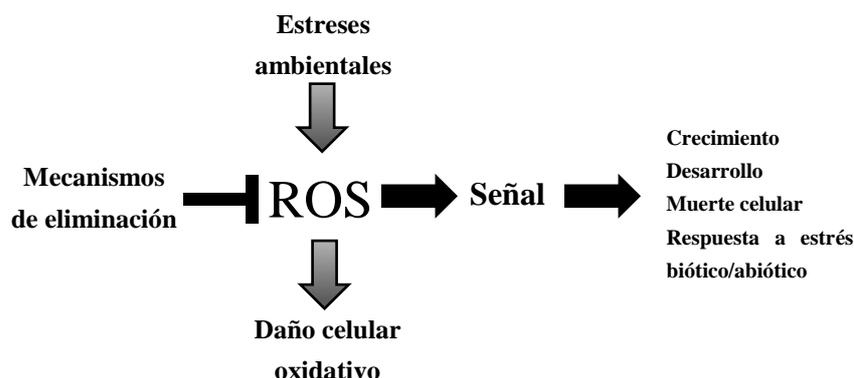
### ***1.2.2. Estrés oxidativo: respuesta secundaria a los daños por frío***

Además del efecto directo de las bajas temperaturas en la organización molecular de los lípidos de la membrana, la pérdida de su integridad en sí se ve reforzada por los procesos oxidativos, ya que el estrés por frío aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los cambios ambientales y físicos que sufre el fruto antes y después de la cosecha inducen la producción de ROS, que son la causa del daño oxidativo durante la postcosecha, induciendo la pérdida de calidad y la reducción de la vida útil de los frutos (Valenzuela et al., 2017).

El estrés oxidativo ocurre cuando se perturba la homeostasis celular y hay un aumento desproporcionado en la producción de ROS (Fig. 1. 9) (Mittler, 2002; Vanderauwera et al., 2009). Las ROS (p. ej.  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $^1O_2$ ) son formas parcialmente reducidas o activadas de oxígeno atmosférico. Las ROS se producen en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas bajo condiciones fisiológicas normales, y se incrementan cuando la planta está expuesta a unas condiciones desfavorables (Gill & Tuteja, 2010). Por tanto, el incremento de ROS se asocia a numerosos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Foyer & Noctor, 2005). El aumento anormal del contenido de ROS proviene principalmente de los cambios en el proceso de fotorrespiración, fotosíntesis y respiración mitocondrial. Si este drástico aumento en la concentración de ROS debido al estrés oxidativo no se contrarresta con su detoxificación, se produce la destrucción oxidativa de las células por la inducción de procesos como la desintegración de la membrana celular a través de la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas, la inhibición de la actividad enzimática y, finalmente, el daño que se produce en el ADN y el ARN (Ácido ribonucleico) (Mittler, 2002; Sevillano et al., 2009).

Es importante tener en cuenta que las ROS pueden actuar además de como factores dañinos, como protectores o como moléculas de señalización dependiendo del equilibrio que se establezca entre la producción de ROS y su

eliminación o detoxificación en el sitio y el momento adecuados. Por lo tanto, es muy importante disponer de estrategias para evitar un aumento descontrolado de las ROS y de esta forma, evitar o tolerar el estrés oxidativo, generando una respuesta que incluye cambios a nivel bioquímico y molecular (Choudhury et al., 2017). La defensa ante las ROS incluye la inducción de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.



**Figura 1. 9.** Las condiciones ambientales desfavorables resultan en una producción excesiva de ROS que conduce a lesiones celulares oxidativas a altas concentraciones. Para prevenir el daño celular dependiente de ROS, las plantas tienen una amplia gama de mecanismos antioxidantes a su disposición para usar ROS simultáneamente como señal dentro de varios procesos biológicos, como el crecimiento y el desarrollo, respuestas de defensa a estímulos bióticos y abióticos y muerte celular programada. (Vanderauwera et al., 2009)

### 1.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

#### 1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos en plantas están compuestos por un grupo de enzimas como son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), diferentes peroxidasas y enzimas del ciclo ascorbato-glutati6n (AsA-GSH) (Mittler et al., 2004).

**Tabla 1. 1.** Enzimas antioxidantes destacadas (Gill & Tuteja, 2010)

<b>Antioxidantes enzimáticos</b>	<b>código</b>	<b>Reacción catalizada</b>
Superóxido dismutasa (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalasa (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$
Ascorbato peroxidasa (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Mono-dehidroascorbato reductasa (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AsA + NAD(P)^+$
Dehidroascorbato reductasa (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AsA + GSSG$
Glutatión reductasa (GR)	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

Las **superóxido dismutasas** (SOD) son las principales enzimas antioxidantes presentes en las células procariotas y eucariotas; actúan como la primera defensa frente al anión superóxido, producido en los diferentes compartimentos celulares, catalizando su dismutación formando peróxido de hidrógeno y oxígeno. Son las únicas enzimas encargadas de la detoxificación del  $O_2^{\bullet-}$  (P. Sharma et al., 2012). Las SOD son una clase de metaloenzimas que se clasifican en tres tipos diferentes dependiendo del metal localizado en su centro activo: cobre y zinc (Cu/Zn-SOD, localizadas en cloroplastos, peroxisomas y citosol), hierro (Fe-SOD, cloroplastos) y manganeso (Mn-SOD, mitocondrias y peroxisomas).

La sobreexpresión de las SOD y el aumento de su actividad están relacionados con la defensa de las plantas frente al daño oxidativo causado por el estrés biótico o abiótico y tiene un papel fundamental en la supervivencia de las plantas en estas condiciones (Gill & Tuteja, 2010). La

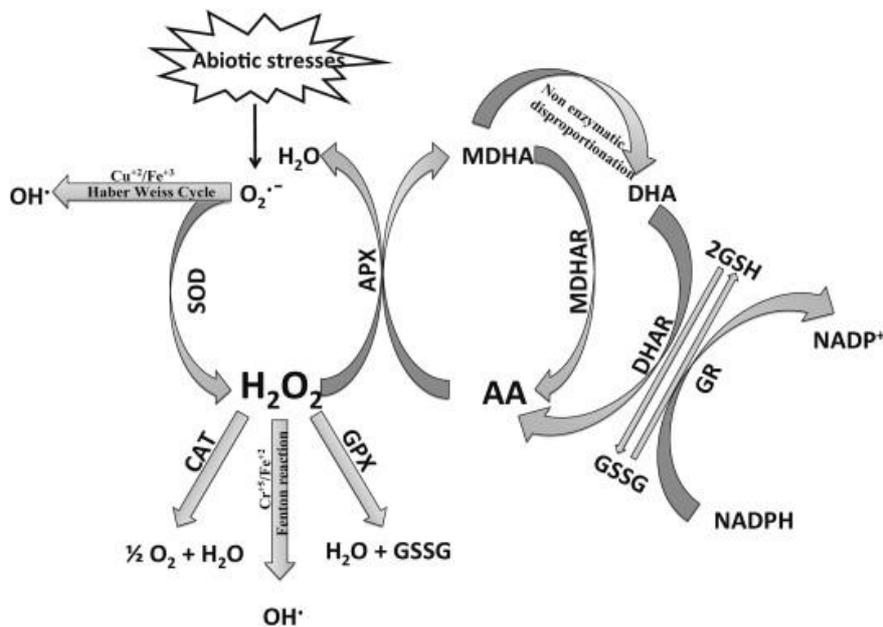
mayor actividad de esta enzima está generalmente correlacionada con una mayor tolerancia de la planta frente a estreses ambientales (Gupta et al., 1993; P. Sharma et al., 2012). En plantas de pimiento, que muestran sensibilidad al estrés por frío, se observaron incrementos en la actividad SOD en aquellas variedades más tolerantes (Lim et al., 2009). J. Zheng et al. (2020) describieron un aumento en la actividad SOD en aquellas variedades de trigo resistentes al frío.

La **catalasa** (CAT) es una hemoproteína tetramérica indispensable en la detoxificación de ROS en condiciones de estrés (Garg & Manchanda, 2009). Esta enzima es la encargada de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante dismutación en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>, que se genera en peroxisomas por oxidasas involucradas en la β-oxidación de ácidos grasos, fotorrespiración y catabolismo de purinas. Las diferentes isoenzimas CAT se han estudiado ampliamente en las plantas superiores, encontrándose en distintos orgánulos con diferente expresión.

La CAT parece ser una de las primeras y principales enzimas del sistema antioxidante de la planta activada como respuesta al estrés oxidativo causado por los DF (Sevillano et al., 2009). Diferentes hallazgos parecen confirmar esta hipótesis. En el cultivo de tomate Micro -Tom, esta actividad enzimática mostró un aumento importante en las frutas almacenadas durante 4 semanas a 4 °C y luego reacondicionadas a temperatura ambiente (Malacrida et al., 2006). En el estudio desarrollado por Sala (1998) sobre almacenamiento a baja temperatura de distintas variedades de mandarinas tolerantes y sensibles a los DF, se observó un aumento similar en la actividad de SOD en ambos grupos, pero las variedades tolerantes mostraron mayor actividad CAT. Carvajal et al. (2011) estudiaron distintas variedades de calabacín almacenadas en frío, se observó una mayor actividad CAT en aquellas variedades más tolerantes a los DF.

El ciclo **ascorbato-glutatió**n o de **Foyer-Halliwell-Asada** es una vía metabólica que actúa como un mecanismo antioxidante en plantas, presente

en el citosol, peroxisomas, mitocondria y plastos (Foyer et al., 1997; Halliwell & Foyer, 1976). Forman parte de este ciclo las enzimas **ascorbato peroxidasa** (APX), **monodehidroascorbato peroxidasa** (MDHAR), **dehidroascorbato peroxidasa** (DHAR), y **glutación reductasa** (GR) (Fig. 1. 10). También es necesario para el funcionamiento del ciclo la presencia de NAD(P)H, una coenzima que participa en reacciones de óxido reducción. El ciclo comienza con la acción de la enzima APX que reduce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua mediante el uso del ascorbato (AsA) formando monodehidroascorbato (MDHA). Este es reducido a AsA por la enzima MDAR consumiendo NAD(P)H. El MDHA generado puede dar lugar de forma espontánea AsA y dehidroascorbato (DHA). El DHA es reducido por la enzima DHAR utilizando glutación (GSH) y NAD(P)H. El glutación oxidado (GSSG) es regenerado por la enzima GR que también requiere NAD(P)H.



**Figura 1. 10.** Ciclo ascorbato-glutación. APX: Enzima ascorbato peroxidasa, MDHAR: monodehidroascorbato peroxidasa, DHAR: dehidroascorbato peroxidasa, GR: glutación reductasa, AA: ascorbato, DHA: dehidroascorbato, MDHA: monodehidroascorbato, GSH: glutación, GSSG: glutación oxidado, SOD: superóxido dismutasa. (Gill & Tuteja, 2010)

Sato et al. (2001) mostraron que la inducción de la actividad APX por medio de un tratamiento térmico es un elemento clave en la protección del arroz frente a una exposición posterior a bajas temperaturas. En un trabajo posterior Sato et al. (2011) comprobaron que la sobreexpresión de genes codificantes de APX producían una mejora en la tolerancia al estrés por frío. El aumento de la actividad y expresión de APX está ampliamente descrita en numerosos tratamientos inductores de la tolerancia al frío tanto en frutos como en vegetales (Carvajal et al., 2014; Rabiei et al., 2019; B. Wu et al., 2014; H. Yang et al., 2011; Yao et al., 2018).

La GR juega un papel importante en la desintoxicación de ROS, interviene en la regeneración de GSH y confiere tolerancia al estrés abiótico en las plantas (Hasanuzzaman et al., 2010, 2012). La mayor participación de GR en la mejora de la tolerancia al estrés se debe al reciclaje de GSH y el mantenimiento de la relación GSH / GSSG en la célula vegetal.

Se ha revisado el papel de la GR en la señalización durante el estrés y la aclimatación al frío (Hossain et al., 2018; Kocsy, Galiba, et al., 2001). La actividad GR es significativamente mayor en las plantas que muestran tolerancia a las bajas temperaturas. Así, se ha demostrado una correlación positiva entre la tolerancia a bajas temperaturas y el incremento en actividad GR en plantas como *Cucumis sativus* (W. H. Hu et al., 2008; P.-L. Xu et al., 2008) y *Cucumis melo* (Fogelman et al., 2011). Genotipos tolerantes al frío en arroz (Huang & Guo, 2005), mostraron una actividad GR mayor que la de los genotipos sensibles. Además, el aumento en el contenido de GSH y la actividad de GR en genotipos de maíz sensibles al frío indujeron una disminución de los DF (Kocsy, Ballmoos, et al., 2001).

### ***1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos***

El **ascorbato** (AsA) o vitamina C es el antioxidante más abundante en células vegetales, con un papel clave en la defensa frente al estrés oxidativo

causado por un aumento en los niveles de ROS que se generan durante estreses bióticos y abióticos (Foyer & Noctor, 2011; Qian et al., 2014; Smirnoff, 2000). AsA posee un papel vital en la percepción de estos estreses, la homeostasis redox y la posterior regulación de los mismos (Akram et al., 2017). El AsA proporciona una protección directa de la membrana plasmática al reaccionar con  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y regenerar el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) a partir del radical tocoferoxilo (vitamina E oxidada) (Noctor & Foyer, 1998). Además, tiene un papel clave en la eliminación de  $H_2O_2$  a través del ciclo AsA-GSH (Hasanuzzaman et al., 2019).

El tripéptido **glutati6n** ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinylglycine) es uno de los metabolitos cruciales en las plantas siendo considerado como la defensa intracelular m1s importante, junto con el AsA, frente al da1o oxidativo inducido por ROS (Gill et al., 2013). Se produce abundantemente en forma reducida (GSH) y se localiza en todas las c6lulas y compartimentos celulares, al igual que el AsA (Foyer & Noctor, 2003; Smirnoff, 2000). El equilibrio entre el GSH y GSSG es la clave para el mantenimiento del estado redox celular (P. Sharma et al., 2012). Debido a su poder reductor, el GSH juega un papel importante en diversos procesos biol6gicos, incluyendo el crecimiento/divisi6n celular, transducci6n de se1ales, regulaci6n enzim1tica, desintoxicaci6n de xenobi6ticos, y la expresi6n de los genes sensibles al estr6s (Foyer et al., 1997).

El GSH funciona como antioxidante mediante distintas v1as. Puede reaccionar qu1micamente con  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y, por lo tanto, puede funcionar directamente eliminando radicales libres (Foyer, 2019). Tambi6n puede participar en la regeneraci6n de otro potencial antioxidante, AsA, a trav6s del ciclo AsA-GSH. El GSH recicla AsA de la forma oxidada a reducida por la enzima DHAR (Gill & Tuteja, 2010).

Los **compuestos fen6licos** son metabolitos secundarios muy diversos (flavonoides, taninos, ligninas, etc) que poseen propiedades antioxidantes. Se encuentran abundantemente en la mayor1a de los tejidos vegetales (de la Rosa

et al., 2019). Representan el segundo grupo más abundante de compuestos orgánicos en el reino vegetal (justo detrás de la celulosa) y realizan diferentes actividades en la planta, tales como soporte estructural y protección contra la radiación solar ultravioleta, respuesta al estrés biótico o abiótico, etc. Se ha demostrado que superan a los antioxidantes conocidos, AsA y  $\alpha$ -tocoferol, en ensayos in vitro de actividad antioxidante debido a su gran capacidad para donar electrones o átomos de hidrógeno. Los polifenoles pueden quelar los iones metálicos de transición, pueden eliminar directamente ROS y pueden inhibir la peroxidación lipídica atrapando el radical alcoxi lipídico (Arora et al., 2000). Algunos tratamientos pre y postcosecha pueden inducir la síntesis de compuestos fenólicos y aumentar de esta forma la vida útil de los frutos, mediante la activación de su sistema de defensa antioxidante (de la Rosa et al., 2019).

#### **1.4. TRATAMIENTOS POSTCOSECHA**

La investigación de la fisiología postcosecha tiene una gran importancia y repercusión económica; un incorrecto tratamiento de los frutos durante su almacenamiento puede provocar un gran declive de la calidad y la vida útil de los mismos, produciendo grandes pérdidas económicas. Se han desarrollado diferentes tecnologías postcosecha para evitar o retrasar el desarrollo de daños por frío en frutos durante su almacenamiento a baja temperatura, que es el método de almacenamiento más comúnmente empleado, debido a que ralentiza el metabolismo celular, paralizando procesos de maduración y senescencia (Sevillano et al., 2009).

Los daños causados por las bajas temperaturas durante la maduración y la senescencia de los productos hortícolas, los daños por frío, afectan negativamente la calidad de los mismos y, por tanto, a su comercialización; es por ello que se han desarrollado distintos tratamientos inductores de

tolerancia. La tendencia actual del mercado es evitar el uso de productos químicos sintéticos, al mismo tiempo que se fomenta el uso de tecnologías sostenibles de postcosecha basadas en tratamientos físicos (temperatura, humedad relativa y envasado en atmósfera modificada) y tratamientos químicos utilizando productos naturales y reguladores del crecimiento, no repercutiendo negativamente en la salud humana o en el medio ambiente.

Concretamente en calabacín se han evaluado diversos tratamientos para mejorar la postcosecha y disminuir los daños por frío, y se ha estudiado la fisiología del fruto durante el almacenamiento (Tabla 1. 2). Entre los tratamientos que han sido utilizados en otras especies que mejoran la tolerancia al estrés por frío, la aplicación de ácido abscísico (ABA) y óxido nítrico (NO) son objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

**Tabla 1.2.** Tratamientos postcosecha de tipo físico y químico en *Cucurbita pepo*

<b>Tratamiento postcosecha</b>	<b>Efecto</b>	
<b>Físico</b>	<b>Preacondicionamiento</b>	Disminución en los DF y pérdida de peso, reducción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA y contenido de ácido ascórbico, y actividad inducida de enzimas antioxidantes
	<b>Baños en agua caliente</b>	Disminución de los DF, daño en las membranas y en la pérdida de firmeza.
	<b>Atmósferas modificadas. CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub></b>	DF reducidos, niveles elevados de espermidina, espermina y fenoles totales, inducción de las actividades de oxidasa alternativa (SOD, APX y CAT)
	<b>Atmósfera controlada. Retractilado</b>	Producción reducida de etileno y de la expresión de genes relacionados, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y MDA reducidos
	<b>Cubierta de quitosano</b>	DF reducidos y conservación de la firmeza del fruto

**Tabla 1.2.** Tratamientos postcosecha de tipo físico y químico en *Cucurbita pepo*

	<b>Tratamiento postcosecha</b>	<b>Efecto</b>
<b>Químico</b>	<b>1-MCP</b>	Reducción de la pérdida de peso, respiración y etileno, reducción de expresión de genes de etileno
	<b>Citoquinina</b>	Deterioro y deshidratación más lentos, acumulación de compuestos fenólicos
	<b>Ácido <math>\gamma</math>-aminobutírico</b>	Reducción del índice de DF, pérdida de peso y muerte celular, así como una menor tasa de fuga de electrolitos. Mayor contenido en fumarato, malato, ATP y NADPH
	<b>Glicina betaína</b>	DF reducidos, redujo el nivel de ácidos grasos saturados y mejoró la acumulación de prolina y las actividades de APX, CAT y SOD y de expresiones genéticas relativas.
	<b>Poliaminas</b>	Inducción de actividades APX, CAT y GR, mayor contenido de ascorbato, FRAP, glucosa, fructosa y rafinosa.
	<b>Ácido abscísico</b>	<i>Resultados capítulo I</i>
	<b>Óxido nítrico</b>	<i>Resultados capítulo II</i>

#### ***1.4.1. Tratamientos con ácido abscísico***

En los últimos años se ha prestado especial atención al estudio de los tratamientos químicos con hormonas en la mejora de la calidad postcosecha, ya que junto a su implicación en los procesos de crecimiento y desarrollo, algunas fitohormonas juegan un papel esencial en la defensa frente al estrés (Verma et al., 2016).

El ABA es una hormona que participa en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de las plantas, tales como la maduración, embriogénesis, dormición y germinación de semillas. Además, esta hormona es muy importante en el control de las respuestas frente a estreses ambientales, tanto bióticos (ataque de patógenos y heridas provocadas por insectos) (Cao et al., 2011), como abióticos (sequía, alta salinidad y tolerancia a bajas temperaturas) (Mehrotra et al., 2014; Sah et al., 2016). El ABA actúa como mediador entre la percepción del estrés y la producción de la respuesta a través de la inducción de mecanismos de señalización que implican a otras hormonas vegetales.

En condiciones desfavorables, las plantas acumulan ABA, y esta fitohormona activa la expresión de numerosos genes relacionados con el estrés mediante la regulación de la expresión génica, la transducción de señales y la adquisición de mecanismos de tolerancia para soportar un entorno adverso. En frutos sensibles al frío, se observan diferentes respuestas al aplicar ABA dependiendo de la especie. En mandarinas, el contenido de ABA no se pudo correlacionar con la tolerancia a la aparición de DF (Lafuente et al., 1997). Por el contrario, el tratamiento con ABA en piña mejoró la respuesta de los frutos a la baja temperatura, ya que el fruto mantuvo su calidad durante el almacenamiento en frío (Qin Zhang et al., 2015).

Dada la implicación de esta hormona en la respuesta al estrés por frío en otras especies, surge la necesidad de profundizar en los mecanismos de

respuesta a este estrés en calabacín y ver su posible aplicación en la mejora de la calidad postcosecha.

#### ***1.4.2. Tratamiento con óxido nítrico***

El óxido nítrico (NO) juega un papel importante en el desarrollo vegetal, juega un papel regulador en la germinación de las semillas o en la reducción de la latencia en semillas (Bethke et al., 2006, 2007), se ha visto también relacionado con la regulación de la maduración y senescencia (Mishina et al., 2007), y con el movimiento estomático (Garcia-Mata & Lamattina, 2007). Además, el NO es una molécula de señalización vital que juega un papel crítico tanto en las respuestas frente al estrés abiótico como biótico (Shi et al., 2012), viéndose implicado en respuestas a sequía (Asgher et al., 2017; Garcia-Mata & Lamattina, 2002), o frente a infección por patógenos (Floryszak-Wieczorek et al., 2007). Tanto el estrés biótico como el abiótico alteran la producción de NO endógeno, y se ha visto que el NO aplicado de forma exógena mejora la tolerancia de las plantas frente a diversos estreses (Qiao & Fan, 2008; Wills et al., 2015).

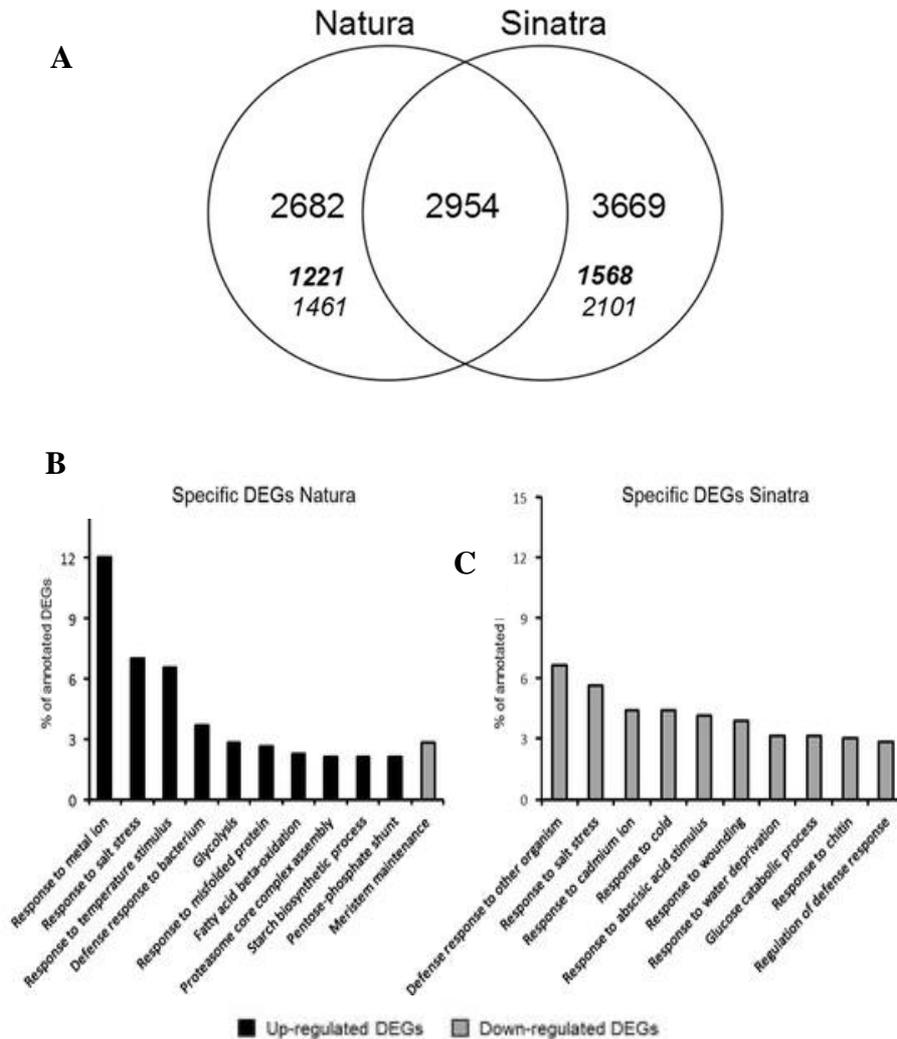
Muchos son los estudios que relacionan también al NO con la tolerancia al frío en frutos. La aplicación exógena de NO mediante fumigación con gas o inmersión en una solución de un compuesto donador de NO alivia algunos de los efectos del estrés por baja temperatura en un gran número de frutos (Ren et al., 2017; Wills et al., 2015; B. Wu et al., 2014; Z. Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2008). Con estos antecedentes creemos que es importante estudiar el papel del NO en la postcosecha de calabacín y su posible aplicación en la tolerancia al frío, evaluando su efecto en el comportamiento de los frutos durante la postcosecha.

## **1.5. ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS POR FRÍO EN *C. PEPO***

Los DF se desarrollan de manera desigual entre variedades de *Cucurbita pepo*. Carvajal et al., (2011) realizaron un estudio con variedades de *C. pepo* contrastantes en cuanto a su comportamiento postcosecha y su resistencia a la conservación a bajas temperaturas. De todas las variedades analizadas seleccionaron la variedad Natura como tolerante a la frigoconservación, y la variedad Sinatra que mostró una gran susceptibilidad al frío. A partir de estas dos variedades, numerosos estudios fisiológicos y genéticos se han llevado a cabo (Carvajal et al., 2011, 2014, 2015, 2017), los cuales se han completado con estudios transcriptómicos, mediante RNA-Seq, que han resultado en la detección de un conjunto de genes expresados diferencialmente en estas dos variedades contrastantes (Carvajal et al., 2018).

Los análisis de “Gen Ontology” (GO) mostraron que las respuestas sobre-representadas frente al estrés por frío en la variedad tolerante son la respuesta a estrés oxidativo y la respuesta a estímulos hormonales, mientras que en los frutos de la variedad sensible el término GO más representado fue el de la maduración del fruto.

También se identificaron mecanismos moleculares implicados en la tolerancia al frío, regulados de manera diferencial en las variedades tolerante y sensible. Estos mecanismos se relacionan principalmente con el metabolismo de carbohidratos, la transcripción, la transducción de señales, el metabolismo energético, así como mecanismos implicados en el transporte y degradación proteica (Carvajal et al., 2018) (Fig. 1. 11).



**Figura 1. 11.** A.-Diagrama de los genes diferencialmente expresados (DEG) en frutos Natura y Sinatra almacenados en frío (4 °C frente a 20 °C). Los números en negrita y cursiva representan los DEG específicamente regulados al alza debido al almacenamiento en frío en cada variedad. Los números en cursiva representan los DEG específicamente reprimidos debido al almacenamiento en frío en cada variedad. **B-C.-** Procesos biológicos más importantes (BP) en porcentaje DEG específicos de Natura (**A**), específicos de Sinatra (**B**), almacenados a 4 °C. (Carvajal et al. 2018)

En cuanto a los genes asociados con la tolerancia al frío en frutos de calabacín, se encontraron una serie de candidatos que poseían una mayor expresión en Natura, la variedad tolerante, entre los que destacan los que codifican para: la malato deshidrogenasa (esta enzima que participa en el metabolismo central y la homeostasis rédox entre compartimentos celulares), el factor de transcripción tipo MYB106 (relacionado con la diferenciación de células epidérmicas y el desarrollo de tricomas en pepino); y ZAT10, (regulador positivo en la tolerancia al estrés osmótico), entre otros (Tabla 1. 3).

Cabe destacar el enorme aumento en la expresión del factor de transcripción MYB106. A la vista de los datos contenidos en la Tabla 1. 3, se puede deducir que este factor de transcripción presenta importantes implicaciones en la mayor tolerancia al frío de Natura respecto a Sinatra, ya que, tras el almacenamiento en frío, el perfil de expresión aumentó notablemente en Natura, mientras que en Sinatra se mantuvo sin cambios.

Sin embargo, el papel de estos posibles reguladores de la tolerancia a frío en calabacín es aún desconocido. Por ello, es necesario estudiar en profundidad la función de estos genes en el mantenimiento de la calidad postcosecha de los frutos de calabacín.

**Tabla 1. 3.** Genes candidatos probablemente involucrados en la tolerancia al frío en el fruto de calabacín. Perfil de expresión en el fruto antes (recién cosechados, FH) y después de 14 días de almacenamiento a 20 °C y 4 °C se muestra en FPKM (Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)

ID	Description	Natura			Sinatra		
		FH	20°C	4°C	FH	20°C	4°C
<b>Carbohydrate and Energy Metabolism</b>							
<b>CUUC107944</b>	Malate dehydrogenase	15,18	8,09	24,28	10,44	13,40	8,09
<b>Peptide transport</b>							
<b>CUUC107903</b>	Peptide transporter PTR3-A-like	53,95	47,18	279,90	35,85	57,65	91,19
<b>CUUC89270</b>	Peptide transporter PTR2-like	9,65	5,05	32,93	8,81	7,48	16,57
<b>CUUC89268</b>	Peptide transporter PTR2-like	2,46	1,28	10,33	2,75	1,62	4,75
<b>Transcription</b>							
<b>CUUC97743</b>	Transcription factor MYB106	0,37	0,16	61,85	0,00	0,04	0,00
<b>CUUC105134</b>	DELLA protein GAIP	11,12	9,99	36,80	13,29	10,46	20,50
<b>CUUC104934</b>	AP2 ERF domain-containing TF	13,54	8,61	144,59	20,40	171,93	55,08
<b>CUUC92773</b>	C-repeat binding factor (CBF)	14,79	14,92	15,58	17,02	329,14	2,41
<b>CUUC61049</b>	Zinc finger protein ZAT10-like	396,63	148,71	1436,86	501,20	1727,79	509,51

## 1.6. IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA MEJORA VEGETAL

La producción de alimentos en cantidad y calidad suficiente para la creciente población mundial es un importante reto para este siglo. La inseguridad alimentaria y la falta de acceso a los alimentos amenaza la salud de millones de personas en todo el mundo. Además, la población mundial está creciendo rápidamente y se espera que alcance los 8,3 mil millones para 2030 (*United Nations Population Division / Department of Economic and Social Affairs*, 2020). El aumento de la población, se ha unido a nuevas amenazas, como son el aumento del estrés abiótico debido al cambio climático, la disminución de la tierra disponible y adecuada para el cultivo debido a la salinización, la desertificación y el uso humano, además de nuevas enfermedades (Sedeek et al., 2019). Para evitar la falta de alimentos en un futuro próximo, se debe duplicar la tasa actual de producción de cultivos (Godfray et al., 2010).

Aunque la oferta de productos hortícolas está aumentando, la presión de crecimiento y cultivo hace que la biodiversidad y el valor nutricional de estos, estén disminuyendo (Khoury et al., 2014). Estas disminuciones pueden atribuirse parcialmente a una menor diversidad genética de los cultivos hortícolas como resultado de la domesticación, así como a las barreras

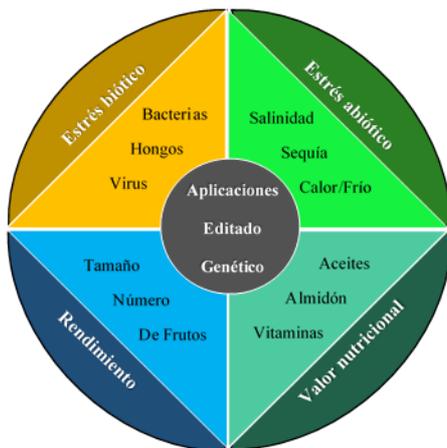


Fig. 1. 12. Aplicación y objetivos de la edición del genoma en la mejora vegetal.

reproductivas que surgen con las variedades silvestres. Por lo tanto, la generación de recursos genéticos con características diversas y deseables será el objetivo de la mejora de los productos hortícolas (J. Xu et al., 2019). Sin embargo, para hacer frente a estos retos, aparte de la utilización de las técnicas

tradicionales, se requerirá de un trabajo adicional basado en la biotecnología e ingeniería genética.

A pesar de la gran diversidad de cultivos hortícolas muchos de los objetivos en la mejora vegetal son comunes (Fig. 1. 12), destacando la necesidad de una mejora del rendimiento, de la calidad y del valor nutricional, a la vez que se prolonga la vida útil de frutos y vegetales, y una mayor tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Sedeek et al., 2019; F. Wang et al., 2016).

La biotecnología comprende una serie de técnicas que permiten la mejora vegetal. Para ello, en primer lugar, se deben de identificar el conjunto de genes y metabolitos responsables de la característica a estudiar, y posteriormente, mediante ingeniería genómica o editado genético se silenciarán, sobreexpresarán o introducirán distintos genes en la especie a mejorar.

En la actualidad existe un gran número de métodos de transferencia de ADN y vectores de expresión efectivos para un amplio rango de plantas. El desarrollo de plantas transgénicas permite la mejora de los cultivos a la vez que proporciona un medio eficaz para el estudio de la función génica durante el desarrollo y otros procesos en la planta (Abdallah et al., 2015).

Un requisito esencial para la edición génica es la disponibilidad del genoma del cultivo. Los estudios de las funciones génicas generalmente se hacen en plantas modelo, por lo que estos datos sólo sirven de referencia y no para una aplicación directa en otras especies. La falta de información genética sobre los cultivos hortícolas, junto al hecho de que muchos de estos cultivos siguen siendo altamente recalcitrantes al proceso de transformación y regeneración, ha restringido en gran medida la edición en estos cultivos a pesar de su importancia agronómica (Xiong et al., 2015).

## 1.7. MANIPULACIÓN GENÉTICA DE CARÁCTER TRANSITORIO

### *1.7.1. Sobreexpresión de genes mediante el uso de vectores virales*

Los vectores basados en virus de plantas son importantes herramientas biotecnológicas que complementan la mejora convencional y la transformación genética estable. Teniendo en cuenta la velocidad con la que se establece una infección viral y la alta tasa de acumulación de las proteínas codificadas por virus en las plantas (Hefferon, 2017), el uso de vectores virales es una herramienta muy interesante para la sobreexpresión de proteínas de interés en las plantas y la evaluación de la función de las mismas, proporcionando nuevas ideas sobre la función de genes específicos en el desarrollo de las plantas (Shoresh et al., 2006; Zhang & Ghabrial, 2006).

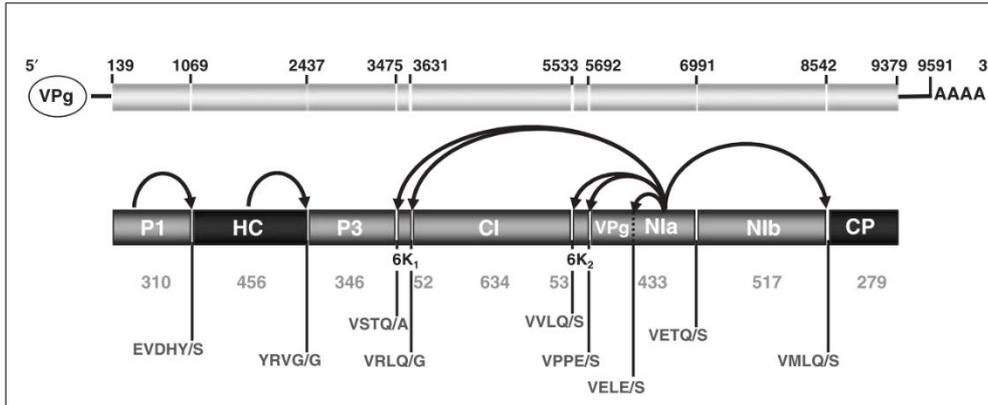
Para que estos vectores virales puedan ser herramientas de utilidad en plantas, estos no deben afectar al desarrollo, ni reducir su rendimiento o ser vectores potenciales de propagación entre plantas (Arazi et al., 2001). Los vectores virales deben ser capaces de replicarse, propagarse y expresar los genes de interés en las células infectadas, de esta manera han demostrado ser útiles en la expresión transitoria de diferentes genes en células vegetales (Vainstein et al., 2011). Distintos virus tanto de ADN como de ARN han sido diseñados para la expresión de proteínas heterólogas en varias especies modelo como en *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* (Gleba et al., 2007; Komarova et al., 2010; Lico et al., 2008; Matoba et al., 2011).

Existen numerosas ventajas en el uso de vectores virales. Primero, los vectores virales pueden viajar de una célula a otra e infectar sistémicamente a su huésped y, por lo tanto, pueden funcionar como vehículos eficientes para el suministro de las proteínas expresadas en una amplia gama de células y órganos diana. En segundo lugar, muchas especies de plantas modelo y agrónomicamente importantes pueden ser infectadas por una amplia gama de

virus. Tercero, los vectores virales a menudo conducen a niveles de expresión muy altos de las proteínas de interés en las plantas infectadas, lo que podría ser útil para superar la baja eficiencia que se ha atribuido (al menos parcialmente) a la transformación estable. Cuarto, los vectores virales no se integran en el genoma y pueden ser introducidos indirectamente en las células y órganos diana por varios medios: técnicas biolísticas; inoculación mecánica de ARN transcrito *in vitro*; inoculación de ARN a partir de extractos de hojas de plantas infectadas, así como mediante Agroinfección (Vainstein et al., 2011). Los vectores virales pueden proporcionar una oportunidad única para evitar el paso de la transformación estable y la posterior regeneración de la planta (Purkayastha & Dasgupta, 2009; Vainstein et al., 2011).

También existen limitaciones en esta herramienta: las inserciones de más de 1 kb de tamaño generalmente no se pueden expresar, los vectores sistémicos no infectan todas las partes de la planta, no llegando a la semilla en la mayoría de los casos, la propagación del virus es asíncrona, la infección progresa a diferentes velocidades en diferentes hojas, y el vector suele ser inestable, por lo que muchos tejidos infectados pueden no expresar la proteína de interés (Gleba et al., 2007).

Dentro de los virus más importantes a nivel mundial está el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV, Zucchini Yellow Mosaic Virus), es miembro del género Potyvirus, de la familia Potyviridae. Su genoma está compuesto por un ARN monocatenario positivo y posee una longitud de 9,593 nt. Se expresa como una poliproteína que es escindida por tres proteasas virales (P1, HC-Pro y NIa) y procesada para dar lugar a diez proteínas maduras. Posee una proteína terminal VPg unida covalentemente al extremo 5', mientras que el extremo 3' está poliadenilado (Figura 1. 13).



**Figura 1. 13.** Esquema del genoma del ZYMV y el procesamiento del mismo. Los números en color negro indican el número de nucleótido en el límite de cada gen. Los números en color gris indican el tamaño de cada proteína en aminoácidos. Las flechas indican los sitios de corte de cada una de las tres proteasas virales. Fuente: Gal-On (2007).

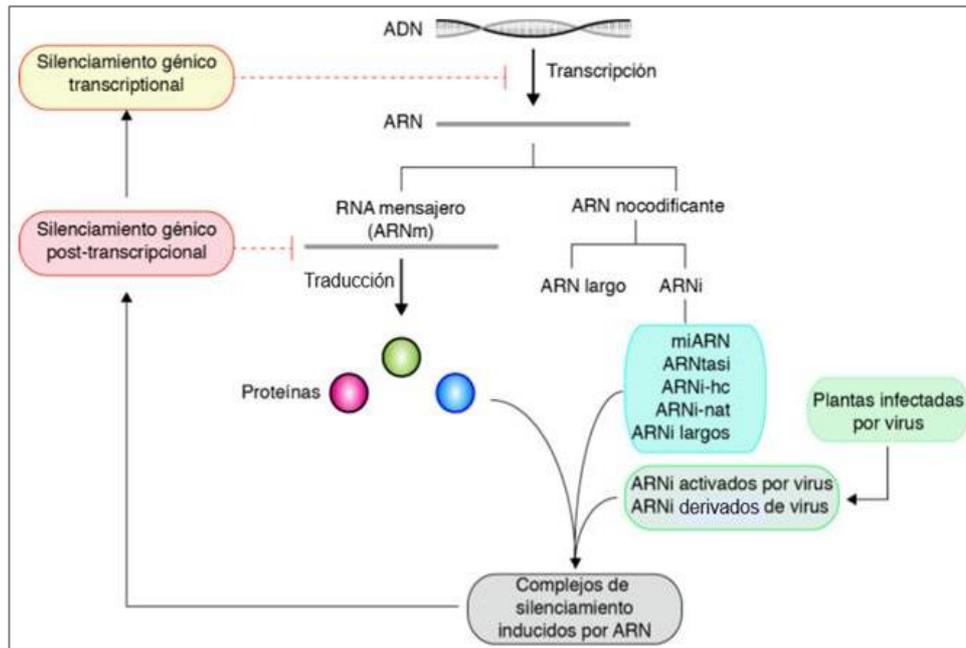
Para poder utilizar el ZYMV como un sistema de expresión de genes en cucurbitáceas, se diseñó el vector recombinante ZYMV-AGII a partir de un ZYMV atenuado (modificado en un dominio muy conservado dentro de la región HC). El vector ZYMV-AGII tiene todos los requerimientos de seguridad necesarios (Arazi et al., 2001): no causa la enfermedad, no se transmite a través de áfidos, no se acumula en el terreno y no se transmite a las semillas. Se han expresado con éxito más de 30 genes diferentes en cucurbitáceas utilizando el del vector ZYMV (Arazi et al., 2001, 2002; Shores et al., 2006).

### 1.7.2. El silenciamiento génico mediante VIGS y ARNi

Entre las herramientas biotecnológicas para el estudio de la función génica existen distintas aproximaciones que permiten el silenciamiento génico, como la tecnología VIGS (Virus Induced Gene Silencing) (Lindbo et al., 1993; Ruiz et al., 1998). Aunque los vectores virales se diseñaron originalmente para servir como herramientas de sobreexpresión, los virus

vegetales tienen también la capacidad de silenciar o suprimir la expresión génica en plantas, por lo que son una herramienta fundamental en la genómica funcional y la genética inversa (Purkayastha & Dasgupta, 2009). La tecnología VIGS, se basa en el sistema de defensa innato de las plantas frente a una infección vírica (Lindbo et al., 2001). Tanto los virus de ADN como los de ARN producen silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, Post-transcriptional Gene Silencing) que consiste en la degradación de aquellos ARN mensajeros (ARNm) que posean secuencias complementarias al virus, la inhibición de su traducción y el silenciamiento génico transcripcional (TGS, Transcriptional Gene Silencing), a través de la modificación del ADN mediante metilaciones y/o la remodelación de la cromatina (P. M. Waterhouse et al., 2001) (Fig. 1. 14).

Se han modificado numerosos virus de ARN y ADN para el desarrollo de vectores VIGS. El gen a silenciar se clona en un ADN viral (vectores basados en virus de ADN) o ADN complementario (ADNc) (vectores basados en virus de ARN). Los vectores VIGS se introducen en plantas por inoculación mecánica, agroinfiltración mediada por *Agrobacterium* o, por métodos de biolística para vectores basados en ADN (Purkayastha & Dasgupta, 2009). Esta metodología tiene como ventajas que el método es rápido y no se necesita una transformación estable de plantas (no se trata de transgénicos).



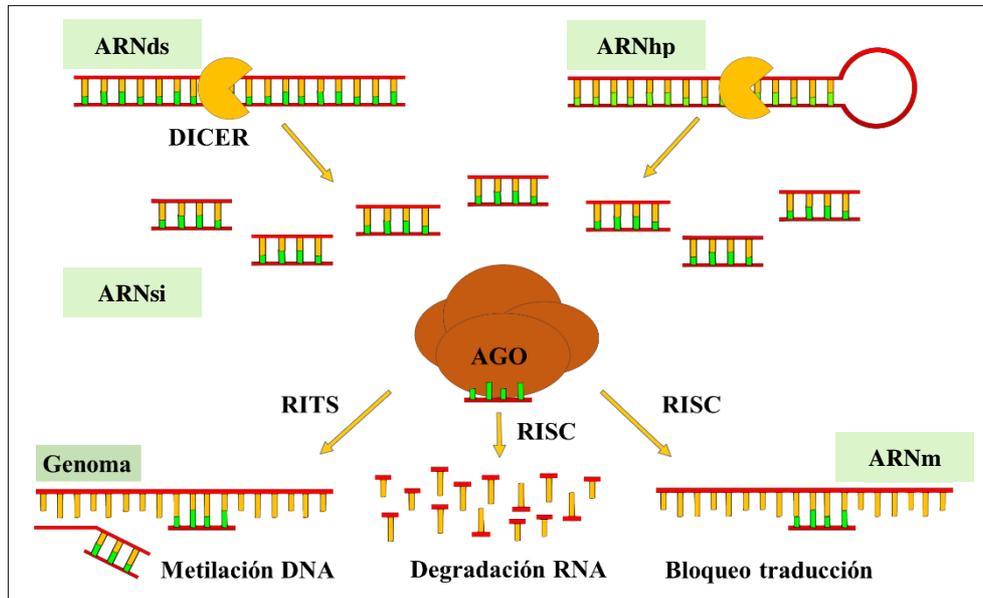
**Figura 1. 14.** Se forman complejos de silenciamiento inducido por ARN entre proteínas y ARN de interferencia (ARNi) que no codifican para proteínas. El silenciamiento génico bloquea las secuencias complementarias induciendo su degradación o evitando la traducción. Plantas infectadas por virus acumulan ARNi derivados del ARN viral. Extraído de Garcia-Ruiz et al., (2016)

Los VIGS activan la vía del ARN de interferencia (ARNi). Cuando las plantas son infectadas con un virus, a partir de la doble cadena de ARN se van a formar los pequeños ARN (ARNsi) gracias a la acción de la ribonucleasa de clase III llamada DICER. Estos ARNsi se unen al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, RNA-induced silencing complex) que media el silenciamiento. Si en el vector viral se introduce un trozo de ADN homólogo a una secuencia del genoma de la planta, los transcritos del gen diana son degradados por la maquinaria de silenciamiento celular (Kant & Dasgupta, 2017).

El vector vírico ZYMV descrito anteriormente para la sobreexpresión génica también puede ser utilizado para silenciamiento génico. Shores et al. (2006) mostraron por primera vez el silenciamiento génico mediante la utilización de este vector viral (Robertson, 2004). Se insertó un fragmento del gen diana en orientación antisentido, manteniendo el marco de la poliproteína ZYMV.

Otra estrategia para producir silenciamiento génico, es la utilización de ARNi. Para inducir este silenciamiento se introduce en la planta un vector que contenga la secuencia del gen que se quiere silenciar en sentido y antisentido separadas por un intrón, lo que da lugar a la formación de una estructura en horquilla (ARNhp), esta formación producirá un silenciamiento mediante PTGS y TGS al igual que ocurre en el caso de los VIGS.

La Figura 1. 15 presenta el proceso de generación y acción del ARNi: el ARNhp originado tras ser introducido de forma artificial un fragmento en sentido y antisentido será reconocido por la enzima DICER encargada de fragmentar el ARN en pequeñas moléculas de doble cadena (ARNsi, ARN pequeños de interferencia), para posteriormente ser incorporadas a un complejo multi-proteínico (RISC). Este complejo separa las hebras de la molécula ARNsi, quedando solo una de ellas en el complejo. Por último, se produce el silenciamiento cuando el ARNsi se une a secuencias complementarias de ARN monocatenarias, guiados por una proteína Argonauta y, finalmente son cortados por enzimas degradándose así los transcritos (Mysore & Senthil-Kumar, 2015; Watson et al., 2005).



**Figura 1. 15.** Silenciamiento génico mediante ARNi. ARNs: ARN de doble cadena, ARNhp: ARN en horquilla, DICER: enzima ribonucleasa que realiza cortes en ARN de doble cadena, AGO: Argonauta, ARNm: ARN mensajero, ARNs: pequeños ARN interferentes.

## 1.8. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA ESTABLE MEDIANTE *AGROBACTERIUM*

La transformación de las plantas ha permitido una extensión del conocimiento de la biología de las plantas y ha revolucionado la agricultura comercial. Desafortunadamente, para la mayoría de los cultivos, la transformación y la regeneración posterior siguen siendo difíciles de realizar actuando como cuellos de botella en el proceso.

La transfección de la planta abarca dos pasos consecutivos distintos: el primero la introducción del ADN en las células de la planta y segundo la integración del ADN introducido en el genoma de la planta (transformación estable) (Altpeter et al., 2016). Existe un amplio rango de métodos para la integración de ADN foráneo en las células vegetales. Estas técnicas se pueden

clasificar según se trate de un sistema de transferencia directa (mediante biolística) o indirecta mediada por *Agrobacterium*.

Una de las técnicas más versátil y ampliamente extendida es la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Este es un fitopatógeno del suelo que infecta de forma natural a las plantas y causa en ellas tumores debido a la integración de una secuencia de ADN plasmídico en el genoma vegetal que codifica enzimas para la síntesis de fitohormonas que se sobreexpresan dando lugar a una hiperplasia e hipertrofia de las células (Zupan et al., 2000). El segmento de ADN que se transfiere es conocido como la región ADN-T (ADN de transferencia) y se encuentra en el plásmido de la bacteria llamado plásmido Ti (inductor de tumores). El plásmido Ti debe ser modificado eliminando los genes responsables de la formación de tumores en la planta, denominados *ONC* (oncogenes) y los genes *OPS* para la síntesis de opinas, que se encuentran en la región del ADN-T. En la transferencia de genes, a través del sistema *A. tumefaciens*, se emplean dos tipos de vectores: los de cointegración (sistemas en *cis*) y los binarios. Los vectores binarios (contienen los bordes del ADN-T en el que se incluye la región de expresión o genes de interés) no necesitan integrarse al plásmido Ti y se mantienen como plásmidos independientes, dentro de la célula bacteriana.

Para que se produzca la transformación genética de plantas mediada por *A. tumefaciens* se requiere la presencia de dos componentes genéticos ubicados en el plásmido Ti bacteriano. El primer componente esencial es el ADN-T, definido por repeticiones imperfectas conservadas de 25 pares de bases en los extremos de la región T llamadas secuencias de borde. La segunda es la región de virulencia (*Vir*), que está compuesta por al menos siete loci principales (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* y *virG*) que codifican los componentes de la maquinaria de proteínas bacterianas que median el procesamiento y la transferencia del ADN-T. Las proteínas *VirA* y *VirG* son

reguladores de dos componentes que activan la expresión de otros genes vir en el plásmido Ti. VirB, VirC, VirD, VirE y tal vez VirF están involucrados en el procesamiento, transferencia e integración del ADN-T de *A. tumefaciens* en una célula vegetal (Hwang et al., 2017).

La transformación mediada por *Agrobacterium* consiste en la unión bacteriana a una célula vegetal dañada, seguidamente se transfieren el ADN-T y las proteínas efectoras de virulencia, se produce el movimiento citoplasmático de complejos de T-ADN proteína hasta la entrada en el núcleo, donde se eliminan de proteínas de la cadena T, se integra el T-ADN en el genoma de la célula y por último se produce la expresión del gen (Gelvin, 2012; Lacroix & Citovsky, 2013).

Las plantas difieren mucho en su susceptibilidad a la transformación mediada por *Agrobacterium* (Gelvin, 2010). Estas diferencias ocurren no solo entre especies, sino también entre variedades de una misma especie, como ocurre dentro de la familia Cucurbitaceae, en la que algunas especies son recalcitrantes a la transformación, como es el caso de *C. pepo*. Para esta familia existen algunos trabajos que han obtenido transgénicos utilizando diversos procedimientos, aunque todos con una baja eficiencia de transformación.

Shah et al. (2008) obtuvieron transgénicos de *C. pepo* mediante agroinfección con una eficiencia de solo un 0.7 %. Con respecto a otras cucurbitáceas, Nanasato et al. (2011) llevaron a cabo la transformación genética de *Cucurbita moschata* con un aumento medio de la eficiencia de infección hasta el 2.7 % realizando heridas sobre los explantes. Nanasato & Tabei (2015) muestran un método de transformación mejorado en *C. sativus* con una eficacia de 11.9 %  $\pm$  3.5 y en *C. moschata* de 9.2 %  $\pm$  2.9. Bezirganoglu et al. (2014) transformaron *Cucumis melo* L. var. *makuwa* consiguiendo una eficiencia de solo un 0.8 % de los explantes inoculados. En conclusión, los estudios de transformación estable en cucurbitáceas no son muy numerosos y los protocolos existentes producen ratios de eficiencia muy

bajas, todo ello unido a las propiedades inherentes de cada especie y cultivar hace que la transformación estable en cucurbitáceas sea un importante objetivo por conseguir.

### **1.8.1. Regeneración**

Para obtener una planta modificada genéticamente es indispensable un buen protocolo de cultivo *in vitro* y de regeneración. La regeneración de plantas completas a partir de células diferenciadas *in vitro* es una clara demostración de la plasticidad y totipotencia de las células vegetales en respuesta a señales ambientales concretas (Miguel & Marum, 2011).

Muchos son los factores que intervienen en el proceso de regeneración: el tipo de explante, la composición de los medios de crecimiento, los fitorreguladores y las condiciones de cultivo tales como la luz, temperatura y humedad (Smith, 2012).

En la regeneración se pretende la inducción de yemas a partir de un tejido somático, utilizando para ello distintos tipos de explantes como hojas, tallos, raíces o cotiledones, lo que se conoce como regeneración somática u organogénesis somática. Puede llevarse a cabo de forma indirecta si se produce la formación de un callo y posterior inducción de brotes y raíces, o directa si se origina sin pasar por el estadio de callo. Aunque la regeneración indirecta sea la más usada en la mayoría de las plantas, para las especies del género *Cucurbita* se ha utilizado en la mayoría de los casos la regeneración directa mediante el uso de explantes de cotiledón, aunque con grandes diferencias en cuanto a su eficiencia y siendo esta de forma generalizada bastante reducida (Alam et al., 2019; Ananthkrishnan et al., 2003, 2007; Lee et al., 2003; Nanasato & Tabei, 2015). Sin embargo, a pesar de que se ha obtenido regeneración en algunas especies de la familia Cucurbitaceae, los

resultados han sido prácticamente nulos en *C. pepo*. Por ello, es de vital importancia la puesta a punto de un buen protocolo de cultivo y regeneración en calabacín para poder realizar una modificación genética estable de calabacín y así poder proporcionar una herramienta imprescindible para el estudio de esta especie.



# 2

## OBJETIVOS

### *OBJECTIVES*





El **objetivo principal** de este estudio es el desarrollo de nuevas tecnologías que mejoren la tolerancia al frío y la calidad postcosecha del fruto de calabacín.

Para ello, los objetivos específicos desarrollados en esta tesis son los siguientes:

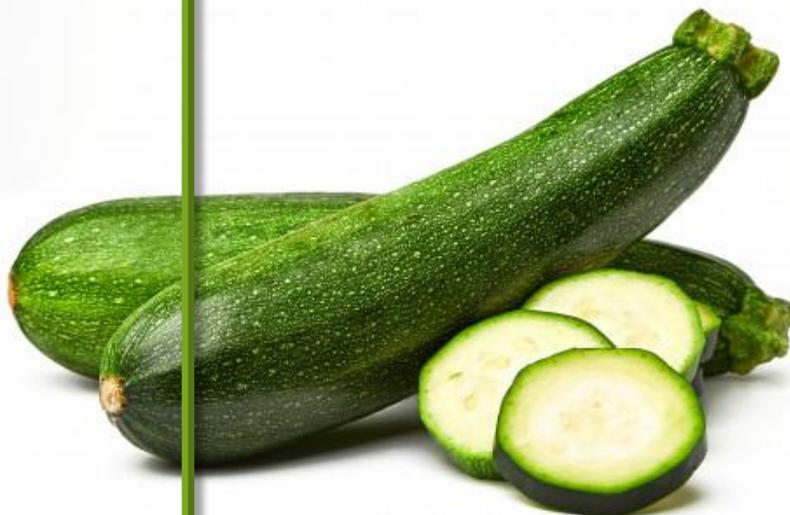
1. Búsqueda de nuevos tratamientos que mejoren la respuesta a la conservación en frío de diferentes variedades de *Cucurbita pepo* y análisis fisiológico de los resultados de los mismos.
2. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta al frío.
3. Puesta a punto de sistemas de modificación de la expresión génica mediante virus en *Cucurbita pepo*.
4. Puesta a punto de un sistema de transformación estable de *Cucurbita pepo* y regeneración de plantas.
5. Aproximación al estudio de la función de los genes que durante las investigaciones previas se vean implicados en la respuesta al frío mediante las técnicas desarrolladas en los anteriores objetivos.



# 3

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *MATERIALS AND METHODS*





### 3.1. MATERIAL VEGETAL

#### 3.1.1. Estudios de postcosecha y condiciones de almacenamiento

Los frutos de calabacín (*Cucurbita pepo* L. morfotipo Zucchini) de las variedades comerciales 'Natura' (Enza Zaden) y 'Sinatra' (Clause-Tezier) fueron proporcionadas por FEMAGO S.L. Después de la cosecha y en su caso, para los diferentes tratamientos, la fruta se almacenó en una cámara con temperatura controlada y en oscuridad permanente a 4 °C y 85-90 % humedad relativa durante 14 días.

En todos los experimentos y tratamientos, se prepararon tres réplicas por variedad, tratamiento y período de almacenamiento, cada una de las cuales consistió en 6 frutos de tamaño similar.

##### 3.1.1.1. Tratamientos postcosecha con ácido abscísico y óxido nítrico

Se emplearon frutos inmaduros recién cosechados de las variedades Natura y Sinatra.

**Tratamiento con ABA.** Se sumergieron frutos de Natura en 5 mM de tungstato de sodio (TS), un inhibidor de la enzima aldehído abscísico oxidasa, a 20 °C durante 20 minutos. El control consistió en agua destilada, o 5 mM de TS + 0.5 mM de ABA como segundo control para descartar los efectos no específicos de TS. Los frutos de Sinatra se sumergieron en las condiciones descritas anteriormente en 0.5 mM de ABA o agua destilada como control. Posteriormente, todos los frutos se colocaron en papel secante durante 2 horas antes de su almacenamiento.

**Tratamiento con NO.** Los tratamientos con NO se realizaron por inmersión de los frutos de la variedad Sinatra en una solución 25, 100 o 500 μM nitroprusiato de sodio (SNP, un compuesto liberador de NO) durante 20 minutos a 20 °C, en 25 μM de ferricianuro de potasio ( $K_3(Fe(CN))_6$ ) análogo estructural del donante de NO) y agua destilada, siendo estos dos últimos los controles.

Tras los tratamientos de NO o ABA se determinaron la pérdida de peso, índice de daños por frío y firmeza, así como la tasa de muerte celular (como se describe posteriormente), tras lo cual el exocarpo se separó, congeló y pulverizó en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### 3.1.2. Cultivo de plantas de *C. pepo*

Para los estudios con plantas en maceta, las semillas de calabacín de las distintas variedades, se sembraron en un sustrato compuesto por turba:perlita:vermiculita (3:2:1) manteniéndose con un ciclo luz/oscuridad de 16/8 horas en una cámara de cultivo KOXKA (SA8/17-27/R), con una temperatura  $27 \pm 1$  °C y una RH de 55 %. La intensidad luminosa fue de  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada por lámparas fluorescentes Sylvania Cool-White y lámparas incandescentes de 40 vatios. Se empleó para su riego la solución nutritiva Hoagland y Arnon (Tabla 3.1).

**Tabla. 3.1.** Solución nutritiva Hoagland y Arnon.

<i>Macronutrientes (g)</i>		<i>Micronutrientes (g)</i>	
KNO <sub>3</sub>	0.850	Na <sub>2</sub> FeEDTA	0.09300
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.312	MnCl <sub>2</sub>	0.00040
KCl	0.373	ZnCl <sub>2</sub>	0.00010
CaCl <sub>2</sub>	0.367	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.00010
MgCl <sub>2</sub>	0.305	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.00300
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.284	CuCl <sub>2</sub>	0.00004
Agua 1000 mL			

#### 3.1.2.1. Estudio de plantas de calabacín sometidas a estrés por frío

Tras 45 días de crecimiento en las condiciones antes descritas, las plantas fueron transferidas a una cámara de frío, donde se almacenaron durante 14 días a 4 °C manteniendo el ciclo de luz/oscuridad y las mismas condiciones de riego.

Durante el periodo de estrés por frío, se recogieron muestras del meristemo apical y hoja joven (tercera-cuarta hoja completamente expandida) a las 0, 1, 6 y 24 horas, y a los 3, 5 y 14 días.

Para cada tiempo y variedad se realizaron tres réplicas con un mínimo de tres plantas. Las muestras fueron congeladas y pulverizadas en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

## **3.2. ANÁLISIS FISIOLÓGICOS DEL FRUTO DE CALABACÍN**

### ***3.2.1. Pérdida de peso***

La pérdida de peso de cada fruto se calculó mediante la diferencia entre el peso inicial y final tras el periodo de conservación, y se expresó como porcentaje de pérdida (%). El resultado representa la media  $\pm$  SE de todas las determinaciones realizadas.

### ***3.2.2. Índice de daños por frío***

El índice de daños por frío (DF) se calculó a partir de valores asignados en la evaluación visual de los frutos, de acuerdo con una escala descrita por Martínez-Téllez et al. (2002). A cada fruto se le asignó un valor: 0 (sin daños), 1 (<10 % de la superficie total), 2 (10-20 % de la superficie) y 3 (>20 % de la superficie). El índice se calculó como:  $\sum$  (valor de la escala (0-3) x número de frutos de cada valor) / número de frutos evaluado.

### ***3.2.3 Textura***

La textura de los frutos se analizó mediante un texturómetro manual FHT-803 (Silverado) con una sonda cilíndrica de 7.9 mm de diámetro en la zona central de cada fruto y tras eliminar el exocarpo y los resultados se expresaron en Newtons (N).

### ***3.2.4. Pérdida de electrolitos***

La pérdida de electrolitos fue determinada en el exocarpo fresco de calabacín según Mao et al. (2007). Con un sacabocados se hicieron discos de exocarpo de 11 mm de diámetro. Para cada repetición técnica se tomaron 10 discos que se lavaron 3 veces con agua destilada durante 3 min y se incubaron a temperatura ambiente en agitación a 200 rpm en 50 mL de agua destilada. Trascorridos 30 min, se midió la conductividad de la solución ( $EC_0$ ) con un conductímetro Consort C860 equipado con un electrodo Consort SK10T (Consort nv, Bélgica). Los discos se hirvieron durante 10 min en la solución de la incubación y se volvió a medir la conductividad de la misma tras enfriarse a temperatura ambiente, obteniéndose de esta forma la

conductividad máxima ( $EC_M$ ). La pérdida de electrolitos del tejido se expresó como porcentaje de  $EC_0$  respecto al valor de la  $EC_M$ .

#### ***3.2.4. Tasa de muerte celular***

La tasa de muerte celular se analizó indirectamente mediante la estimación de la absorción de azul tripán según Qu et al. (2009), con las modificaciones descritas en Carvajal et al. (2015). Se tomaron 5 discos de exocarpo de cada réplica con un perforador de 11 mm de diámetro. Se midieron cuatro réplicas de cada tratamiento. Los discos de exocarpo se sumergieron en azul de tripán al 0.25 % (p/v) y se incubaron en un agitador de plataforma durante 10 minutos. Después, los discos se lavaron con agua desionizada y se secaron en papel de filtro. Los discos secos se pesaron y homogeneizaron en etanol al 50 % (v/v). Tras lo cual las muestras se centrifugaron a 4 °C y 10,000 x g durante 10 min determinándose la absorbancia del sobrenadante a 585 nm. La tasa de muerte celular se expresó como porcentaje de la acumulación de azul tripán con respecto a los frutos recién cosechados.

### **3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

#### ***3.3.1. Peroxidación lipídica***

La peroxidación lipídica se determinó mediante la cuantificación de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) según el método descrito por Heath y Packer (1968), con modificaciones. El material vegetal se homogeneizó (1:4, p/v) en ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/v) y 0.2 mL de hidroxitolueno butilado (BHT) 4 % (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 4°C y 10.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se mezcló con ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.5 % (p/v) en TCA al 20 % en proporción 1:4 (v/v) y la mezcla se incubó a 95 °C durante 30 min. Pasado ese tiempo, se enfrió inmediatamente en hielo para detener la reacción y se centrifugó a 4 °C y 4000 x g durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm (absorbancia específica) y a 600 nm (absorbancia inespecífica). Los TBARS se calcularon restando la absorbancia inespecífica a la específica y utilizando una curva patrón de MDA; los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol MDA kg}^{-1}$  PF (peso fresco).

### **3.3.2. Contenido en peróxido de hidrógeno**

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se analizó según Alexieva et al. (2001). El material vegetal (1:4, p/v) se homogeneizó con TCA al 0.1 % (p/v). Después de la centrifugación a 4 °C y 12,000 x g durante 15 min, se recogió el sobrenadante. La mezcla de reacción fue 0.25 mL de sobrenadante, 0.25 mL de tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7) y 1 mL de KI 1 M. Después de una hora de incubación en oscuridad, la absorbancia se midió a 390 nm. La cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se calculó utilizando una curva patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se expresó como  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ PF}$ .

### **3.3.3. Contenido fenólico total**

El contenido fenólico total se determinó utilizando el procedimiento Folin-Ciocalteu, descrito previamente por Singleton & Rossi, (1965). Se homogeneizó 0,3 g de material vegetal en 6 mL de acetona al 80 %. Se agitó durante 2,30 h a 4 °C. Tras el periodo de agitación se centrifugó 15 min a 4000 x g a 4 °C. El sobrenadante se diluyó con acetona (1:4; v/v) y se mezcló con el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) diluido 1:5 (v/v). Se incubó en agitación a temperatura ambiente y oscuridad durante 5 min adicionándose 250  $\mu\text{L}$  de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % (p/v). Trascorridos 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó 5 min a 5000 rpm y se midió su absorbancia a 760 nm. El contenido de fenoles totales se cuantificó mediante una curva patrón de ácido gálico y se expresó en  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ PF}$ .

### **3.3.4. TEAC**

El ensayo de la capacidad antioxidante de Trolox (TEAC) es un método espectrofotométrico que se basa en la inhibición por parte de los antioxidantes de la absorbancia del catión radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol-6-sulfónico). Se realizó según el protocolo de Re et al. (1999) con algunas modificaciones. Se maceraron 0,3 g de material vegetal en 6 mL de acetona al 80 % agitándose durante 2.5 h a 4 °C. El sobrenadante obtenido de centrifugar durante 15 min a 5000 rpm se diluyó 2/3 con el reactivo ABTS 7 mM y tampón acetato potásico 20 mM pH 4.5. Tras 1 h de incubación se midió la absorbancia a 734 nm. El porcentaje de inhibición de la formación del catión radical ABTS por la muestra antioxidante se calcula

mediante una curva patrón del antioxidante sintético Trolox. Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{mol}$  equivalentes Trolox  $\text{kg}^{-1}$  PF.

### **3.3.5. FRAP**

La capacidad antioxidante se analizó también por el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) descrito por Benzie y Strain (1996). El método se basa en la capacidad del extracto para reducir el Fe del radical  $\text{Fe}^{3+}$  - 2,4,6,-tris(2-piridil)-s-triacina (TPTZ) a  $\text{Fe}^{2+}$ .

El material vegetal (0.3 g) se maceró en 6 mL de acetona al 80 %. La mezcla se agitó a 4 °C durante 2.5 h. El homogeneizado se centrifugó durante 15 min a 5000 rpm a 4 °C. Al sobrenadante diluido al 50 % se le adicionó 900  $\mu\text{L}$  del Reactivo de FRAP (tampón acetato sódico 0.3 M pH 3.6 con TPTZ 10 Mm y  $\text{FeCl}_3$  20 mM). Tras una incubación en agitación a 37 °C durante 30 min se midió la absorbancia a 595 nm. La capacidad antioxidante total medida por este método se cuantificó mediante una curva patrón con  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y se expresó en  $\mu\text{mol}$   $\text{kg}^{-1}$  PF.

### **3.3.6. Ascorbato total**

El contenido de ácido ascórbico se cuantificó mediante el método descrito por Alós et al. (2013) con modificaciones. El material vegetal se homogeneizó con ácido metafosfórico al 5 % (p/v) (1:2, p/v). El homogeneizado se centrifugó 4 °C y  $13.500 \times g$  durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró con un filtro de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se añadió ditioneitol (DTT) al sobrenadante a una concentración final de 5 mM y se incubó durante 1 h en la oscuridad para la determinación total del ácido ascórbico.

El contenido total de ácido ascórbico se analizó por HPLC utilizando un sistema Hewlett-Packard equipado con una columna C18 de  $4.6 \times 150$  mm. El ascorbato se eluyó a un flujo de  $0.9 \text{ mL min}^{-1}$  usando un gradiente de elución con acético al 0.1 % pH 3 (A) y metanol (B). El gradiente fue de (tiempo (min); porcentaje de A): (0; 90 %), (7.5; 90 %), (8; 15 %) and (10; 15 %). Posteriormente la columna fue regenerada con las condiciones iniciales durante 3 min. La detección se realizó con un diodo de array a 254 nm. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con ascorbato sódico y los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico  $\text{kg}^{-1}$  PF.

### 3.3.7. Contenido en ácido abscísico

El contenido en ácido abscísico (ABA) se midió según Palma et al. (2015). El material vegetal se homogeneizó en proporción 1:8 (p/v) con metanol frío al 100 % e hidroxitolueno butilado al 2 % (p/v). El homogeneizado se agitó durante 2 horas a 4 °C y se centrifugó a  $3000 \times g$  durante 10 minutos a la misma temperatura. Después de la centrifugación, el precipitado se volvió a extraer con 1 mL de metanol, y la extracción se repitió nuevamente. Luego, los sobrenadantes se combinaron y secaron completamente bajo una corriente de nitrógeno, y se disolvieron en 2 mL de agua. El pH de la fase acuosa se ajustó a 1.5-2.5 con HCl 1 N. El ABA se extrajo dos veces en 1.5 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se secó bajo una corriente de nitrógeno, se resuspendió en metanol y se filtró a través de un filtro de nylon (0.22  $\mu\text{m}$ ).

Mediante el sistema UPLC Acquity las muestras se inyectaron en una columna (Acquity UPLC HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  100 mm) y la columna se eluyó a un caudal constante de 0.6 mL  $\text{min}^{-1}$  y la elución en gradiente fue con agua y ácido fórmico al 0.01 % (solvente A) y acetonitrilo que contenía 0,01% de ácido fórmico (disolvente B). El perfil de gradiente se aplicó de la siguiente manera (t (min); A %): (0; 95 %), (6; 0 %), (6.10; 95 %), (8; 95 %). Se detectó usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-S (UPCL / ESI-MS / MS, Waters) en el modo de ionización electrospray negativa (ESI). El voltaje de pulverización iónica se ajustó a -2 kV y la temperatura a 150 °C. El ABA se detectó en el modo de monitorización de reacción múltiple del espectrómetro de masas en tándem con las siguientes transiciones  $m/z$  263.04  $\rightarrow$  153.08 y 263.04  $\rightarrow$  219.12. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g kg}^{-1}$  PF.

### 3.3.8. Determinación de aminoácidos

Los aminoácidos se extrajeron con etanol / cloroformo / HCl 0.1 N (12/5/1; v/v/v) en una proporción de 1:7 (p/v). La norvalina se utilizó como patrón interno. El extracto se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y  $3500 \times g$ , y el sobrenadante se separó en cloroformo y fases acuosas mediante la adición de HCl 0.1N y  $\text{CHCl}_3$ . La fase acuosa se pasó a través de un filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  y posteriormente se realizó una derivatización pre-columna con OPA (o-phthalaldehyde) y FMOC (FMOC). Finalmente, los aminoácidos se analizaron por HPLC utilizando un sistema

Hewlett-Packard equipado con una columna Zorbax Eclipse-AAA 4.6 mm × 150 mm. Los aminoácidos se eluyeron a un flujo de 1,5 mL min<sup>-1</sup> usando un gradiente de elución con tampón fosfato de sodio 40 mM pH 7.8 (A) y una mezcla de acetonitrilo / metanol / agua (45/45/10, v/v/v) (B). El gradiente fue de (tiempo (min); A %): (0; 100 %), (2; 100 %), (20; 40 %), (21; 0 %) y (25; 0 %). Posteriormente la columna fue regenerada con las condiciones iniciales durante 2 min. La detección se realizó utilizando un detector de fluorescencia usando longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 450 nm (0-15 min) y 266 y 305 nm (15-25 min) respectivamente. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración para cada aminoácido y los resultados se expresaron como μmol kg<sup>-1</sup> PF.

### **3.3.9. Poliaminas**

Se usaron 0.5 g de material vegetal para el análisis de poliaminas. Se homogeneizó con 1.5 ml de ácido perclórico frío al 5 % y 1,7-diaminoheptano (60 nmol mL<sup>-1</sup>) como patrón interno, durante 24 h a 4 °C. El homogeneizado se centrifugó (3000 x g, 5 min a 4 °C) y se utilizó 0.2 mL del sobrenadante para determinar las poliaminas libres. Las muestras se mezclaron con 0.4 mL de cloruro de dansilo (10 mg/mL) y 0.2 mL de carbonato de sodio saturado. La mezcla se incubó en la oscuridad durante 12 h a temperatura ambiente. El exceso de reactivo de dansilo se eliminó con 0.1 mL de prolina (100 mg/mL) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se extrajeron dansilpoliaminas en 0.4 mL de tolueno. La fase orgánica se evaporó bajo una corriente de aire, y se disolvió en 0.1 mL de acetonitrilo.

Las poliaminas se analizaron por HPLC utilizando un sistema Hewlett-Packard equipado con una columna C18 de 4.6 × 250 mm. El flujo de disolvente fue de 1.5 mL min<sup>-1</sup> y el gradiente de elución se preparó con eluyente A (agua) y eluyente B (acetonitrilo). El perfil de gradiente se aplicó como sigue (t (min); A %): (0; 30 %), (4.5; 30 %), (9; 0 %), (14; 0 %), (15; 30 %). El paso final se mantuvo durante 2 minutos antes de regenerar la columna. La detección se realizó con un fluorómetro utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 415 y 510 nm, respectivamente, según Flores y Galston (1982).

Se usó un procedimiento de calibración usando 1,7-diaminoheptano (60 nmol mL<sup>-1</sup>) como patrón interno. Los resultados se expresaron como μmol kg<sup>-1</sup> PF.

### **3.3.10. Pigmentos**

La determinación de pigmentos se realizó según Wellburn (1994). Para la extracción se homogeneizó el tejido en una proporción 1:5 (p/v) con la mezcla etanol:cloroformo:agua (12:5:1; v/v/v) y se centrifugó en frío a 3,500 x g durante 10 min. Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de mezcla cloroformo:agua (1:0.25; v/v) se agitó y se dejó separar las fases durante 24 h a 4 °C. Se midió la absorbancia de la fase orgánica a 480, 648 y 666 nm y se emplearon las siguientes fórmulas para el cálculo de las concentraciones: Clorofila a ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $1091A_{666} - 1.2A_{648}$ ; Clorofila b ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $16.38A_{648} - 4.57A_{666}$ ; Carotenos + xantofilas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $(1000^{a_{480}} - 1.42C_{la} - 46.09C_{lb}) / 202$ .

### **3.3.11. Determinación por fluorescencia de NO**

La determinación del NO se realizó según Nakatsubo et al. (1998) El exocarpo del fruto se homogeneizó en una proporción 1:3 (p/v) con Tris-HCl 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM, tritón 0.2 % y glicerol 10 %, y se centrifugó a 5,000 x g durante 30 min en frío. El sobrenadante se diluyó 1:4 (v/v) con tampón HEPES 50 mM pH 7.5 y se incubó con 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) 20  $\mu\text{M}$  durante 2 h a 37 °C. La fluorescencia se analizó en un fluorímetro (excitación 495 y emisión 515).

## **3.4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

### **3.4.1. Superóxido dismutasa**

La actividad superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación de superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno. La extracción y posterior cuantificación de esta enzima se realizó mediante la técnica de inhibición de la reducción fotoquímica de azul de nitrotetrazolio (NBT) descrita por Beyer y Fridovich (1987).

El material vegetal (0.2 g) se homogeneizó con 1.6 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8 que contenía EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 0.1 mM y mercaptoetanol 10 mM. Además, se añadió PPVP insoluble en una cantidad

equivalente al 40 % del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se centrifugó a 15000 x g a 4 °C durante 15 min.

El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad enzimática mediante la siguiente mezcla de reacción: tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.8 (EDTA 0.1 mM) riboflavina 2 µM, NBT 75 µM y metionina 13 mM. La reacción se inició al añadir 50 µL de extracto para completar un volumen final de 2 mL.

La actividad se determinó midiendo, en intervalos de 10 min, la absorbancia de la mezcla de reacción después de haber sido expuesta a la luz. Los blancos permanecieron en oscuridad y los controles carecían de extracto vegetal. La actividad SOD se expresó como unidades  $\text{min}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{PF}$ .

### **3.4.2. Catalasa**

La actividad catalasa (EC 1.11.1.6) (CAT) cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno formando agua y oxígeno. La extracción y posterior cuantificación de esta enzima se determinó según el método de Arbona et al. (2008) basado en la disminución de la absorbancia, debida a la desaparición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que se mide a 240 nm y 30 °C. Se homogeneizó 0,3 g de material vegetal con 1 mL de tampón fosfato potásico 1 mM, que contenía EDTA 0.1 M y tritón X-100 al 0.1 %. Se añadió a la mezcla 0,02 g de PVPP (polivinil polipirrolidona). El homogeneizado a 15000 x g durante 20 min a 4 °C. Se realizó una mezcla de reacción compuesta por: 50 mM Tampón fosfato potásico pH 7, Tritón X-100 0.1 % (v/v) y 10.6 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A esta mezcla se le adicionó 50 µL del extracto. La actividad CAT se expresó como  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{kg}^{-1} \text{PF}$ .

### **3.4.3. Ascorbato peroxidasa (APX)**

La enzima ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.1) elimina el peróxido de hidrógeno transformando el ascorbato en monodehidroascorbato. La actividad se cuantificó siguiendo el protocolo descrito por Hossain y Asada (1984) con algunas modificaciones descritas en Carvajal et al. (2015).

El material vegetal se homogeneizó en tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.8 (1:3, p/v) adicionado con EDTA 0.1 Mm y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, y PVPP al 10 % (p/v). Se añadió L-ascorbato sódico 5 mM. Los homogeneizados se centrifugaron 15 min a 4 °C y 15,000 x g y se emplearon los sobrenadantes como extractos

enzimáticos. La disminución de absorbancia se midió a 290 nm durante 1 min. La actividad se calculó usando para el ascorbato un coeficiente de extinción molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y se expresó en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ PF}$ .

#### **3.4.4. Glutación reductasa (GR)**

La enzima glutatión reductasa (GR, EC 1.8.5.1) regenera el glutatión reducido a partir de su forma oxidada, utilizando NADPH como poder reductor. Su actividad se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADPH según lo descrito por Edwards et al. (1990). La mezcla de reacción estaba formada por tampón HEPES-NaOH 0,01 M pH 7.8, EDTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, glutatión oxidado 0.25 mM, NADPH 0.2 mM y 0.1 mL del extracto enzimático completando hasta 1 mL. La extracción se realizó con 0.3 g de material vegetal y 1 mL de tampón fosfato potásico 1 mM, que contenía EDTA 0.1 M y tritón X-100 al 0.1 %. Se añadió a la mezcla 0.02 g de PVPP. El homogeneizado se centrifugó a  $15000 \times g$  durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$  obteniéndose el extracto enzimático. La actividad se expresó como  $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ PF}$ .

#### **3.4.5. Actividad abscísico aldehído oxidasa (AAO)**

Se homogeneizó el material vegetal (1: 1.5; p/v) con tampón Tris-HCl 250 mM (pH 8.3) que contenía EDTA 10 mM, molibdato de sodio 5 mM, ditiotreitól 2 mM, glutatión reducido 10 mM y flavín-adenín dinucleótido 10  $\mu\text{M}$ . El homogeneizado se centrifugó a  $18.000 \times g$  durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$  y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio a una saturación del 60 %. Después de la incubación a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min con agitación continua, las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación a  $4^\circ\text{C}$  y  $15,000 \times g$  durante 15 min. El pellet se disolvió en 2.5 mL de tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7.5) y se eliminó la sal en columnas Sephadex G-25 (GE Healthcare) equilibrando con el mismo tampón. La fracción de proteína se filtró y se concentró con filtros centrífugos Amicon Ultra (Millipore®).

La actividad AAO se analizó en una mezcla de reacción compuesta por indol-3-carboxaldehído 0.4 mM, tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7.5) y extracto proteico. La reacción se llevó a cabo a  $30^\circ\text{C}$  durante 120 min y se detuvo mediante la adición de HCl 1 M,  $\text{NaHSO}_4$  2 M y metanol. Los blancos consistieron

en la misma mezcla de reacción, pero añadiendo HCl 1 M antes de la incubación. La mezcla se centrifugó y se usó el sobrenadante para determinar la producción de ácido indol-3-carboxílico. Este ácido se analizó por HPLC usando un sistema Hewlett-Packard equipado con una columna C18 de 4.6 mm x 250 mm. El flujo de disolvente fue de 1 mL min<sup>-1</sup> y el gradiente de elución se preparó con eluyente A (ácido fórmico al 0.3 % en agua Milli-Q) y eluyente B (acetonitrilo). El perfil de gradiente se aplicó de la siguiente manera (t (min); A %): (0; 85 %), (5; 50 %), (8; 50 %), (10; 0 %), (14; 0 %), (16; 85 %). El paso final se mantuvo durante 4 minutos antes de regenerar la columna. La detección se realizó con un diodo de array a 280 nm y la cantidad se determinó cuantificando el área del pico con una curva de calibración. La actividad AAO se expresó como µg de ácido s<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> de proteína. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry et al. (1951).

#### ***3.4.6. Fenilalanina amonio-liasa***

La actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL, EC 4.3.1.5) se realizó según el protocolo descrito por Civello et al. (1997) con algunas modificaciones. Se homogeneizó el material vegetal en una proporción 1:2 (p/v) en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 8.8 suplementado con EDTA 2 mM, 2 mercaptoetanol 10 mM, tritón X-100 al 0.1 % (v/v) y PVPP al 5 % (p/v). Los extractos se agitaron durante 1 h. La mezcla de reacción con 1 mL de volumen final formada por tampón Tris-HCL 0.05 M pH 8.8, fenilalanina 10 mM y 0.1 mL del extracto enzimático. Después de 1 h a 37 °C, se detuvo la reacción añadiendo TCA hasta llegar a una concentración final del 20 %. Se incubó durante 10 min en hielo y la mezcla de reacción se centrifugó a 13.000 x g durante 15 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 290 nm. La actividad se cuantificó mediante una curva patrón de ácido cinámico y se expresó como µmol ácido cinámico kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> PF.

### **3.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS**

#### ***3.5.1. Proteínas S-nitrosiladas. Método Biotin-switch***

Se utilizó el método biotin switch (Jaffrey et al., 2001) con algunas modificaciones para detectar proteínas s-nitrosiladas en calabacín, método que convierte los grupos -S-NO en grupos biotinilados, que son posteriormente medidos con anticuerpos anti-biotina.

El exocarpo de calabacín se homogeneizó con tampón HEN (HEPES 25 mM, EDTA 1 mM, neocuproína 0.1 mM, Triton X-100 al 0.2 %; pH 7.7) en proporción 1: 3 (p/v). El homogeneizado se centrifugó durante 30 minutos a 4 °C. Después se usó el ensayo de Bradford para determinar la concentración de proteína en el sobrenadante. Se usó la misma cantidad de proteína para cada tiempo y condición. Los sobrenadantes se incubaron con SDS al 2.5 % y S-metilmetanosulfonato 20 mM a 50 °C durante 30 minutos con frecuente agitación. Las proteínas se precipitaron con dos volúmenes de acetona fría y se disolvieron en 0.1 mL de tampón RB (HEPES 25 mM, EDTA 1 mM y SDS al 1 %, pH 7.7), biotina-HPDP 1 mM y ácido ascórbico 1 mM. Tras 1 h de incubación, se añadió el tampón de muestra SDS-PAGE.

### ***3.5.2. Detección péptido HA***

Para la detección del péptido HA, hojas de calabacín infectadas con el vector vírico se homogeneizaron en una relación mínima 1/0.5 (p/v) con tampón Tris-HCl 25 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y EDTA 0.5 mM. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 13.200 rpm a 4°C durante 15 min. En el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford. Las muestras se solubilizaron en tampón de carga (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 0.1%, SDS 0.5%, azul de bromofenol 0.05% y DTT 100 mM) y posteriormente se calentaron a 100°C durante 4 min.

### ***3.5.3. Transferencia e inmunodetección***

Tras la electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels Bio-Rad) se transfirieron a membrana de PVDF (difluoruro de polivinilo) para inmunotransferencia, usando un sistema de transferencia semiseca (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). La membrana se tiñó con rojo Ponceau para verificar la equivalencia en la carga de proteínas. Las proteínas S-nitrosiladas se detectaron con un anticuerpo primario anti-biotina (1:10,000; Sigma), y un anticuerpo primario anti-HA (1:10,000; Sigma) para la detección del péptido HA. Para la detección de la reacción antígeno anticuerpo se empleó el método de quimioluminiscencia, mediante oxidación de luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti-IgG, Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad).

Para el visualizado de inmunocomplejos se utilizó el sistema de detección ChemiDoc™ (Bio-Rad).

## **3.6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### ***3.6.1. Extracción de ARN***

La extracción del ARN total se realizó mediante el uso del reactivo TRIzol Reagent (Bioline) (fenol-sales de guanidina).

Para la extracción de ARN se homogeneizó entre 50 a 300 mg de tejido. Se añadió 1 mL de TRIzol y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µL de cloroformo y se mantuvo en agitación durante 15 min centrifugando a 4 °C y 12000 x g durante otros 15 min. A la fase acuosa se le añadió 0.5 mL de isopropanol, dejándose reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó a temperatura ambiente a 12000 x g durante 8 min. El ARN precipitado se lavó con 1 mL de etanol frío 75 % y la mezcla se centrifugó a 7500 x g durante 5 min. Tras eliminar el etanol, el ARN se secó y se resuspendió en agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC). El ARN total extraído fue tratado con ADNasa para eliminar los restos de DNA de las muestras.

La integridad del ARN fue comprobada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE (tampón tris-acético-EDTA) teñidos con GoldView™ (Viswagen Biotech Pvt. Ltd.). La cuantificación se realizó en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

### ***3.6.2. Síntesis de ADNc***

La síntesis de ADNc se llevó a cabo a partir de entre 500-1000 ng de ARN utilizando el kit para síntesis de ADNc SensiFAST™ (Bioline), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

El ADNc obtenido fue amplificado por PCR y analizado en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE teñidos con GoldView™.

### ***3.6.3. RT-PCR***

Las reacciones RT-PCR se realizaron con el kit SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) en un termociclador iQ5 Real time PCR (Bio-Rad). Los cebadores

empleados en esta tesis se especifican en las tablas 3. 2-3-4 desglosados dependiendo del capítulo de resultados en el que se han utilizado.

**Tabla. 3.2.** Cebadores utilizados en el capítulo Resultados II. Tratamiento postcosecha de mejora con ABA

<i>Gen</i>	<i>Nombre</i>	<i>Forward primer (5' → 3')</i>	<i>Reverse primer (5' → 3')</i>
<i>AI5L2/ABF3</i>	ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 2	CAGCAATGATGGGG GTTTA	GTCTACGCTCGAC AGTTTTCTC
<i>ATHB7</i>	Homeobox-leucine zipper protein ATHB-7	CAAAAGTTAGGCGA GCTTGTT	CTTGATGTCCTCCT CCATTCTC
<i>bHLH112</i>	Transcription factor bHLH112	TGCGGAAAGAGAAG CTAGGG	ACTGACTTGATCG TGGAGGAAC
<i>HDA6</i>	Histone deacetylase 6	CGCTTCACTTCCGTC AGGTC	GGCCGGTTGATCT CCATCC
<i>KAT2</i>	3-ketoacyl-CoA thiolase 2	TGGAGAAGGCAATC AACAGG	GCGAGCAGATCAT CAGGATAAG
<i>NAC072/RD26</i>	NAC domain-containing protein 72	CCACCACTTCTCCCT TCAAA	TGCCAACTCTTTTT CCTTCG
<i>PYL1</i>	Abscisic acid receptor PYL1	ACCTCACCCTCACC ACCTC	ATGTGAATCCTTC GCTCACC
<i>PYL4</i>	Abscisic acid receptor PYL4	AACCAGACCTGCTC CGCC	GAGGATGTGGTGT TCGTCGTC
<i>EF-1α</i>	Elongation factor-1α	GCTTGGGTGCTCGAC AAACT	TCCACAGAGCAAT GTCAATGG

**Tabla 3.3.** Cebadores utilizados en el capítulo Resultados III. Sobreexpresión y silenciamiento génico en Cucurbita pepo mediante el uso de ZYMV

<i>Gen/Construcción</i>	<i>Amplificación/características</i>	<i>Forward primer (5' → 3')</i>	<i>Reverse primer (5' → 3')</i>
<b>MYB106-like</b>	RT-PCR (170 pb)	GAAACAGGTGGTCAGCGA TAG	CAATATGAACTCCACC CTCACC
<b>ZYMV-AGII (BestF-R)</b>	Amplificación zona multiclonaje	TGTCTCAGCTATGTATGG AGCT	TTCGCCTCTTGGTTCA ACCA
<b><i>EF-1α</i></b>	Elongation factor-1α (97 pb)	GCTTGGGTGCTCGACAAA CT	TCCACAGAGCAATGTC AATGG
<b>MYB106-like-sobreexpresión</b>	Clonaje enzimas de restricción <b>PstI-SalI</b>	atctgcagagtGGAACCTCTCCT CGCCG	CATTCTCGGCGGCGAG TTCgtcgacat
<b>MYB106-AS</b>	Clonaje Antisentido <b>SalI-PstI</b>	atgtcgacAAAGAACGGATAA CGAGATC	CCAAGCTGCAACCAAT TCCActgcagat
<b>MYB106-HA</b>	Clonaje <b>PstI-SalI</b>	atctgcagagtGGAACCTCTCCT CGCCG	CATTCTCGGCGGCGAGTT CTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTgtcgacat

**Tabla 3.4.** Cebadores utilizados en el capítulo Resultados IV. Regeneración y transformación de *Cucurbita pepo*

<i>Gen/Construcción</i>	<i>Amplificación</i>	<i>Forward primer</i> (5' → 3')	<i>Reverse primer</i> (5' → 3')
<b>GUS</b>	Comprobación plásmido (588 pb)	CCGTCCCAAGCAGTTACA AT	TTCGGAATCTCCACGTT ACC
<b>GUS2</b>	Comprobación transformación planta (100 pb)	GAATACGGCGTGGATACG TTAG	GATCAAAGACGCGGTGAT ACA

### 3.6.4. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se siguió el protocolo establecido por Dellaporta et al. (1983). El material vegetal previamente congelado con nitrógeno líquido fue homogeneizado con 700 µL del tampón de extracción Dellaporta (Tabla 3.5) y a la mezcla se le añadió 100 µL dodecil sulfato sódico (SDS) (10 %). Tras una incubación de 10 minutos a 65 °C, se le añadió 250 µL de acetato potásico y se mezcló vigorosamente. Se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 13000 x g durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con 500 µL de isopropanol y se incubó 12 horas a -20 °C. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y una vez descartado el sobrenadante, se lavó con etanol a 70 %. Por último, se eliminó el etanol centrifugando a 13000 rpm por 5 min y se resuspendió el ADN en agua incubándola a 65 °C 10 min.

**Tabla 3.5.** Composición tampón Dellaporta

<b>Tampón Dellaporta</b>	
Tris pH 8	100 mM
EDTA pH 8	50 mM
NaCl	500 mM
β-Mercaptoetanol	10 mM

La integridad del ADN fue comprobada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE teñidos con GoldView™ (Viswagen Biotech Pvt. Ltd.). La cuantificación se realizó mediante NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

### 3.6.5. Extracción de DNA plasmídico

El ADN plasmídico se aisló mediante el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB). El precipitado de bacterias se resuspendió completamente con 250 µL de tampón Stett (Tabla 3.6). A la suspensión se le añadió 4 µL de lisozima, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente se calentó a 100 °C durante 45 s y se centrifugó a 13000 x g durante 10 min. Se descartó el precipitado y al sobrenadante se le añadió 20 µL/mL (volumen del cultivo original) de ARNasa, y se incubó durante 15 min a 37 °C. Se le añadió 8 µL de CTAB al 5 % a 37 °C mezclándose por inversión y centrifugándose durante 5 min. El precipitado se disolvió en 0,2 volúmenes de NaCl 1,2 M y 0,5 volúmenes de etanol frío 96%. Se recuperó el precipitado por centrifugación, 13000 x g durante 10 min, y se lavó con etanol frío 70 %. El precipitado tras secarse se disolvió en 20 µL H<sub>2</sub>O.

**Tabla 3.6.** Composición tampón Stett

<b>Tampón Stett</b>	
Tris-HCl pH 8	100 mM
EDTA pH 8	50 mM
Tritón X-100	0.1 %
Sacarosa	8 %

El otro método utilizado para la extracción de plásmido o minipreparaciones fue utilizando kits comerciales de las casas Thermo Fisher y Canvax.

La integridad del ADN fue comprobada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE teñidos con GoldView™ (Viswagen Biotech Pvt. Ltd.). La cuantificación se realizó en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

### ***3.6.6. Análisis de restricción de ADN***

Se utilizaron las endonucleasas de restricción suministradas por Thermo Fisher. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante, utilizándose de forma general incubaciones de entre 30 min a 3 h a 37 °C tras lo cual se inactivaban las enzimas. La eficiencia de las restricciones se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### ***3.6.7. Ligación***

Se calcularon las proporciones adecuadas con la ayuda del software NEBcalculator (v1.10.1) de New England Biolabs. Se mezclaron el vector y fragmento siguiendo el protocolo establecido por el kit T4 DNA ligase (Canvax Biotech). Los productos de la ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes.

Los plásmidos comerciales utilizados para este fin fueron pSPARK y pMBL (Canvax Biotech).

### ***3.6.8. Amplificación del ADN por PCR***

Se realizó siguiendo las especificaciones de los fabricantes, dependiendo de la finalidad de la amplificación se usaron: Horse-Power Taq DNA polymerase (para fragmentos no destinados a secuenciación) y FastPANGEA High Fidelity DNA Polymerase (para secuenciación), ambas enzimas de Canvax Bioline.

La amplificación fue comprobada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE teñidos con GoldView™ (Viswagen Biotech Pvt. Ltd.).

### ***3.6.9. Secuenciación del ADN***

La secuenciación del ADN se realizó en los servicios de secuenciación del centro de instrumentación científica de la Universidad de Granada con el secuenciador masivo MiSeq-Illumina.

### 3.7. MANIPULACIÓN DE *E. COLI*

#### 3.7.1. Preparación de *E. coli* competentes

Las células de *Escherichia coli* competentes se prepararon según el protocolo descrito por Hanahan (1983). Se incubaron a 37 °C durante toda la noche en medio Luria-Bernati (LB) compuesto por triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, y NaCl 0.5 % a pH 7. Tras su crecimiento se inocularon 4 mL del cultivo inicial en 100 mL del medio LB líquido con MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Se incubó hasta que el cultivo bacteriano alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,6-0,7. Se transfirieron a un tubo de centrifuga y se incubaron 15 min en hielo. Las células se recuperaron por centrifugación a 4000 x g por 10 min a 4°C y se resuspendieron en 32 mL de tampón RF1 (Tabla 3.7), manteniendo en hielo durante 15 min. Las células se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones y se recuperaron en 4 mL de tampón RF2 (Tabla 3.7). Las células se alicuotaron para su almacenaje a -80 °C o para su utilización inmediata.

**Tabla 3.7.** Soluciones RF1 y RF2

<b>RF1</b>	
Acetato potásico	30 mM
RbCl	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glicerol	12 %
<b>RF2</b>	
MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glicerol	12 %

#### 3.7.2. Transformación de *E. coli*

Se añadieron de 0.1 a 1 µg de DNA plasmídico o 5 µL de producto de ligación a una alícuota de 100 µL de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 1 h. Seguidamente se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se volvió a incubar en hielo. Transcurridos 5 minutos le añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1-2 h. Se sembraron entre 100-200 µL en placas Petri

con medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C y se seleccionaron las colonias.

### **3.8. MANIPULACIÓN DE *A. TUMEFACIENS***

#### ***3.8.1. Preparación de células electrocompetentes***

Las cepas de *A. tumefaciens* se cultivaron durante 24 horas en medio LB con los antibióticos adecuados. Se tomaron 5 mL del cultivo inicial y se crecieron a 28 °C en 250 mL de medio LB sin antibióticos. Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.5, se centrifugó el cultivo a 2900 x g a 4 °C durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250 mL de tampón HEPES 1 mM pH 7. Se centrifugó nuevamente a 2000 x g 20 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 mL de tampón HEPES 1mM pH 7. Se centrifugaron las bacterias dos veces más resuspendiendo el pellet en 50 mL de HEPES 1 mM pH 7, añadiendo en la última centrifugación un 10 % de glicerol. Tras la última centrifugación el pellet se resuspendió en 1 mL HEPES 1 Mm pH 7 y 10 % de glicerol. Las bacterias se alicuotaron para su almacenaje a -80 °C o para su utilización inmediata.

#### ***3.8.2. Transformación por electroporación***

Para la electroporación de *A. tumefaciens* se utilizó entre 25-50 ng de plásmido. La mezcla de las bacterias electrocompetentes y el plásmido se depositaron en una cubeta de electroporación preenfriada, evitando de esta forma posibles choques térmicos. Tras realizar la electroporación en un electroporador BioRad Micopulser, se añadió 500 µL de medio SOC (Tabla 3.8) incubándose las bacterias transformadas durante 3 h en agitación a 28 °C. Se sembraron entre 100-200 µL de bacterias en placas Petri con medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas se incubaron 24 h a 28 °C.

**Tabla 3.8.** Medio de cultivo SOC

<b>SOC</b>	
Glucosa	20 mM
Triptona	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
KCl	2.5 mM

### 3.9. VECTORES VÍRICOS E INFECCIÓN

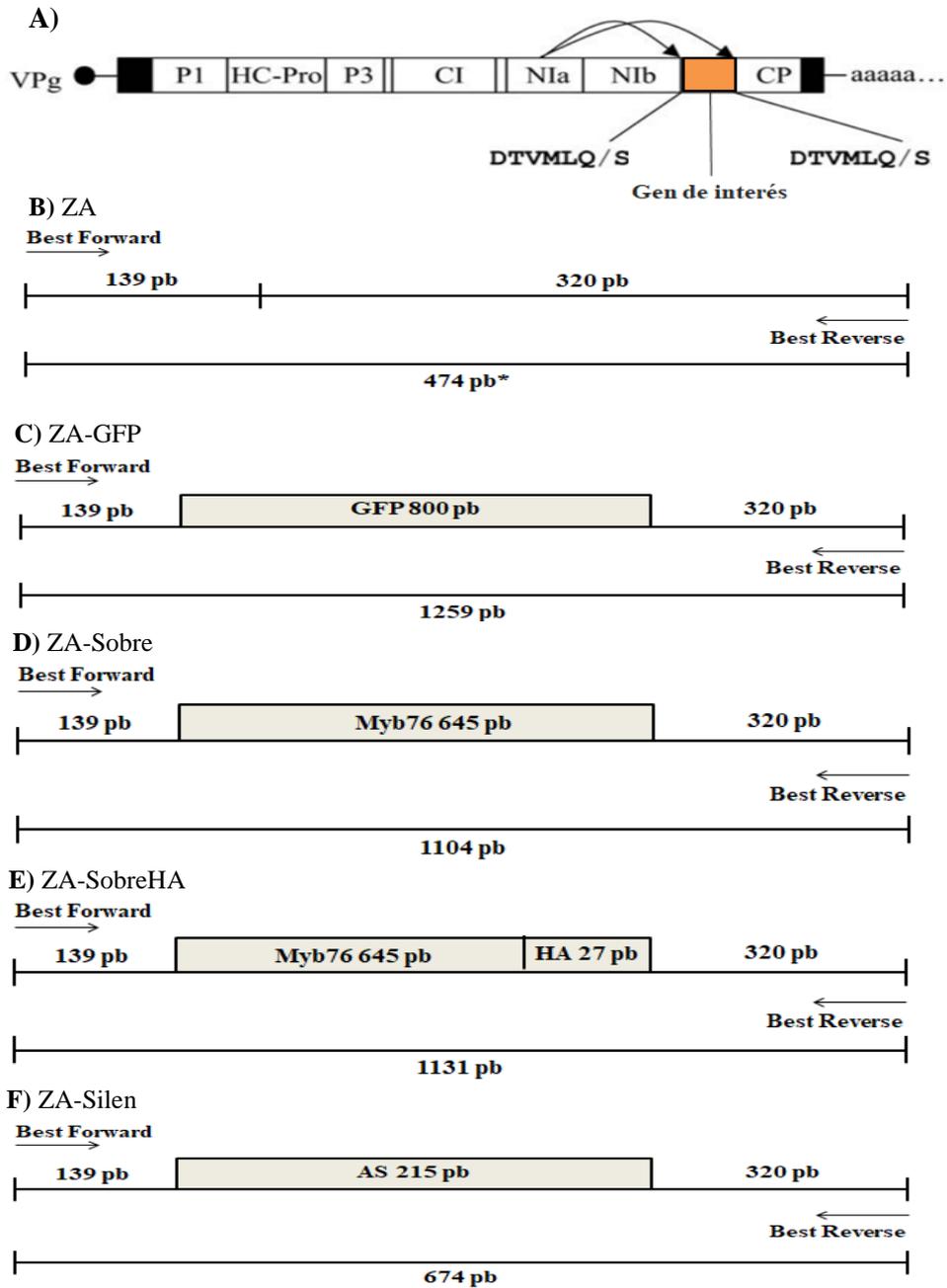
#### 3.9.1. Construcción de los vectores víricos

Para la construcción los vectores víricos ZA-GFP, ZA-Sobre, ZA-SobreHA, ZA-Silen y ZF-Sobre, el gen MYB106 se amplificó y se insertó en el vector atenuado ZYMV-AGII entre las regiones codificantes de la proteína de la cápside y de la replicasa Nib, tal como se muestra en la Figura 3.1 dando lugar a las distintas construcciones empleadas en la infección de *C. pepo*. Esa región Nib/CP incluye una secuencia de 15 pb con sitios de restricción. Para poder realizar la ligación entre el vector y las distintas secuencias a insertar, se añadieron a los cebadores de amplificación las enzimas PstI y SalI (Tabla 3.3.).

La construcción ZA-Sobre contiene el gen *MYB106* completo para realizar la sobreexpresión (Fig. 3.1D); mientras que la construcción ZA-SobreHA contiene además un fragmento de 27 pb del gen de la hemaglutinina del virus de la influenza humana que codifica para la Tag-HA, un péptido que se emplea en el etiquetado de proteínas para facilitar su detección o purificación (Fig. 3.1E). Por otro lado, la construcción ZYMV-AGII-AS contiene un fragmento de 215 del gen en antisentido (AS) (Figuras 3.1F).

El vector vírico ZYMV-AGII fue desarrollado y cedido por el laboratorio del Dr. Amit Gal-On (Volcani Center, Israel). El vector contaba con el promotor

CaMV 35S y el terminador NOS del plásmido pGREEN, además de resistencia a kanamicina.



**Figura 3.1.** A.- Representación esquemática del lugar de inserción de los genes de interés en el vector vírico ZYMV-AGII. B-F.- Detalle de las diferentes construcciones.

### **3.9.2. Infección a través de biolística**

Para la infección y por consiguiente la transformación transitoria, el método empleado fue la biolística, con pistola de ADN (*shooting*). Esto se realizó gracias a la colaboración con el Dr. Amit Gal-On (Volcani Center, Israel) y también a la colaboración con el Dr. Jesús Navas (Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Málaga).

Para la inoculación de los constructos mediante biolística se siguió el protocolo de Gal-On et al. (1995). A 35  $\mu\text{L}$  de una solución de tungsteno (Bio-Rad) con una concentración 100 mg/mL se le añadió 10  $\mu\text{L}$  de cada virus (a una concentración de 50 ng/ $\mu\text{L}$ , suspendido en agua) y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M. La mezcla se agitó durante 1 minuto. Posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 2 segundos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de etanol 100% manteniéndose en hielo. Tras lo cual se realizaron dos disparos por cotiledón con 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla. Los cotiledones correspondían a plántulas a los 8-10 días de la germinación.

### **3.9.3. Transformación con abrasivo**

Para la propagación del virus de los vectores inoculados previamente en *C. pepo*, y tras comprobarse su infectividad y correcta presencia en la planta, se llevó a cabo una infección con hojas infectadas anteriormente utilizando para ello un abrasivo.

Para realizar la infección, se tomaron porciones de las hojas de plantas infectadas con los distintos constructos, se maceraron y se impregnaron los cotiledones/hojas de las plantas a infectar, que habían sido espolvoreados previamente con el abrasivo carborundo (o carburo de silicio) (Carlo Erba Reagenti).

Con este tipo de técnica fueron infectadas plantas en estadio de cotiledón (8-10 días), y plantas adultas (27-30 días).

### 3.10. CULTIVO *IN VITRO* DE *CUCURBITA PEPO*

#### 3.10.1. Preparación semillas

Se emplearon semillas de *C. pepo* L. de las variedades Muc-16 (cultivar español tradicional) y Cavili (híbrido comercial). Se sumergieron durante 10 minutos en agua y se eliminaron las testas con pinzas y bisturí (Fig. 3.2A). Las semillas peladas se desinfectaron durante 15 minutos en hipoclorito de sodio al 1 % (p / v) con dos gotas de Tween 20. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril 5 veces. Las semillas esterilizadas se germinaron a  $25 \pm 2$  °C en la oscuridad durante 3 días en medio Murashige y Skoog (MS) basal (Tabla 3. 9) (Fig. 3. 2B) (Murashige y Skoog, 1962) con 2 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) y 1 mg/L de ácido abscísico (ABA), y Agar a 0.8 % (p/v) (Medio de siembra, Tabla 3. 10) en placas de Petri. El pH se ajustó a 5.7 antes de la adición de agar y se esterilizó en autoclave.

**Tabla 3. 9.** Composición del medio Murashige y skoog (MS)

Macronutrientes (g/L)	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65
KNO <sub>3</sub>	1.9
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.37
CaCl <sub>2</sub> .aq	0.33
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17
Micronutrientes (mg/L)	
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> .EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8

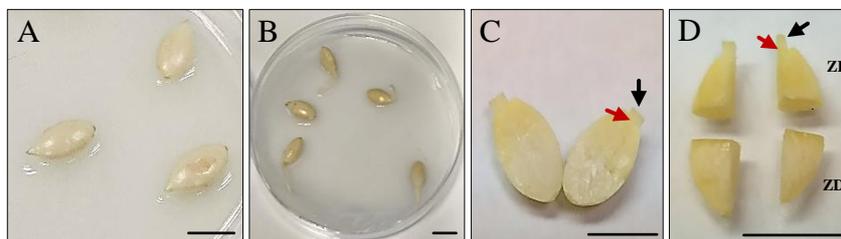
Vitaminas (mg/L)	
Myo-Inositol	100
Tiamina HCl	0.1
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2
Piridoxina HCl	0.5

**Tabla 3. 10.** Composición del medio de siembra para las semillas de *C. pepo*.

Medio de siembra	
MS	x1
Sacarosa	30 g/l
ABA	1 mg/l
BAP	2 mg/l
Agar	0.8 %
pH 5.7-5.8 (1 N NaOH)	

### 3.10.2. Preparación de explantes de cotiledón para regeneración

Partiendo de las semillas germinadas los brotes y raíces iniciales se eliminaron conservando una parte de 2-1 mm del hipocótilo (Fig. 3. 2C) (Ananthkrishnan et al., 2003). Los cotiledones se cortaron longitudinalmente y posteriormente se dividieron por la mitad, dejando dos explantes proximales que presentaban hipocótilo y dos distales carentes de esta parte (Fig. 3. 2D). Ambas partes fueron utilizadas en los estudios de regeneración.



**Figura 3. 2.** Semillas de *C. pepo* cv. Cora tras la desinfección y eliminación de la testa (A). Imagen de las semillas tras 3 días de desarrollo en oscuridad (B). Separación de los cotiledones donde previamente se ha eliminado la raíz iniciada y el eje meristemático, permaneciendo un hipocótilo de 1-2 mm de longitud (C-D).

### 3.10.3. Regeneración in vitro

Los explantes cotiledonarios se colocaron en medio MS (pH 5.7), 30 g/L de sacarosa, agar al 0.8 % (p/v) y se complementaron con cuatro combinaciones hormonales diferentes (Tabla 3.11): MSA (2 mg/L BAP + 0.1 mg/L GA3), MSB (1 mg/L BAP + 0.1 mg/L GA3), MSC (0.1 mg/L BAP + 1 mg/L GA3) y MSD (0.1 mg/L BAP + 2 mg/L GA3). Estos medios se refrescaron cada 2 semanas de cultivo. Los explantes se incubaron a  $25 \pm 2$  °C en 16 / 8 horas en fotoperíodo luz/oscuridad.

Se registró la evolución en la regeneración de los distintos tipos de explantes y en los diferentes medios. El porcentaje de explantes sanos se expresó como Greening rate, siendo este el porcentaje de explantes verdes y que crecían normalmente con respecto al número total de explantes.

Se cuantificó la eficiencia en la inducción de brotes, calculado como el porcentaje de cotiledones que desarrollaban brotes con respecto al total, y eficiencia en la inducción de raíces, expresado como el porcentaje de cotiledones que desarrollaban raíces con respecto al total.

**Tabla 3.11.** Medios utilizados en la regeneración de *C. pepo*.

Componentes	MSA	MSB	MSC	MSD
<b>MS</b>	x1	x1	x1	x1
<b>Vitaminas</b>	x1	x1	x1	x1
<b>Sacarosa (g/L)</b>	30	30	30	30
<b><sup>1</sup>BAP (mg/L)</b>	2	1	0,1	0,1
<b><sup>2</sup>GA<sub>3</sub> (mg/L)</b>	0,1	0,1	1	2
<b>Agar (%)</b>	0,8	0,8	0,8	0,8

<sup>1</sup>BAP: 6-bencilaminopurina.

<sup>2</sup>GA<sub>3</sub>: Giberelina

### 3.11. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *C. PEPO*

#### 3.11.1. Cepa bacteriana y vector binario utilizados

Para el estudio de la transformación en *C. pepo* se utilizaron cuatro cepas diferentes de *Agrobacterium tumefaciens*, AGLO, AGL1 y GV3101. El plásmido utilizado en este trabajo fue pGFPGUSplus (Addgene plasmid # 64401; <http://n2t.net/addgene:64401> ; RRID:Addgene\_64401), que consta de 13701 pb y es usado para estudios sobre expresión genética y mejora en la transformación genética de plantas (Binary vector pGFPGUSplus, complete sequence, 2007) (Figura 3.3). Porta tres casetes de expresión para: proteína de fluorescencia verde (GFP), enzima  $\beta$ -glucuronidasa e higromicina fosfotransferasa II (HptII). El promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) controla cada gen en estas

construcciones (Vickers et al., 2007). La selección de plásmidos en bacterias se realizó con kanamicina y para la transformación de cotiledones, higromicina.

Las cepas de *Agrobacterium* utilizadas para la transformación se cultivaron en medio LB (pH 5.2) suplementado con 10 mM ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES), acetosiringona 20 µM, 50 mg/L de kanamicina y los antibióticos específicos para cada cepa utilizada (Tabla 3.12). Se crecieron a una temperatura 28 °C hasta que se logró una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Antes de la inoculación de los explantes, las cepas de *Agrobacterium* se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, y posteriormente, se resuspendieron y agitaron durante 2 horas en el medio de inoculación (IN) (Tabla 3.13), aumentando la concentración de acetosiringona a 200 µM y ajustándose el pH a 5.2 (Nanasato et al., 2013).

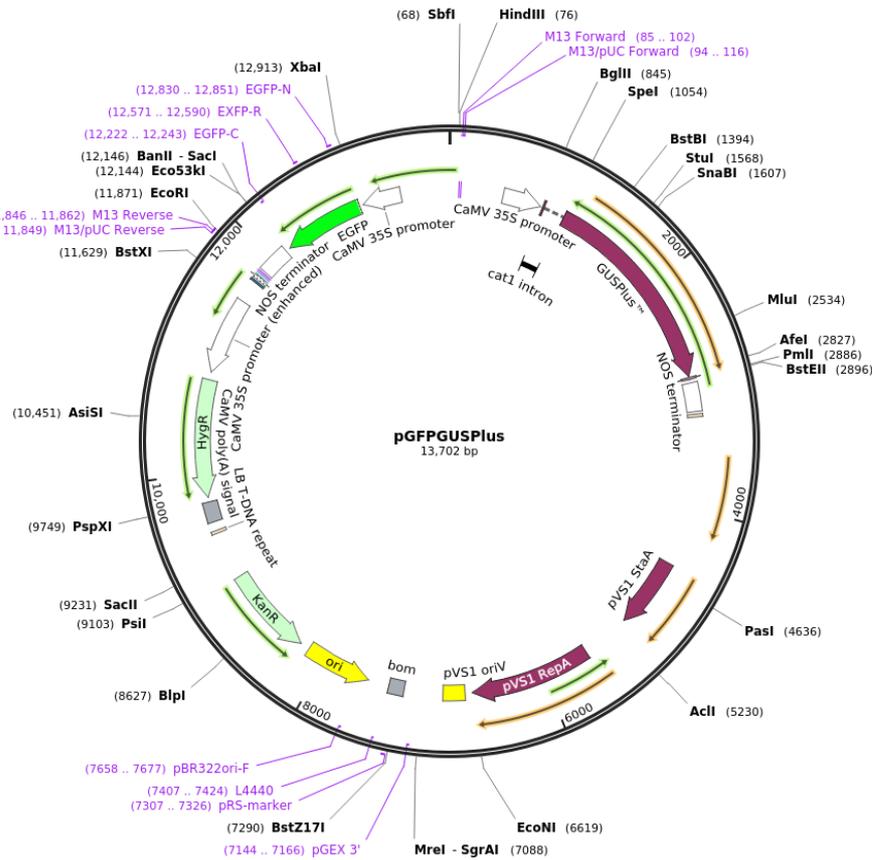


Figura 3.3. Esquema plásmido pGFPGUSPlus creado mediante SnapGene.

**Tabla 3.12.** Antibióticos selectivos para cada cepa de *Agrobacterium*

<b>Cepa <i>Agrobacterium</i></b>	<b>Rifampicina</b>	<b>Carbemicilina</b>
<b>AGL0</b>	15 mg/L	-
<b>AGL1</b>	-	50 mg/L
<b>GV3101</b>	15 mg/L	-

**Tabla 3.13.** Medio IN utilizado para el cocultivo de *Agrobacterium* y *C. pepo*

<b>MEDIO IN</b>	
<b>MS</b>	x1
<b>Sacarosa</b>	30 g/L
<b>ABA</b>	1 mg/L
<b>BAP</b>	2 mg/L
<b>1 M MES</b>	10 mL/L
<b>Acetosiringona</b>	200 $\mu$ M
pH 5.2 (1 N NaOH)	

### ***3.11.2. Preparación de la explantes de cotiledón***

La preparación de los cotiledones para la transformación se realizó siguiendo el mismo protocolo que se describe en el apartado 3.x.2 de regeneración, con las siguientes excepciones. Sólo se utilizó la parte del cotiledón proximal con hipocótilo (ZP) (Fig. 3.2D) y las semillas se dejaron 24 h en el medio de siembra (Tabla 3.10) antes de ser cortadas para el protocolo de transformación.

### ***3.11.3. Transformación de explantes cotiledonarios, cocultivo con *Agrobacterium* y regeneración en medio selectivo***

Los explantes cotiledonarios se sumergieron en cada cultivo de *Agrobacterium* y se sometieron a dos pulsos de vacío durante 5 minutos a - 0.080 MPa siguiendo el protocolo de Nanasato et al. (2013). Se eliminó el exceso de bacterias y los explantes inoculados se colocaron en una placa de Petri con papel de

filtro estéril y 5 mL de medio de cocultivo (Ozawa, 2009). Después de tres días en cocultivo a 25 °C y oscuridad, los explantes se lavaron 5 veces con agua estéril y se colocaron en medio MSC (Tabla 3.11) con higromicina 20 mg/L y 500 mg/L de cefotaxima. Los explantes transformados se incubaron a  $25 \pm 2$  °C en 16/8 horas en fotoperiodo luz/oscuridad. El medio selectivo se refrescó cada dos semanas.

Se realizaron tres repeticiones independientes con un mínimo en cada una de ellas de 32 explantes por variedad y cepa bacteriana. Se recogieron datos periódicamente del número de nuevos brotes, número de brotes por explante, raíces y plantas.

### **3.12. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES MARCADORES**

#### ***3.12.1. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS)***

Los ensayos de actividad de GUS *in situ* fueron realizados siguiendo la metodología descrita por Jefferson et al. (1987), con algunas modificaciones. El sustrato utilizado fue el 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-glucuronido (X-Gluc) que al ser hidrolizado por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, producto del gen *gus*, produce un precipitado azulado. Las hojas o fragmentos de cotiledones objeto de estudio, se sumergieron en el tampón de reacción GUS (fosfato de sodio (100 mM), EDTA (10 mM), Tritón X-100 (0.1 %), ferricianuro de potasio (0.5 mM) pH 7.0, adicionándole 1 g/L del sustrato X-Gluc. La incubación se realizó en oscuridad durante 12 horas a 37 °C. Posteriormente, el material fue sometido a sucesivos lavados con etanol al 70 %. Finalmente, y mediante observación en lupa Olympus (SZ-ST) se detectaron los explantes/hojas que presentaron coloración azul.

#### ***3.12.2. Evaluación de GFP***

Para detectar la expresión de GFP se utilizó un microscopio de fluorescencia (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Las imágenes de la GFP se obtuvieron a una longitud de onda de excitación de 480 nm y a un filtro de emisión 510-525 nm.

### 3.13. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Para la búsqueda de la secuencia del gen MYB106-like en diferentes organismos, y en particular en *C. pepo* se usó la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para la obtención de la secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica se utilizó el software “ExPasy Translate Tool” (<http://web.expasy.org/translate/>). Dicho software traduce la cadena de nucleótidos introducida en los 6 posibles marcos de lectura. El marco de lectura abierto (Open Reading Frame, ORF) de mayor longitud fue seleccionado como representante de la secuencia aminoacídica codificada por el gen.

Con el propósito de señalar los dominios conservados y las homologías de la proteína MYB106-like se realizó la búsqueda de proteínas ortólogas en las bases de datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) y NCBI.

Para entender la relación y similitud de la entre la secuencia del factor de transcripción MYB106-like en calabacín, con el grupo de proteínas ortólogas previamente seleccionadas, se procedió a la construcción de un árbol filogenético mediante los softwares bioinformáticos PhyML y TreeDyn mediante el método de máxima verosimilitud ([http://phylogeny.lirmm.fr/phylo\\_cgi/index.cgi](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/index.cgi)) (Dereeper et al., 2008; Guindon et al., 2010).

La construcción del alineamiento múltiple con las secuencias aminoacídicas se realizó mediante el programa Jalview V.2 (<https://www.jalview.org/>) (A. M. Waterhouse et al., 2009). Para identificarlos dominios conservados que se observaron en el alineamiento múltiple se usó la base de dato Pfam (Instituto europeo de bioinformática) (El-Gebali et al., 2019). La estructura secundaria de la proteína se obtuvo con el programa I-Tasser (Roy et al., 2010). La estructura terciaria se modelizó *in silico* mediante SWISS-MODEL (Biozentrum. University of Basel) (A. Waterhouse et al., 2018).

El interactoma del FT MYB106-like se realizó mediante el programa STRING (Szklarczyk et al., 2019), una base de datos biológica y un recurso web de interacciones proteína-proteína conocidas y previstas.

# 4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*RESULTS AND  
DISCUSSION*





# I

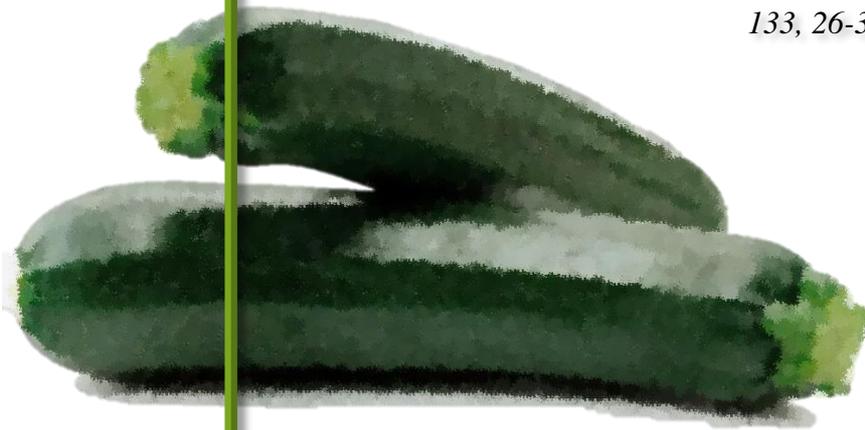
## CAPÍTULO

### Tratamiento postcosecha de mejora con ABA

*Carvajal, F., Palma, F., Jiménez-Muñoz, R.,  
Jamilena, M., Pulido, A., & Garrido, D. (2017)*

*Unravelling the role of abscisic acid in chilling  
tolerance of zucchini during postharvest  
cold storage.*

*Postharvest Biology and Technology*  
*133, 26-35.*





## **I.1. INTRODUCCIÓN**

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que desempeña un papel crucial en diferentes procesos del desarrollo de la planta, siendo además un regulador principal de la resistencia y la respuesta adaptativa frente a numerosos estreses ambientales, especialmente aquellos que inducen la deshidratación como sequía, alta salinidad, y baja temperatura (Mehrotra et al., 2014; Sah et al., 2016). En estas condiciones desfavorables, las plantas acumulan ABA, y esta fitohormona activa la expresión de numerosos genes relacionados con el estrés que se encuentran involucrados en la regulación de la expresión génica, la transducción de señales y la adquisición de tolerancia al estrés para soportar un entorno adverso. Esta respuesta implica primero la percepción de la señal y posteriormente la activación de los genes inducidos por ABA. Con respecto a la percepción de la señal, se han descrito diferentes receptores de ABA, pertenecientes a la familia PYR/PYL/RCAR (PYRabactin resistance/PYrabactin resistance-Like/Regulatory Component of ABA Receptor), que incluye receptores monoméricos (PYL4-6, PYL8-10) y diméricos (PYR1, PYL1-3), presentando los receptores monoméricos una mayor afinidad por el ABA (Dupeux et al., 2011; Finkelstein, 2013; Pizzio et al., 2013). Estos receptores forman un complejo estable con el ABA y una proteína fosfatasa 2C del grupo A (PP2C), este complejo inactiva la fosfatasa y permite la autofosforilación de proteínas quinasas pertenecientes a la familia SnRK2 (Sucrose non-fermenting 1 (SNF1)-related protein kinase 2), iniciándose así la respuesta de ABA (Finkelstein, 2013). Los genes inducidos por ABA contienen en su región promotora un dominio consenso conocido como elemento sensible a ABA (ABRE, ABA-Responsive Element) (Y. Fujita et al., 2011). Los factores de transcripción (FTs) que se unen a estos elementos ABRE son los miembros de la familia ABF/AREB (ABRE Binding Factor/ABA-Responsive Element Binding Factor); que presentan

una cremallera de leucina (bZIP, Leucine Zipper Basic) en su secuencia (Yoshida et al., 2010).

En relación al desarrollo del fruto, se ha podido comprobar la importante implicación del ABA en la regulación de la maduración, tanto en frutos climatéricos como no climatéricos, como tomate, fresa y cereza dulce (J. Chen et al., 2016; Teribia et al., 2016; Mei Zhang et al., 2009). En los frutos climatéricos, se ha detectado un aumento del contenido en ABA que precede al pico de etileno, mientras que en los frutos no climatéricos, el ABA parece jugar un papel más importante que el etileno en la maduración (McAtee et al., 2013; Osorio et al., 2013; Vallarino et al., 2015). Recientemente se ha descrito una gran acumulación de ABA durante la maduración del fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.), una especie no climatérica, así como una inducción de la maduración del fruto mediante la aplicación exógena de esta fitohormona (P. Chen et al., 2016). Sin embargo, la relación entre el metabolismo de ABA y el comportamiento del fruto durante el almacenamiento postcosecha no se ha estudiado en profundidad.

El manejo postcosecha de muchos frutos generalmente incluye el almacenamiento a temperaturas que disminuyen su frecuencia respiratoria para evitar el deterioro y la maduración, lo que significa que los frutos tienen que resistir diferentes estreses antes de llegar al consumidor. Las bajas temperaturas, por encima del punto de congelación (0–15 °C), provocan daños en frutos tropicales y subtropicales que se conocen como daños por frío (DF). El fruto del calabacín, debido a su origen subtropical, es susceptible de desarrollar este trastorno fisiológico. Además, el calabacín se cosecha en una etapa inmadura, lo que hace que al ser almacenado en frío sea más susceptible a sufrir deshidratación y desarrollar DF debido a su metabolismo acelerado (Mohammed y Brecht, 2003). Varios estudios han demostrado que la susceptibilidad al frío en el calabacín depende de la variedad (Carvajal et al., 2011; Megías, Manzano, et al., 2016). Estos autores seleccionaron Natura y Sinatra como las variedades comerciales con un comportamiento más

contrastante, siendo Natura la variedad más tolerante al frío y Sinatra la más sensible (Carvajal et al., 2014; Palma, Carvajal, Jamilena, et al., 2014; Palma, Carvajal, Lluch, et al., 2014). En frutos de otras especies, como uva y piña, el ABA induce respuestas fisiológicas que ayudan a disminuir los daños que aparecen después del almacenamiento en frío en la postcosecha (Cantín et al., 2007; Qin Zhang et al., 2015). Sin embargo, otros estudios muestran el papel opuesto del ABA con respecto a la sensibilidad al frío, así ocurre en la mandarina (Gosalbes et al., 2004; Lafuente et al., 1997). Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo ha sido desentrañar la implicación del ABA en la respuesta al frío durante el almacenamiento postcosecha en el fruto de calabacín. Para este propósito, se estudió la biosíntesis y la respuesta a ABA en las variedades Natura y Sinatra para comparar y contrastar el comportamiento de estas dos variedades.

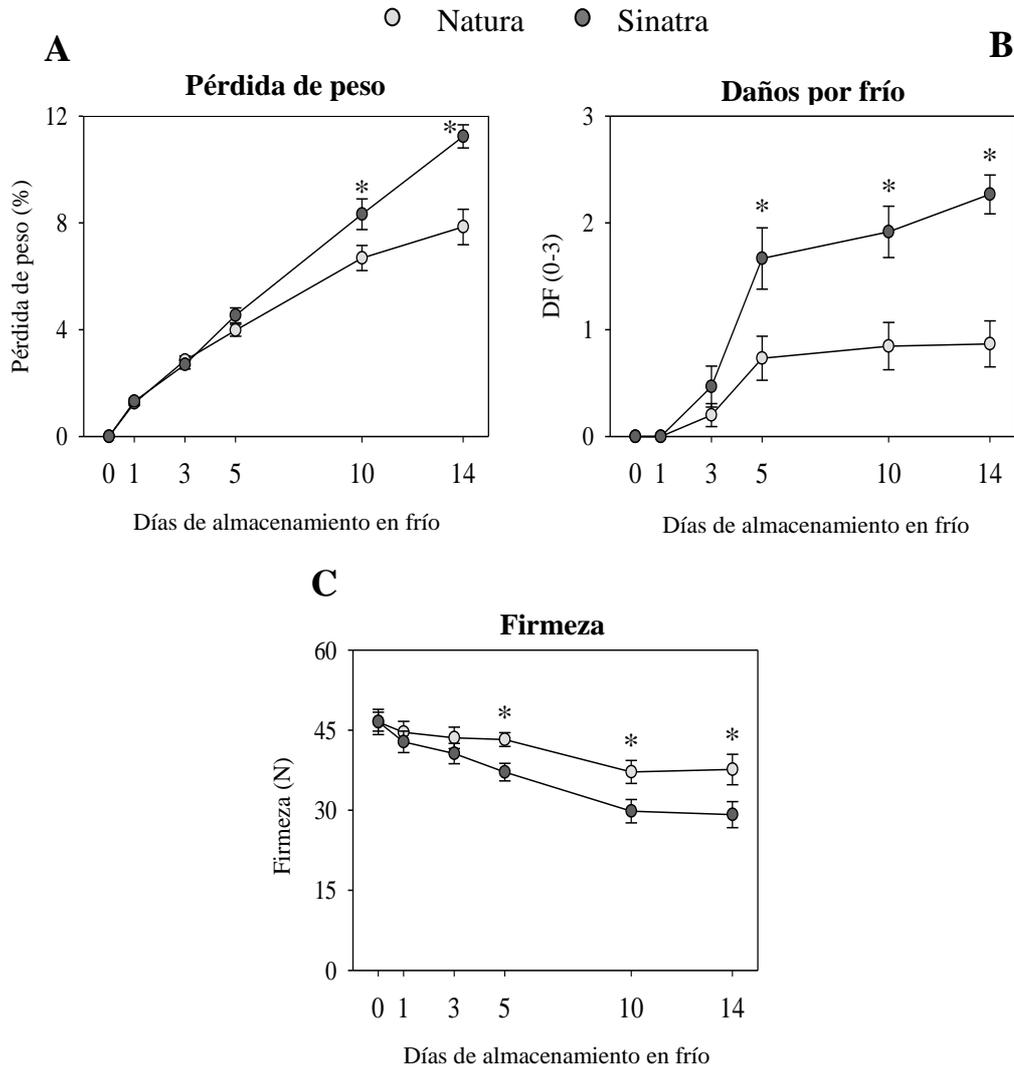
## **I.2. RESULTADOS**

### ***I.2.1. Correlación entre la tolerancia al frío y la producción de ABA en el fruto de calabacín***

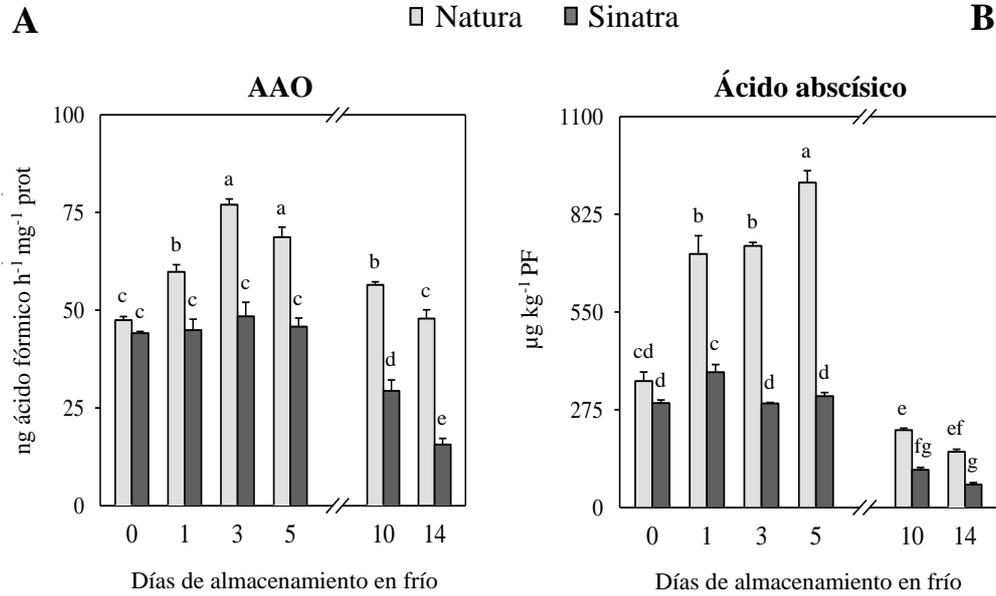
En un primer experimento, los frutos de la variedad tolerante al frío Natura, y la sensible al frío Sinatra, se utilizaron para evaluar la calidad de la postcosecha a lo largo del almacenamiento a baja temperatura, así como la biosíntesis, percepción y señalización de ABA. Los cambios en la pérdida de peso, el índice de DF y la firmeza de los frutos mantenida a 4 °C se muestran en la Fig. I. 1. Durante un corto período de almacenamiento, ambas variedades registraron una pérdida de peso similar, pero después de 5 días, Sinatra sufrió una mayor pérdida de peso que los frutos de Natura (Fig. I. 1A). Al final del almacenamiento postcosecha, las diferencias en este parámetro de calidad entre variedades fueron de alrededor del 4 %. Los síntomas de DF fueron visibles después de 3 días de almacenamiento en frío, mostrando Sinatra más daños que Natura después de 5 días, con un índice de DF que fue

2.6 veces mayor al final del experimento (Fig. I. 1B). La firmeza medida en la región central de los frutos sin exocarpo disminuyó con el almacenamiento a baja temperatura, y esta disminución fue mayor en Sinatra que en Natura después de 5 días de almacenamiento (Fig. I. 1C), siendo las diferencias significativas a partir de ese día, al igual que ocurrió con los DF.

El paso final de la ruta de biosíntesis de ABA consiste en la oxidación del aldehído de ABA en ácido abscísico, proceso catalizado por la enzima abscísico aldehído oxidasa (AAO). La actividad de esta enzima y el contenido en ABA se analizaron en el exocarpo de los frutos y los resultados se representan en la Fig. I. 2. La actividad AAO solo aumentó en la variedad tolerante al frío Natura, alcanzando su nivel más alto al tercer día de almacenamiento (Fig. I. 2A). En consecuencia, el contenido de ABA aumentó drásticamente en Natura, presentando después de las primeras 24 h de exposición al frío, valores que duplicaron los encontrados en los frutos antes de su almacenaje. A partir de entonces, el contenido de ABA en frutos de Natura durante su almacenamiento en frío continuó aumentando hasta alcanzar su nivel máximo después de 5 días, lo que corresponde a 2.6 veces el valor encontrado en los frutos recién cosechados. Con respecto al nivel de ABA en los frutos de Sinatra, solo se detectó un incremento del 7 % después de 24 h a 4 °C en comparación con el valor inicial. En el almacenamiento a largo plazo, 14 días, el contenido en ABA disminuyó significativamente en los frutos de ambas variedades con respecto a los frutos recién cosechados. Analizando la posible correlación entre la calidad postcosecha y el contenido de ABA en el fruto de calabacín, se encontró una significativa correlación negativa entre la pérdida de peso (-0.68), el índice de DF (-0.67) y los niveles de ABA, y una correlación positiva entre la firmeza (0.85) y el contenido en ABA.



**Fig. I. 1.** Pérdida de peso (A), índice de daños por frío (DF) (B), y firmeza en la parte central (C) en frutos de calabacín de las variedades Natura y Sinatra almacenados a 4 °C. Los datos representan las medias  $\pm$  SE de tres réplicas compuestas por 6 frutos cada una. Los asteriscos indican diferencias significativas entre variedades para un mismo periodo de almacenamiento en frío de acuerdo con el test de Fisher ( $p < 0.05$ ).



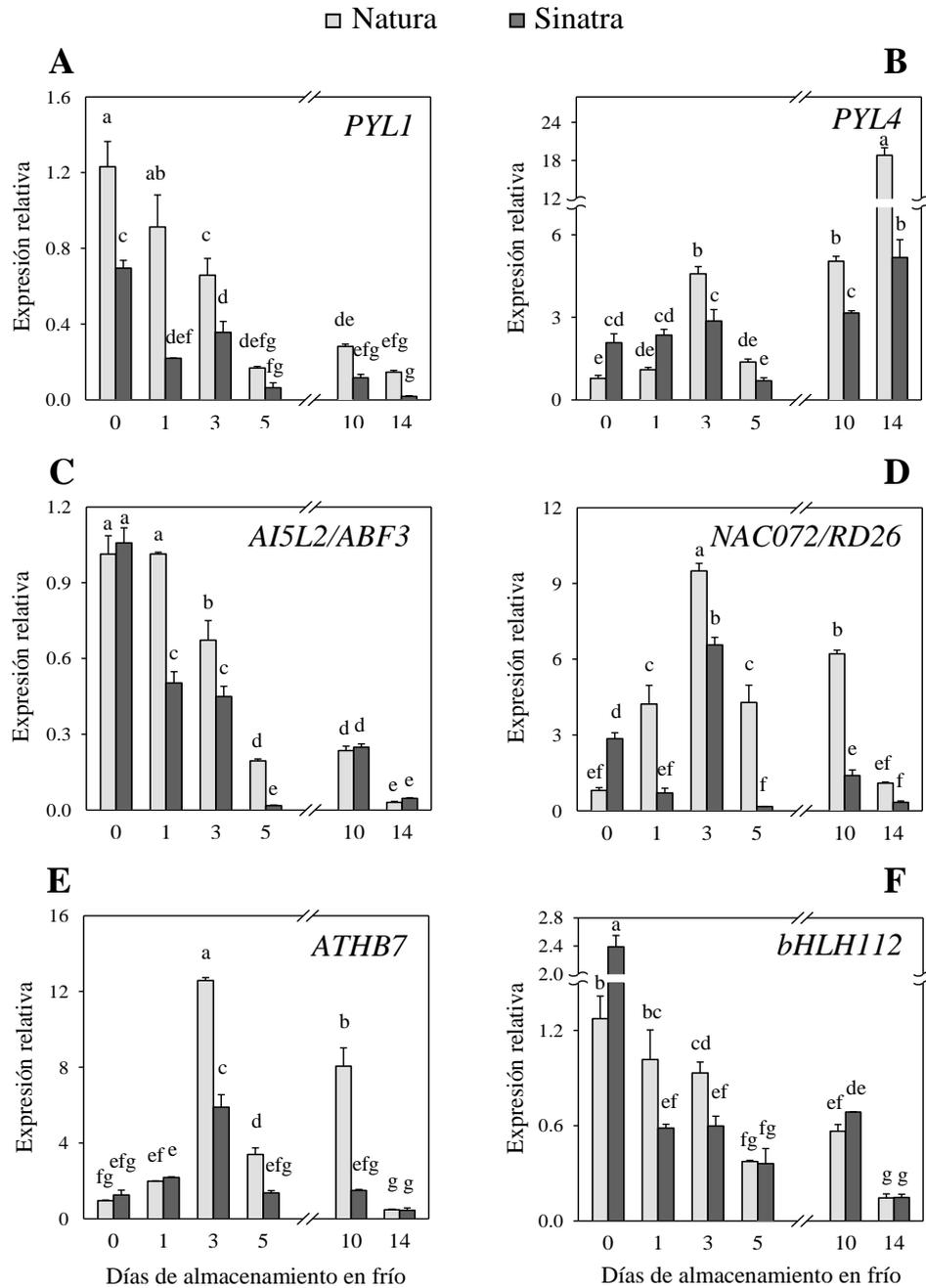
**Fig. I. 2.** Actividad abscísico aldehído oxidase (AAO) (A), contenido en ácido abscísico (B) en el exocarpo de fruto de calabacín de las variedades Natura y Sinatra almacenados a 4 °C. Los datos representan las medias  $\pm$  SE de tres réplicas compuestas por 6 frutos cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Fisher ( $p < 0.05$ ).

### ***1.2.2. Diferencias entre variedades en la expresión de genes relacionados con ABA durante el almacenamiento en frío***

Para entender la relación entre la resistencia al frío y el ABA, también se investigó el mecanismo de respuesta mediado por ABA durante la postcosecha. Para ello, se realizó un análisis transcripcional de algunos genes involucrados en la percepción de ABA, así como en la transducción o modulación de la señal en frutos refrigerados de las variedades Natura y Sinatra. Se analizaron genes para receptores de ABA, factores de transcripción (FT) relacionados con ABA y enzimas involucradas en la transducción o modulación de señales mediadas por esta hormona. La expresión de los dos receptores de ABA estudiados (*PYL1* y *PYL4*) mostró una tendencia opuesta en los frutos conservados a 4 °C (Fig. I. 3A y B). En

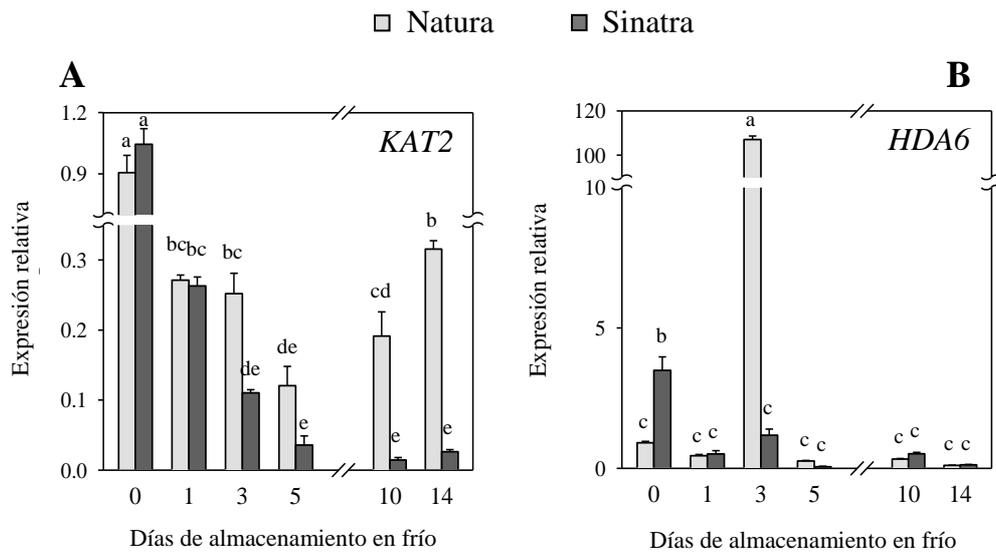
ambas variedades, la transcripción de *PYL1* disminuyó con el almacenamiento en frío. Por el contrario, la expresión de *PYL4* tendió a aumentar, alcanzando sus valores más altos al final del almacenamiento. Al comparar los niveles de transcripción entre Natura y Sinatra, la variedad tolerante al frío presentó una expresión significativamente mayor del receptor *PYL1* durante los primeros 3 días de exposición a baja temperatura, aunque en tiempos posteriores las diferencias no fueron significativas. Por otro lado, *PYL4* mostró un nivel de transcripción más bajo en frutos de Natura recién cosechados y después de un día a 4 °C que en Sinatra. Posteriormente, la expresión de este gen fue mayor en Natura, siendo significativamente mayor al final del período de almacenamiento, donde la variedad tolerante al frío presentó una transcripción 3.6 veces mayor de este receptor de ABA en comparación con la variedad sensible al frío.

En nuestro estudio, también analizamos la expresión de los FT implicados en la ruta de transducción de señales de ABA: *AI5L2/ABF3*, *ATHB7*, *NAC072/RD26* y *bHLH112*, y los resultados obtenidos se resumen en la figura I. 3C-F. En general, *AI5L2/ABF3* disminuyó su transcripción con el almacenamiento en frío en frutos de ambas variedades, pero con diferencias significativas en sus valores a corto plazo de exposición al frío, encontrando niveles más altos en Natura (Fig. I. 3C). *ATHB7* y *NAC072/RD26* mostraron una tendencia similar durante la postcosecha de Natura a 4 °C (Fig. I. 3D y E), registrando un pico de expresión en el día 3 y el día 10 de almacenamiento en frío. En estos días, la acumulación de ARNm de *ATHB7* fue 2.1 y 5.4 veces mayor en Natura con respecto a Sinatra. Los niveles de *NAC072/RD26* fueron significativamente más altos en los frutos de Natura que en los de Sinatra en todos los tiempos analizados, excepto antes del almacenamiento y después de 14 días a 4 °C. La transcripción de *bHLH112* disminuyó significativamente en los frutos de ambas variedades después de ser almacenados en frío, aunque en Natura el nivel de expresión fue mayor los dos primeros días (Fig. I. 3F).



**Fig. I. 3.** Expresión relativa de los genes *PYLI* (A) y *PYLA* (B) receptores ABA, y de los factores de transcripción *AI5L2 / ABF3* (C), *NAC072 / RD26* (D), *ATHB7* (E) y *bHLH112* (F) en el exocarpo de calabacín de las variedades Natura y Sinatra almacenadas a 4°C. Los datos presentados son medias  $\pm$  SE de tres muestras de seis frutos cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p < 0.05$ ).

Con respecto a *KAT2* (3-cetoacil-CoA tiolasa 2), otra proteína que participa en la señalización de ABA, la expresión del gen disminuyó en los frutos a tiempos cortos; mientras que a partir del día 5 en adelante, en Natura, la transcripción de este gen aumentó de manera constante hasta alcanzar 12 veces los niveles encontrados en Sinatra a los 14 días de almacenamiento en frío (Fig. I. 4A). Por otro lado, la expresión del gen *HDA6* (histona desacetilasa 6), una enzima que modula la respuesta de ABA, fue mayor en los frutos de Sinatra recién cosechados, aunque bajo el almacenamiento en frío, el contenido de ARNm disminuyó drásticamente en esta variedad. Sin embargo, el comportamiento más notable de este gen se encontró en Natura al tercer día a 4 °C, cuando su expresión aumentó drásticamente (Fig. I. 4B).



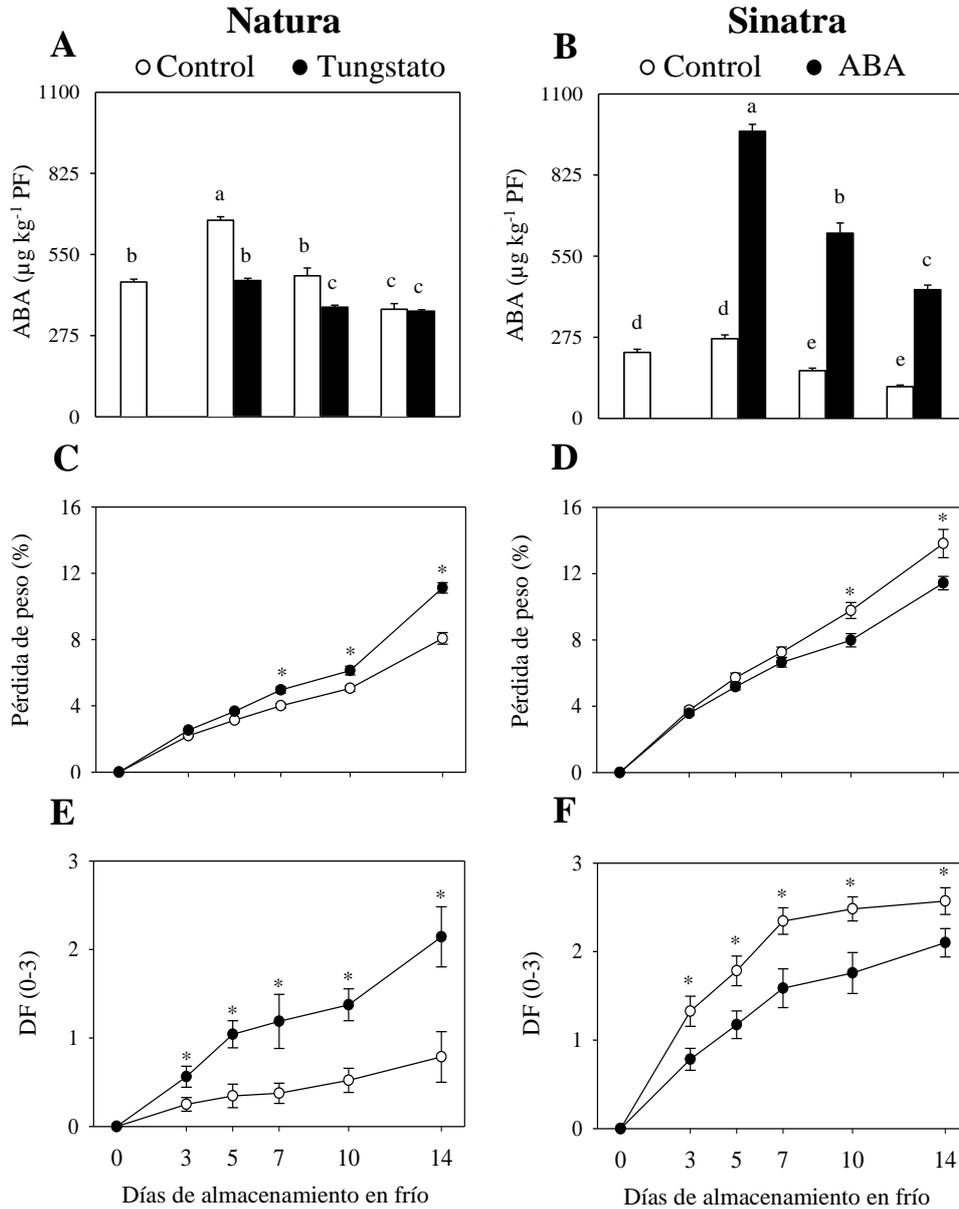
**Fig. I. 4.** Expresión relativa de los genes 3-cetoacil-CoA tiolasa 2 (*KAT2*) (**A**) e histona desacetilasa 6 (*HDA6*) (**B**) en el exocarpo de calabacín de las variedades Natura y Sinatra almacenadas a 4°C. Los datos presentados son medias  $\pm$  SE de tres muestras de seis frutos cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p < 0.05$ ).

***1.2.3. Inducción de la sensibilidad y tolerancia al frío mediante tratamientos con TS y ABA exógenos, respectivamente.***

La detección de una mayor cantidad de ABA en la variedad más tolerante al frío Natura, así como el aumento de la expresión de algunos genes relacionados con ABA en condiciones de estrés por frío, nos lleva a formular la hipótesis de que esta fitohormona desencadena una respuesta de defensa en frío en calabacín. Para probarlo, se realizó un segundo experimento inhibiendo la biosíntesis de ABA en la variedad tolerante al frío Natura con 5 mM de Tungstato sódico (TS), un inhibidor de la enzima abscísico aldehído oxidasa, último paso de síntesis de ABA, y añadiendo a la variedad sensible al frío Sinatra 0.5 mM de ABA antes del almacenamiento en frío. La concentración de ambos compuestos empleados se eligió de acuerdo con ensayos preliminares (datos no mostrados). En el caso de TS, 5 mM fue la concentración más baja capaz de prevenir el pico de ABA que ocurre en Natura a 4 °C (Fig. I. 5A). Por el contrario, la adición de ABA en los frutos Sinatra aumentó el contenido endógeno de ABA cuando los frutos se mantuvieron a baja temperatura (Fig. I. 5B), registrando diferencias que variaron de 3.6 a 4.1 veces respecto al control. Es de destacar que el valor máximo de ABA endógeno alcanzado en frutos de Sinatra tratados con ABA fue similar al valor medido en frutos de Natura no tratados en el quinto día de almacenamiento.

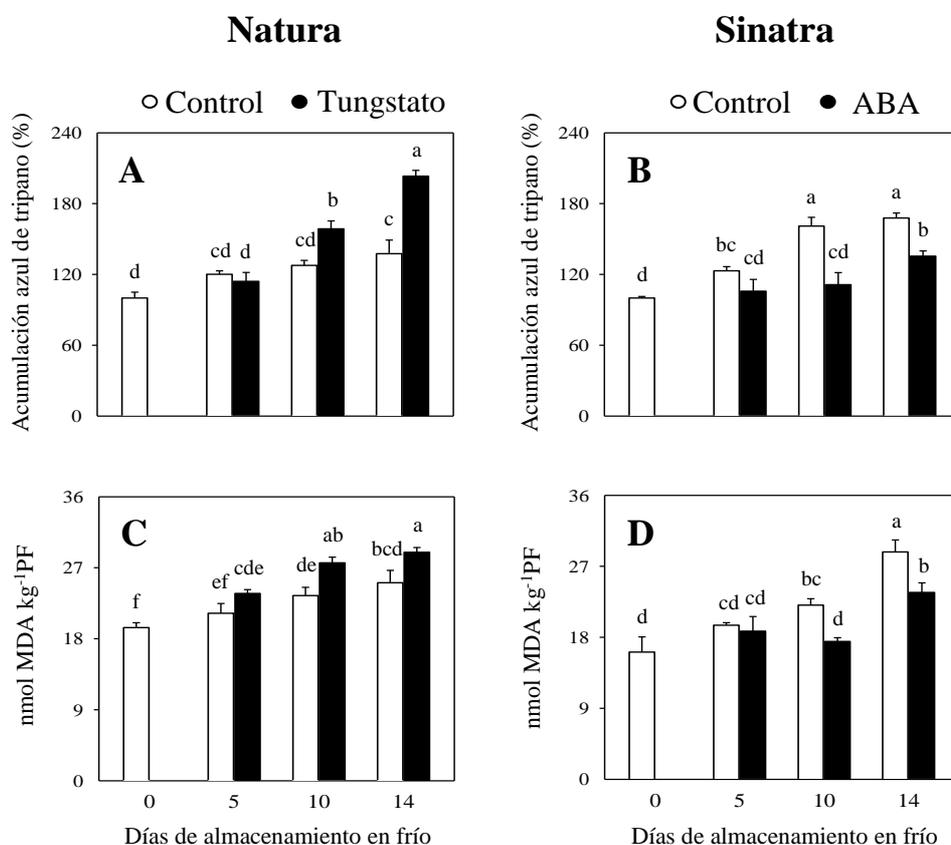
Con respecto al comportamiento postcosecha, los frutos Natura tratados con TS mostraron una pérdida de peso significativamente mayor que los frutos control después del día 7 de almacenamiento a 4 °C (Fig. I. 5C). Por el contrario, los frutos Sinatra tratados con ABA sufrieron una menor pérdida de peso que los frutos control durante el almacenamiento a lo largo del tiempo (Fig. I. 5D). TS hizo que Natura fuera más susceptible a desarrollar DF, como se representa en la Fig. I. 5E, con diferencias significativas respecto a los frutos no tratados después del tercer día de almacenamiento en frío. Por el contrario, los frutos Sinatra tratados con ABA se vieron menos afectados

por la baja temperatura, encontrando diferencias significativas en el índice de DF entre los tratados y los no tratados desde el día 5 hasta el final del almacenamiento en frío (Fig. I. 5F).



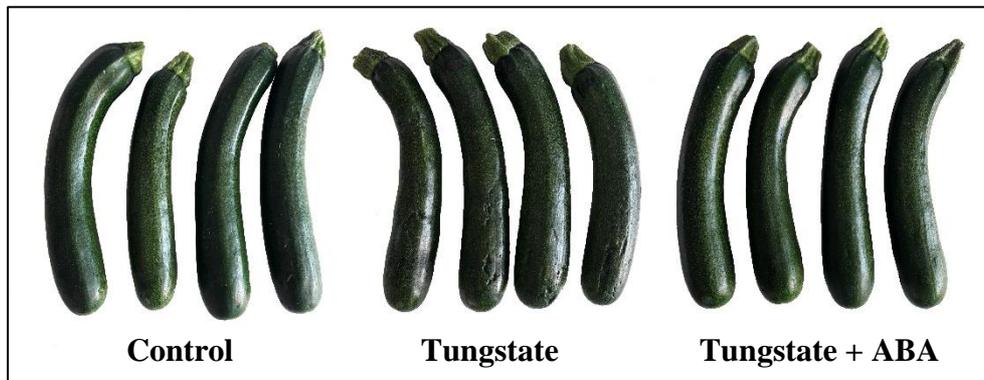
**Fig. I. 5.** Contenido de ABA en el exocarpo, pérdida de peso e índice DF en frutos Natura control y tratados con 5 mM de tungstato de sodio (A, C y E), y en frutos de Sinatra control y tratados con 0,5 mM de ácido abscísico (B, D y F) almacenados a 4°C. Los datos presentados son medias  $\pm$  SE de tres muestras de seis frutos cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p < 0.05$ ).

En este experimento también determinamos indirectamente la tasa de muerte celular midiendo el porcentaje de acumulación de azul de tripano, como un indicador de la integridad del tejido, y TBARS, como una medida de la peroxidación lipídica (Fig. I. 6). Ambos parámetros fueron más altos en Natura tratado con TS que en el control (Fig. I. 6A y C). Sin embargo, en frutos Sinatra tratados con ABA se redujo la tasa de mortalidad celular y la peroxidación lipídica en comparación con los frutos de Sinatra no tratados (Fig. I. 6B y D).



**Fig. I. 6.** Ratio de muerte celular y contenido en malonaldehído (TBARS) en el exocarpo de los frutos Natura control y tratados con 5 mM de tungstato de sodio (A y C), y Sinatra control y tratados con 0.5 mM de ácido abscísico (B y D) almacenados a 4°C. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p < 0.05$ ).

Para confirmar que el TS realmente estaba bloqueando la biosíntesis de ABA, se trató un conjunto de frutos Natura con TS 5 mM más 0.5 mM de ABA. Los cambios en la apariencia, la pérdida de peso, el índice de DF y el contenido de ABA se resumen en la Fig. I. 7 y la Tabla I. 1. No se encontraron diferencias significativas en ningún parámetro en comparación con los frutos control, excepto en los niveles de ABA que fueron más altos debido a la aplicación exógena de esta fitohormona. Estos resultados confirman que los efectos negativos en la calidad postcosecha de los frutos Natura tratados con TS se deben a la reducción del contenido de ABA por este inhibidor.



**Fig. I. 7.** Aspecto visual de los frutos Natura control, tratado con 5 mM de tungstato de sodio y 5 mM de tungstato de sodio más 0.5 mM de ácido abscísico después de 14 días de almacenamiento a 4 ° C.

## Capítulo I.- Tratamiento postcosecha con ABA

**Table I. 1.** Cambios en la pérdida de peso (%), índice DF (0-3) y contenido en ABA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en los frutos de Natura control y tratados con 5 mM de tungstato de sodio (TS) y 5 mM de TS más 0.5 mM de ABA almacenados a 4 ° C.

<i>Días a 4 °C</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Pérdida de peso (%)</i>	<i>Índice DF (0-3)</i>	<i>Contenido ABA (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</i>
<b>5</b>	Control	3.13 <sup>b</sup>	0.34 <sup>b</sup>	666 <sup>b</sup>
	TS	3.67 <sup>a</sup>	1.04 <sup>a</sup>	462 <sup>c</sup>
	TS + ABA	3.22 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>	787 <sup>a</sup>
<b>10</b>	Control	5.05 <sup>b</sup>	0.52 <sup>b</sup>	478 <sup>b</sup>
	TS	6.13 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	371 <sup>c</sup>
	TS + ABA	5.10 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	621 <sup>a</sup>
<b>14</b>	Control	8.87 <sup>b</sup>	0.79 <sup>b</sup>	364 <sup>b</sup>
	TS	11.12 <sup>a</sup>	2.16 <sup>a</sup>	358 <sup>b</sup>
	TS + ABA	8.28 <sup>b</sup>	0.63 <sup>b</sup>	484 <sup>a</sup>

Los datos representan las medias de 18 frutos para pérdida de peso e índice de CI y 3 réplicas de 6 frutos en el caso del contenido en ABA. Para cada parámetro y tiempo de almacenamiento las distintas letras indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p < 0.05$ ).

### I.3. DISCUSIÓN

La fitohormona ABA es una molécula clave en la regulación de la respuesta al estrés, especialmente en estreses que inducen la deshidratación, como la sequía, la alta salinidad y la baja temperatura (Sah et al., 2016). Este trabajo pretende dilucidar el papel de ABA en la regulación de la tolerancia al frío en el fruto de calabacín. Con este propósito, investigamos la postcosecha de dos variedades de calabacín que difieren en su respuesta al almacenamiento en frío: Natura, más tolerante a la baja temperatura, y Sinatra, cuyos frutos son muy susceptibles a desarrollar DF (Carvajal et al., 2011). Las diferencias en la pérdida de peso encontradas en Natura y Sinatra comenzaron a ser significativas después de 5 días de almacenamiento en frío,

unido a una mayor disminución de la firmeza detectada en la variedad sensible. La firmeza es un parámetro de calidad importante que está determinado por las características físicas del tejido y por la presión de turgencia, dependiendo esto último de la acumulación de solutos y del estado de hidratación de las células (Toivonen & Brummell, 2008). La deshidratación, junto con las modificaciones que ocurren en la pared celular (Carvajal et al., 2015) y la cutícula pueden ser responsables de los cambios observados en la firmeza.

Con respecto a la implicación de ABA en la respuesta al estrés por frío, se registró una acumulación de esta fitohormona en el fruto de la variedad tolerante Natura, correspondiente con una inducción de actividad AAO, la última enzima en la vía de biosíntesis de ABA. Este aumento se observó el primer día de almacenamiento y continuó durante los siguientes 5 días, cuando el ABA alcanzó su valor máximo. A tiempos más prolongados de almacenamiento, el contenido de ABA descendió en los frutos de ambas variedades a niveles inferiores a los medidos antes del almacenamiento. El aumento de ABA observado en Natura cuando los frutos se mantuvieron a baja temperatura podría conducir a una adaptación al frío, con una menor pérdida de peso e índice de DF, así como a un mejor mantenimiento de la firmeza durante el almacenamiento prolongado. Además, se ha demostrado que el ABA induce la acumulación de moléculas osmoprotectoras tales como azúcares solubles y prolina para evitar la deshidratación celular (Urano et al., 2009). Anteriores estudios han demostrado que los frutos de Natura acumularon significativamente más contenido de glucosa, fructosa y rafinosa que Sinatra después de 14 días a 4 °C, y concretamente este último azúcar se ha asociado a la respuesta de deshidratación en el exocarpo de calabacín (Palma, Carvajal, Jamilena, et al., 2014). Del mismo modo, en otros trabajos se ha detectado una mayor acumulación de prolina en Natura después de 14 días de almacenamiento en frío (Palma, Carvajal, Lluch, et al., 2014). Estas diferencias en la acumulación de osmoprotectores entre las variedades en un

plazo de tiempo prolongado en conservación, podrían estar relacionadas con los cambios observados en el contenido de ABA a corto plazo en el almacenamiento en frío, lo que respalda el mantenimiento del estado hídrico en los frutos de Natura frente a Sinatra. El ABA también se ha descrito como potenciador de la defensa antioxidante frente a ROS producidas durante condiciones de estrés (Palma, López-Gómez, Tejera, et al., 2014). En el caso del fruto de calabacín, el ABA podría estar implicado en una menor acumulación de ROS y peroxidación de lípidos, así como una mayor actividad de la enzima catalasa correlacionada con la tolerancia al frío durante el almacenamiento postcosecha (Carvajal et al., 2011).

La percepción de ABA y la transducción de señales en frutos de calabacín conservados en frío se han investigado mediante el estudio de los cambios transcripcionales de algunos de los genes relacionados con la respuesta de ABA. El almacenamiento en frío aumentó la expresión del receptor monomérico *PYL4*, siendo esta inducción más alta en Natura que en Sinatra, mientras que el receptor dimérico *PYL1* disminuyó su transcripción en ambas variedades. Esta acumulación de *PYL4* encontrada en Natura podría activar la respuesta de ABA de una manera más eficiente. Resultados similares se han descrito recientemente en las hojas de maíz, donde *PYL1* disminuyó su expresión con un tratamiento de ABA, mientras que la transcripción de *PYL4* se vio incrementada en estas condiciones (W. Fan et al., 2016). Por otro lado, la sobreexpresión de *PYL5* en *Arabidopsis* aumentó la sensibilidad a ABA e indujo resistencia a la sequía (Santiago et al., 2009), y se observó el mismo comportamiento en plantas con una mutación *PYL4*, donde se registró una mejor interacción de *PYL4* con la fosfatasa *PP2CA* y, por lo tanto, mayor inhibición de esta fosfatasa, permitiendo la acción de las proteínas quinasas *SnRK2* dando lugar a la respuesta de ABA (Pizzio et al., 2013).

Entre los FTs implicados en la señalización de ABA, el factor *AI5L2/ABF3* se ha asociado con la tolerancia al frío y la congelación (S. Kim

et al., 2004; J. Wang et al., 2016). En nuestro estudio, *ABF3* mostró una mayor expresión en Natura que en Sinatra en los días 1, 3 y 5 después del almacenamiento en frío; por lo que podría resultar en una respuesta mejor y más rápida de señalización.

Otras familias de FTs que están involucradas en la respuesta de ABA son NAC, ATHB y bHLH. Concretamente, NAC072 o RD26 (Response to Dehydration 26) está fuertemente inducida por ABA (X. Li et al., 2016) y nuestros resultados muestran que Natura presentó niveles de transcripción más altos que Sinatra. Además, este gen mostró un patrón de expresión similar al de *ABF3*, lo que respalda la idea de una mejor respuesta al estrés por frío mediada por ABA en Natura. Bajo ciertas condiciones, NAC072/RD26 actúa como cofactor de *ABF3*, mientras que en otros actúa de manera antagónica, lo que indica que su expresión depende parcialmente de *ABF3* (X. Li et al., 2016). Además, NAC072/RD26 también se ha implicado en la desintoxicación de ROS mediada por ABA (M. Fujita et al., 2004), lo que podría estar relacionado con los niveles más bajos de peróxido de hidrógeno detectados en la variedad tolerante al frío (Carvajal et al., 2011). ATHB7 codifica una proteína de homeodominio de cierre leucina (HD-Zip) que activa la transcripción de los genes de respuesta ABA y está implicada en el control de los procesos de desarrollo de las plantas y la respuesta frente a numerosos estreses abióticos (Ré et al., 2014). En concreto, los efectos del estrés por sequía se minimizan en las plantas de tomate con expresión ectópica de este gen (Mishra et al., 2012). De acuerdo con eso, ATHB7 mostró más expresión en los frutos de Natura. El FT bHLH112 se ha asociado con respuestas celulares a un estímulo de ABA y una mejora de la capacidad de eliminación de ROS (Yujia Liu et al., 2015). Su expresión cayó dramáticamente después de las primeras horas de exposición a baja temperatura en el fruto Sinatra, mientras que Natura mantuvo una alta transcripción de *bHLH112* durante los primeros tres días de almacenamiento.

La enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa (KAT) participa en la degradación de ácidos grasos catalizando el último paso de la  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas, desempeñando específicamente KAT2 el papel principal de este proceso catabólico. La  $\beta$ -oxidación del ácido graso produce peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno que puede actuar como molécula de señalización y está involucrada en la respuesta de ABA (T. Jiang et al., 2011). En calabacín, KAT2 también podría estar implicado en las respuestas mediadas por ABA, ya que Natura contenía mayores niveles de transcripción de KAT2 que Sinatra, aumentando en la variedad tolerante al frío incluso al final del almacenamiento.

Las modificaciones epigenéticas participan en la regulación de muchos procesos fisiológicos, así como en la modulación de las respuestas de la planta frente a condiciones de estrés biótico y abiótico (Chinnusamy & Zhu, 2009). Entre estas modificaciones, la deacetilación a través de los complejos de histona deacetilasa (HDAC) puede reprimir la expresión génica bajo ciertas condiciones ambientales desfavorables como parte de diferentes vías de señalización de fitohormonas (Perrella et al., 2013). La expresión de *HDA6* mostró un aumento drástico en la variedad tolerante al frío Natura después de 3 días de almacenamiento, lo que sugiere que la modulación de la expresión génica puede desempeñar un papel en las respuestas adaptativas al frío en el fruto de calabacín. De acuerdo con este resultado, se ha descrito que HDA6 es necesario para las respuestas a la sequía o la salinidad mediadas por ABA (L.-T. Chen et al., 2010; L.-T. Chen & Wu, 2010), y la tolerancia a la congelación en el arroz (To et al., 2011). En *Arabidopsis*, las plantas *HDA6*-ARN de interferencia fueron más sensibles al ABA y al estrés salino (L.-T. Chen et al., 2010), mostrándose que la sobreexpresión de *HDC1* interactúa con HDA6 y permitiendo a la planta crecer bajo condiciones de estrés hídrico (Perrella et al., 2013).

Para relacionar ABA con la adquisición de resistencia al frío en calabacín, se realizó la aplicación exógena de TS, un inhibidor de la actividad

AAO, en la variedad Natura tolerante al frío y se aplicó ABA exógeno a los frutos sensibles al almacenamiento en frío de la variedad Sinatra. La aplicación de TS hizo que Natura fuera más susceptible al frío, registrando una mayor pérdida de peso, índice de DF, tasa de muerte celular y peroxidación lipídica. En relación con estos hallazgos, se ha observado que el TS agrava los síntomas internos de pardeamiento en piña almacenada a temperatura ambiente (Qin Zhang et al., 2015). Por el contrario, el tratamiento con ABA en Sinatra mejoró la respuesta de los frutos a la baja temperatura, disminuyendo la pérdida de peso y el daño por frío. Debido a su implicación en la defensa contra el estrés oxidativo, los frutos tratados con ABA redujeron su tasa de muerte celular y la peroxidación de lípidos, mientras que los tratados con TS aumentaron estos parámetros. La aplicación exógena de ABA se ha empleado en diferentes frutos, como uva de mesa y piña (Cantín et al., 2007; Q. Zhang et al., 2015) para el mantenimiento de la calidad postcosecha. En otras condiciones de postcosecha, el ABA endógeno también ha demostrado ser un importante regulador de la calidad del fruto, por ejemplo, en la naranja (Romero et al., 2012, 2013). En esta especie, el estudio de un mutante espontáneo específico de fruto deficiente en ABA (Pinalate), ha permitido establecer el papel de ABA en el proceso de deshidratación que tiene lugar durante el almacenamiento postcosecha de la naranja a temperatura ambiente (Romero et al., 2013).

En conclusión, la variedad tolerante Natura aumentó el contenido de ABA desde el primer día de almacenamiento en frío, y también aumentó la expresión génica de los componentes de la vía de señalización de ABA. Además, la inhibición de la biosíntesis de ABA indujo sensibilidad al frío en esta variedad, mientras que el tratamiento con ABA mejoró la calidad de la fruta Sinatra sensible al frío.



# II

## CAPÍTULO

### Tratamiento postcosecha con óxido nítrico

*Jiménez-Muñoz, R., Carvajal, F., Palma, F.,  
Castro-Cegrí, A., Pulido, A., Jamilena, M,  
Romero-Puertas, M. & Garrido, D. (2021)*

*Pre-storage nitric oxide treatment enhances  
chilling tolerance of zucchini fruit (*Cucurbita  
pepo L.*) by S-nitrosylation of proteins and  
modulation of the antioxidant response*

*Postharvest Biology and Technology*

*Vol. 171*





## II.1. INTRODUCCIÓN

Los daños por frío (DF) son una sintomatología que aparece en algunos frutos durante la postcosecha, cuando se almacenan a baja temperatura, por encima de 0 °C. En diferentes variedades de calabacín, se ha descrito de forma detallada tanto la respuesta al almacenamiento en frío (Carvajal et al., 2011), como la aplicación de distintos tratamientos físicos y químicos que han proporcionado una mejora en la resistencia a estos daños (Carvajal et al., 2014, 2017; Palma et al., 2015, 2019). En calabacín, los efectos de los DF que aparecen en los frutos durante el almacenamiento a baja temperatura, se manifiestan en un aumento de la peroxidación lipídica y, por lo tanto, un incremento en la fuga de electrolitos, la pérdida de peso y la concentración de ROS, debido a que reducen los mecanismos de protección oxidativa. El óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización importante con diversas funciones fisiológicas en las plantas; se considera una molécula señal en condiciones de estrés, jugando en muchos casos un papel crítico tanto en las respuestas frente al estrés biótico como abiótico (Shi et al., 2012); además, se ha demostrado que el NO funciona como una señal intrínseca en el crecimiento de la planta (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007; León & Costa-Broseta, 2020; Romero-Puertas & Sandalio, 2016; Sánchez-Vicente et al., 2019). Gran cantidad de estudios se centran en el NO y el estrés biótico durante la postcosecha de diferentes frutos. Esto es debido a que el NO puede regular las respuestas de defensa, siendo capaz de inducir resistencia frente a patógenos (B. Fan et al., 2008; M. Hu et al., 2014; Zhou et al., 2016). En el caso del estrés abiótico, se ha demostrado que esta molécula puede aliviar algunos de sus efectos negativos en una amplia variedad de plantas y frutos (Qiao & Fan, 2008; Wills et al., 2015). En *Arabidopsis*, se observó que mutantes con niveles reducidos de nitrato reductasa (NR) y, por lo tanto, con una baja producción de NO, fueron menos

tolerantes al frío, mientras que en la aclimatación al almacenamiento al frío se estimuló la actividad NR (M. G. Zhao et al., 2009).

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios sobre la importancia del NO en la mejora de la postcosecha de los frutos durante el almacenamiento en frío. Cada vez existen más pruebas que confirman la implicación del NO en el mantenimiento de la calidad postcosecha en frutos (Z. Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2006), vegetales (Yunfen Liu et al., 2016) y flor cortada (Shabanian et al., 2018). En pepino, el NO redujo los DF al mejorar la respuesta antioxidante (H. Yang et al., 2011); en tomate, el NO mejoró la tolerancia al frío al regular la expresión del factor de transcripción LeCBF1 y, el tratamiento de banana con NO, relacionó la resistencia al estrés por frío con niveles más elevados de ATP y carga energética (Y. Wang et al., 2015). En frutos de níspero, Xu et al. (2012) indicaron que la producción endógena de NO es un mecanismo de defensa natural generado contra el estrés abiótico por baja temperatura, por lo que se podría pensar que la aplicación de NO exógeno mejoraría la respuesta natural frente a este estrés.

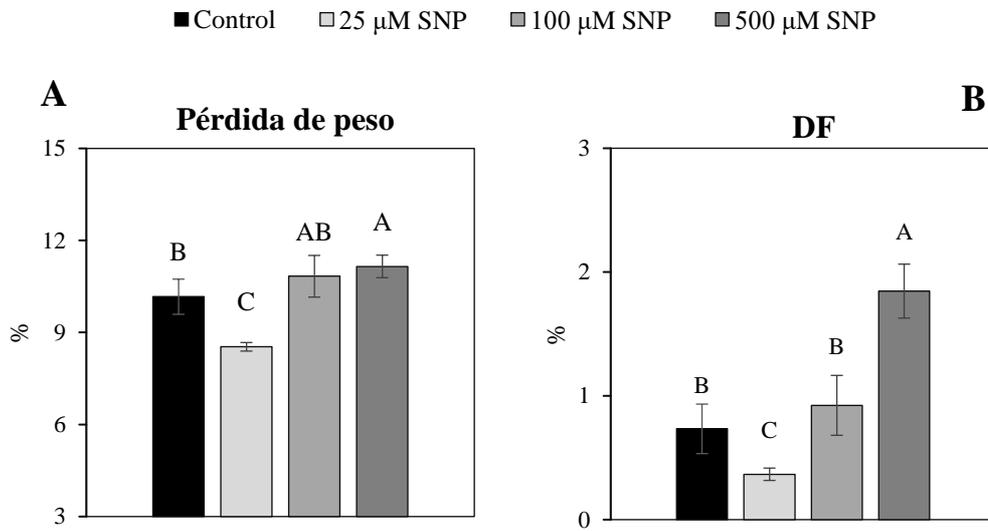
La mayoría de los tratamientos con NO que estudian los cambios relacionados con los DF en la postcosecha, se han realizado utilizando nitroprusiato de sodio (SNP) como donante de NO; sin embargo, este compuesto además de liberar NO también libera cianuro (CN), por lo que es necesario estudiar igualmente el posible efecto del CN en la postcosecha.

En este trabajo, analizamos el efecto del tratamiento con NO en la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío, y estudiamos su implicación en los mecanismos antioxidantes. Los experimentos se han realizado con la variedad de calabacín Sinatra, caracterizada por ser muy sensible a los DF (Carvajal et al., 2011).

## II.2. RESULTADOS

### *II.2.1. Optimización de la concentración de SNP para el tratamiento postcosecha*

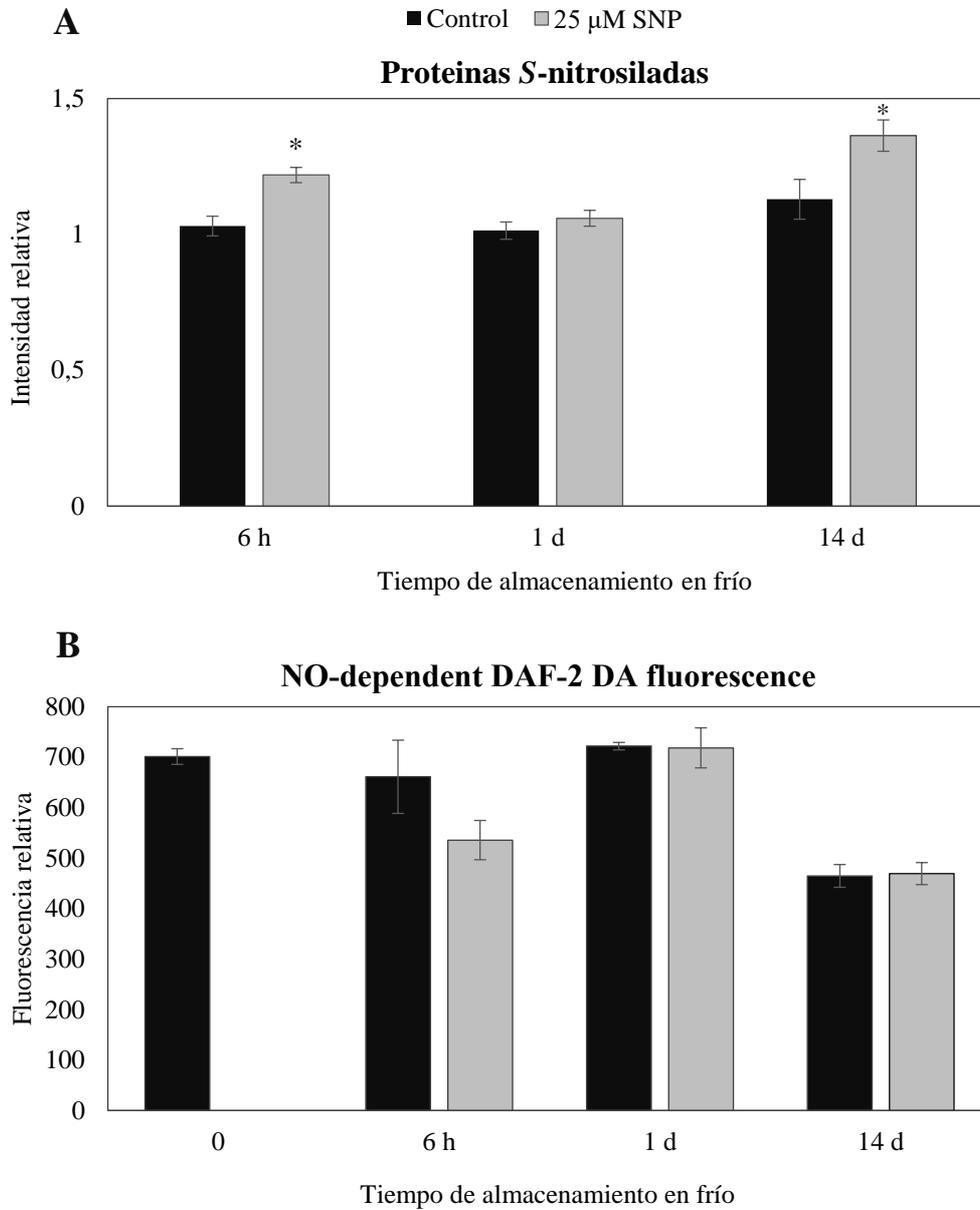
El nitroprusiato sódico (SNP) se usó como donante de NO para estudiar su efecto en el fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío. Se probaron diferentes concentraciones, 25, 100 y 500  $\mu\text{M}$ , siendo 25  $\mu\text{M}$  la concentración que mostró un efecto positivo en la calidad de los frutos de la variedad Sinatra almacenados a 4 °C. Esta concentración mantuvo la calidad postcosecha de los frutos de calabacín por encima de la de los controles; disminuyendo la pérdida de peso en un 16 % y los DF en un 50 % después de 14 días de almacenamiento en frío. La concentración más alta de SNP que fue utilizada (500  $\mu\text{M}$ ) aceleró el deterioro de los frutos, aumentando en un 10 % la pérdida de peso y un 152 % los DF al final del almacenamiento (14 d) con respecto al control (Fig. II. 1). Además, en el caso del tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de SNP, también se observó una aceleración en la pérdida de calidad del fruto, aumentando en un 7 % en la pérdida de peso y en un 26 % los DF con respecto al control en el día 14. En base a estos resultados, se seleccionó la concentración de 25  $\mu\text{M}$  como la adecuada para realizar los demás análisis adicionales.



**Fig. II. 1.** Porcentaje de pérdida de peso (A) e índice de daños por frío (B) a los 14 días de almacenamiento en frío en frutos Sinatra tratados con diferentes concentraciones de SNP. Los datos presentados equivalen a medias  $\pm$  SE. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

### II.2.2. Comprobación de la efectividad del nitroprusiato sódico

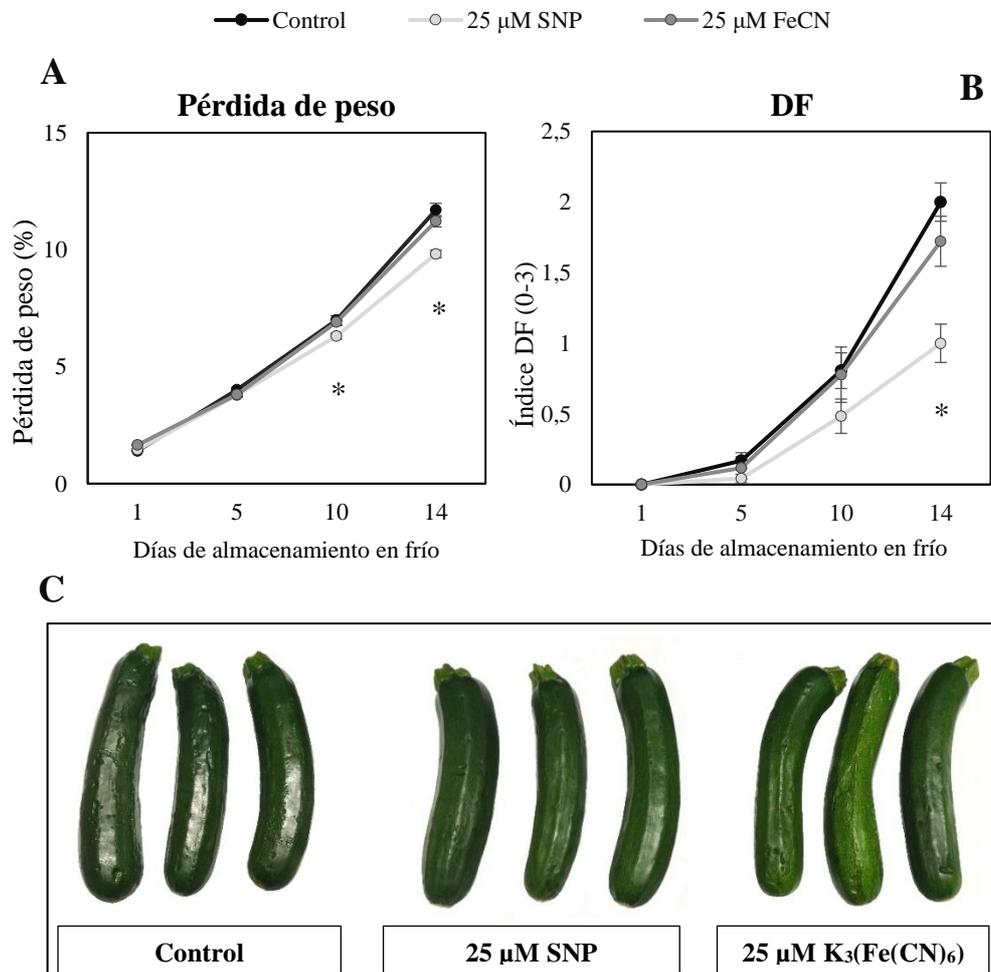
Se realizó un estudio de *S*-nitrosilación en los frutos después de ser tratados con SNP (25  $\mu$ M) para confirmar la liberación y la entrada de NO en los tejidos. La extracción de proteínas y los análisis posteriores se realizaron en el exocarpo de los frutos. La cantidad de proteínas *S*-nitrosiladas fue mayor en los frutos tratados con SNP en comparación con el control (Fig. II. 2A). Se detectó un aumento en las proteínas *S*-nitrosiladas 6 h después del tratamiento con SNP, siendo similar al de las muestras control después de 1 día para aumentar nuevamente al final del almacenamiento en frío (14 días). También se midió el contenido endógeno de NO en los frutos, sin encontrar diferencias destacables en la cantidad de este compuesto entre los frutos control y los tratados (Fig. II. 2B).



**Fig. II. 2.** (A) Inmunodetección de proteínas S-nitrosiladas en el exocarpo de los frutos control y tratados con SNP, sometidas a estudio por el método *biotin-switch* expresado como tasa de cambio de intensidad absoluta a las 6 h, 1 d y 14 d. (B) Detección espectrofluorométrica de NO en el exocarpo de fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío con DAF-2 DA. Los datos presentados representan medias por cuadruplicado de la intensidad absoluta  $\pm$  SE del análisis *biotin-switch*. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en relación al control. ( $p < 0.05$ ).

### ***II.2.3. Efecto del NO en la calidad del fruto***

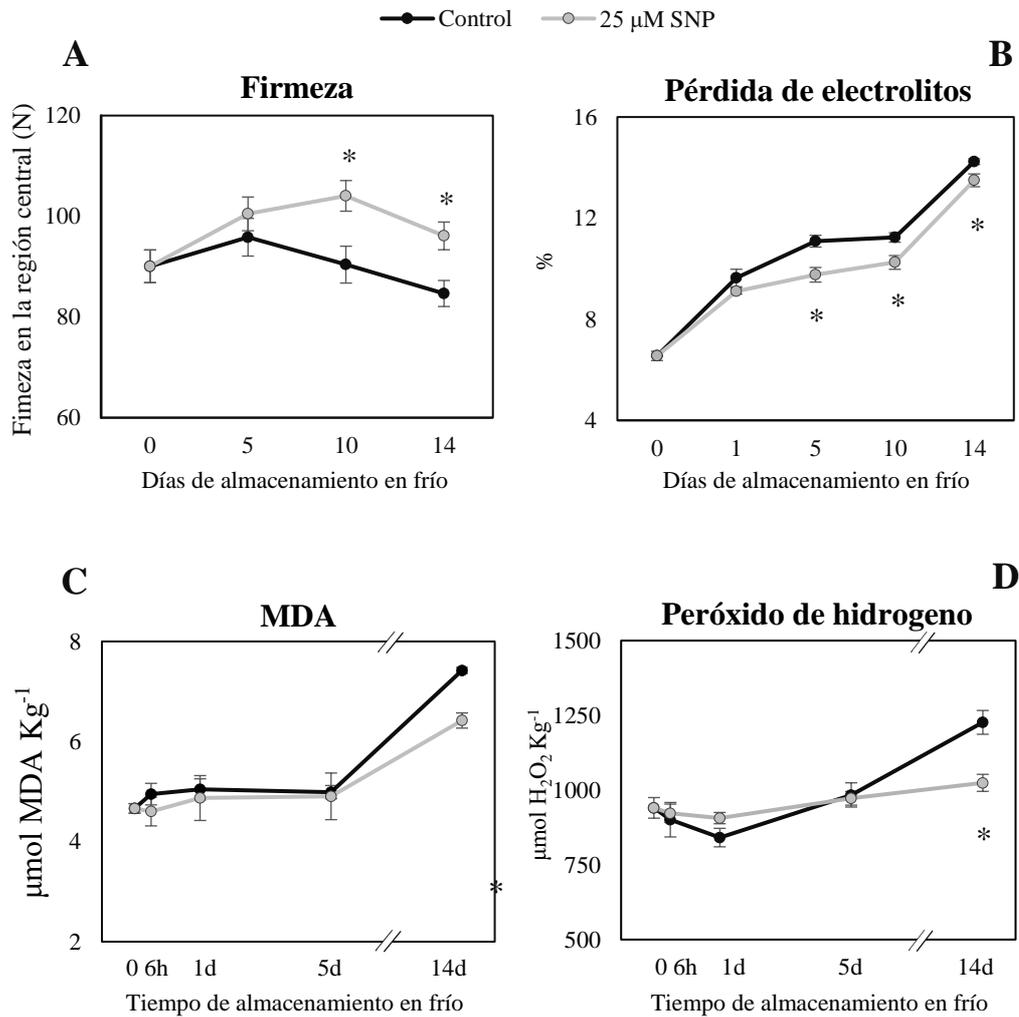
Como ya se señaló, dado que el SNP además de donador de NO, también libera CN, para descartar su posible efecto y, poder así separar el efecto del NO de cualquier otro efecto secundario atribuido al CN, un conjunto de frutos se trató con ferricianuro de potasio. Después de los tratamientos, los frutos se almacenaron a 4 °C durante 14 días y se analizó la pérdida de peso, los DF, la firmeza y la pérdida de electrolitos en los días 1, 5, 10 y 14 como indicadores de la calidad del fruto. El análisis de estos parámetros permitió detectar el efecto del tratamiento con NO en la mejora de la calidad postcosecha durante el almacenamiento en frío. Se observó una disminución significativa en la pérdida de peso después de 10 días de almacenamiento en los frutos tratados, en paralelo con los cambios en los DF que fueron significativos a los 14 días. (Fig. II. 3A y B). El ferricianuro de potasio no tuvo ningún efecto sobre la calidad, ya que los frutos tratados con este compuesto presentaron el mismo comportamiento que los frutos control (Fig. II. 3). La apariencia visual de los frutos tratados con SNP al final del almacenamiento en frío fue mejor en comparación con los controles (Fig. II. 3C).



**Fig. II. 3.** Pérdida de peso (A) e índice de daño por frío (B) en frutos de calabacín almacenados a 4 ° C durante 14 días con 25 μM de nitroprusiato de sodio, 25 μM de ferricianuro de potasio y controles. (C) Aspecto visual de estos frutos de control después de 14 días de almacenamiento. Los datos presentados son medias de 18 frutos ± SE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos para el mismo período de almacenamiento en relación a los controles ( $p < 0.05$ ).

La firmeza comenzó a disminuir en los frutos control a partir del quinto día de almacenamiento, mientras que en los tratados con SNP se mantuvo constante durante los primeros 10 días, y solo al final del almacenamiento en frío a los 14 días, se detectó una pérdida en la firmeza,

pero nunca fue mayor que en los frutos control (Fig. II. 4A). La aplicación de NO también redujo el efecto del estrés por frío en la degradación de la membrana, mostrando los frutos tratados con SNP una menor pérdida de electrolitos que los controles desde el quinto día de almacenamiento en frío (Fig. II. 4B). Al medir la peroxidación lipídica mediante el ensayo MDA, se encontraron diferencias significativas en los frutos tratados con respecto a los controles, detectándose menor cantidad de MDA en los frutos tratados (Fig. II. 4C). Se midió el peróxido de hidrógeno como indicativo del nivel de estrés oxidativo (Fig. II. 4D). Durante el almacenamiento en frío, los frutos de la variedad sensible Sinatra experimentaron un aumento del estrés oxidativo. Los frutos control acumularon  $H_2O_2$  a lo largo del período de almacenamiento, detectándose al final de este (14 d) la mayor concentración observada durante la totalidad del almacenamiento, mientras que en los frutos tratados con NO la cantidad de  $H_2O_2$  no aumentó al final del almacenamiento.

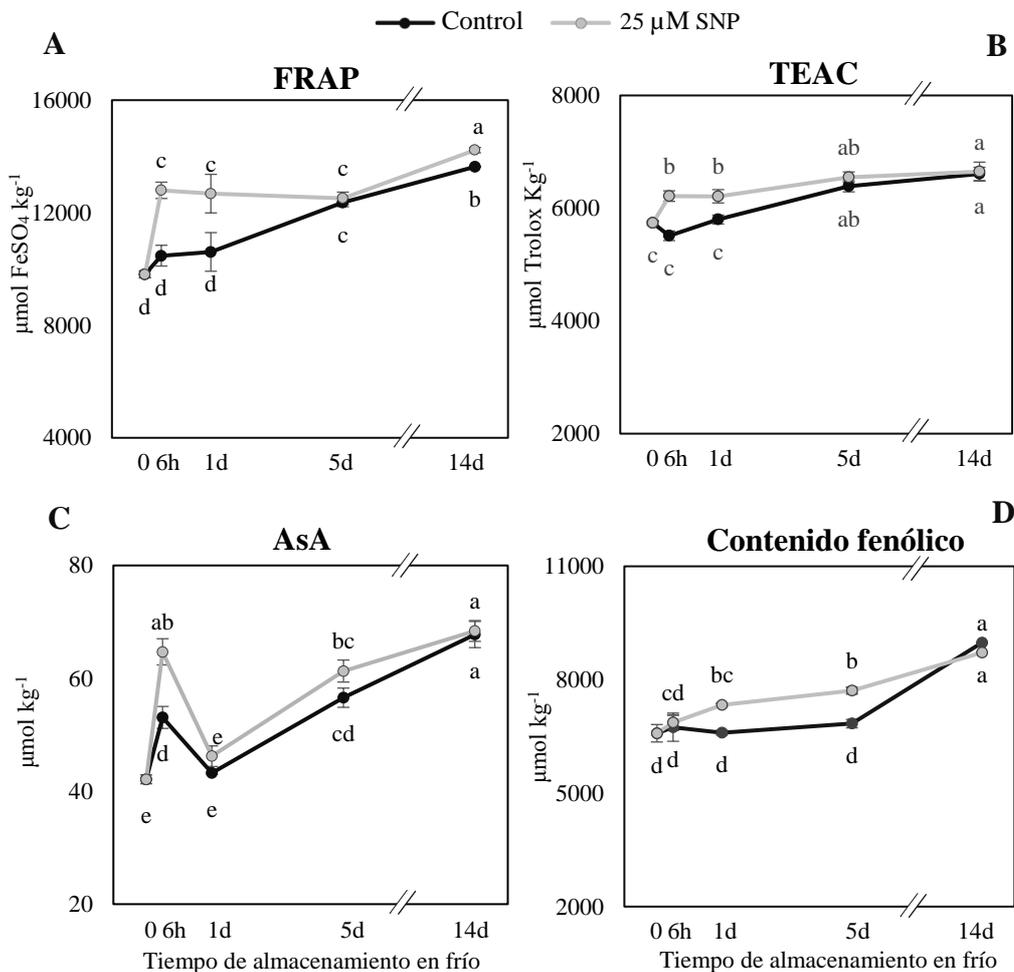


**Fig. II. 4.** Firmeza en la región central (A), porcentaje de pérdida de electrolitos (B), contenido de malondialdehído (MDA) (C) y peróxido de hidrógeno (D) en frutos Sintra almacenados a 4 °C. Los datos presentados son medias de 18 frutos  $\pm$  SE. Los datos presentados son medias  $\pm$  SE de muestras triplicadas de seis frutos cada una. Los asteriscos indican diferencias significativas en relación al control ( $p < 0.05$ ).

#### II.2.4. Efectos del NO sobre los metabolitos antioxidantes

Con respecto a la capacidad antioxidante, que se midió utilizando dos métodos diferentes, FRAP y TEAC, los frutos tratados con NO mostraron una mayor capacidad antioxidante durante las primeras 24 h de almacenamiento con ambos métodos (Fig. II. 5A y B). El contenido en ascorbato (AsA)

alcanzó su punto máximo a las 6 horas después del tratamiento, siendo un 21 % mayor en los frutos tratados que en los controles (Fig. II. 5C); tras lo cual, la cantidad de ascorbato se mantuvo igual entre los frutos control y tratados. El contenido fenólico fue significativamente mayor en los frutos tratados con NO durante los primeros días de almacenamiento en frío, entre un 10 % y un 13 % hasta el día 5, y no se observaron diferencias significativas a los 14 d (Fig. II. 5D).



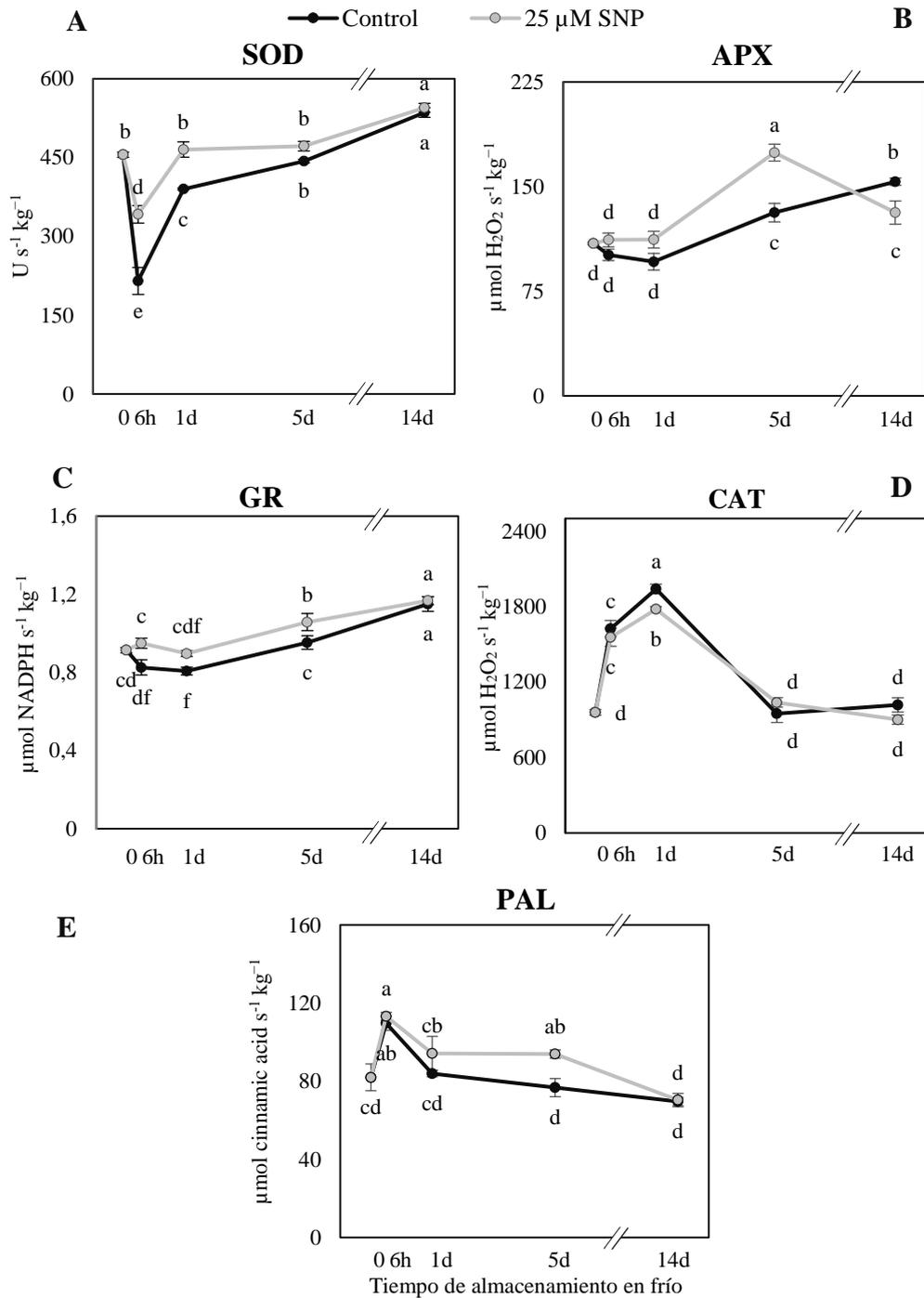
**Fig. II. 5.** Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) (A), capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC) (B), ascorbato total (C) y contenido fenólico en frutos Sintra control y tratados con SNP durante 14 días a 4°C. Los datos presentados son medias  $\pm$  SE de muestras por triplicado de seis frutos cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

### ***II.2.5. Cambios en actividades enzimáticas antioxidantes***

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) a las 6 horas después del almacenamiento en frío disminuyó drásticamente en los frutos control y, en los tratados con SNP, se mantuvo parte de la actividad en este tiempo (Fig. II. 6A). Después de 1 día de almacenamiento en frío, la actividad de SOD se recuperó en ambos frutos, pero fue significativamente mayor en los frutos tratados. Después de 14 días, no se observaron diferencias significativas.

Se midieron las actividades ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR). Ambas fueron mayores en los frutos tratados con NO en los primeros 5 días de almacenamiento en frío (Fig. II. 6B y C). La actividad APX aumentó hasta el quinto día en el que se encontró un pico de actividad en los frutos tratados, siendo un 32 % más alta que en los frutos control. La actividad GR permaneció siendo mayor en los frutos con el tratamiento de NO también durante los primeros 5 días, y en el día 14 no se detectaron diferencias. La actividad catalasa (CAT) se indujo rápidamente en ambos, tratados y controles, en las primeras 24 h de almacenamiento y después de un día disminuyó (Fig. II. 6D).

La actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL) se indujo rápidamente a las 6 horas de almacenamiento en frío, y luego disminuyó hasta los 14 días tanto en los controles y como los tratados con NO. El tratamiento con NO detuvo parte de la pérdida de actividad en el quinto día, en comparación con los frutos control, mostrando una actividad un 32 % superior. No se observaron diferencias significativas a los 14 días.



**Fig. II. 6.** Actividades ascorbato peroxidasa (A), glutatión reductasa (B), superóxido dismutasa (C), catalasa (D) y fenilalanina amoniaco liasa (E) en el exocarpo de frutos de calabacín almacenados a 4 °C. Los datos presentados son medias ± SE de muestras por triplicado de seis frutos cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

### ***II.2.6. Determinación del perfil aminoacídico durante el almacenamiento en frío***

Los perfiles de aminoácidos durante el almacenamiento en frío en calabacín no presentaron grandes diferencias significativas entre los frutos tratados con SNP y los controles (Tabla II. 1A y B).

En el caso de aminoácidos como la fenilalanina (Phe), alanina (Ala) o glutámico (Glu) se observó una caída en sus concentraciones al final del almacenamiento en frío no detectándose diferencias significativas entre los grupos control y tratados. En cambio, la concentración de los aminoácidos tirosina (Tyr), arginina (Arg) e hidroxiprolina (Hyp, derivado de la prolina) se incrementó durante el almacenamiento a 4 °C, siendo significativo este aumento con respecto al estado tras la cosecha, no observándose diferencias entre los frutos tratados con SNP y el control.

En los frutos tratados con NO, solo se encontraron diferencias significativas en la cantidad de glicina (Gly) y lisina (Lys) en comparación con el control a los 14 días de almacenamiento en frío. En cuanto a la prolina (Pro), estas diferencias significativas se observaron a los 5 días, para posteriormente volver a igualarse al final del almacenamiento en frío.

### ***II.2.7. Efecto del tratamiento con SNP en el contenido en poliaminas***

Se estudiaron los cambios en el contenido en poliaminas de los frutos Sinatra tratados y no tratados conservados a 4 °C. En el exocarpo de los frutos se detectaron putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm). La Put (Fig. II. 7A) fue la única que aumentó durante el almacenamiento en frío. El contenido en las poliaminas Spd y Spm se redujo durante el almacenamiento de los frutos, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los frutos tratados con SNP y los controles (Fig. II. 7B y C).

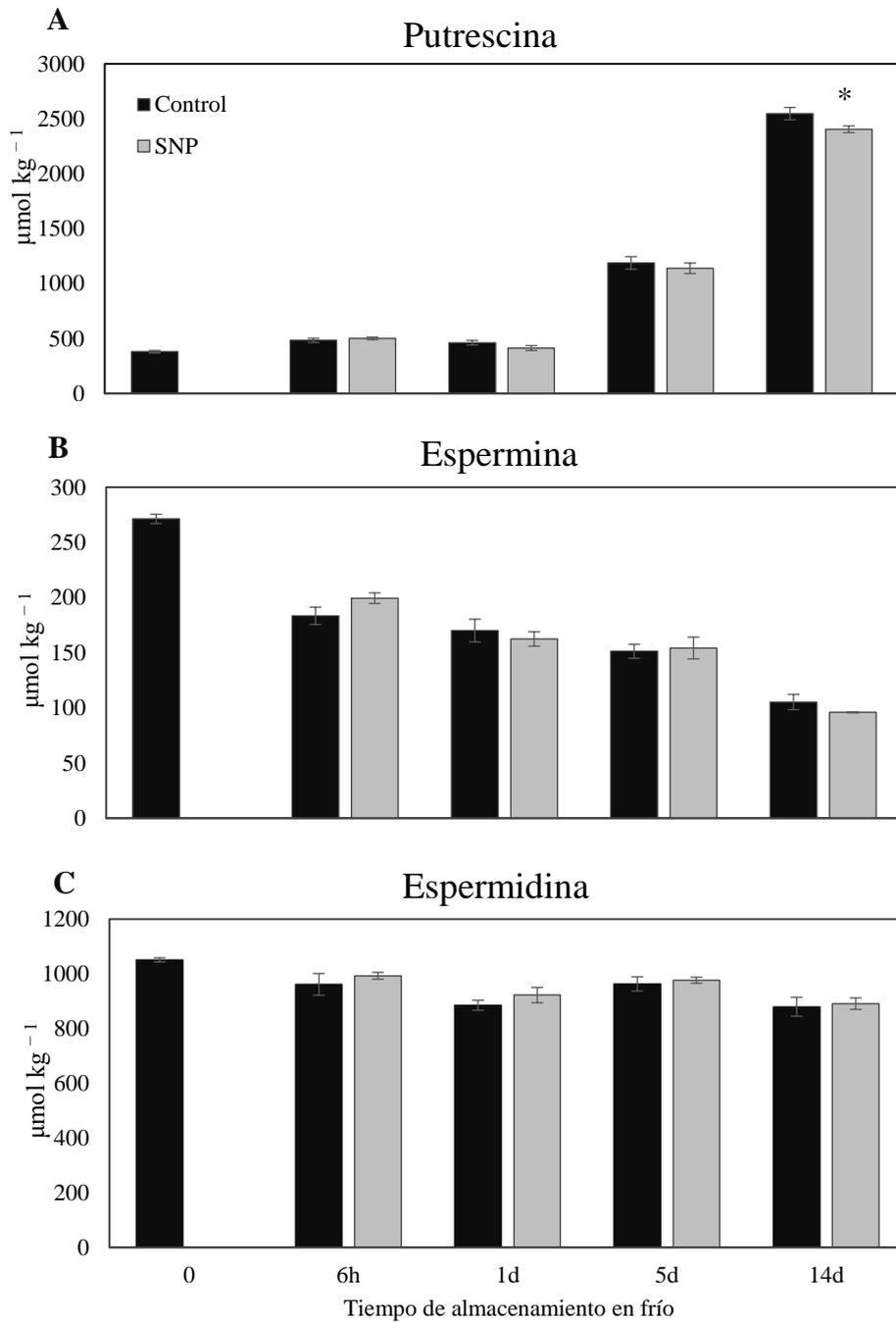
*Capítulo II.- Tratamiento postcosecha con NO*

**Table II. 1A.** Contenido aminoacídico en frutos de calabacín durante el almacenamiento a 4 °C. Ácido glutámico (Glu), Glicina (Gly), Treonina (Thr), Arginina (Arg), Alanina (Ala), Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) Tirosina (Tyr), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Hidroxiprolina (HyP), Prolina (Pro). Las letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0.05$ )

<i>Tiempo a 4°C</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Aminoácidos (<math>\mu\text{mol kg}^{-1}</math> PF)</i>					
		<b>Glu</b>	<b>Ser</b>	<b>His</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Arg</b>
<i>0</i>		211.70 <sup>ab</sup>	521.11 <sup>ab</sup>	185.30 <sup>ef</sup>	147.90 <sup>bc</sup>	222.79 <sup>b</sup>	189.92 <sup>cd</sup>
<i>6 h</i>	Control	196.10 <sup>b</sup>	389.87 <sup>ab</sup>	176.37 <sup>f</sup>	122.29 <sup>c</sup>	186.15 <sup>e</sup>	150.77 <sup>de</sup>
	SNP	215.07 <sup>ab</sup>	397.88 <sup>ab</sup>	178.76 <sup>ab</sup>	124.58 <sup>c</sup>	187.49 <sup>de</sup>	148.25 <sup>e</sup>
<i>1 d</i>	Control	210.74 <sup>ab</sup>	639.92 <sup>a</sup>	192.26 <sup>de</sup>	159.03 <sup>bc</sup>	239.63 <sup>a</sup>	226.58 <sup>bc</sup>
	SNP	223.35 <sup>a</sup>	662.80 <sup>a</sup>	176.26 <sup>f</sup>	163.55 <sup>b</sup>	247.48 <sup>a</sup>	239.41 <sup>b</sup>
<i>5 d</i>	Control	143.82 <sup>d</sup>	568.41 <sup>a</sup>	207.95 <sup>c</sup>	156.09 <sup>bc</sup>	245.28 <sup>a</sup>	252.13 <sup>b</sup>
	SNP	154.64 <sup>cd</sup>	411.23 <sup>ab</sup>	200.71 <sup>cd</sup>	153.69 <sup>bc</sup>	249.94 <sup>a</sup>	246.91 <sup>b</sup>
<i>14 d</i>	Control	163.79 <sup>cd</sup>	225.08 <sup>b</sup>	246.33 <sup>a</sup>	133.71 <sup>bc</sup>	211.80 <sup>bc</sup>	373.18 <sup>a</sup>
	SNP	172.06 <sup>c</sup>	414.40 <sup>ab</sup>	224.43 <sup>b</sup>	199.48 <sup>a</sup>	203.39 <sup>cd</sup>	367.31 <sup>a</sup>

**Table II. 1B.** Contenido aminoacídico en frutos de calabacín durante el almacenamiento a 4 °C. Ácido glutámico (His), Glicina (Gly), Treonina (Thr), Arginina (Arg), Alanina (Ala), Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) Tirosina (Tyr), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Hidroxiprolina (HyP), Prolina (Pro). Diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0,05$ )

<i>Tiempo a 4 °C</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Aminoácidos (<math>\mu\text{mol kg}^{-1}</math> PF)</i>					
		<b>Cys</b>	<b>Val</b>	<b>Met</b>	<b>Phe</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>
<i>0</i>		136.15 <sup>b</sup>	318.85 <sup>b</sup>	157.97 <sup>b</sup>	151.23 <sup>d</sup>	227.05 <sup>ab</sup>	247.92 <sup>a</sup>
<i>6 h</i>	Control	118.42 <sup>d</sup>	241.90 <sup>cd</sup>	147.34 <sup>b</sup>	123.54 <sup>e</sup>	175.76 <sup>c</sup>	201.52 <sup>d</sup>
	SNP	121.77 <sup>d</sup>	248.76 <sup>c</sup>	172.31 <sup>ab</sup>	123.57 <sup>e</sup>	183.48 <sup>c</sup>	208.01 <sup>cd</sup>
<i>1 d</i>	Control	142.27 <sup>a</sup>	353.3 <sup>a</sup>	171.30 <sup>ab</sup>	167.80 <sup>c</sup>	241.60 <sup>a</sup>	242.09 <sup>ab</sup>
	SNP	142.20 <sup>a</sup>	359.56 <sup>a</sup>	155.32 <sup>b</sup>	169.01 <sup>c</sup>	237.47 <sup>a</sup>	239.98 <sup>ab</sup>
<i>5 d</i>	Control	129.18 <sup>c</sup>	323.75 <sup>b</sup>	182.29 <sup>ab</sup>	194.97 <sup>b</sup>	211.10 <sup>b</sup>	217.45 <sup>cd</sup>
	SNP	132.77 <sup>bc</sup>	324.99 <sup>b</sup>	179.71 <sup>ab</sup>	190.16 <sup>b</sup>	214.84 <sup>b</sup>	226.63 <sup>bc</sup>
<i>14 d</i>	Control	119.36 <sup>d</sup>	222.26 <sup>de</sup>	212.56 <sup>a</sup>	213.91 <sup>a</sup>	145.51 <sup>d</sup>	149.46 <sup>e</sup>
	SNP	120.68 <sup>d</sup>	213.26 <sup>e</sup>	181.61 <sup>ab</sup>	193.03 <sup>b</sup>	146.84 <sup>d</sup>	149.53 <sup>e</sup>



**Fig. II. 7.** Contenido de poliaminas en el exocarpo de calabacín almacenado a 4 °C durante 14 días. Putrescina (A), Espermina (B) y Espermidina (C). Los valores son medias  $\pm$  SE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en relación al control ( $p < 0,05$ ).

### **II.3. DISCUSIÓN**

El presente estudio examina el efecto del óxido nítrico en el fruto de calabacín durante su almacenamiento en frío y en la calidad de postcosecha, analizando diferentes parámetros relacionados con el estrés por frío y el efecto del NO.

El fruto de calabacín es susceptible a los daños por frío cuando se almacena a baja temperatura. Los DF causan pérdida de agua, ablandamiento y picado en el exocarpo del fruto como resultado de la pérdida de integridad celular, causada por los daños en las membranas celulares (Balandrán-Quintana et al., 2002; Martínez-Téllez et al., 2002). En el presente estudio, se utilizaron tres concentraciones diferentes de SNP para evaluar el efecto del NO en la postcosecha durante el almacenamiento en frío de frutos Sinatra, una variedad sensible al frío (Carvajal et al., 2011). Los resultados mostraron que 25  $\mu\text{M}$  SNP era la concentración adecuada, capaz de mejorar el comportamiento del fruto durante el almacenamiento en frío con respecto a los frutos no tratados, ya que estos frutos mostraron una menor pérdida de peso y DF. Las concentraciones más altas resultaron perjudiciales para la calidad postcosecha, ya que se detectaron mayores daños durante el almacenamiento en frío, en contradicción con otros resultados encontrados en distintos frutos tratados con estas concentraciones, como en cereza (Rabiei et al., 2019) y lichi (Barman et al., 2014). En melocotón, un exceso en la cantidad de SNP (100  $\mu\text{M}$ ), también indujo un fuerte daño en el fruto, debido en parte al ion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) formado a partir de las reacciones del NO en exceso con el anión superóxido y otros ROS (Saba & Moradi, 2017). El  $\text{ONOO}^-$  reacciona con grupos tiol de proteínas, radicales poliinsaturados y lípidos de los ácidos grasos de membrana, causando graves daños a las células (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007; Vandelle & Delledonne, 2011). La misma respuesta se observó en tomate por R. Zhao et al. (2011), un contenido apropiado de NO (20  $\mu\text{M}$ ) mejoró la tolerancia al frío, no obstante niveles altos de NO causaron daños en el fruto.

El NO es capaz de modificar la actividad enzimática mediante la *S*-nitrosilación de proteínas, una específica y esencial modificación postraducciona de proteínas, mediante la unión covalente del NO con el grupo tiol de un residuo de cisteína (Romero-Puertas et al., 2013; Stamler et al., 2001). El NO es capaz de regular el metabolismo de las ROS a través de la modulación de ambos, enzimas productoras de ROS y sistemas antioxidantes (Romero-Puertas & Sandalio, 2016). En particular, todas las enzimas del ciclo ASC-GSH parecen estar controladas por el NO mediante nitración y/o *S*-nitrosilación, siendo la APX la enzima más estudiada en la desintoxicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Correa-Aragunde et al., 2015). Distintos estudios afirman que todas las proteínas del ciclo AsA-GSH están influenciadas por estas modificaciones postraduccionales, que se logran a partir de la interacción con el NO (Huanjie Yang et al., 2015). En calabacín, el tratamiento con SNP produjo un aumento de las proteínas *S*-nitrosiladas tras de 6 horas de almacenamiento en frío, y al medir la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes se encontró, para la mayoría de ellas, también una mayor actividad en el tratamiento con SNP, pudiendo ser indicativo de este tipo de regulación.

Se sabe que el NO es capaz de proteger a la planta contra el estrés oxidativo, como ocurre en el calabacín durante el almacenamiento en frío, siendo más grave en variedades sensibles como Sinatra (Carvajal et al., 2011, 2017). El NO se aplicó utilizando una solución de SNP como donante. El SNP libera también CN, y para poder descartar posibles efectos secundarios de este compuesto sobre la calidad del fruto, se trataron como controles adicionales frutos con ferricianuro y, en este caso, no se encontraron diferencias significativas en la calidad postcosecha durante el almacenamiento en frío en comparación con los frutos control, por lo que podemos descartar un efecto negativo del CN y el uso del SNP como donante de NO. El tratamiento con NO (25 µM SNP) mejoró los parámetros de calidad del fruto durante el almacenamiento en frío, con una menor pérdida de peso y DF después de los

14 días, como sucede también con otros tratamientos químicos aplicados en fruto de calabacín, como ácido abscísico, putrescina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Carvajal et al., 2017; Palma et al., 2015, 2019). El NO hizo que los frutos conservaran la firmeza y controlaran la pérdida de electrolitos durante los últimos días de almacenamiento en frío. El estrés medido como producción de MDA, indicativo de peroxidación lipídica, fue mayor en los frutos control en comparación con los frutos tratados. Este parámetro es un buen indicador del estrés causado por el almacenamiento en frío tras la cosecha, y muestra una correlación positiva con la pérdida de electrolitos y los daños por frío (Carvajal et al., 2011, 2014).

Al final del almacenamiento en frío, los frutos control presentaban mayores cantidades de  $H_2O_2$  que los frutos tratados con SNP. Las bajas temperaturas, por encima de los 0 °C, inducen niveles elevados de ROS (Carvajal et al., 2011) y el NO puede proteger contra el daño oxidativo aumentando las actividades de las enzimas antioxidantes (Wills et al., 2015; M. Xu et al., 2012; Z. Yang et al., 2012; Qitong Zhang et al., 2019; T. Zhang et al., 2017). Por lo tanto, la capacidad antioxidante total medida por dos métodos distintos, FRAP y TEAC, fue mayor en el tratamiento con NO durante los primeros días de almacenamiento en frío, y fue respaldada también por una mayor cantidad de fenoles y un aumento en la actividad de la enzima PAL. Una respuesta similar se observó después del tratamiento con NO durante el almacenamiento en frío, en banana por Wang et al. (2013) y cereza por Aghdam et al. (2019). La vitamina C (AsA) es un metabolito con capacidad antioxidante y, en asociación con otros componentes del sistema antioxidante, protege del daño oxidativo (Hasanuzzaman et al., 2019; Noctor & Foyer, 1998). En fruto de calabacín, la cantidad de AsA aumentó a lo largo del almacenamiento en frío tanto en frutos tratados como en los controles, y alcanzó su punto máximo a las 6 h, encontrándose una cantidad mayor en los tratados con NO.

SOD, APX, GR y CAT se han categorizado como las principales enzimas del sistema de defensa de contra las ROS, que desempeñan un papel primordial en la resistencia de los frutos al frío (Janská et al., 2010; S. Sharma et al., 2020; Walker & Mckersie, 1993). Nuestros resultados mostraron que un tratamiento con SNP produjo un incremento menor en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, probablemente debido a un aumento en las actividades de GR, SOD y APX; la menor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ser responsable de la disminución del daño a nivel de membrana, medida como peroxidación lipídica. La SOD podría mejorar la capacidad del tejido para eliminar O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se elimina directamente mediante el ciclo ASC-GSH. Una alta actividad APX / GR es vital para mantener una relación AsA / GSH óptima (Aghdam et al., 2016; Rabiei et al., 2019). En kiwi tratado con NO, Zhu et al. (2008) encontraron una reducción significativa en la acumulación de MDA y de peróxido de hidrógeno, así como un retraso en la disminución de la cantidad de AsA, además de un aumento en la actividad de SOD frente al estrés producido durante el almacenamiento en frío. En *Myrica rubra*, F. Wu et al. (2012) también mostraron una disminución en la permeabilidad de la membrana y la peroxidación lipídica, así como una mayor actividad de SOD y APX, junto con una mayor capacidad antioxidante y cantidad de compuestos fenólicos totales. Se observó el mismo comportamiento en cultivares de *Gerbera* tratados con NO, mostraron un aumento en las actividades SOD y APX; sin embargo, la actividad CAT no cambió significativamente con respecto al control o fue mayor en la primera parte del almacenamiento, disminuyendo posteriormente. Rabiei et al. (2019) describieron, en el fruto de cereza tratada con SNP, una menor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atribuido a la mejora en la actividad de enzimas de eliminación de ROS como SOD, CAT, APX y GR, lo que resultó en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular.

La prolina es un aminoácido que puede estabilizar la homeostasis celular, actuando como un osmolito capaz de proteger a la planta de la pérdida

de agua, estabilizar estructuras subcelulares y eliminar radicales libres, mejorando la tolerancia al estrés abiótico y la recuperación tras el estrés (Ashraf & Foolad, 2007; G. Xu et al., 2007). En *Arabidopsis*, la acumulación de NO endógeno indujo mayor tolerancia al frío (M. G. Zhao et al., 2009). Las concentraciones elevadas de NO se asociaron con la acumulación de prolina y el aumento de la tolerancia al frío en esta planta. En tomate tras el tratamiento con SNP, Zhao et al. (2011) describieron un aumento en el contenido en prolina durante los primeros 20 días de almacenamiento en frío, produciéndose su disminución al final del mismo. En banana se produjo una respuesta similar, el contenido de prolina aumentó en los frutos durante los primeros 10 días de almacenamiento, siendo significativamente mayor en los tratados con SNP, para posteriormente disminuir (Y. Wang et al., 2013).

En calabacín, durante el almacenamiento a baja temperatura, se detectaron diferencias significativas entre el control y los frutos tratados con SNP solo después de 5 días de almacenamiento en frío, tras lo cual estas diferencias se igualaron. La acumulación de prolina es parte del mecanismo de defensa en las plantas cuando están expuestas al estrés, y esta se ha observado en algunos frutos después de tratamientos que mejoran la tolerancia al frío durante la postcosecha, como ocurre en pera (D. Li et al., 2017), banana (Luo et al., 2015) y mango (Zhengke Zhang et al., 2017). En el caso concreto de calabacín, tratamientos que mejoraron la calidad postcosecha y la vida útil del fruto a baja temperatura como poliaminas (Palma, Carvajal, Jamilena, et al., 2014; Palma et al., 2015), preacondicionamiento (Carvajal et al., 2014) y GABA (Palma et al., 2019) también provocaron un aumento del contenido en prolina. En estudios anteriores, se describió en una variedad de calabacín tolerante a los DF, una mayor acumulación de prolina durante el almacenamiento en frío (Palma, Carvajal, Lluch, et al., 2014).

Entre las poliaminas analizadas, fue la putrescina la única que aumentó en el fruto durante el almacenamiento a 4 ° C, aunque en los

controles el aumento fue significativamente mayor que en los tratados con NO. En estudios previos, se demostró que el aumento de los niveles de putrescina se debe al estrés provocado por el almacenamiento en frío, observándose niveles inferiores en las variedades de calabacín tolerantes a la frigoconservación. Esta reducción se debe al uso de la putrescina como sustrato para la síntesis de otros metabolitos asociados con la tolerancia al frío, modulando los niveles de otros compuestos como el GABA (Palma, Carvajal, Jamilena, et al., 2014; Palma et al., 2019).

En conclusión, el NO, debido principalmente al ciclo ASC-GSH, parece desempeñar un papel regulador en el equilibrio antioxidante, en el fruto de calabacín durante la primera parte del almacenamiento en frío, manteniendo la homeostasis redox celular. El NO disminuye los síntomas de daños por frío, mejorando la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante el almacenamiento a baja temperatura.

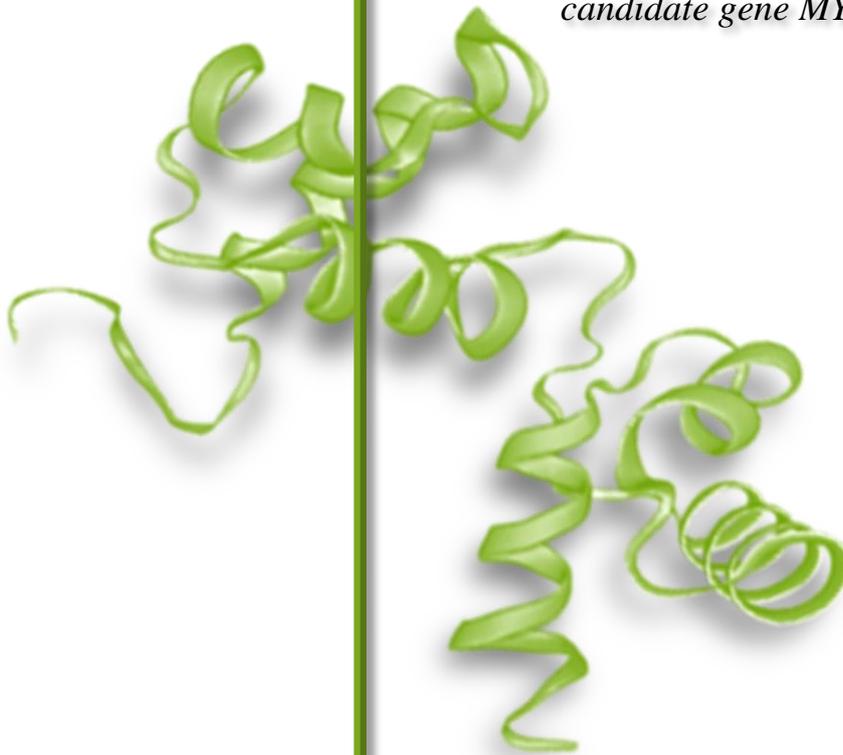
# III

## CAPÍTULO

### Caracterización del gen candidato

#### *MYB106-like*

*Characterization of the  
candidate gene MYB106-like*





### III.1. INTRODUCCIÓN

Los factores de transcripción MYB representan una familia de proteínas que presentan un dominio conservado de unión al ADN, particularmente las plantas poseen una subfamilia caracterizada por un dominio MYB de tipo R2R3 diferenciado por las repeticiones en sus secuencias (Stracke et al., 2001). Los genes de esta subfamilia se expresan diferencialmente en los distintos tejidos de la planta y muestran especificidad frente a diferentes condiciones fisiológicas, entre ellas el estrés abiótico, lo que indica su gran potencial regulador (Dubos et al., 2010; Kranz et al., 1998).

A partir de estudios transcriptómicos de variedades de *C. pepo* contrastantes respecto a la tolerancia de sus frutos al frío durante la postcosecha, nuestro grupo ha seleccionado numerosos genes candidatos a regular la tolerancia al estrés por frío (Carvajal et al., 2018). Entre estos genes cabe destacar el perteneciente a la familia R2R3-MYB, denominado *MYB106-like*, que mostró una elevada expresión en frutos de la variedad tolerante frente a los de la variedad sensible.

En *Arabidopsis thaliana* el homólogo al gen *MYB106-like* funciona como un represor del crecimiento de células epidérmicas y regula negativamente la formación de tricomas ramificados (Jakoby et al., 2008). Sin embargo, este factor de transcripción no solo actúa como un regulador negativo sino también como activador del crecimiento celular, promoviendo la expansión de tricomas en *A. thaliana* (Gilding & Marks, 2010). Oshima et al. (2013) describieron la implicación de este gen en la formación de nanocrestas de la cutícula en pétalos y estambres, y en la morfogénesis de tricomas en órganos vegetativos. Estos autores destacaron la coordinación de este gen con otros factores de transcripción como WIN1/SHN1, que participan en la regulación de la biosíntesis de la cutícula y la acumulación de cera en los órganos reproductivos.

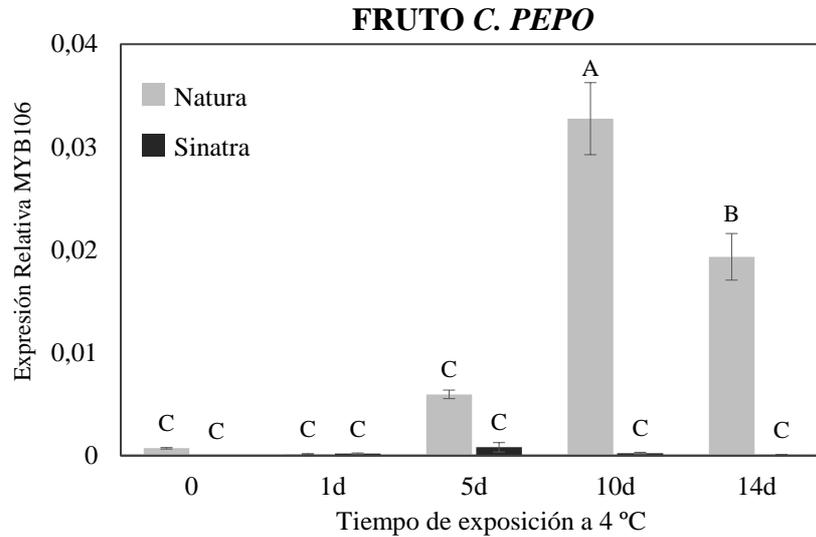
Mediante estudios transcriptómicos sobre el efecto de las bajas temperaturas se ha detectado un incremento en la expresión de genes relacionados con la síntesis de cutícula en condiciones de estrés por frío. Teniendo en cuenta la relación de MYB106 con la formación de la cutícula, y debido al incremento de expresión de este gen en frutos durante su conservación en frío en la variedad tolerante, se ha propuesto este gen como candidato asociado a la tolerancia al frío. Por ello se ha acometido el estudio de la expresión de MYB106-like en distintos tejidos, variedades y condiciones fisiológicas y su caracterización.

## III.2. RESULTADOS

### *III.2.1. Estudio de la expresión en fruto del gen MYB106-like*

Para validar los resultados obtenidos en el estudio transcriptómico y obtener una visión general de los cambios de la expresión del gen en el fruto a lo largo del periodo de estrés por frío, se analizó su expresión en dos variedades de *C. pepo* con distinto comportamiento frente al frío, la variedad tolerante Natura y la variedad sensible Sinatra. Frutos comerciales recién cosechados de ambas variedades se almacenaron en frío durante 14 días tras los que se analizó la expresión de *MYB106-like* (Fig. III. 1).

Se observaron diferencias significativas a nivel de expresión entre las dos variedades contrastantes. Los niveles de ARNm en el fruto de Sinatra fueron casi imperceptibles durante todo el estudio, tanto antes del almacenamiento como tras la exposición a baja temperatura. En la variedad tolerante Natura, la expresión aumentó drásticamente durante el almacenamiento en frío, detectando un máximo a los 10 días, y con unos niveles 45 veces mayores a los analizados en frutos recién cosechados y también en frutos de la variedad Sinatra a 10 días de postcosecha.



**Figura III. 1.** Expresión relativa del gen *MYB106-like* en frutos de las variedades Natura y Sinatra almacenados a 4 °C. Datos representan las medias  $\pm$  ES de réplicas triplicadas de 6 frutos. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test estadístico Fisher ( $p < 0.05$ ).

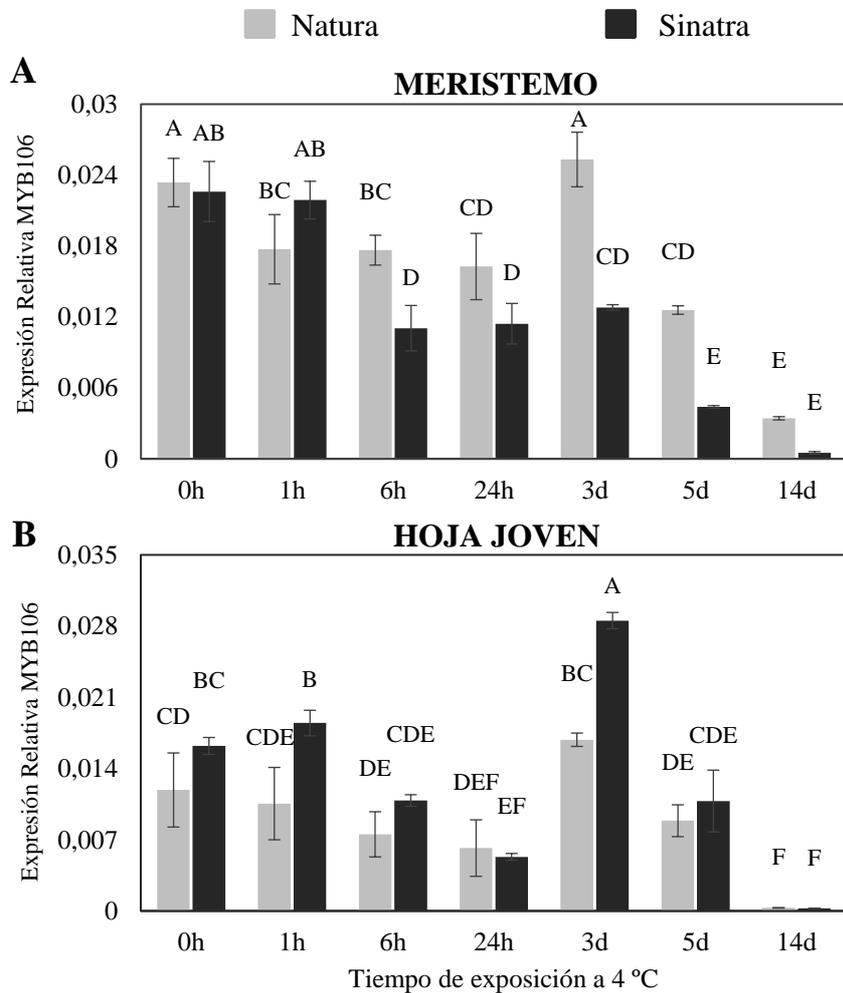
### **III.2.2. Estudio de la expresión del gen *MYB106* en plantas de *C. pepo***

Para estudiar y entender la relación entre el estrés por frío y el gen *MYB106*, se analizó la expresión en plantas de las dos variedades de *C. pepo* contrastantes, Natura y Sinatra. La expresión del gen se estudió en distintos órganos de la planta antes y durante 14 días de exposición a baja temperatura (Fig. III. 2).

En el meristemo, la expresión del gen en ambas variedades fue muy similar mostrando en general una tendencia decreciente desde el inicio de la exposición al frío hasta el final del mismo (Fig. III. 2A). Sin embargo, destaca un pico a los 3 días en la variedad tolerante, volviendo a valores de expresión semejantes a los hallados antes del estrés, para de nuevo disminuir a partir el quinto día de manera significativa. En la variedad sensible se produjo una fuerte reducción de la expresión que disminuyó significativamente en un 50

% tras 6 horas de almacenamiento en frío, esta expresión se mantuvo hasta los 3 días, para posteriormente disminuir hasta los 14 días.

En cuanto a la expresión en hoja joven (Fig. III. 2B), para Natura se observó la misma tendencia que en el meristemo, incluyendo el aumento a los 3 días y su declive a los 14 días. Sin embargo, cabe destacar que en la variedad sensible Sinatra a pesar de seguir también la misma tendencia en general de descenso en el meristemo, aunque se observa un pico a los 3 días de almacenamiento mayor que el detectado en Natura.



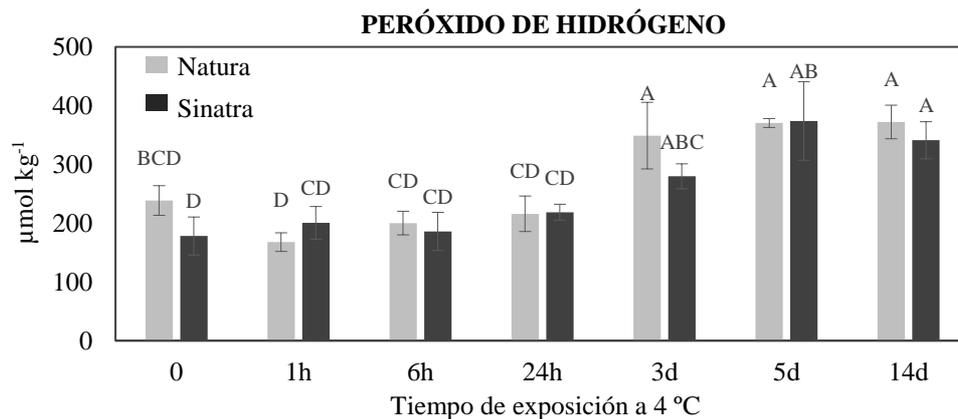
**Figura III. 2.** Expresión relativa del gen *MYB106-like* en el meristemo (A) y hoja joven (B) almacenados a 4 °C. Datos representan las medias  $\pm$  ES de réplicas triplicadas de tres plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test estadístico Fisher ( $p < 0.05$ ).

### III.2.3. Estado de las plantas durante el almacenamiento en frío

Las plantas de 1 mes y medio de edad mostraron una tendencia a la disminución en el contenido de pigmentos a lo largo del tiempo durante el almacenamiento en frío, sin que se detectaran diferencias entre variedades (Tabla III. 1). Con respecto al contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. III. 2), tampoco se observaron diferencias entre variedades.

**Tabla III. 1.** Contenido en pigmentos en hoja joven de dos variedades de *C. pepo*. Datos representan las medias  $\pm$  ES de réplicas triplicadas de tres plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test estadístico Fisher ( $p < 0.05$ ).

Días a 4 °C	Variedad	Clorofila A	Clorofila B	Carotenos y xantofilas
0	Natura	7,33 <sup>a</sup>	1,59 <sup>a</sup>	2,42 <sup>a</sup>
	Sinatra	6,73 <sup>a</sup>	1,43 <sup>a</sup>	2,19 <sup>ab</sup>
5	Natura	4,23 <sup>b</sup>	0,8 <sup>b</sup>	1,75 <sup>c</sup>
	Sinatra	4,32 <sup>b</sup>	0,85 <sup>b</sup>	1,62 <sup>c</sup>
14	Natura	3,63 <sup>bc</sup>	0,71 <sup>b</sup>	1,8 <sup>bc</sup>
	Sinatra	3,07 <sup>c</sup>	0,69 <sup>b</sup>	1,63 <sup>c</sup>



**Figura III. 3.** Contenido en peróxido de hidrógeno en hoja joven de dos variedades de *C. pepo*. Datos representan las medias  $\pm$  ES de réplicas triplicadas de tres plantas.

III.2.4. Estudio in silico del gen MYB106-like de *C. pepo*

La secuencia nucleotídica del gen *MYB106-like* fue obtenida en la plataforma *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* (Gen ID: 111791574). El gen se encuentra en la hebra sentido del cromosoma 3. El modelo génico muestra una organización en 4 exones y 3 pequeños intrones.

La secuencia correspondiente al ARN mensajero para el gen *MYB106-like* se compone de 808 nucleótidos (*GenBank NCBI*) (Fig. III. 4). Esta se analizó mediante el software *ExPasy translate tool* obteniéndose una proteína ininterrumpida de 215 aminoácidos.

1	L C Y I Q M E T S P R R H K S G L K K G P W T P E E D	
1	CTGTGTATATCCAAATGCGAACCTCTCCTCGCCGCCACAAGTCAGGGTTGAAGAAAGGGCCATGGACCCGGGAAAGA	80
1	GACACAATATAGGTTACCTTTGGAGAGGAGCGCGGTGTTTCAGTCCCACTTCTTTCCCGGTACCTGCGGCCCTTCTTCT	80
81	H K L L A Y I Q Q H G H G S W R T L P P K A G L E R	
81	CCACAAACTCTTGGCTTACATTTCAGCAGCATGGCCATGGAGCTGGCGAACCTTGCCACCCGAAGCCGGACTCGAGCGAT	160
81	GGTGTTTGAGAACCGAATGTAAAGTCGTACCGGTACCTTCGACCCGCTGGAAACGGTGGCTTTTCGGCTGAGCTCGCTA	160
161	C G K S C R L R W T N Y L R P D I K R G K F S L H E E	
161	GTGGAAAGAGTTGTAGACTTCGATGGACGAATTACCTCCGACCCGACATCAAAAGAGGAAAATTTAGTTTTCACGAAGAG	240
161	CACCTTCTCAACATCTGAAGCTACCTGCTTAATGGAGGCTGGGCTGTAGTTTTCTCCTTTAAATCAAACGTGCTTCTC	240
241	Q A I V Q L H A L L G N R W S A I A T H L P K R T D N	
241	CAAGCGATCGTTCAACTTCATGCACTCCTCGAARACAGGTGGTCAGCGATAGCGACCCATTTACCTAAAAGAACGGATAA	320
241	GTTCGCTAGCAAGTTGAAGTACGTGAGGAGCCTTTGTCCACAGTCGCTATCGCTGGGTAATGSAATTTTCTTGCCATT	320
321	E I K N Y W N T H M K K K L I K M G I D P I T H K P	
321	CGAGATCAAGAACTACTGGAACACGCATATGAAGAAAAGCTGATCAAAATGGGGATAGATCCAATCACTCACAAACCAA	400
321	GCTCTAGTTCCTGATGACCTTGTGCGTATACTTCTTTTCGACTAGTTTTACCCCTATCTAGGTTAGTGAAGTGTGTTGTT	400
401	I K N N E E Q N N M N S T L T H M A Q W E T A R L E A	
401	TTAAGAAATGARGAACAAACCAATATGAATCCACCCTCACCCACATGGCTCAATGGGAAACGGCTCGCTCGAAGCC	480
401	AATCTTGTTACTTCTGTTTTGTTTATACTTGGAGTGGGAGTGGGTGTACCGAGTTACCCTTTGGCCAGCCGAGCTTCGG	480
481	E E R L A R Q S K L Q P I P S A N Q N P Y G S S G G E	
481	GAAGAACGACTCGCTCGACAAATCCAAGCTGCAACCAATTCATCGCCAAATCAAAACCCATATGGTTCTTCAGCGCGCA	560
481	CTTCTTGCTGAGCGAGCTGTTAGGTTTCGACGTTGGTTAAGGTAGTCGGTTAGTTTTGGGTATACCAAGAAGTCCGCGCT	560
561	E S P T T S S T A A G G D Q L P S S D S K N N W W D	
561	GGAGTCTCCACGAGCTCGTCTACGGCCGCGGTGGCGATCAACTGCCGTCGTCGGACAGCAAGAACAACTGGTGGGACA	640
561	CCTCAGAGGTTGCTGCAGCAGATCCCGCGCGCCACCGCTAGTTGACGCGCAGAGCCTGTCTCTTGTGTTGACCAACCTGT	640
641	T I L G G E F * V K * V F I Y * * W K K K M T Q K L I	
641	CCATTCCTCGCGCGAGTTCGATGGAAGTGAAGTTTTTATTTAATGATGGAAAAGAAAATGACCCAAAATTAAT	720
641	GGTAAGAGCCGCGCTCAAGTCTACTTCACTCAAAAATAAATAATTAATACTTCTTTTCTTTACTGGGTTTTTAATTA	720
721	M I F G N Y Y F G N * C K C E S L I Y N Y Y Y V F K L	
721	ATGATTTTCGGAAATTTATTTTGGGAATTAATGTAAGTGTGAAAGTTGATTTACAATTAATTAATGTTTTTAAAT	800
721	TACTAAAAGCCCTTAAATAAAAACCCCTTAATTAACATTCACACTTCAAACTAAATGTTAATAATAATCAAAAATTTAA	800
	I S	
801	AATTTCTA	808
801	TTAAGAT	808

Figura III. 4. Secuencia ADNc correspondiente al ARNm del gen *MYB106-like* de *C. pepo* y la secuencia aminoacídica correspondiente. Cuadro negro señala la metionina de inicio y el gris señala la localización del codón de stop. Realizado mediante software Bioedit.

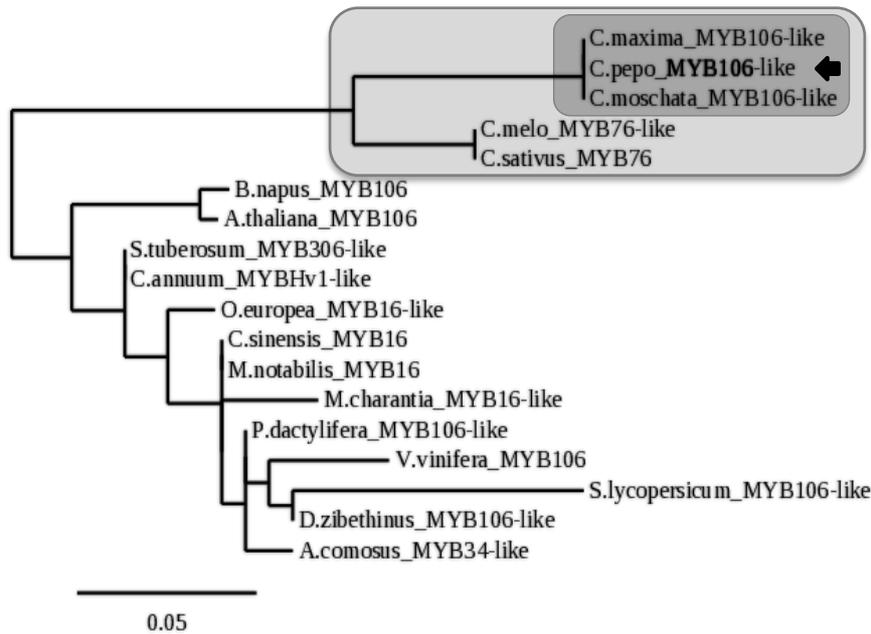
### III.2.5. Análisis de similitud e identidad para la proteína MYB106-like de *C. pepo*

En la tabla III. 2. se muestra una serie de proteínas ortólogas con respecto a MYB106 de *Cucurbita pepo*, halladas mediante NCBI y UNIPROT, donde se detalla la especie, el número de accesión y el porcentaje de identidad.

**Tabla. III. 2.** Resumen de similitudes por alineamiento de la proteína MYB106-like mediante la herramienta BLASTp NCBI.

<i>Especie</i>	<i>Descripción</i>	<i>Identidad</i>	<i>Accesión</i>
<i>Cucurbita moschata</i>	Transcription factor MYB106-like	100.00	XP_022934712.1
<i>Cucurbita maxima</i>	transcription factor MYB106-like	98.60	XP_022983871.1
<i>Cucumis melo</i>	Transcription factor MYB76-like isoform X2	76.39	XP_008443378.1
<i>Cucumis sativus</i>	Transcription factor MYB106	75.63	XP_004136689.1
<i>Solanum tuberosum</i>	Myb-related protein 306-like	77.65	XP_006338434
<i>Capsicum annuum</i>	Myb-related protein Hv1-like	77.65	XP_016561384
<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Transcription factor MYB16-like	77.65	XP_022857955
<i>Citrus sinensis</i>	Transcription factor MYB16	77.06	XP_006482628
<i>Momordica charantia</i>	Transcription factor MYB16 like	74.70	XP_022134455
<i>Solanum lycopersicum</i>	Transcription factor MYB16	74.70	XP_004239393
<i>Phoenix dactylifera</i>	Transcription factor MYB106-like	76.47	XP_008783569
<i>Brassica napus</i>	Transcription factor MYB106	62.50	XP_013640325
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Myb domain protein 106	76.92	NP_001326423
<i>Vitis vinifera</i>	Transcription factor MYB106	69.27	RVW84119
<i>Durio zibethinus</i>	Transcription factor MYB106-like	63.93	XP_022775777
<i>Ananas comosus</i>	Transcription factor MYB34-like	75.88	XP_020082966
<i>Morus notabilis</i>	Transcription factor MYB16	77.06	XP_010088130

Para entender la relación y similitud entre la secuencia del factor de transcripción MYB106-like de calabacín y el de otras especies, se construyó un árbol filogenético que mostró una muy alta relación entre las proteínas de distintas especies de la familia Cucurbitaceae, formando un único nodo que se dividió en dos coincidiendo con los géneros *Cucurbita* y *Cucumis* (Fig. III. 5)

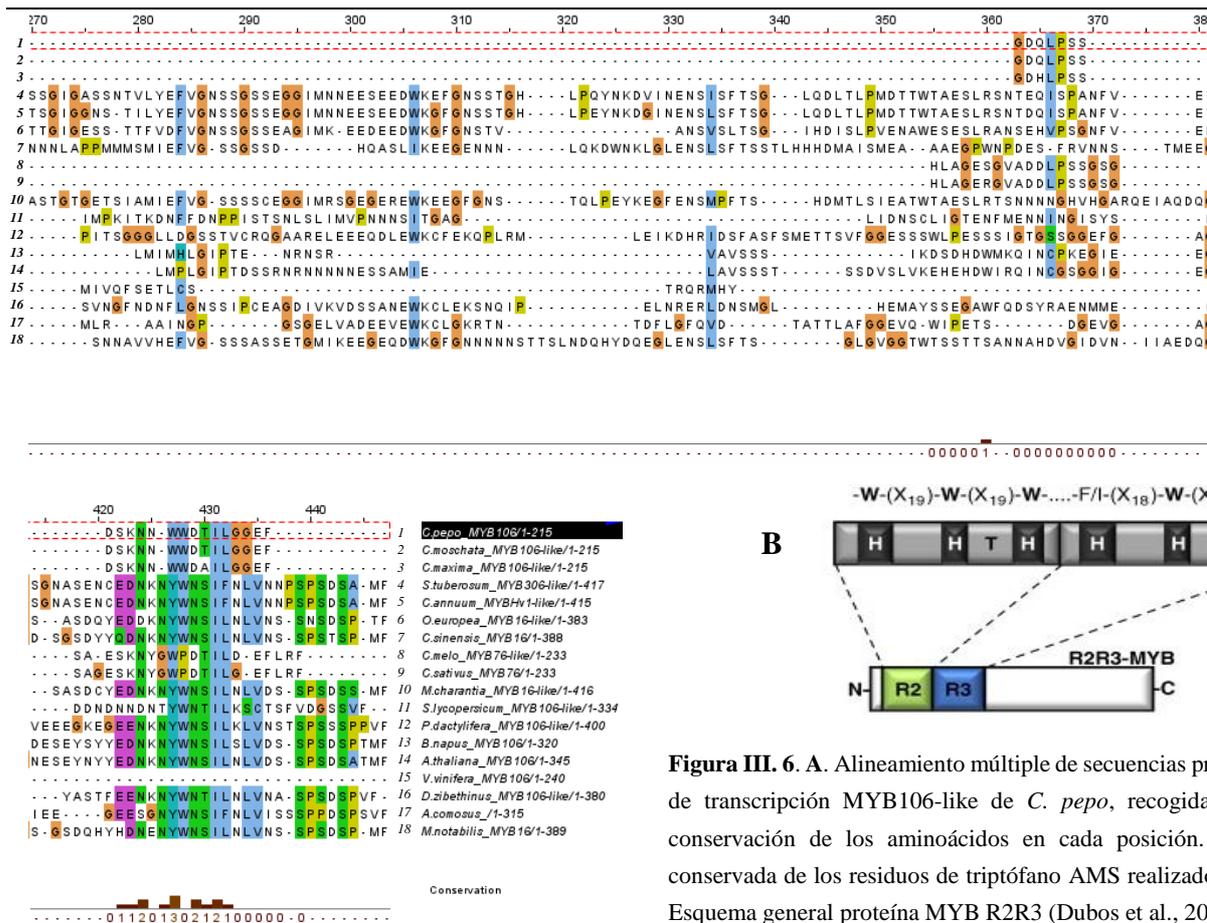


**Figura III. 5.** Árbol filogenético del factor de transcripción MYB106-like y otras proteínas relacionadas. Flecha señalando la localización del factor de transcripción en *C. pepo*. Familia Cucurbitaceae (cuadro gris claro). Género *Cucurbita* (gris oscuro). PhyML, TreeDyn.

La construcción de un alineamiento múltiple con las secuencias aminoacídicas mostró una gran conservación en los primeros 120 aminoácidos correspondientes a las repeticiones R2R3 característicos de este grupo de proteínas (Fig. III. 6). Esta zona altamente conservada corresponde al dominio de unión con el ADN diana.



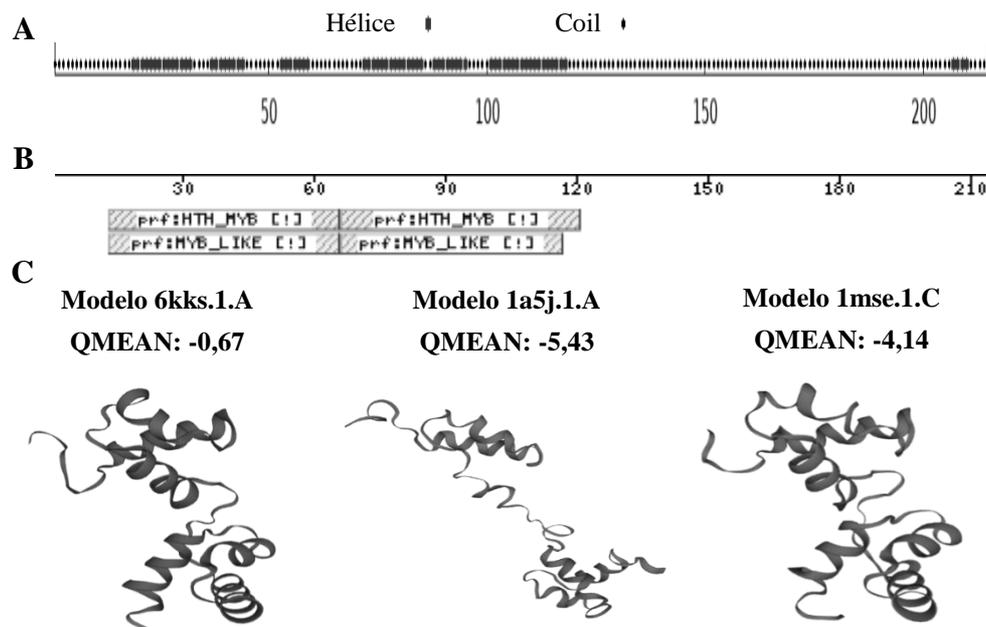
### Capítulo III.- Caracterización del gen candidato MYB106-like



**Figura III. 6. A.** Alineamiento múltiple de secuencias de transcripción MYB106-like de *C. pepo*, recogidas de diferentes especies. El gráfico de conservación de los aminoácidos en cada posición muestra que los residuos de triptófano AMS (residuos 130 y 132) son altamente conservados. **B.** Esquema general proteína MYB R2R3 (Dubos et al., 2002).

### III.2.6. Características de la proteína MYB106-like

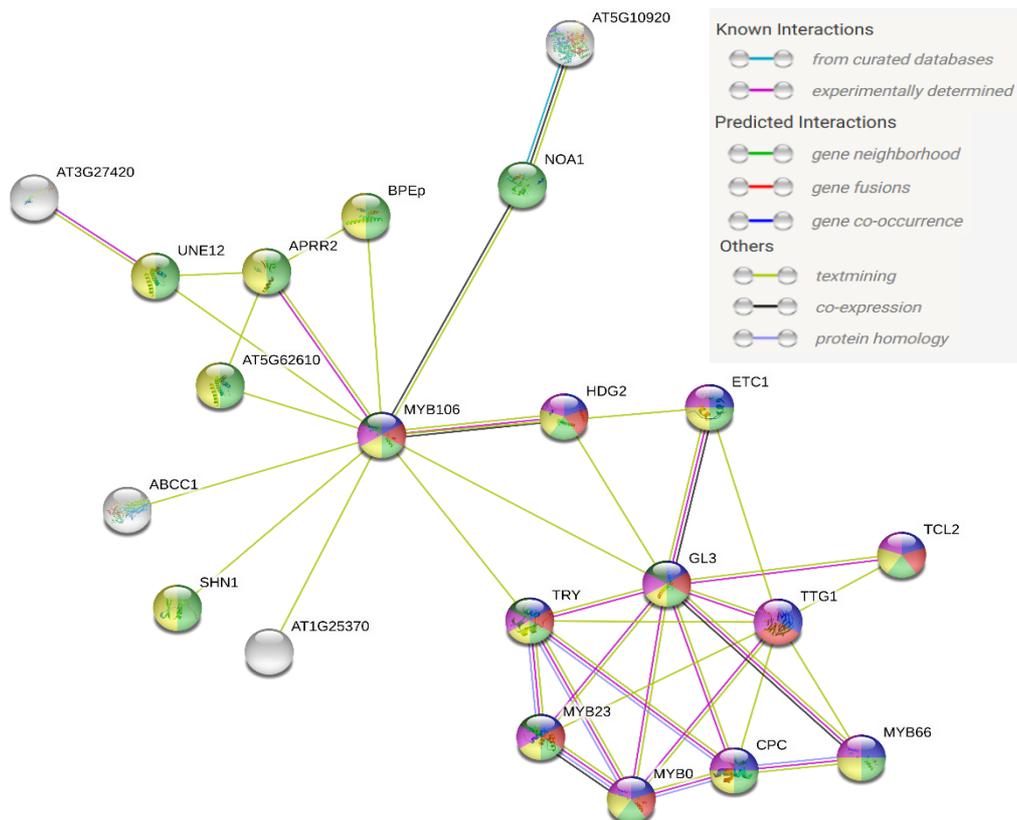
El análisis de la proteína MYB106-Like confirmó una estructura secundaria típica de la familia R2R3MYB. Cada repetición, R2 R3, estaba compuesta por entre 50-53 aminoácidos con la estructura secundaria característica de hélice-hélice-giro-hélice (Figura III. 7A). Estas repeticiones se confirmaron como dominios proteicos conservados MYB-Like al analizarlas mediante las bases de datos PROSIDE y Pfam (Fig. III. 7B). La estructura terciaria modelizada *in silico* (SWISS-MODEL) proporcionó tres posibles modelos estructurales para la proteína problema con un alto valor QMEAN, indicando la alta fiabilidad de los modelos propuestos (Fig. III. 7C).



**Figura III. 7.** A. Predicción de la estructura secundaria de la proteína MYB106-like *C. pepo*. realizado mediante I-TASSER (Zhang Lab. University of Michigan). B. Dominios conservados identificados mediante Pfam. C. Modelos 3D de estructura terciaria para Myb106-like con el valor de fiabilidad (SWISS-MODEL).

### III.2.7. Estudio del interactoma de MYB106

Las funciones de esta proteína se pudieron caracterizar como parte de algunos procesos biológicos estando implicado en el desarrollo de la epidermis, diferenciación celular y de tricomas, entre otras funciones. Existen numerosas evidencias de la relación de este factor de transcripción con otras proteínas como HDG2 o SHN1, esta última es una proteína de unión a ADN.



Biological Process (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0090558	plant epidermis development	11 of 217	1.14e-15
GO:0010026	trichome differentiation	8 of 75	1.65e-13
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	16 of 2361	1.09e-11
GO:0006351	transcription, DNA-templated	15 of 1957	1.36e-11
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	16 of 2591	2.04e-11
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	16 of 2632	2.27e-11
GO:0030154	cell differentiation	11 of 680	2.27e-11
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	16 of 2736	2.82e-11
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	15 of 2209	2.82e-11
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	15 of 2167	2.82e-11
GO:0010091	trichome branching	4 of 28	5.53e-08

**Figura III. 8.** Diagrama de interacciones en *A. thaliana* de MYB106 con otras proteínas creado mediante el software STRING.

### III.3. DISCUSIÓN

El FT MYB106-like fue seleccionado como un posible candidato implicado en la tolerancia al frío gracias a un estudio transcriptómico previo del grupo de investigación comparando variedades con distinta sensibilidad frente a este estrés (Carvajal et al., 2018).

Debido a la ausencia de información sobre este factor de transcripción y su importancia en *C. pepo*, se ha abordado una caracterización funcional de dicho gen. La expresión en el fruto siguió una dinámica totalmente distinta a lo que posteriormente se observó en hoja y meristemo. En ambas variedades la expresión del gen fue muy baja al inicio del estrés, pero fue en la variedad tolerante Natura donde a los 10 días de exposición a 4 °C se produjo un gran pico de expresión superior a los valores que se observaron en los otros tejidos. Estos datos corroboraron los resultados obtenidos en el estudio transcriptómico realizado por Carvajal et al. (2018), y permitieron analizar la evolución de la expresión a lo largo del tiempo. S. Yang et al. (2018) determinaron también una expresión diferencial entre distintos tejidos *C. sativus* del homólogo *CsMYB6*, como hoja joven, tallo, raíces, destacando la expresión en ovario.

A diferencia del fruto durante el almacenamiento en frío, la expresión del gen tanto en hoja como en meristemo fue muy similar entre ambas variedades a lo largo de la exposición al frío. En ambos tejidos en la variedad tolerante, se observó como a los tres días de exposición los valores de expresión aumentaron, para después disminuir a largo plazo. Datos similares obtuvieron L. Zhang et al. (2012) en plántulas de trigo a 4 °C, donde aumentó de la expresión a lo largo de las primeras 72 horas. En plántulas de *Pinus sibirica* sometidas a un estrés a temperaturas de -20 °C, Zhao et al. (2020) observaron un aumento de la expresión del gen MYB106 durante las primeras 24 horas.

Durante el periodo de estrés por frío no se observaron cambios aparentes en las plantas, aunque si se observó una tendencia de disminución en el contenido de clorofilas, que podría indicar una reducción en el metabolismo fotosintético. En plántulas de brócoli y rábano, Paradiso et al. (2018) observaron que tras 13 días a 5 °C no se encontraron diferencias en el contenido total de clorofilas, debido tal vez a que estas plantas permanecieron en oscuridad durante todo el almacenamiento.

Para caracterizar el FT MYB106-like de *Cucurbita pepo*, se realizó además un análisis *in silico* mediante una serie de herramientas bioinformáticas. El gen codifica una proteína de 215 aminoácidos con un elevado porcentaje de identidad con las especies del mismo género *C. moschata* y *C. máxima*. Este factor de transcripción se clasificó dentro del subgrupo 9 de esta familia ya que presentaba unos motivos característicos de 10 y 22 aminoácidos descritos por Kranz et al. (1998). El alineamiento múltiple permitió caracterizar la secuencia consenso conservada, identificándose las repeticiones R2R3 propias de la familia MYB. Estas repeticiones comprendían una estructura secundaria específica de hélice-hélice-giro-hélice (HTH) característica de estas proteínas, el giro es necesario para la formación del dominio de unión al ADN (Matus et al., 2008). Los dominios proteicos conservados fueron del tipo MYB-like pudiéndose unir tanto a ADN (dominio MYB) como a proteínas (dominio SANT) (Boyer et al., 2004).

La falta de información funcional de este FT en cucurbitáceas y más concretamente en *C. pepo*, nos llevó a estudiar sus funciones en *A. thaliana*, (Hruz et al., 2008; Katiyar et al., 2012; Ma et al., 2005; Zimmermann et al., 2004). Este análisis mostró que este gen se expresaba en todos los estadios del desarrollo de la planta de *Arabidopsis*. Kranz et al. (1998) confirmó también una expresión diferencial de los FT R2R3-MYB entre los distintos tejidos, además de responder de forma distinta a las condiciones fisiológicas, lo que indicó el gran potencial regulador de estos FT. Yanhui et al. (2006)

mostraron que la mayoría de los genes MYB respondían a las condiciones de estrés.

Se ha descrito una co-expresión del gen *MYB106* con otros genes como *HDG2*. El gen *HDG2* codifica una proteína de la familia HD-ZIP IV, su mutación en *Arabidopsis* produjo tricomas con apariencia vidriosa en comparación con los de tipo salvaje, sin afectar al número de ramificaciones (Marks et al., 2009; Peterson et al., 2013).

Otra de las interacciones destacadas es la que se señala con el gen *SHN1/WIN1*. Ambos genes, *MYB106* y *SHN1/WIN1*, han sido catalogados como algunos de los principales reguladores transcripcionales en la biosíntesis de la cutícula (M. He et al., 2018). Oshima et al. (2013) mostraron que *MYB106* y *WIN1/SHN1* regulan conjuntos similares de genes. Sus resultados indicaron que la cascada reguladora de proteínas similares a MIXTA (*MYB106-MYB16*) y *WIN1/SHN1* regulan coordinadamente la biosíntesis de cutina y la acumulación de cera, destacando a *MYB106* como regulador de la expresión de *WIN1/SHN1*.

Demostrada la relevancia funcional del gen *MYB106* en otras especies, y habiéndose estudiado en profundidad su expresión quedando patente su posible implicación frente al estrés por frío en calabacín, el siguiente paso necesario era su evaluación funcional mediante el uso de técnicas biotecnológicas.



# IV

## CAPÍTULO Sobreexpresión y silenciamiento génico en *Cucurbita pepo* mediante el uso de ZYMV

*Overexpression and gene silencing in  
Cucurbita pepo using ZYMV*





## **IV.1. INTRODUCCIÓN**

Los virus de ARN de plantas son una herramienta eficiente para la sobreexpresión y silenciamiento de genes endógenos. Esta tecnología es de gran utilidad para conocer la función de determinados genes en el desarrollo y las respuestas de defensa frente al estrés en las plantas. Por otro lado, el silenciamiento génico inducido por virus también es una técnica rápida y eficiente de genética inversa para la regulación negativa de los genes diana (Robertson, 2004; Shoresh et al., 2006).

El virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV, género Potyvirus, familia Potyviridae) es uno de los principales patógenos de las cucurbitáceas en todo el mundo (Messelink et al., 2020). Los síntomas de la enfermedad causados por ZYMV a menudo incluyen amarillamiento, retraso en el crecimiento, deformaciones de las hojas con ampollas de color verde oscuro y mosaico. En el caso de infección temprana, se observan graves pérdidas de rendimiento de los cultivos como resultado de problemas de desarrollo o deformación de la fruta (Desbiez & Lecoq, 1997; Gal-On, 2007).

Para su transmisión por áfidos el ZYMV necesita la presencia de un triplete de aminoácidos (Asp-Ala-Gly) próximo al extremo N-terminal de la proteína de la cápside (CP), ya que una mutación en esta región impide la transmisión del virus (Gal-On et al., 1992). También se sabe que la sustitución de Arg por Ile en la posición 180 del dominio Phe-Arg-Asn-Lys (FRNK), un dominio muy conservado que se encuentra en la región HC-Pro, es la responsable de la modificación de la sintomatología provocada por el virus, pasando a ser leve o incluso asintomática, dando lugar a un virus atenuado, sin que esto afecte a la infectividad del virus ni a su movimiento sistémico en la planta (Gal-On, 2000).

Para poder utilizar el ZYMV como un sistema de expresión de genes en cucurbitáceas, se diseñó un vector recombinante ZYMV-AGII a partir de un ZYMV atenuado (Gal-On, 2000). ZYMV-AGII es un sistema que se ha utilizado con éxito para la sobreexpresión de varios genes en cucurbitáceas (Aly et al., 2005; Arazi et al., 2001, 2002; Shoresh et al., 2006). A diferencia de otros vectores virales conocidos, que causan enfermedades graves a las plantas hospedadoras, este vector no provoca un fenotipo grave ni un deterioro del desarrollo como el causado por la cepa salvaje del virus; de hecho, los síntomas en pepino y en calabacín son generalmente leves (Gal-On, 2000).

## **IV.2. RESULTADOS**

### ***IV.2.1. Construcción de los vectores víricos***

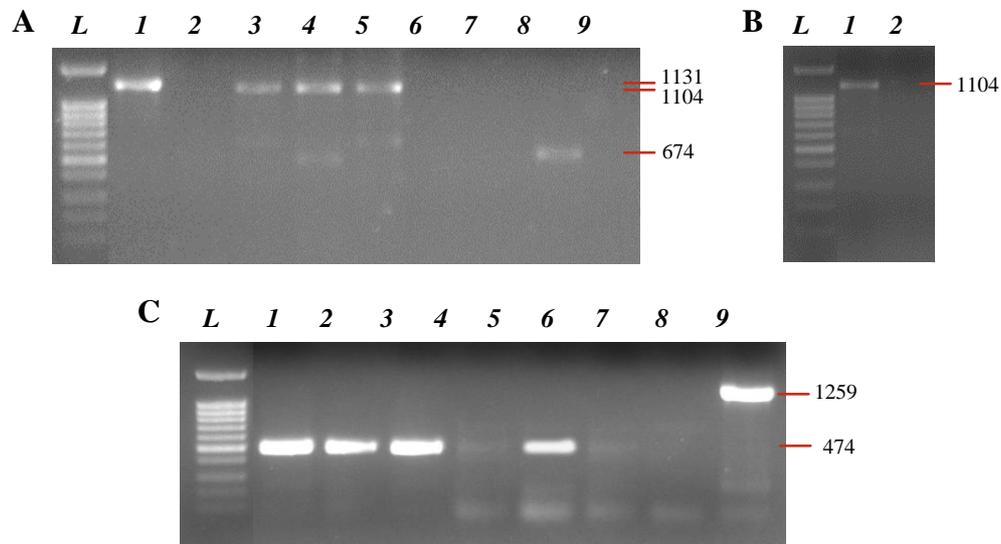
A partir del vector vírico ZYMV-AGII se realizaron los distintos constructos (Tabla IV.1), como se detalla en el apartado 3.9 de material y métodos. Todas las construcciones fueron secuenciadas para posteriormente proceder a la infección de las plantas por biolística.

**Tabla IV. 1.** Resumen de los distintos vectores víricos utilizados.

<i>Nombre vector vírico</i>	<i>Características</i>	<i>Función</i>
<b>ZA</b>	ZYMV-AGII- Vector vírico atenuado	Control
<b>ZA-GFP</b>	Virus atenuado con la proteína GFP	Control
<b>ZA-sobre</b>	Virus atenuado con la secuencia del gen <i>MYB106-like</i> completa	Sobreexpresión
<b>ZA-SobreHA</b>	Virus atenuado con la secuencia del gen <i>MYB106-like</i> completa con el epítipo HA	Sobreexpresión y control de expresión proteína
<b>ZA-Silen</b>	Virus atenuado con parte de la secuencia del gen <i>MYB106-like</i> en antisentido	Silenciamiento
<b>ZF-Sobre</b>	Vector vírico no atenuado con la secuencia del gen <i>MYB106-like</i> completa	Control

#### ***IV.2.2. Infectividad, expresión y estabilidad de los vectores virales***

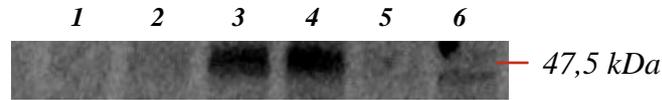
Para comprobar la efectividad de la transformación, se extrajo ARN de hojas de plantas infectadas con las construcciones anteriores y se realizó la comprobación mediante PCR, los resultados se muestran en (Fig. IV.1).



**Figura IV.1.** Electroforesis en gel de agarosa de la PCR comprobación de las plantas infectadas utilizando los cebadores BestF y BestR. (L) Marcador de peso molecular; **A.-**(1,2) ZA-SobreHA; (3,4,5,6) ZA-Sobre; (7,8) ZA-Silen; (9) Control negativo. **B.-** (1) ZF-Sobre; (2) Control negativo; **C.-** (1,2,3,4,5) ZA; (7) Control planta sin infectar; (8) Control negativo; (9) ZA-GFP.

Se analizó el procesamiento de la proteína introducida por el vector para la sobreexpresión en tejidos sintomáticos de plantas de calabacín infectadas con el vector ZA-SobreHA mediante western blot.

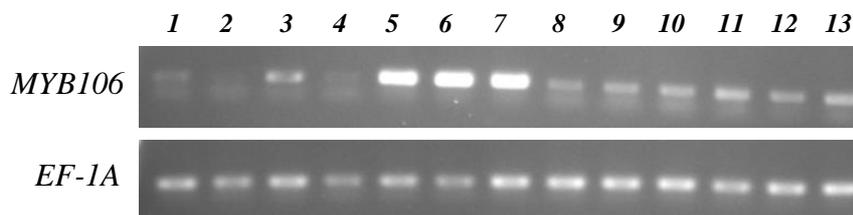
Para ello se utilizó un anticuerpo específico frente al péptido hemaglutinina (Hemaglutinin, HA) del virus de la gripe. Se observaron bandas positivas en las plantas infectadas, no observándose las mismas en los controles sin infectar y aquellos infectados con el virus atenuado ZA (Fig. IV.2).



**Figura IV.2.** Análisis western blot de proteínas expresadas en plantas de *C. pepo* mediante el uso de anticuerpo anti-HA. (1, 2) Plantas control; (2, 3) plantas infectadas con el vector ZA-SobreHA; (5, 6) Plantas infectadas con el vector vírico control ZA.

#### ***IV.2.3. Efecto de los vectores víricos sobre la expresión del gen MYB106 en plantas de calabacín***

Se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa la expresión del *MYB106-like* en las plantas infectadas para observar si se producían cambios en su expresión (Fig. IV. 3). Tanto en el caso del silenciamiento como en la sobreexpresión, se produjeron variaciones en la expresión del gen (Fig. IV. 3). Esta se redujo notablemente, alrededor de un 75 %, en las plantas infectadas con el vector vírico para el silenciamiento (ZA-Silen). En plantas infectadas con el vector de sobreexpresión, con o sin el epítipo HA, se produjo un aumento de la expresión, llegando a ser un 65 % mayor que en las plantas control. La infección con los vectores víricos control (vacío y con el inserto del gen que codifica para la GFP) no provocaron cambios en la expresión del *MYB106*.



**Figura IV. 3.** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de *MYB106* en hojas de calabacín. Hojas de plantas infectadas con los vectores víricos: ZA-Silen (1,2,4); ZA-GFP (3); ZA-Sobre (5,6); ZA-SobreHA (7); ZA (8,9,10); Control sin infección vírica (11,12,13).

#### **IV.2.4. Fenotipo de las plantas infectadas**

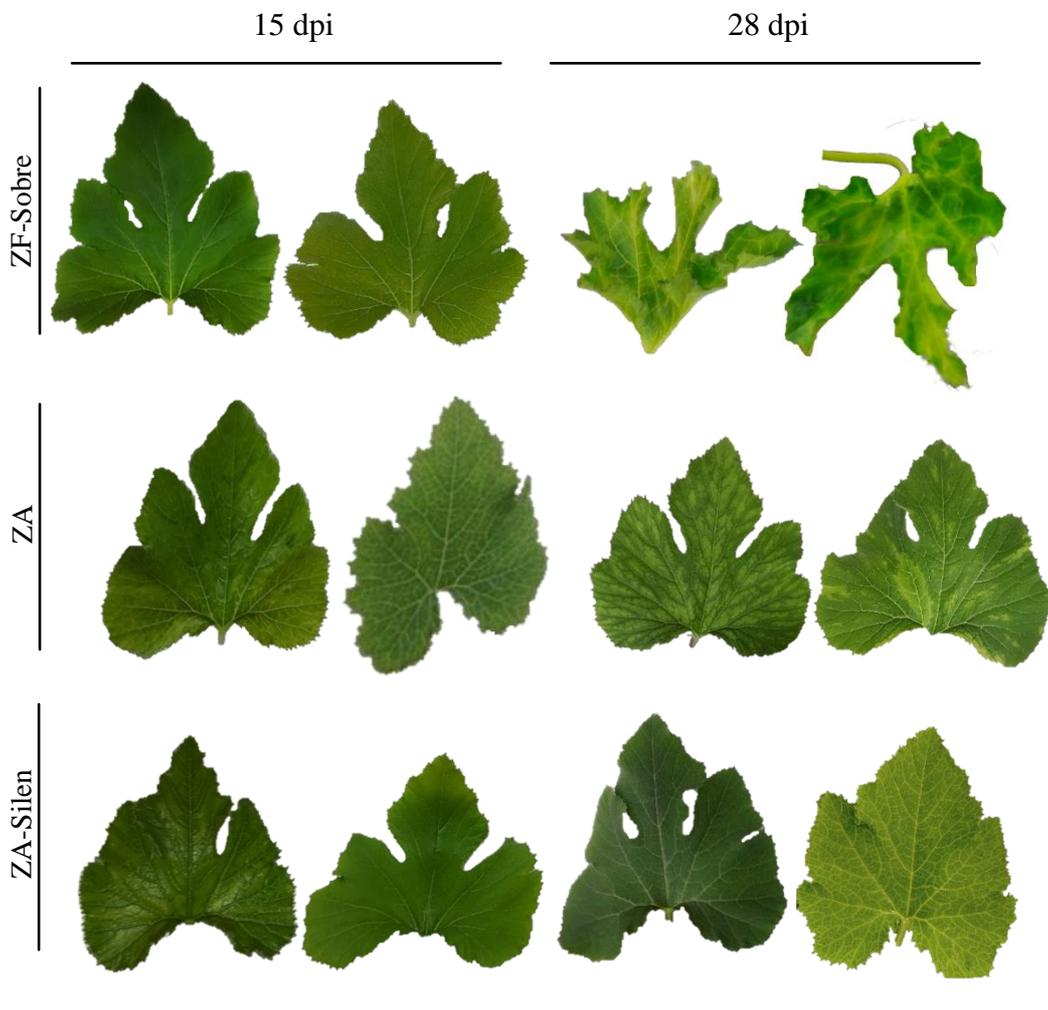
Tras la infección de distintas variedades, Sinatra, Natura, Cavili y Cora, con los vectores víricos utilizados no se detectaron diferencias fenotípicas entre variedades.

La construcción con el vector no atenuado, ZF-Sobre, a los 15 días post-infección (dpi) provocó síntomas muy leves, y tras 28 días los síntomas fueron más aparentes y severos, con hojas cloróticas y deformadas, e incluso inhibió de crecimiento de la planta (Fig. IV. 4).

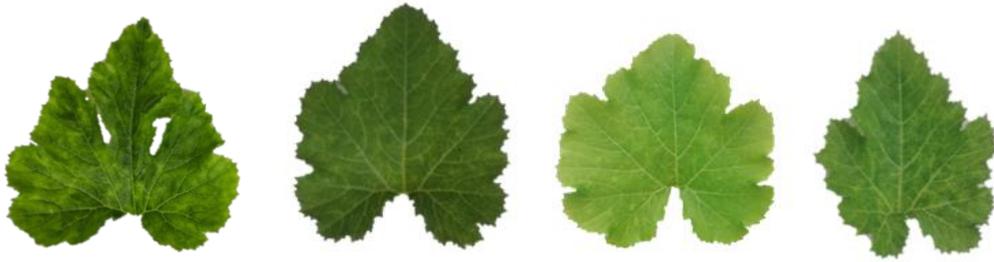
En el caso de las plantas de *C. pepo* infectadas con el vector atenuado control (ZA) se observaron síntomas muy leves a los 15 dpi, presentado un aclaramiento en los nervios de las hojas. A los 28 días los síntomas eran más visibles mostrando un dibujo en mosaico que no afectó a la forma de las hojas y tampoco al normal crecimiento de la planta (Fig. IV.4).

El fenotipo de las hojas pertenecientes a plantas infectadas con ZA-Silen, vector vírico utilizado para el silenciamiento del gen *MYB106* (Fig. IV. 4), no sufrió cambios destacables entre las 2 y 4 semanas. En ambas ocasiones, la morfología de las hojas fue similar y presentaron un color uniforme, sólo a los 28 días presentaban una clorosis muy tenue en los nervios, similar a lo encontrado en algunas hojas de plantas infectadas con el vector vírico vacío.

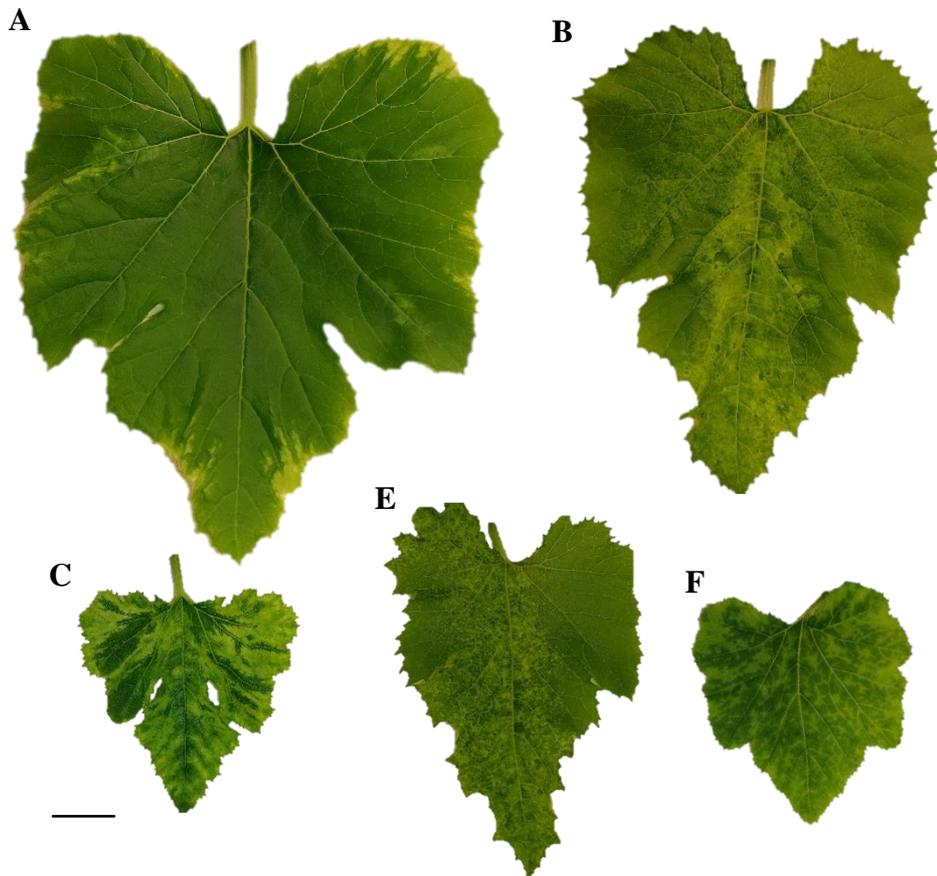
El vector vírico para la sobreexpresión del *MYB106*, ZA-Sobre, provocó diversos mosaicos en las hojas del calabacín. A los 15 dpi (Fig. IV. 5) los síntomas provocados por el virus fueron leves, y los mosaicos cloróticos casi inapreciables. Tras 28 días de infección, las plantas presentaban distintos motivos en sus hojas que eran mucho más evidentes (Fig. IV. 6), observándose desde punteaduras, manchas cloróticas sólo en las partes externas (Fig. IV. 6A) a clorosis generalizada similar a la encontrada con el vector control ZA (Fig. IV. 6C) y clorosis leves rodeando a los nervios secundarios de la hoja (Fig. IV. 6F).



**Figura IV. 4.** Hojas de plantas de *C. pepo* infectadas con los vectores víricos ZF-Sobre, ZA y ZA-Silen a los 15 y 28 dpi.

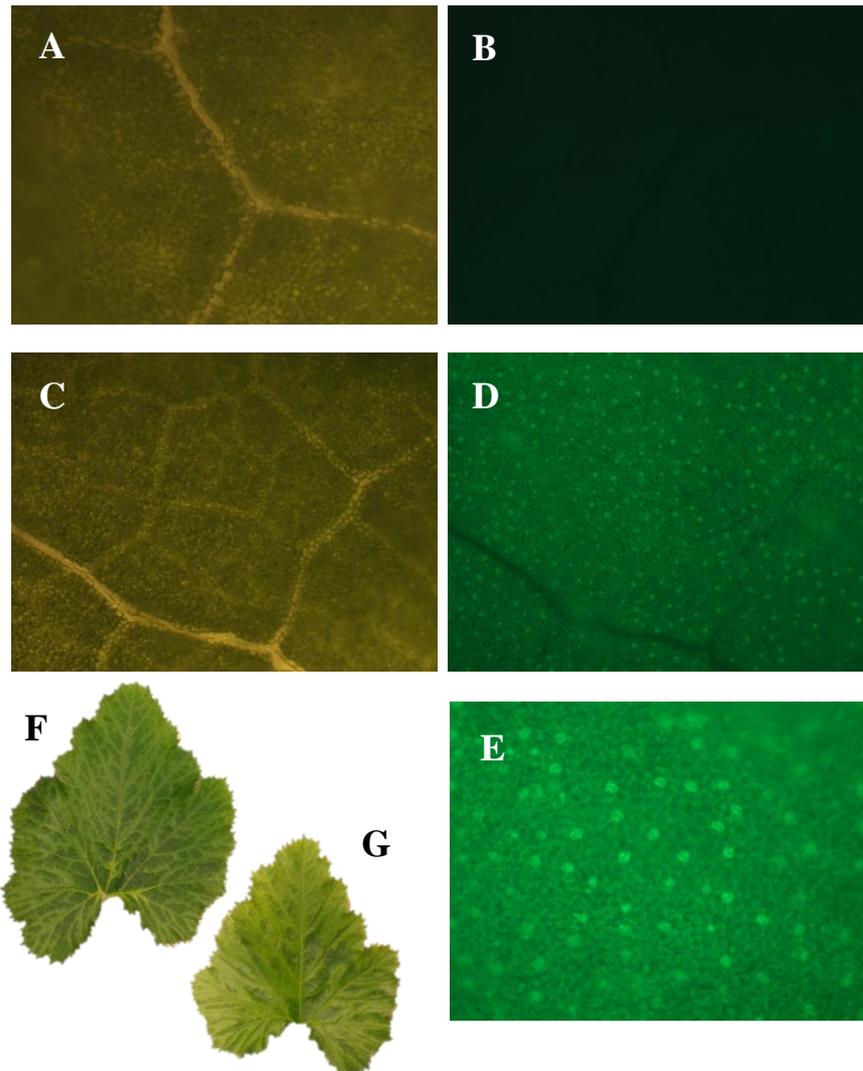


**Figura IV. 5.** Hojas de *C. pepo* infectadas con la construcción **ZA-Sobre** tras **15 dpi**.



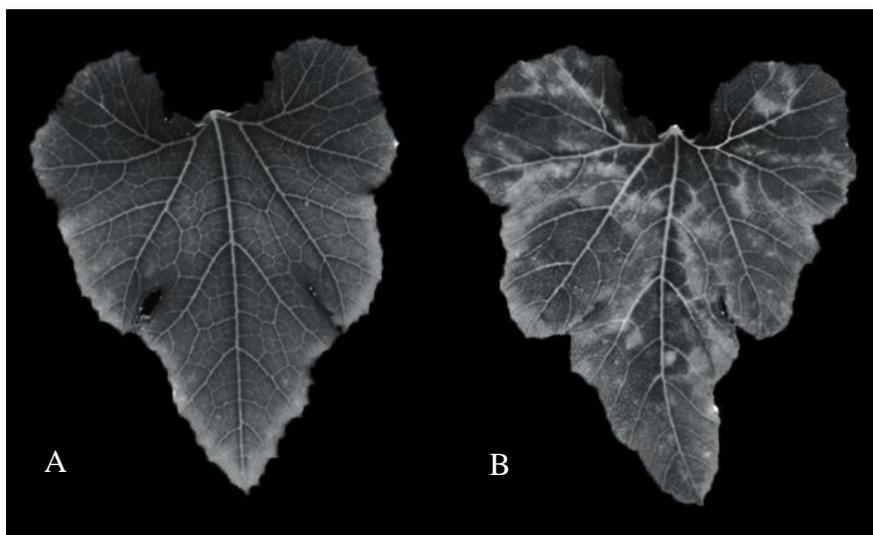
**Figura IV. 6.** Diversidad de mosaicos presentados en una única planta de *C. pepo* infectada con la construcción **ZA-Sobre** a los **28 dpi**. Hoja totalmente expandida con una clorosis muy leve en zonas externas (**A**). Hoja adulta con clorosis de tipo punteado localizada en la zona central de forma más intensa (**B**, **D**). Hoja en desarrollo con clorosis severa generalizada (**C**) y clorosis distribuida en las zonas de los nervios (**E**). Barra 1 cm.

La otra construcción control de la infección ZA-GFP, mostró síntomas iguales a los expresados por el vector vírico vacío ZA (Fig. IV. 7F-G). Para comprobar la correcta expresión de la proteína GFP, se observaron hojas mediante microscopía de fluorescencia detectado la presencia de esta enzima en las hojas infectadas (Fig. IV. 7).



**Figura IV. 7.** Imágenes de microscopía de fluorescencia. Hoja control sin infección (A) imagen sin filtro de fluorescencia y con filtro para excitación de GFP (B). Hoja de planta inoculada con la construcción ZA-GFP sin (C) y con filtro. (E)Aumento 20X. Hojas tras 15 dpi (F) y 28 dpi (G) con el vector ZA-GFP.

Por otra parte, para detectar la localización de las proteínas GFP y por tanto del vector viral AGII en la hoja, estas se analizaron visualizándolas bajo luz UV (Fig. IV. 8), con lo que se pudo observar que la localización no era uniforme, detectándose zonas con mayor intensidad de infección. Cabe destacar que las zonas cloróticas de la hoja no correspondían con las zonas de mayor presencia de GFP.



**Figura IV. 8.** Imágenes bajo luz UV de una hoja control (A) e inoculada con la construcción ZA-GFP (B) de *C. pepo*.

#### ***IV.2.5. Análisis de los síntomas provocados por el vector de sobreexpresión en el fruto de calabacín***

Las plantas de calabacín de la variedad Cora tras un mes y medio desde la infección con la construcción de sobreexpresión ZA-Sobre seguían expresando el gen diana correctamente, hecho que se comprobó mediante PCR semicuantitativa. La presencia del virus era visible en la planta y además se corroboró la sobreexpresión del gen *MYb106* en las hojas tras este tiempo.

Para valorar la efectividad de la infección en frutos, se evaluaron éstos a los 2-3 días postantesis en la variedad Cora.

El estudio por RT-PCR semicuantitativa de frutos de plantas infectadas por el vector ZA-Sobre confirmó la presencia del mismo tanto en el mesocarpo como el exocarpo del fruto (Fig. IV. 9A-B), observándose una banda de igual tamaño e intensidad en todos los frutos analizados y que no aparecía en los frutos control de plantas no infectadas.

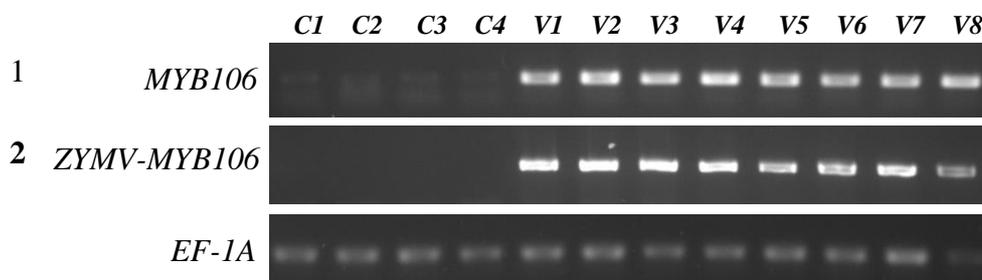
En cuanto a la expresión del gen *MYB106*, en los frutos control fue muy baja en comparación con los frutos infectados que tenían una alta expresión del gen, lo que confirmaba la sobreexpresión del gen *MYB106* tanto en el mesocarpo como en el exocarpo del fruto (Fig. IV. 9). Cabe destacar que no se observaron diferencias en el nivel de expresión del gen entre los distintos frutos infectados.

El crecimiento y desarrollo de los frutos fue normal, sin sufrir graves deformaciones ni clorosis, como se observa en la figura IV. 10. En el mesocarpo del fruto no se observó ningún fenotipo específico del virus (Fig. IV. 10), a pesar de su presencia patente mediante RT-PCR semicuantitativa (Fig. IV. 9). En el exocarpo, sin embargo, si eran notables las zonas con coloración en mosaico y pequeñas deformaciones o hundimientos (Fig. IV. 11).

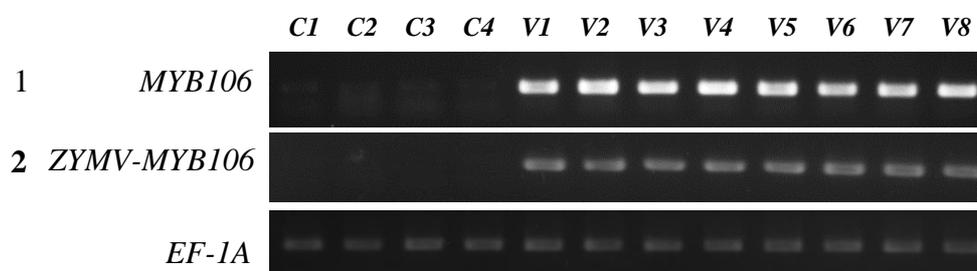
Una vista más en detalle del exocarpo del fruto (Fig. IV. 11) permitió observar cómo las deformaciones se desarrollaron de forma muy leve en los frutos jóvenes (2-3 días postantesis) (Fig. IV. 11.B-C). En cambio, en aquellos frutos más avanzados en el desarrollo (5-6 días postantesis) (Fig. IV. 11D) estas deformaciones fueron más pronunciadas en la zona de cierre pistilar, dificultando una futura evaluación de los frutos durante la postcosecha.

En la evaluación del número de tricomas del exocarpo de los frutos infectados con ZA-sobre no se observaron diferencias significativas con respecto a los frutos control sin infectar (Detalle de los tricomas Fig. IV. 11).

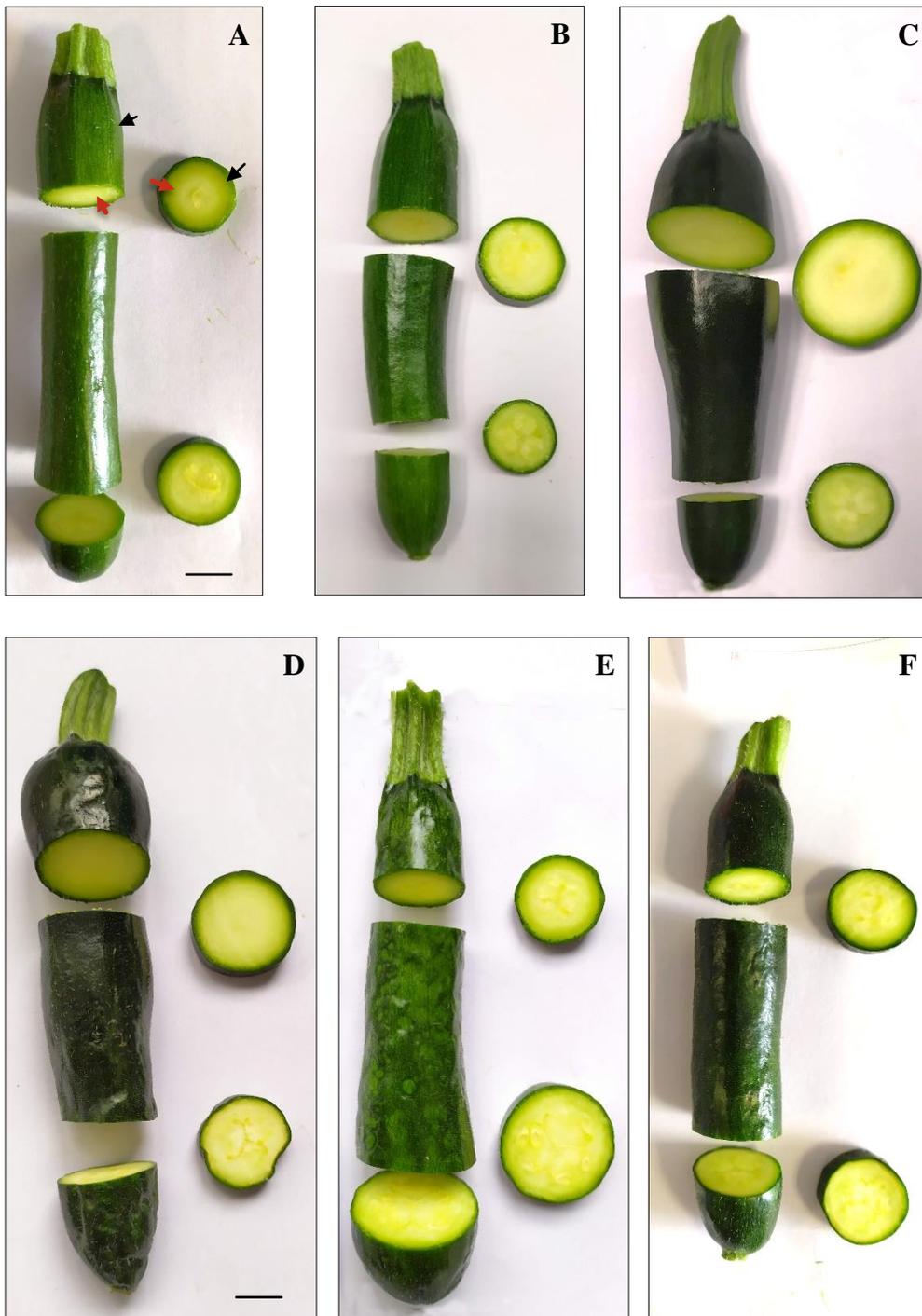
**A. MESOCARPO**



**B. EXOCARPO**



**Figura IV.9.** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de *MYB106* (1- cebadores RTMYB2) y del virus (2- cebadores RTvirus) en el mesocarpo (**A**) y exocarpo (**B**) de frutos de calabacín de la variedad Cora. (C1-C4) Frutos control sin infección. (V1-V8) Frutos de plantas infectadas con el virus ZA-Sobre. La expresión del gen constitutivo *EF-1A* sirvió para normalizar las concentraciones de ADNc empleadas.



**Figura IV. 10.** Frutos control de *C. pepo* cv. Cora sin infección vírica (A, B, C) y frutos de plantas infectadas con el vector vírico de sobreexpresión ZA-Sobre (D, E, F). Flecha negra señala el exocarpo y roja el mesocarpo. Barra 1 cm.



**Figura IV. 11.** Imagen de un fruto control de *C. pepo* cv. Cora sin infección vírica (A) y frutos de planta infectada con el vector vírico de sobreexpresión ZA-Sobre (B, C y D). Detalle del exocarpo de la zona media (I) y final del fruto (II). Barra 1 cm

### IV.3. DISCUSIÓN

El uso de vectores víricos es una técnica que ha sido aplicada en diversas especies de cucurbitáceas con distinto grado de éxito (Aly et al., 2005; Arazi et al., 2001, 2002; Kang et al., 2016; Shibolet et al., 2001). A diferencia de otros vectores virales conocidos, que causan enfermedades graves a las plantas hospedadoras, el vector viral utilizado como herramienta de editado genético fue el virus atenuado ZYMV-AGII (Arazi et al., 2001), que presenta la ventaja de que en las cucurbitáceas se expresa con la misma intensidad que la cepa severa de ZYMV, sin provocar ningún deterioro fenotípico durante el desarrollo (Gal-On, 2000).

La primera infección se realizó mediante biolística para comprobar la infectividad de los constructos. Al comparar los resultados de la infección entre hojas de distintos estadios de desarrollo en *C. pepo*, encontramos resultados contrarios a lo inicialmente esperado, obteniéndose en hojas desarrolladas un porcentaje de infección superior al encontrado en cotiledón. En principio, cabía esperar que las infecciones en cotiledones fuesen más exitosas, debido a su gran tasa de división y, a que poseen mayor resistencia que las hojas, pudiendo aguantar mucho mejor la presión de disparo de la pistola de ADN (H. Wang, 2011), sin embargo, las hojas desarrolladas tuvieron un porcentaje mayor de infección.

Nuestros resultados muestran el éxito de las construcciones para la sobreexpresión y el silenciamiento del virus en hojas de las plantas infectadas mediante RT-PCR semicuantitativa. Ni el virus control ZYMV-AGII, ni el que incluía la GFP provocan cambios en la expresión del gen *MYB106-like*. La sobreexpresión produjo un aumento de alrededor del 65% en la expresión del gen y la construcción de silenciamiento disminuyó en más del 75% la expresión del gen *MYB106-like* en las hojas de plantas infectadas. Estos resultados son similares a los aportados por Shores et al. (2006) en la sobreexpresión y silenciamiento de los niveles de ARN mensajero del gen

*TIPK en pepino.* Se ha demostrado que se acumulan siARNs derivados de virus en plantas infectadas con Potyvirus (Xie et al., 2004).

Los síntomas del virus de todas las construcciones comenzaron a ser patentes en la mayoría de las plantas alrededor del día 10 tras la infección, siendo cada vez más patentes con el transcurso del tiempo. El virus se distribuyó por toda la planta hospedante, incluidos los frutos, pero de manera no uniforme, lo que concuerda con lo encontrado previamente por otros autores con diversas construcciones del mismo vector vírico (Aly et al., 2005; Arazi et al., 2001, 2002; Shoshet et al., 2006).

La construcción control con GFP, tuvo una actividad no uniforme en la planta, con mayor actividad concentrada alrededor de las venas principales y laterales, lo que sugiere una replicación activa del virus en estas áreas. Aunque en este trabajo solo se han visualizado las hojas por la imposibilidad de analizar la planta completa, en diversos estudios se ha observado que GFP es detectable en otros órganos como tallos, hojas y frutos (Arazi et al., 2001; Shoshet et al., 2006). Se han demostrado patrones de expresión similares con GFP para otros vectores potivíricos (German-Retana et al., 2000).

Los fenotipos expresados en plantas infectadas mostraron similitudes entre las construcciones control (ZA y ZA-GFP) y en la construcción para el silenciamiento, el fenotipo en mosaico fue muy leve. Sin embargo, en el caso de la sobreexpresión, las hojas mostraron unos motivos en sus hojas no solo distintos a los controles, sino que en la propia planta se encontraron hojas con distinta sintomatología, desde mosaicos que cubrían toda la hoja hasta leves punteaduras. En el estudio realizado por Arazi et al. (2002) la utilización del vector ZYMV-AGII para la expresión de dos proteínas antitumorales provocó también una sintomatología distinta entre las plantas infectadas con cada una de las construcciones, aunque no se encontraron distintos mosaicos en las hojas de misma planta infectada.

Se consiguió un aumento de la expresión del gen en el fruto utilizando el constructo ZA-Sobre, tanto en el exocarpo como en el mesocarpo. Sin embargo, la expresión del gen *MYB106* fue prácticamente inexistente en los tejidos analizados en los frutos control. La sintomatología que provocó ZA-Sobre fue bastante tenue en el mesocarpo, pequeñas deformaciones y mosaicos de distinto color en el exocarpo que no impedían el correcto desarrollo de los frutos y mantenían su típica morfología. Arazi et al. (2001) detectaron en frutos de pepino la presencia del virus mediante proteína GFP prácticamente solo en la zona embrionaria, no en el exocarpo y mesocarpo. Otra de las construcciones utilizadas en el mismo estudio con el interferón-alfa 2 humano, provocó síntomas visibles en las hojas de calabacín con mosaicos leves, pero no sintomatología observable en los frutos, aunque si se detectó su presencia mediante RT-PCR.

En plantas de pepino con sobreexpresión del gen *csMYB6*, homólogo a *AtMYB106* Yang et al. (2018) observaron, una disminución de los tricomas en la superficie del fruto y el peciolo en comparación con los frutos control. Además, la sobreexpresión en *Arabidopsis* produjo plantas con tricomas menos ramificados y con un fenotipo igual al de plantas de pepino. *AtMYB106* suprime la formación de ramificaciones de tricomas en *Arabidopsis*, en lugar disminuir la formación de los tricomas en sí (Jakoby et al., 2008), quizás debido al carácter unicelular de los tricomas en esta planta frente a los pluricelulares que se encuentran en pepino. En nuestro estudio hemos visto que la sobreexpresión no provoca ninguno de estos comportamientos. La densidad de tricomas en los frutos fue la misma tanto en plantas control como en las plantas que sobreexpresaban el gen. La función de *MYB106* en relación con el desarrollo de tricomas en calabacín no está clara por tanto atendiendo a nuestros resultados.

La cutícula es una capa hidrofóbica continua que recubre todos los órganos aéreos y constituye la primera barrera protectora frente los estreses ambientales (He et al., 2019; Jenks et al., 2002) controlando la pérdida de

agua y protegiendo los tejidos internos (Heredia, 2003). Numerosos estudios han demostrado que la cutícula está asociada con la adaptabilidad de las plantas al estrés por temperatura (Shepherd & Griffiths, 2006). En un estudio realizado por Ladaniya (2011) con frutos de *Citrus reticulata Blanco*, se observó como aquellos que fueron cubiertos por una película de cera experimentaron un mejor comportamiento postcosecha durante el almacenamiento en frío. Recientes estudios desarrollados en nuestro grupo de investigación, han detectado patrones diferenciales de depósito de ceras cuticulares en frutos de diferentes variedades y condiciones, por lo que estos resultados podrían indicar una composición diferencial de la misma, sin embargo, la actividad transcripcional de genes relacionados con la cutícula no mostró una buena correlación con la tolerancia al frío (Carvajal et al., 2016). En *Arabidopsis* and *Torenia fournieri*, Oshima et al. (2013) observaron que el silenciamiento de los genes *MYB106* y *MYB16* indujo deficiencias en la cutícula, dando lugar a superficies cuticulares más permeables, cristales de cera epicuticulares reducidos y pérdida de nanocrestas. En cambio, la sobreexpresión del gen *MYB106* indujo la formación ectópica de nanocrestas, que en condiciones naturales solo se forman en órganos florales, así como cristales de cera en forma de placa en las hojas. Oshima & Mitsuda (2013) mediante el análisis del transcriptoma de plantas transgénicas, revelaron que *MYB106* regula positivamente la formación de la cutícula a través de la activación de la expresión de genes de la biosíntesis de cutina y cera, y *SHN1*, que también regula positivamente los genes biosintéticos de cutina. Queda pendiente para futuras investigaciones el análisis de la cutícula del fruto de calabacín en relación a la función del gen *MYB106* y, el estudio de su posible implicación en el estrés por frío realizando ensayos con frutos con la expresión del gen incrementada y silenciada.

# V

## CAPÍTULO

### Regeneración y transformación de *Cucurbita pepo*

*Regeneration and transformation  
of Cucurbita pepo*





## V.1. INTRODUCCIÓN

La familia Cucurbitaceae incluye géneros de cultivo económicamente muy importantes, como *Citrullus* (sandía), *Cucumis* (pepino) y *Cucurbita* (calabaza) cuyos hábitats se extienden entre las zonas templadas y tropicales (Gaba et al., 2004). El género *Cucurbita* incluye una gran cantidad de especies comercializadas en todo el mundo, siendo *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (calabacín) una de las más importantes. En España, el calabacín se produce principalmente en agricultura protegida, y la mayor parte de la producción es exportada a otros países; por lo tanto, durante su transporte los frutos se mantienen durante un cierto período de tiempo a bajas temperaturas. En el calabacín, este tipo de almacenamiento puede generar daños por frío y, por tanto, pérdidas económicas. Se han realizado muchos esfuerzos para seleccionar marcadores genéticos relacionados con la resistencia a los daños por frío, y se han seleccionado algunos metabolitos y genes, pero la falta de un sistema de edición genético eficiente hace que sea muy difícil demostrar la implicación de estos genes en el proceso.

Es evidente la gran importancia del uso de las herramientas biotecnológicas de cultivo *in vitro* y editado genético en esta especie. Nuestro grupo de investigación ha realizado numerosos estudios relacionados con la mejora de la calidad del fruto de calabacín durante la postcosecha y, en un estudio transcriptómico reciente (Carvajal et al., 2018), se han seleccionado una serie de genes que muestran una mayor expresión en variedades que son más resistentes al almacenamiento en frío, y por tanto candidatos a ser genes de resistencia frente a este estrés. Sin embargo, la implicación de estos genes en la resistencia a los DF es difícil de demostrar en *Cucurbita pepo*, y en general para la familia de las cucurbitáceas, ya que no existen hasta la fecha protocolos de transformación eficientes para esta especie.

En la familia de las cucurbitáceas se han descrito diferentes métodos para la regeneración, y la transformación de plantas; sin embargo, no se ha

probado hasta la fecha ningún método que consiga una gran eficiencia para el género *Cucurbita*. Ganapathi & Perl-Treves (2000) y Vengadesan et al. (2005) describieron protocolos de regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa a partir de cotiledón en algunas variedades de pepino (*Cucumis sativus*) y Kathiravan et al. (2006) describieron un protocolo para lograr la regeneración directa de brotes en *Cucurbita moschata*.

En los últimos años, se han publicado varios métodos innovadores para transformar y regenerar distintas especies de *Cucurbita* con una mayor eficiencia. Nanasato et al. (2011) describieron un método basado en el uso de papel de filtro para mejorar la eficiencia de la transformación de *Cucurbita moschata* Duch y, en 2015, Nanasato & Tabei describieron un protocolo para mejorar la transformación mediada por *Agrobacterium* tanto en pepino como, de nuevo, en calabaza (*C. moschata*).

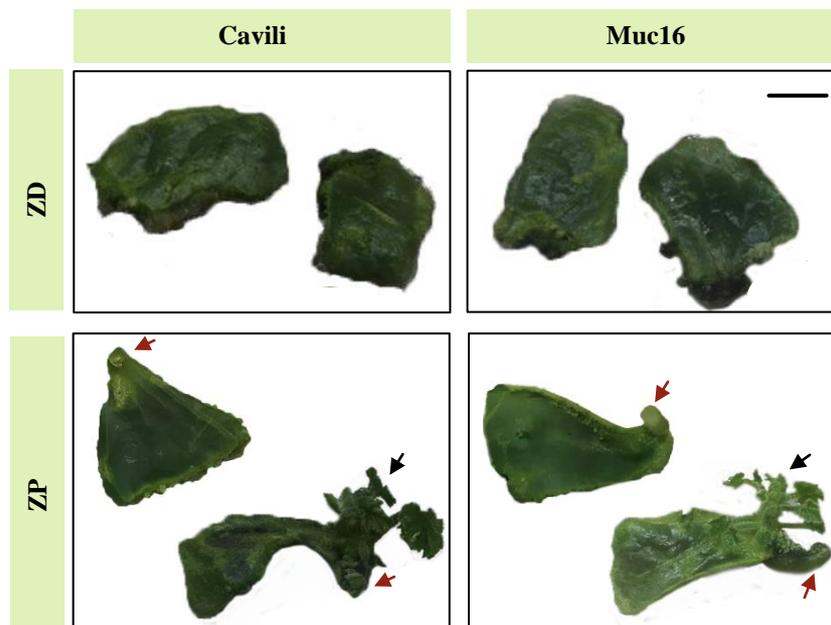
Entre las cucurbitáceas, *Cucurbita pepo* es una de las especies más recalcitrantes a la hora de establecer protocolos de regeneración y transformación, aunque existen algunos trabajos en los que se han descrito algunos métodos que han dado tímidos resultados. Smarrelli et al. (1986) y Sanità di Toppi et al. (1997) demostraron que *Cucurbita pepo* L. podía transformarse mediante el uso de *Agrobacterium*. Shah et al. (2008) presentaron un nuevo protocolo de transformación, aunque la eficacia del mismo fue de sólo un 0.7 %.

En este trabajo presentamos un protocolo para regeneración y transformación genética de 2 líneas de *Cucurbita pepo*, una comercial y otra accesión. Para establecer las condiciones óptimas de regeneración se han probado distintos tipos de explantes y condiciones de cultivo. Además, se ha evaluado la eficiencia de la transformación genética estudiando la capacidad infectiva de varias cepas de *A. tumefaciens*.

## V.2. RESULTADOS

### *V.2.1. Selección del tipo de explante para regeneración in vitro*

Se utilizaron 2 variedades en nuestro estudio, Cavili y Muc16, variedad comercial y tradicional, respectivamente. Las secciones utilizadas como material para la regeneración fueron dos zonas diferenciadas de los cotiledones de la semilla, la parte más distal (ZD) y la mitad más proximal al eje embrionario que contenía parte del hipocótilo, pero sin restos del ápice meristemático (ZP), siguiendo los protocolos de Ananthakrishnan et al. (2003) (Ver sección Material y Métodos). Tras 4 semanas de cultivo en medio MS, la gran mayoría de los explantes mostraban buena apariencia visual y tras comenzar su desarrollo permanecían con una coloración verde, síntoma del buen estado de los mismos (Fig. V. 1), mostrando un alto *greening rate* o porcentaje de supervivencia llegando incluso al 93 % (Tabla V. 1.). Sin embargo, sólo el explante proximal que contenía parte del hipocótilo (ZP) era capaz de regenerar tanto el brote como la raíz (Tabla. V.1). Este tipo de explante fue el utilizado por tanto para la regeneración de plantas *in vitro*.



**Figura V. 1.-** Explantes de las variedades Cavili y Muc16 tras 4 semanas de cultivo *in vitro*. Explantes de zona proximal de cotiledón con hipocótilo (ZP). Explantes de la zona distal del cotiledón (ZD). Flechas rojas indican la zona del hipocótilo. Flechas negras señalan los brotes desarrollados en los explantes. Barra 1 cm.

**Tabla V. 1.** Eficiencia en la regeneración de dos variedades de *C. pepo*.

<i>Variedad</i>	<i>Tipo de explante</i>	<i>Nº explantes</i>	<i>Greening rate (%)<sup>c</sup></i>	<i>%Brotos<sup>d</sup></i>	<i>% Raíz<sup>e</sup></i>
<i>Cavili</i>	ZP <sup>a</sup>	191	86,4	22,0	39,3
	ZD <sup>b</sup>	193	63,7	0,0	0,0
<i>Muc16</i>	ZP	193	92,7	26,4	44,0
	ZD	193	81,9	0,0	0,0

<sup>a</sup>Explante de cotiledón con hipocótilo (ZP)

<sup>b</sup>Explante de la zona distal del cotiledón (ZD)

<sup>c</sup>Greening rate: porcentaje de explantes con buena apariencia visual que se expandían normalmente con respecto al número total de explantes.

<sup>d</sup>Eficiencia en la inducción de brotes calculado como el porcentaje de cotiledones que desarrollaban brotes con respecto al total.

<sup>e</sup>Eficiencia en la inducción de raíces calculado como el porcentaje de cotiledones que desarrollaban raíces con respecto al total.

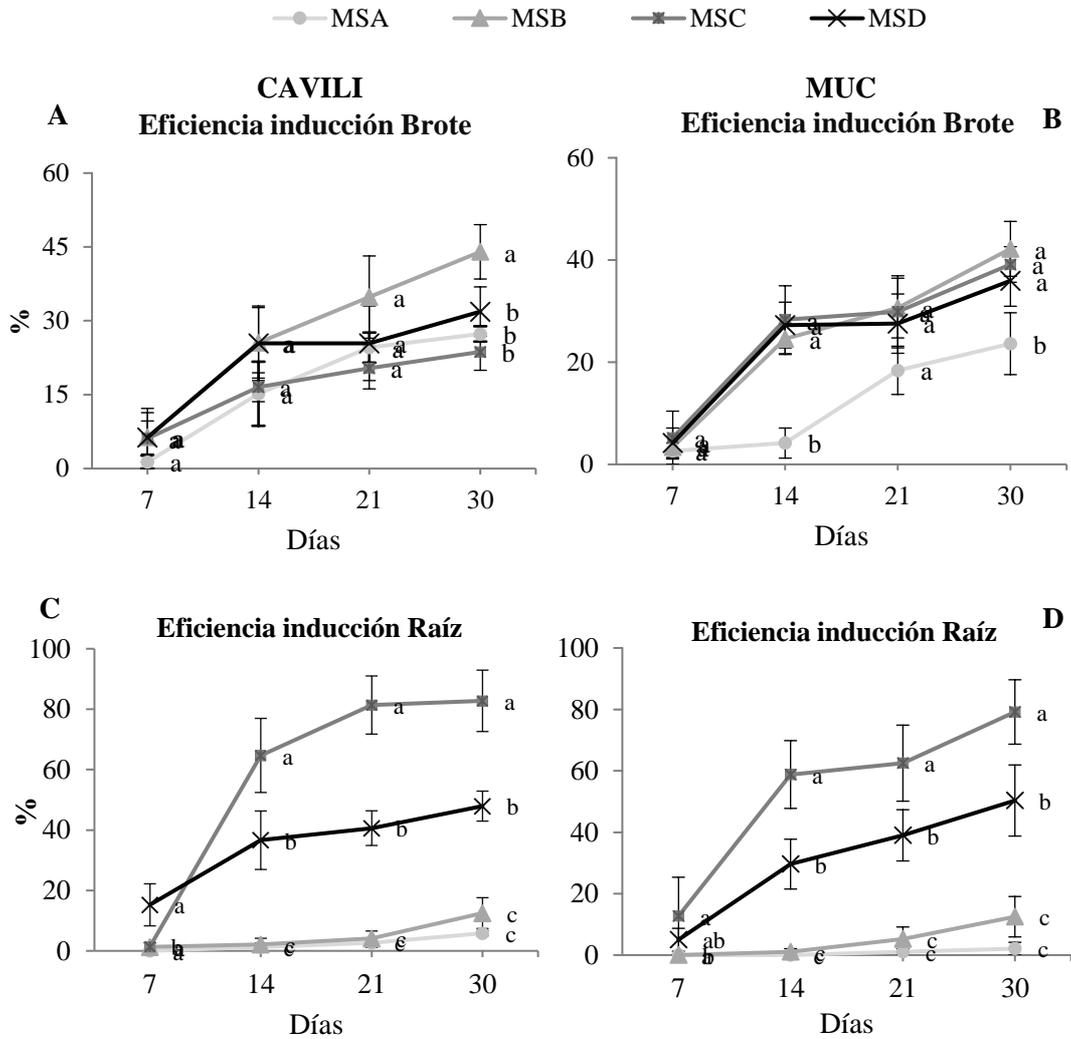
### V.2.2. Evaluación de la regeneración con distintos medios de crecimiento

Para optimizar las condiciones de cultivo y aumentar la eficiencia se utilizaron cuatro medios de cultivo, todos conteniendo medio MS (pH 5.7), 30 g/L de sacarosa y agar al 0.8 % (p/v), suplementados con cuatro combinaciones hormonales: **MSA** (2 mg/L bencilaminopurina (BAP) + 0,1 mg/L ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)), **MSB** (1 mg/L BAP + 0.1 mg/L GA<sub>3</sub>), **MSC** (0.1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>) y **MSD** (0.1 mg/l BAP + 2 mg/l GA<sub>3</sub>).

El desarrollo de los cultivos fue seguido diariamente y analizada la formación de brotes y raíz a los 7, 14, 21 y 30 días. En todos los casos con los distintos medios de cultivo y en las dos variedades se indujo la formación de brotes, destacando el medio MSB que en la variedad Cavili fue significativamente más eficiente que el resto de medios tras 30 días de cultivo *in vitro* (Fig. V.2A). En la variedad Muc16 se observó una menor eficiencia de inducción de brote con el medio MSA, hecho que no se observó en Cavili. No se observaron diferencias significativas en la respuesta de los dos genotipos, que desarrollaron brotes en más de un 40 % de explantes. El análisis de la varianza (Tabla V. 2.), demuestra la existencia de diferencias significativas en el desarrollo de los brotes a lo largo del tiempo en función del medio de cultivo utilizado. La R<sup>2</sup> indicó que los tres factores incluidos en el modelo (variedad, medio de cultivo y tiempo) explican el 68.9 % de la varianza que se observa en variable dependiente (inducción del brote).

La formación de raíces fue mayor en aquellos medios que contenían mayor concentración de giberelinas, MSC y MSD (Fig. V. 2). A partir del día 14, los explantes crecidos en medio MSC con 1 mg/L de GA<sub>3</sub> mostraron un mayor enraizamiento, llegando a alcanzar valores del 83 % y 80 % en Cavili y Muc16 respectivamente, tras 30 días de cultivo *in vitro*. Además, se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo, y también debidas al medio de cultivo utilizado (Tabla V. 3). La variedad también influyó

encontrándose diferencias entre las dos variedades. El 87.5 % de la varianza en la inducción de raíz se explicó con los tres factores incluidos.



**Figura V.2.-** Eficiencia en la inducción de brote en Cavili (A) y Muc16 (B) y raíz en Cavili (C), y Muc16 (D) a lo largo del cultivo *in vitro* con los medios cultivo MSA, MSB, MSC, MSD. Los resultados presentados son el porcentaje medio de brotes/raíces producidos en cuatro experimentos independientes para cada tiempo, variedad y medio de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas entre la eficiencia de inducción de los medios en este periodo de tiempo (comparación de medias mediante Duncan  $p$ -valor  $\leq 0.05$ ).

**Tabla V. 2.-** Análisis de la varianza para la inducción de brotes en dos variedades de *C. pepo*, con cuatro medios de cultivo durante 30 días

<i>Fuente de variación</i>	<i>Tipo III de suma de cuadrados</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Modelo corregido</i>	<sup>a</sup> 19494.357	628.850	6.846	.000
<i>Intersección</i>	57954.580	57954.580	630.879	.000
<i>Medio de cultivo</i>	14663.323	4887.774	53.207	.000
<i>Variedad</i>	9.968	9.968	.109	.743
<i>Tiempo</i>	2395.551	798.517	8.692	.000
<i>Variedad*Medio de cultivo</i>	101.154	33.718	.367	.777
<i>Medio de cultivo*Tiempo</i>	1000.801	111.200	1.210	.298
<i>Variedad*Tiempo</i>	903.162	301.054	3.277	.024
<i>Variedad*Medio de cultivo*Tiempo</i>	420.396	46.711	.508	.865
<i>Error</i>	8818.869	91.863		
<i>Total</i>	86267.805			

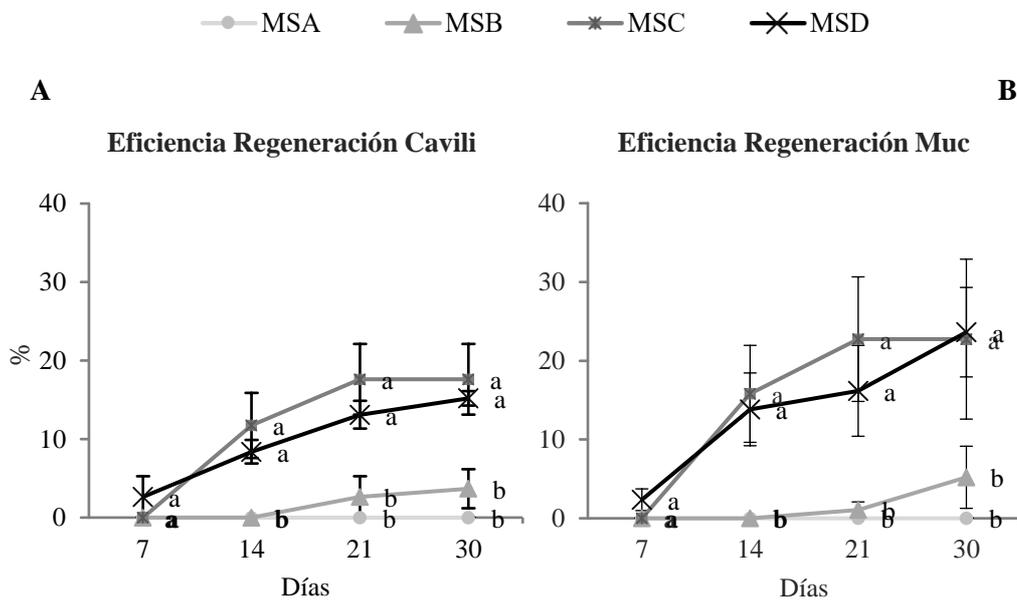
<sup>a</sup>  $R^2 = 0.689$ **Tabla V.3.-** Análisis de la varianza para la inducción de raíces en dos variedades de *C. pepo* con cuatro medios de cultivo durante 30 días

<i>Fuente de variación</i>	<i>Tipo III de suma de cuadrados</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Modelo corregido</i>	97250.408 <sup>a</sup>	3137.110	21.635	.000
<i>Intersección</i>	72102.689	72102.689	497.259	.000
<i>Variedad</i>	3153.256	1051.085	7.249	.000
<i>Medio de cultivo</i>	53776.551	53776.551	370.872	.000
<i>Tiempo</i>	18327.567	6109.189	42.132	.000
<i>Variedad*Medio de cultivo</i>	5329.570	1776.523	12.252	.000
<i>Variedad*Tiempo</i>	2074.793	230.533	1.590	.129
<i>Medio de cultivo*Tiempo</i>	11886.707	3962.236	27.326	.000
<i>Variedad*Medio de cultivo*Tiempo</i>	2701.964	300.218	2.070	.040
<i>Error</i>	13920.034	145.000		
<i>Total</i>	183273.132			

<sup>a</sup>  $R^2 = 0.875$

El número de explantes que desarrollaron simultáneamente raíz y brote fue de alrededor de un 20 % en cavili, y de un 24 % en la variedad Muc con los medios MSC y MSD (Fig. V.3).

Los medios MSA y MSB que indujeron de forma eficaz la producción de brote, no indujeron raíces, por lo que el porcentaje de regeneración disminuyó.

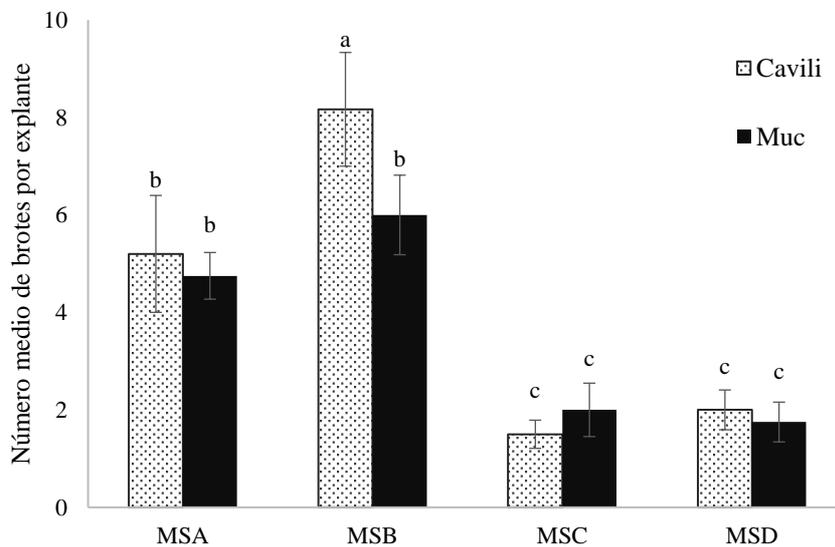


**Figura V. 3.-** Eficiencia de inducción de brote y raíz en la variedad Cavili y Muc, respectivamente (A, B), durante el tiempo de cultivo *in vitro* con los medios MSA, MSB, MSC, MSD. Los resultados presentados son el porcentaje medio de explantes que regeneran brote y raíz en cuatro experimentos independientes para cada tiempo, variedad y medio de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas entre la eficiencia de inducción de los medios en este periodo de tiempo (comparación de medias mediante Duncan  $p$ -valor  $\leq 0.05$ ).

### V.2.2.1. Eficiencia en la inducción de brotes por explante

El número de brotes producidos por explante mostró diferencias significativas en relación a los medios de cultivo *in vitro* y las variedades

utilizadas (Fig. V.4). En Cavili, el medio MSB indujo un mayor número de brotes por explante. En el caso de Muc16, los medios MSA y MSB que contenían una mayor proporción de citoquininas coincidían con una mayor proliferación de brotes. Los medios que contenían una mayor proporción de ácido giberélico y menor de citoquininas, MSC y MSD, produjeron un número muy bajo de brotes por explante en ambas variedades tras 30 días de cultivo *in vitro*.



**Figura V. 4.-** Número medio de brotes por explante en las variedades Cavili y Muc16 después de 30 días de cultivo *in vitro* con los medios cultivo MSA, MSB, MSC, MSD. Los resultados presentados son el porcentaje medio de brotes por explante producidos en cuatro experimentos independientes para cada variedad y medio de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas entre la eficiencia de inducción de los medios en este periodo de tiempo (comparación de medias mediante Duncan  $p$ -valor  $\leq 0.05$ ).

#### **V.2.2.2. Morfología de las plántulas regeneradas**

Desde la primera semana de cultivo *in vitro* se observó un desarrollo normal de brotes y raíces en ambas variedades (Fig. V. 5). El crecimiento de los brotes se produjo en el nudo cotiledonar (la zona de la articulación entre el hipocótilo y el cotiledón) ya en los primeros días de cultivo. No se observaron brotes ni raíces en la zona del explante correspondiente al tejido cotiledonario, y tampoco se desarrollaron brotes en el extremo final del hipocótilo. Con los medios utilizados no se produjo desarrollo de callos. La formación de raíces se observó únicamente en la zona del hipocótilo. Los explantes que enraizaban antes de producir brotes, posteriormente eran incapaces de desarrollarlos, por lo que, aquellos explantes que sólo desarrollaron raíces se descartaron para regeneración. Algunos de los brotes crecieron de forma anormal, produciéndose malformaciones en los tallos, que crecían de forma fusionada en su primera parte para posteriormente dividirse, y formar hojas y nuevos tallos sin fusionar (Fig. V. 5B, E).

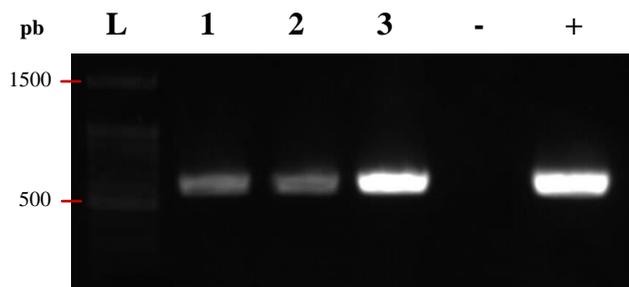


**Figura V. 5.-** Brotes (b) múltiples y raíces (r) en los explantes originales de las variedades Cavili (A, B, C) y Muc16 (D, E, F) después de 30 días de cultivo *in vitro*. El cotiledón (c) y el hipocótilo (h) aún son visibles. Algunos de los brotes se desarrollan de forma anormal creciendo fusionados en ambas variedades (B, E). Barra: 1 cm.

### V.2.3. Transformación de *Agrobacterium* con el plásmido binario pGFPGUSplus

Para realizar la transformación de *C. pepo* se utilizó un plásmido binario comercial pGFPGUSplus que contiene los genes marcadores de la proteína verde fluorescente y el gen que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, además de presentar resistencia a kanamicina e higromicina para la selección de bacterias y explantes transformados, respectivamente. En primer lugar, se realizó la transformación mediante electroporación de las cepas electrocompetentes de *A. tumefaciens* AGL0, AGL1 y GV3101. Para la

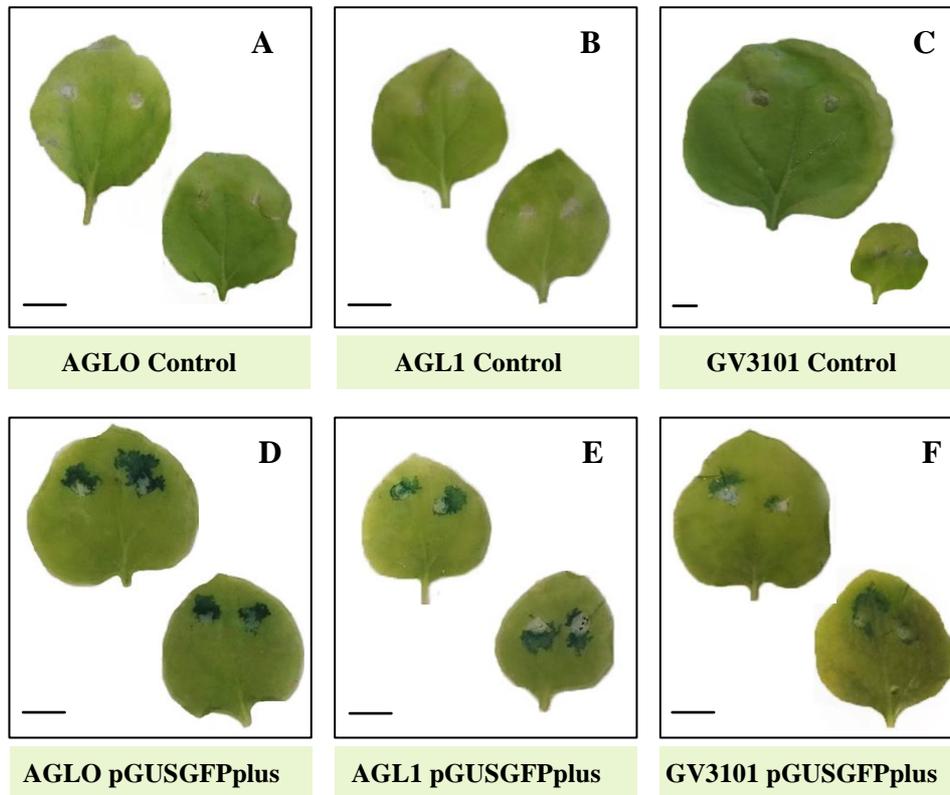
comprobación de la transformación se realizó una PCR de colonias con los primers GUSforward y GUSreverse, que amplificaban un fragmento de 588 pb del gen GUS (Fig. V.6).



**Figura V. 6.-** Comprobación de la transformación de las cepas *A. tumefaciens* AGL0 (1), AGL1 (2) y GV3101 (3) mediante PCR de colonias. Control positivo (+) plásmido pGFPGUSplus y negativo (-) sin ADN.

### V.2.3.1. Comprobación de la infectividad de las cepas transformadas mediante expresión transitoria

Se llevó a cabo la transformación transitoria mediante agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana* para comprobar la infección y expresión de los genes marcadores mediante el uso de las distintas cepas de *A. tumefaciens*. Al cabo de 72 horas de la agroinfección se realizó la prueba histoquímica de la  $\beta$ -glucuronidasa para observar los grupos de células transformados por *A. tumefaciens* (Fig. V. 7). Se tiñeron de azul los grupos de células que habían sido infectadas, en todas las hojas agroinfiltradas con las cepas portadoras del plásmido binario y hubo ausencia de color en aquellas hojas infiltradas con las cepas control, que no portaban el plásmido. De esta forma se comprobó la infectividad de las cepas y la expresión de los genes del vector binario.



**Figura V. 7.-** Detección de la expresión de GUS en hojas de *N. benthamiana*, transformadas mediante agroinfiltración. Se utilizaron las cepas de *A. tumefaciens* AGL0, AGL1 y GV3101, como controles (A-C) y portando el plásmido pGUSGFPplus (D-F). Barra:1cm

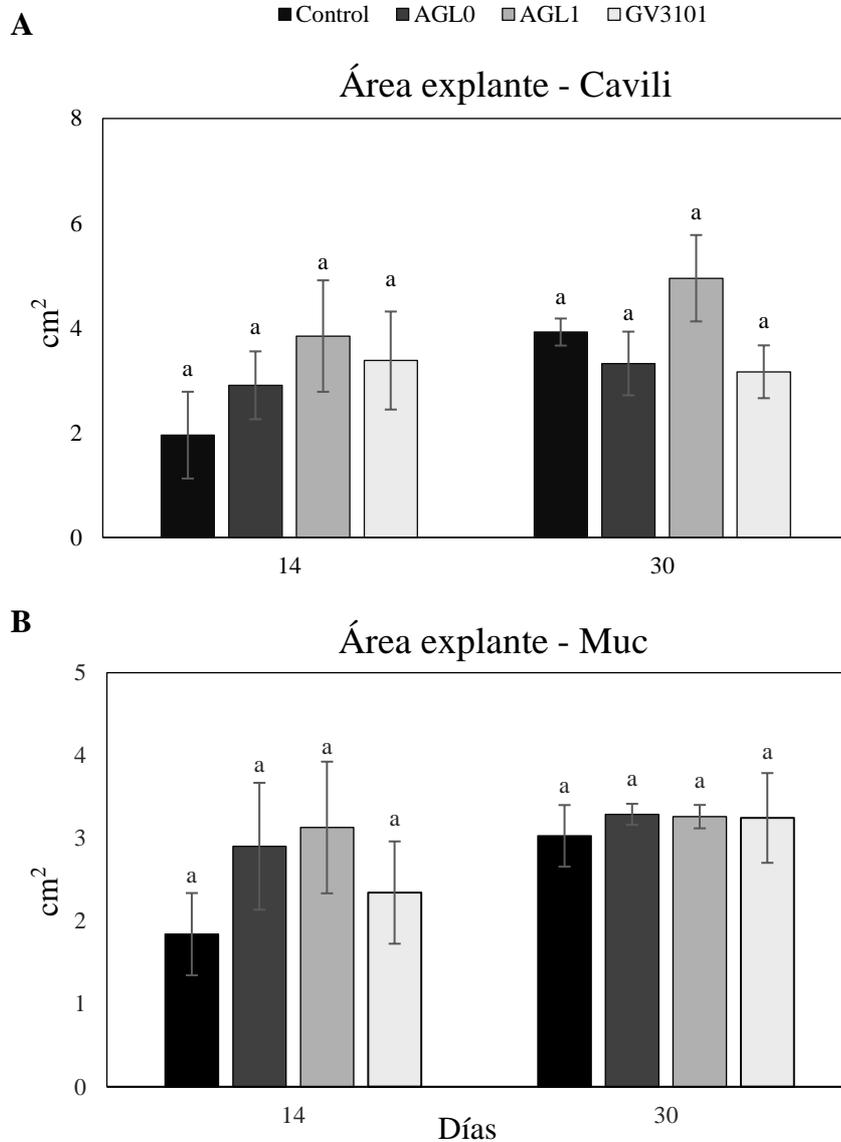
#### V.2.4. Transformación de explantes de *C. pepo*

Se realizó la transformación de dos variedades de *C. pepo*, Cavili y Muc16, mediante tres cepas de *A. tumefaciens* AGL0, AGL1 y GV3101, que contenían el plásmido binario pGFPGUSplus, como se detalló en el punto x-x del apartado material y métodos. Los explantes de *C. pepo* se agroinfectaron con cada una de las cepas que crecieron hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> entre 0.4 y 0.6. Se utilizó acetosiringona tanto para el cultivo líquido de las bacterias, como posteriormente durante el cocultivo.

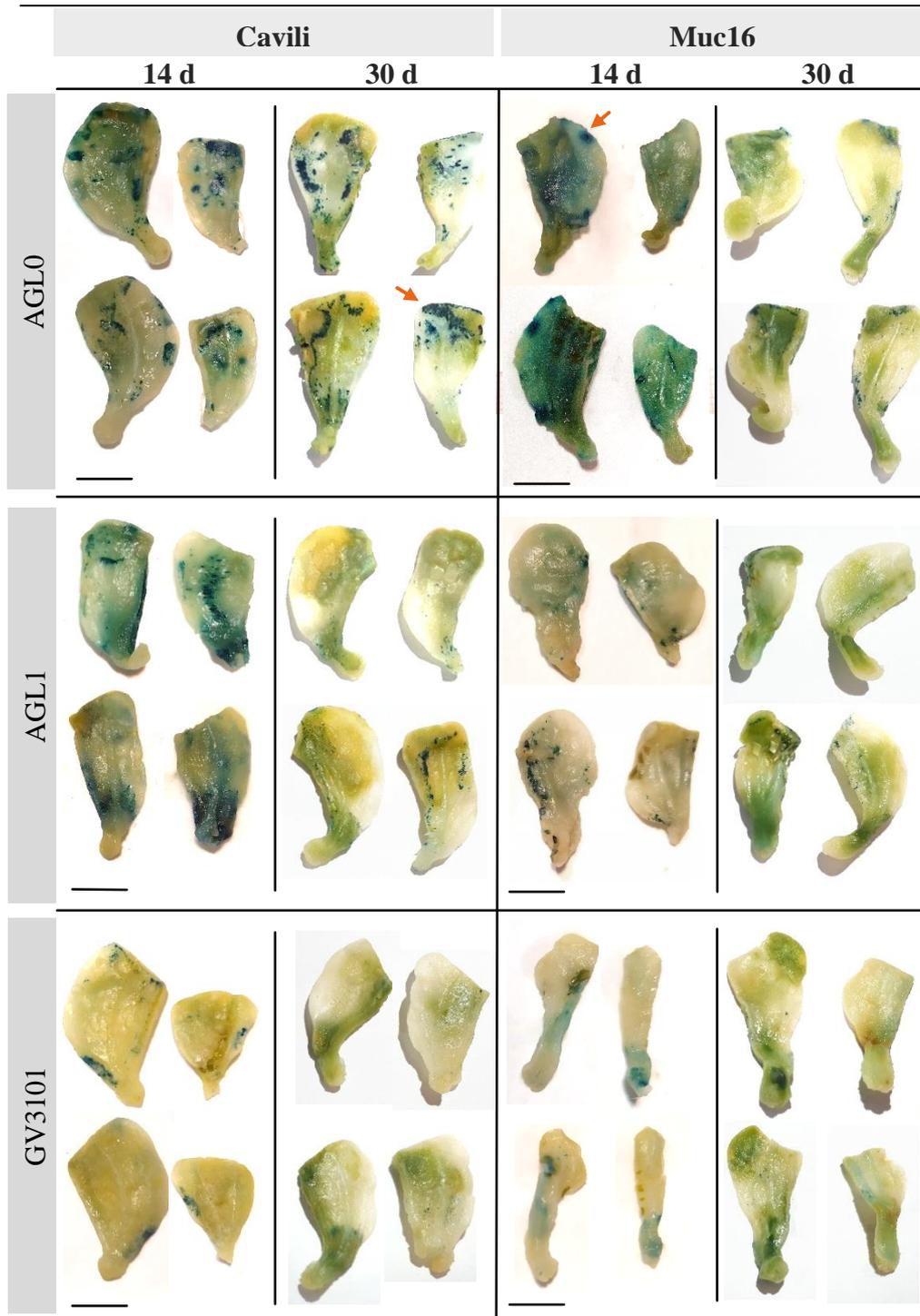
Los explantes sometidos a agroinfección se cultivaron *in vitro* en medio MSB suplementado con cefotaxima e higromicina para la eliminación de *Agrobacterium* y selección de los explantes transformados, respectivamente.

Para estudiar el crecimiento de los explantes durante su cultivo *in vitro* se realizó la medida de sus áreas durante este periodo. A los 14 días tras la agroinfiltración no se observaron diferencias significativas con las distintas cepas utilizadas (Fig. V. 8). Además, no existieron diferencias entre variedades. A los 30 días, tampoco se observaron diferencias significativas debidas a las cepas utilizadas ni entre variedades. Estos resultados implican que la agroinfiltración y la inserción del plásmido no influyó negativamente en el crecimiento de los explantes.

Después de 14 y 30 días de cultivo se realizaron las pruebas histoquímicas de la  $\beta$ -glucuronidasa para evaluar el porcentaje de células transformadas por variedad, tiempo y cepa empleada (Fig. V. 9).



**Figura V. 8.-** Área de los explantes de *C. pepo* Cavili (A) y Muc16 (B) después de 14 y 30 días desde la agroinfección con las cepas AGL0, AGL1 Y GV3101. Letras distintas indican diferencias significativas entre el tamaño medio de los explantes transformados con cada una de las cepas en cada tiempo. Asteriscos indican diferencias entre los 14 y 30 días en los explantes transformados con cada cepa. (Comparación de medias mediante Duncan p-valor  $\leq 0.05$ )



**Figura V. 9.-** Actividad GUS en explantes de *C. pepo* Cavili y Muc16 después de 14 y 30 días desde la agroinfección con las cepas AGL0, AGL1 y GV3101. Barra:1 cm. Flecha indica grupos celulares transformados.

Otro parámetro analizado fue el porcentaje de grupos celulares transformados en los explantes, que se llevó a cabo contabilizando la superficie en cm<sup>2</sup> de las zonas teñidas de azul por la prueba histoquímica X-Gluc, que mide la actividad de la proteína que expresa el gen marcador GUS. Se midieron las zonas teñidas tanto del haz como del envés y se calcularon los porcentajes de zonas teñidas con respecto a la superficie total.

Las diferencias sobre el porcentaje de la zona de explante transformada a los 14 y 30 días entre las distintas cepas de *Agrobacterium* utilizadas se recogen en la figura V.10.

En la variedad Cavili (Fig. V. 10A), en la segunda semana no existieron diferencias entre las cepas de *A. tumefaciens* AGL0 y AGL1 que tuvieron alrededor de un 14 % de grupos celulares transformados. En cambio, existieron diferencias significativas de estas dos cepas con GV3101 que solo presentó un 3 %. A las 4 semanas de cultivo *in vitro*, se encontraron diferencias significativas entre todas las cepas utilizadas. Si comparamos la transformación por semanas, AGL0 mantuvo su porcentaje de células transformadas de las 2 a las 4 semanas. En el caso de la cepa AGL1, se produjo una drástica reducción del porcentaje de explante transformado llegando a reducirse en un 78 %, con diferencias significativas entre las 2 y 4 semanas. La cepa GV3101 permaneció con porcentajes muy reducidos en ambos tiempos no llegando a superar un 4 % en la semana 2 y solo con un 1 % al final del cultivo *in vitro*. Por tanto, en Cavili, la cepa que tuvo una mayor capacidad infectiva y donde se mantuvo mayor porcentaje de explante transformado fue AGL0. Estos resultados concuerdan con lo que visualmente se observa en la figura V. 9 donde se recogen las imágenes de la prueba histoquímica X-Gluc de los explantes transformados por tiempo, cepa y variedad.

En la variedad Muc16 (Fig. V. 10B), a las 2 semanas se observó una gran diferencia entre la transformación de los explantes transformados con la cepa AGL0 respecto a AGL1 y GV3101. Con AGL0 se obtuvo un porcentaje

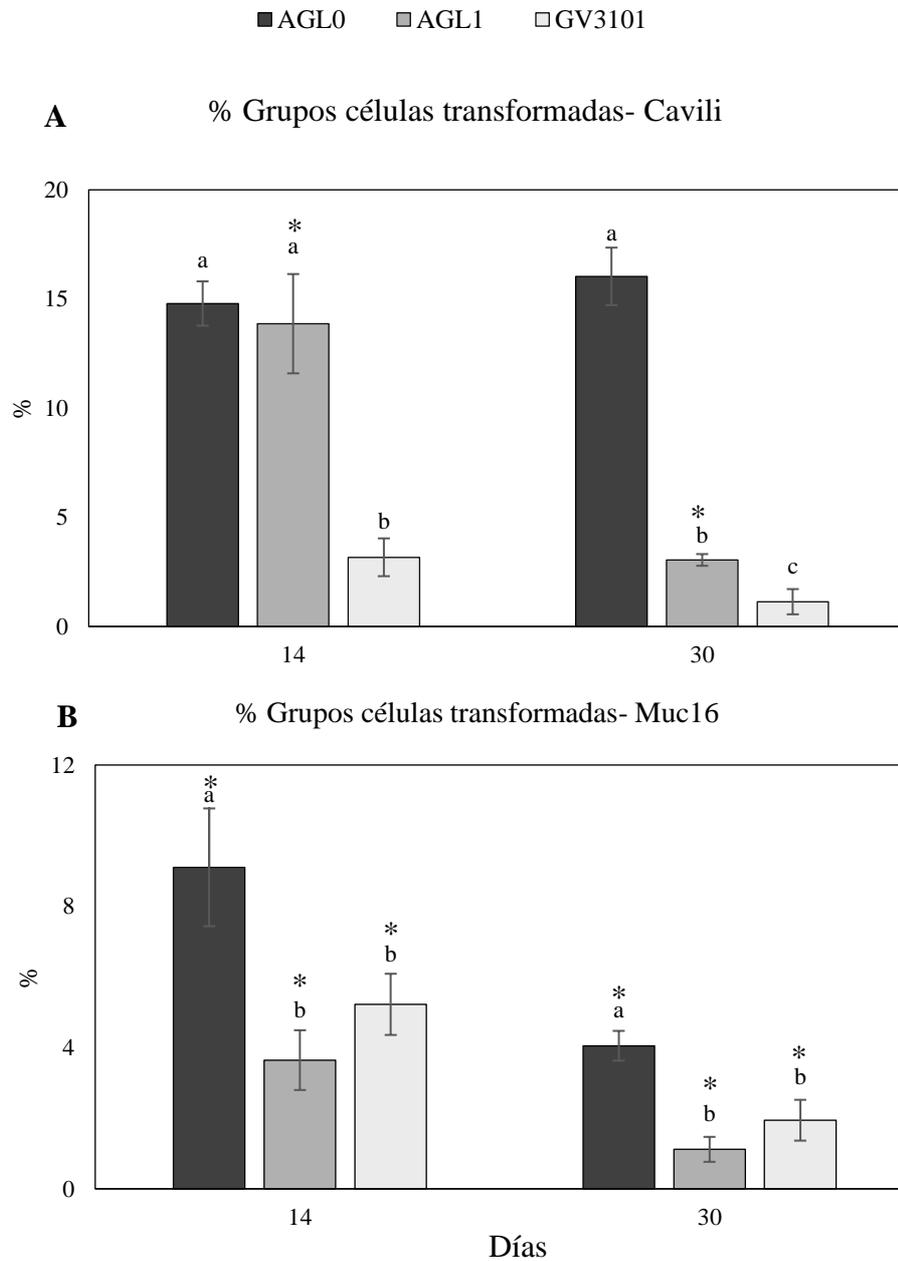
de alrededor del 10 %, sin embargo, con AGL1 y GV3101 no se superó el 5 % de explante transformado, no observándose diferencias significativas entre estas dos últimas cepas.

A los 30 días persistieron las diferencias significativas de la cepa AGL0 respecto a AGL1 y GV3101. AGL0 tuvo un porcentaje de un 4 % y las demás cepas no superaron el 2 %.

Al comparar la evolución de la transformación a lo largo del tiempo para cada una de las cepas, se observó una disminución del porcentaje de transformación del explante de forma generalizada en todas ellas. AGL0 disminuyó un 55 % de la segunda a la cuarta semana. El porcentaje de explante transformado con AGL1 y GV3101 disminuyó un 70 y un 62 %, respectivamente tras 30 días de cultivo *in vitro*.

Finalmente se pudo concluir que la cepa AGL0 con unos mayores porcentajes de infección inicial y mantenimiento de la transformación a lo largo del tiempo fue la más eficaz en la variedad Muc16, algo que también ocurrió en Cavili.

El análisis de la varianza (Tabla V. 4.), demostró que existieron diferencias significativas en el porcentaje de transformación de los explantes a lo largo del tiempo, la cepa de *Agrobacterium* utilizada y la variedad. La  $R^2$  indicó que los tres factores incluidos en el modelo (variedad, cepa de *A. tumefaciens* y tiempo) explican el 92,7 % de la varianza del porcentaje de transformación de los explantes.



**Figura V. 10.-** Porcentaje de células transformadas en *C. pepo* variedad Cavili (A) y Muc16 (B) después de 14 y 30 días desde la agroinfección con las cepas AGL0, AGL1 Y GV3101. Letras diferentes designan diferencias significativas entre cepas en un mismo tiempo. Asteriscos marcan diferencias significativas entre cepas entre tiempos. Comparación de medias mediante Duncan  $p$ -valor  $\leq 0.05$ .

**Tabla V. 4.-** Análisis de la varianza para el porcentaje de transformación del explante en dos variedades de *C. pepo*, con tres cepas durante 30 días de cultivo *in vitro*.

<i>Fuente de variación</i>	<i>Tipo III de suma de cuadrados</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Modelo corregido</i>	1014.646 <sup>a</sup>	92.241	27.807	0.000
<i>Intersección</i>	1486.629	1486.629	448.162	0.000
<i>Variedad</i>	182.081	182.081	54.890	0.000
<i>Medio de cultivo</i>	414.798	207.399	62.523	0.000
<i>Tiempo</i>	126.451	126.451	38.120	0.000
<i>Variedad*Medio de cultivo</i>	169.497	84.748	25.548	0.000
<i>Variedad*Tiempo</i>	0.135	0.135	0.041	0.842
<i>Medio de cultivo*Tiempo</i>	39.591	19.796	5.968	0.008
<i>Variedad*Medio de cultivo*Tiempo</i>	82.094	41.047	12.374	0.000
<i>Error</i>	79.612	3.317		
<i>Total</i>	2580.888			

<sup>a</sup>R<sup>2</sup>=0.927

### V.2.5. Regeneración de explantes transformados de *C. pepo*

Con respecto a la capacidad de regeneración de plántulas a partir de cultivo de explantes transformados, se tomaron datos a los 14 y 30 días registrándose el número de brotes, raíces o ambos, pasando a ser plántulas (Tabla V. 5).

Los datos a los 14 días en la variedad Cavili muestran diferencias significativas entre el porcentaje de brotes regenerado en los explantes transformados con las cepas AGL0 y AGL1 respecto a GV3101. En el caso de Muc16, no se observaron estas diferencias. Si comparamos ambas variedades, el porcentaje de regeneración de brote fue significativamente mayor en Cavili. A las 4 semanas, la variedad Cavili presenta el mayor porcentaje de regeneración con un 34 % en los explantes AGL0, significativamente mayor que en los demás casos. Para la variedad Muc16,

en este tiempo tampoco se observaron diferencias significativas debidas a la cepa de transformación.

La inducción de raíz tanto a las 2 como a las 4 semanas fue muy reducida en todos los tipos de explantes, se destaca la ausencia total de raíces utilizando la cepa GV3101 durante todo el cultivo *in vitro*. Los explantes transformados con la cepa AGL0 de la variedad Muc16 presentaron el mayor porcentaje de regeneración llegando al 7.5 %.

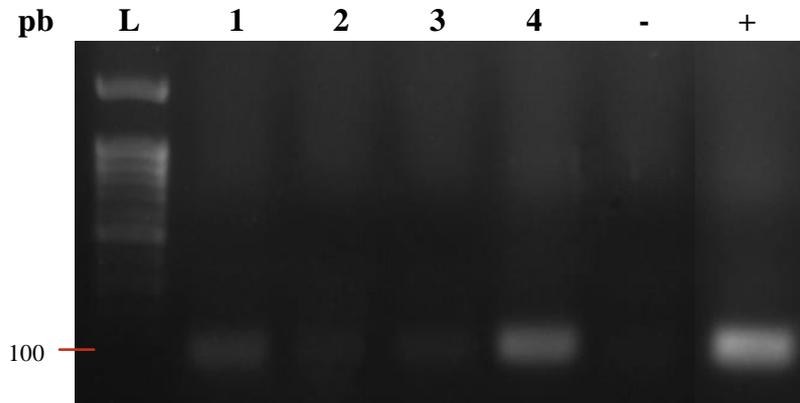
Finalmente, la regeneración hasta plántulas solo se observó utilizando las cepas AGL0 y AGL1. Los porcentajes más altos se atribuyeron a las cepas AGL1 en la variedad Cavili llegando a un 4.82 % y AGL0 en Muc16 a un 5.42 %.

**Tabla V. 5.-** Eficiencia de la regeneración de explantes en dos variedades de *C. pepo* agroinfectadas con tres cepas de *Agrobacterium* durante 30 días de cultivo *in vitro*.

Variedad	Cepa	% Regeneración brote		% Regeneración raíz		% Plantas	
		14 d	30 d	14 d	30 d	14 d	30 d
<i>Cavili</i>	AGL0	30.94 Aa	34.07 Aa	1.35 Aab	4.49 Abc	0 Ab	3.14 Bc
	AGL1	29.44 Aab	29.44 Bb	0 Ab	6.33 Aab	0 Ab	4.82 Aab
	GV3101	26.98 Bb	26.98 Cb	0 Ab	0 Bd	0 Ab	0 Cd
<i>Muc16</i>	AGL0	22.50 Ac	22.08 Ac	4.17 Aa	7.50 Aa	2.08 Aa	5.42 Aa
	AGL1	18.47 Ad	26.85 Ab	1.56 Aab	3.84 Bc	0 Ab	3.84 Abc
	GV3101	21.05 Acd	21.32 Ac	0 Ab	0 Cd	0 Ab	0 Bd

Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre cepas en la misma variedad tiempo. Letras minúsculas marcan diferencias significativas entre variedades y cepas en un mismo tiempo. Comparación de medias mediante Duncan  $p$ -valor  $\leq 0.05$

Sobre las plántulas en regeneración, a las 4 semanas se llevó a cabo la comprobación de la integración del T-DNA del plásmido en el genoma de las plántulas. Para ello se realizó la extracción de ADN y mediante PCR se procedió a su comprobación utilizando los cebadores Gus Forward2 y Gus Reverse2, complementarios a la secuencia del gen GUS y que amplifican 100 pb. Varias de las plántulas dieron un resultado positivo, confirmándose así el éxito de la transformación (Fig. V. 11).



**Figura V. 11.-** PCR de comprobación de la inserción del T-DNA en el genoma de *C. pepo*. Plántulas transformadas con cepa AGL0 y variedad Cavili (1) y variedad Muc16 (2); Plantas transformadas con cepa AGL1 variedad Cavili (3) y Muc16 (4); Control negativo (-) y positivo del plásmido pGFPGUSPlus (+). Carril 1, 4 y + muestran la banda de 100pb

### V. 3. DISCUSIÓN

El presente estudio es un intento de establecer un protocolo de regeneración y transformación genética en *Cucurbita pepo* mediante el uso de diferentes medios de cultivo y cepas de *Agrobacterium* transformadas con el plásmido pGFPGUSplus, y analizando distintos parámetros como los porcentajes de inducción de regeneración o la evolución de la transformación.

Algunas cucurbitáceas presentan una baja tasa de regeneración y supervivencia. Para obtener una buena eficiencia la elección del tipo de explante es fundamental en cualquier protocolo de regeneración (Q. Jiang et al., 2012). Por ello, se han realizado numerosas investigaciones sobre el uso de distintos tipos de explantes, como segmentos nodales, brotes axilares, cotiledones, segmentos de hipocótilos, fragmentos de hojas, entre otros (Alam et al., 2019; Lee et al., 2003; Y. Zhang et al., 2008). En este trabajo se ha realizado una comparativa entre dos tipos de explantes de cotiledón en las variedades de *Cucurbita pepo* Cavili y Muc16. El uso de la zona de cotiledón próxima al hipocótilo demostró ser el adecuado para la regeneración, como ocurre en otras variedades de calabacín (Ananthakrishnan et al., (2003). En *Cucurbita máxima*, Lee et al. (2003) también describieron la ausencia de capacidad organogénica directa de raíces e hipocótilo, sólo produciéndose la regeneración a partir del explante de cotiledón. Y. Zhang et al., (2008) en *Cucurbita moschata* describieron la inducción de brotes múltiples únicamente en la zona más proximal del cotiledón, restringiendo la localización de las células competentes a esta zona.

Los tipos, las concentraciones y las combinaciones de los reguladores del crecimiento influyen significativamente en la regeneración *in vitro* de plantas (Kumar et al., 2011). En este estudio se evaluaron distintas combinaciones hormonales con el objetivo de establecer un protocolo rápido y de gran eficiencia para el desarrollo de brotes y raíces. Los medios de regeneración utilizados en este trabajo contenían una mezcla de citoquininas

(6-bencilaminopurina, BAP) y giberelinas (GA<sub>3</sub>). No se han utilizado auxinas para la regeneración directa desarrollada en este estudio, ya que otros autores han descrito la formación de callos al utilizar esta hormona (Shah et al., 2008). En diversas cucurbitáceas se ha descrito la eficacia de la BAP sobre otras citoquininas para la regeneración y multiplicación de brotes, como sucede en *C. máxima* (Lee et al., 2003), melón (Ntui et al., 2009), *C. sativus* (Vasudevan et al., 2007) y también en *C. pepo* (Ananthakrishnan et al., 2003).

El medio en el que se formaron más brotes fue MSB, que contenía mayor relación citoquinina/giberelina, 1 mg/L BAP / 0.1 mg/L GA<sub>3</sub>, mientras que el medio con una mayor eficiencia de inducción de raíz fue el que contenía una menor cantidad de citoquininas (MSC, 0.1 mg/L BAP + 1 mg/L GA<sub>3</sub>). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Hernandez et al., (2009) en un estudio de micropropagación en dos variedades de *C. pepo*, produciéndose un aumento en la eficiencia de regeneración con 1 mg/L de BAP, frente a concentraciones superiores o a combinaciones de esta hormona con auxinas. En *Cucumis sativus*, Mali y Chavan (2016) demostraron que una concentración de 2 mg/L BAP producía la mayor eficiencia de regeneración, hecho que contrasta con lo observado en este trabajo para la variedad Muc16, ya que esta concentración produjo el efecto contrario. Para *C. moschata*, Nanasato et al. (2011) describieron una mayor eficiencia también con 1 mg / l de BAP. Otras investigaciones destacaron la importancia de la combinación entre BAP y GA<sub>3</sub> para crear una sinergia de acción (Bidarigh & Azarpour, 2013). Moallem et al. (2012) en *Rosa canina* observaron que la combinación de giberelinas y citoquininas promovía una mayor inducción de brote que ambas por separado. Otro factor para destacar en este estudio fue el número de brotes por explante, mayor en aquellos medios de cultivo con una concentración alta de BAP. El medio MSB destacó sobre los demás en la variedad Cavili, y no se observaron diferencias entre MSB y MSA en Muc16. Estudios previos han demostrado que el genotipo es uno de los principales factores que influyen en la eficiencia de la regeneración por lo que estas

variaciones podrían deberse a ello (Alam et al., 2019; Kathiravan et al., 2006; Luan et al., 2019; Sebastiani & Ficcadenti, 2016; Winkelmann et al., 2005). En el presente estudio se observó una respuesta distinta entre las dos variedades Cavili y Muc16, en relación a los medios utilizados.

La morfología de los brotes y las plántulas fue en su gran mayoría normal, exceptuando algunas anomalías en el desarrollo de brotes que se desarrollaban fusionados, como se ha descrito también para otras variedades de calabacín por Ananthkrishnan et al. (2003).

Nuestro sistema de regeneración para *C. pepo* muestra ciertas ventajas sobre los protocolos anteriores. Primero, se observa una alta tasa de inducción de brotes, más del 40 % de los explantes produjeron brotes que posteriormente se podrían enraizar y dar lugar a plántulas. Esta frecuencia fue mayor que la de la embriogénesis somática en calabacín obtenida con el método de Chee (1992), donde solo el 8 % de los explantes produjeron tejido embriogénico y la eficiencia de regeneración de la planta posteriormente también fue baja. Otra ventaja de este protocolo es la velocidad a la que se pueden producir las plántulas regeneradas, ya que tras solo dos semanas de cultivo *in vitro* hasta un 30 % de los explantes produjeron brotes y a las 4 semanas tuvimos más de un 20 % de explantes con brote y raíz, sin realizar ningún cambio en los medios. En cambio, para la regeneración indirecta se pueden necesitar más de 6 meses para producir plántulas (Chee, 1991).

Una vez establecido el protocolo de regeneración para *C. pepo*, se procedió a establecer un protocolo de transformación con *Agrobacterium*. La transformación genética se lleva a cabo de manera más o menos efectiva dependiendo de diferentes factores como son la especie vegetal, la cepa de *Agrobacterium* usada en función de su virulencia y las condiciones de inoculación y cocultivo, entre otros (Canli & Tian, 2009; Shah et al., 2008; Urtubia et al., 2008). Para optimizar nuestro método se realizó la transformación en explantes de cotiledón-hipocótilo y fueron cocultivados

con tres cepas de *Agrobacterium*, utilizando vacío para una mejor infiltración, según lo descrito en pepino por Nanasato et al. (2013).

Tanto en Cavili como en Muc16, la mayor eficacia de infección se observó con la cepa AGL0 con un área infectada más amplia con respecto al área total del explante después de 30 días de cultivo. AGL0 fue seguida en porcentaje de eficiencia por AGL1 y GV3101 no aportó resultados positivos. Numerosos estudios han mostrado gran variabilidad en eficiencia de transformación usando diferentes cepas. En otras cucurbitáceas, la principal cepa utilizada para los eventos de transformación fue EHA105 en el caso de *Cucurbita moshata*, *C. pepo*, *C. maxima*, *C. ficifolia*, (Nanasato et al, 2011, 2013) y también para pepino (Chandrasekaran et al., 2016; Nanasato et al., 2013), LBA4404 para *Cucumis melo* (Bezirganoglu et al., 2014) y para sandía (L. Liu et al., 2016). Otros estudios muestran una comparativa entre cepas, como en el caso de tomate y melón, donde se observó que las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con mayor eficiencia de transformación fueron AGL1 y AGL0 frente a LBA4404, respectivamente (de Vetten et al., 2003; Rashid & Lateef, 2016). En *Pisum sativum*, Pniewski & Kapusta (2005) describieron la superioridad también de las dos cepas hipervirulentas AGL0 y AGL1 frente a EHA105, y en *Dendrobium catenatum* la cepa GV3101 demostró ser más eficiente para la transformación que la cepa EHA105 (Ji Chen et al., 2018). Nuestros resultados apoyan una mayor eficiencia de las cepas AGL0 y AGL1 en las variedades Muc16 y Cavili de *C. pepo*.

La adición de acetosiringona es un factor determinante para obtener una buena eficiencia en la transformación ya que induce los genes Vir. En el estudio en *C. pepo* realizado por Shah et al., (2008), la acetosiringona se añadió a una concentración 50  $\mu$ M, y resultó en un porcentaje de transformación del 0.7 %. Gal-On et al. (2005) utilizaron igualmente una concentración de 200  $\mu$ M acetosiringona para la transformación de pepino. En el presente estudio se añadió acetosiringona 200  $\mu$ M y los resultados de

eficiencia de transformación fueron mayores que los mostrados por Shah et al. (2008) oscilando entre 3 % y 6 % de plántulas regeneradas.

La tasa de crecimiento de *Agrobacterium* influye también en la eficiencia de la transformación. Nanasato et al. (2013) examinaron el efecto de la densidad óptica en la transformación de pepino. Las densidades bajas (OD<sub>600</sub> 0.01-0.1) no fueron efectivas para la transformación, aunque las altas tampoco mostraron resultados positivos (OD<sub>600</sub> 1), una densidad moderada (OD<sub>600</sub> 0.5) fue más adecuada para una transformación eficiente. Esta densidad moderada podría contribuir a proteger los explantes de un daño severo por *Agrobacterium* y la contaminación de los brotes adventicios regenerados. Un apunte importante del presente estudio es que en ambas variedades de *C. pepo*, tanto Cavili como Muc16, el porcentaje de transformación, medido como porcentaje de explantes que se tiñen con X-Gluc a las 2 semanas, disminuye al realizarlo en la semana 4, esto podría deberse a la gran capacidad infectiva que tienen las bacterias al inicio de la transformación pero parte de estas células transformadas pueden morir y no seguir dividiéndose, lo que explicaría por qué disminuye el porcentaje de transformación en AGL1 y GV3101 en la variedad Cavili y la de AGL0, AGL1 y GV3101 en la variedad Muc16 al finalizar el cultivo *in vitro*.

El método de transformación que se ha utilizado en este trabajo consistió en la aplicación de vacío al cocultivo de cotiledones y *Agrobacterium*, y está basado en el trabajo de Nanasato et al. (2015). Estos autores transformaron *Cucumis sativus* y *Cucurbita moschata* mediante *A. tumefaciens* aplicando dos pulsos de vacío, obteniendo una eficiencia de transformación de  $11.9 \pm 3.5$  % y de  $9.2 \pm 2.9$  %, respectivamente. En el presente estudio la cepa AGL0 es la que más eficiencia de infección ha causado, con hasta un 16 % de explante con actividad GUS en la variedad

Cavili, por lo que parece que la aplicación de vacío es eficiente para la transformación genética.

En condiciones distintas y con otras especies, Liu et al. (2016) en *Citrullus lanatus* mostraron que utilizar un tiempo prolongado de precultivo hacía que la regeneración de los brotes aumentara de un 10.7 a un 42.9 %. En el caso del presente estudio, se realizó un precultivo de 24 h de los cotiledones y el cocultivo fue de 72 h obteniéndose entre un 3 y 6 % de regeneración en los explantes transformados. Estos datos podrían confirmar que un mayor precultivo y cocultivo produce una mayor eficiencia de transformación y de regeneración. Sin embargo, H. Wu et al. (2003) en la regeneración de plantas de trigo obtuvieron valores de regeneración más altos cuando se hacía un precultivo de solo 1.5 horas, un tiempo de inoculación de 30 min y cocultivo de 1 día, de manera que si se aumentaban alguno de esos tiempos disminuía el porcentaje de regeneración, un hecho que contradice los estudios citados anteriormente.

El presente estudio consiguió regenerar hasta plántula un 6 % de explantes transformados, confirmándose la transformación en un 50 % de las plantas analizadas. Este estudio representa un primer paso para mejorar la regeneración y transformación en estas variedades de *C. pepo*, para establecer en un futuro líneas transgénicas que permitan un estudio más profundo de la función génica. Estas variedades podrían ser modificadas añadiéndoles la maquinaria Cas9 (Ellison et al., 2020) que permitiría obtener fácilmente mutantes con deleciones en el ADN diana permitiendo aumentar nuestro conocimiento de la función génica en *C. pepo*.





Como se ha descrito a lo largo de esta Tesis Doctoral, el estrés por bajas temperaturas es un problema grave para los cultivos tropicales y subtropicales, entre ellos el calabacín, lo que, acompañado por sus peculiares características como su consumo en estado inmaduro (Toivonen, 2016; Valenzuela et al., 2017), hace que este estrés provoque grandes pérdidas económicas asociadas a su almacenamiento y transporte (Carvajal et al., 2011).

Los daños por frío se producen en frutos sensibles tras la exposición al estrés por baja temperatura, y son consecuencia de las alteraciones fisiológicas y bioquímicas que ocurren a nivel celular en los tejidos del fruto. En el caso del calabacín los daños por frío se manifiestan con la pérdida de peso, de firmeza y daños apreciables en la superficie del fruto, como hundimientos y picado de la superficie (Carvajal et al., 2011, 2015; Martínez-Téllez et al., 2002). Por todo ello, es una cuestión fundamental la búsqueda de tratamientos que mejoren o incrementen la calidad y vida útil del fruto, así como los estudios que desentrañen la respuesta al estrés por baja temperatura. Los capítulos I y II de esta Tesis Doctoral se centran en la utilización de dos tratamientos, ABA y NO, en la postcosecha del fruto de calabacín.

El ABA es una fitohormona que juega un papel crucial en la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés, en concreto está implicada en la tolerancia de las plantas frente a condiciones adversas que inducen la pérdida de agua en los tejidos, como ocurre en condiciones de sequía, de alta salinidad, o frente a bajas temperaturas (Dong et al., 2017; Mehrotra et al., 2014; Sah et al., 2016; Venzhik et al., 2016). La posible implicación del ABA en la resistencia al frío durante postcosecha se ha estudiado en frutos de calabacín de dos variedades, una resistente y otra sensible a la frigoconservación postcosecha. Durante el almacenamiento en frío se ha detectado un incremento de ABA endógeno en frutos de la variedad tolerante Natura, concomitante con un aumento de la actividad de la enzima de síntesis de ABA AAO durante los primeros días de almacenamiento en frío. Este

incremento en ABA en los frutos de la variedad tolerante podría estar relacionada con la adaptación al frío, lo que se traduce en un mantenimiento de la calidad del fruto durante el almacenamiento prolongado. En estudios metabolómicos en plantas de *Arabidopsis* sometidas a un estrés hídrico se ha podido establecer una relación entre el ABA que responde a este estrés y la síntesis de moléculas osmoprotectoras, como azúcares solubles, prolina y poliaminas (Urano et al., 2009). En calabacín se ha descrito una acumulación más importante de moléculas osmoprotectoras en variedades tolerantes al frío (Palma, Carvajal, Jamilena, et al., 2014; Palma, Carvajal, Lluch, et al., 2014). También se ha identificado al ABA como potenciador de la defensa antioxidante frente a ROS producidas durante condiciones de estrés frente a distintos estreses (Palma, López-Gómez, Tejera, et al., 2014; Qitong Zhang et al., 2019b). En el caso del fruto de calabacín, el ABA podría estar implicado en una menor acumulación de ROS y peroxidación de lípidos. En melocotón la aplicación de ABA retrasó el proceso de peroxidación lipídica, manteniendo la fluidez e integridad de las membranas, e inhibió la acumulación de ROS reduciendo de esta forma el daño oxidativo lo que mejoró la calidad del fruto durante el almacenamiento en frío (Qitong Zhang et al., 2019).

El ABA induce una gran cantidad de respuestas celulares en las plantas a través de complejas cascadas de transducción de señales, por lo que la percepción y la transducción de estas señales son puntos clave en este estudio. El receptor *PYL4* incrementó su expresión durante el almacenamiento en frío en la variedad *Natura*, mientras que se produjo una disminución de la expresión del receptor *PL1* de menor afinidad por el ABA. Esta acumulación de *PYL4* podría activar la respuesta de ABA de una manera más eficiente. Guo et al. (2019) en un estudio transcriptómico de dos variedades de arroz con comportamientos extremos frente al estrés por frío, describieron el aumento de la expresión de los genes que codificaban al

receptor PYL4 en la variedad tolerante durante el estrés por frío frente a la sensible, y destacaron que podría ser clave en la respuesta a este estrés.

Entre los factores de transcripción implicados la tolerancia al frío en la respuesta dependiente de ABA destaca *AI5L2/ABF3* (J. Wang et al., 2016). En el presente estudio este factor de transcripción mostró una mayor expresión en los primeros días de almacenamiento en frío en la variedad tolerante Natura, hecho que podría repercutir en una mayor respuesta de señalización. En soja, la expresión ectópica del gen *AtABF3* indujo una mayor tolerancia al estrés por sequía, y por tanto a la deshidratación, mediante la promoción del cierre estomático y la prevención del daño en las membranas celulares (H. J. Kim et al., 2018; Nam et al., 2019).

Otros factores de transcripción como NAC072/RD26 y bHLH112 también mostraron una mayor expresión en la variedad tolerante, ambos están fuertemente inducidos por ABA, además de estar implicados en la detoxificación de ROS (X. Li et al., 2016; Yujia Liu et al., 2015). La histona deacetilasa HDA6, enzima que modula la respuesta de ABA participando en la regulación de estreses como la sequía y la alta salinidad (L.-T. Chen et al., 2010; L.-T. Chen & Wu, 2010; J.-M. Kim et al., 2017), presentó un drástico aumento en la variedad Natura a los tres días de almacenamiento en frío, lo que sugiere que la modulación de la expresión génica desempeña también un papel clave en la respuesta al frío en el fruto de calabacín.

Con la aplicación de un inhibidor de la síntesis de ABA, tungstato de sodio, en la variedad tolerante Natura, se pudo confirmar la relación entre el ABA y la adquisición de tolerancia al frío en fruto de calabacín, ya que los frutos experimentaron una respuesta deficiente a este estrés con mayores daños por frío y pérdida de peso. En cambio, la respuesta al frío mejoró en los frutos Sinatra aplicándoles un tratamiento con ABA. En otros frutos como uva, piña y melocotón la calidad mejoró en condiciones de baja temperatura con el ABA (Cantín et al., 2007; Qin Zhang et al., 2015; Qitong Zhang et al., 2019).

El papel del óxido nítrico frente al estrés por frío también fue objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. El NO se considera una molécula señal en condiciones de estrés, jugando en muchos casos un papel crítico tanto en respuestas frente al estrés biótico como abiótico (Fancy et al., 2017; Shi et al., 2012). El tratamiento con 25  $\mu$ M SNP, donador de NO, mejoró la tolerancia al frío de los frutos de la variedad sensible Sinatra, disminuyendo los daños por frío y la pérdida de peso, prolongando de esta forma la calidad del fruto. Concentraciones mayores provocaron el efecto contrario, pudiéndose atribuir a un exceso de especies reactivas de nitrógeno derivadas del tratamiento, como por ejemplo el peroxinitrito. Tratamientos con NO en frutos de tomate y melocotón experimentaron respuestas muy similares a lo observado en calabacín (Saba & Moradi, 2017; R. Zhao et al., 2011).

Es importante destacar el aumento de las proteínas *S*-nitrosiladas tras 6 horas de almacenamiento en frío en los frutos tratados con NO que podría indicar la regulación de la respuesta al estrés por baja temperatura mediante este tipo modificación postranscripcional de proteínas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis celular. Está establecido que esta molécula controla la actividad enzimática mediante *S*-nitrosilación de proteínas, regulando el metabolismo de las ROS a través de la modulación de enzimas productoras de ROS y sistemas antioxidantes (Romero-Puertas & Sandalio, 2016).

Nuestros resultados muestran que el estrés oxidativo que se deriva de la exposición a baja temperatura fue menos pronunciado en los frutos tratados con NO, presentando éstos una menor peroxidación lipídica y contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, probablemente debido a un aumento en las actividades de GR, SOD y APX. En estudios anteriores se ha descrito como el NO puede proteger contra el daño oxidativo aumentando las actividades de estas enzimas antioxidantes (S. Sharma et al., 2020; Wills et al., 2015; M. Xu et al., 2012; Z. Yang et al., 2012; Qitong Zhang et al., 2019). La capacidad antioxidante total fue mayor en los frutos tratados con NO, respaldada por el aumento de fenoles, ascorbato

y actividad de la enzima PAL, al igual que lo descrito en banana y cereza (Aghdam et al., 2019; Y. Wang et al., 2013). Similar a la respuesta a ABA, el NO indujo un aumento en el contenido de compuestos osmoprotectores como la prolina, con un máximo a los 5 días de almacenamiento en frío. La putrescina en los frutos tratados con SNP fue menor al final del almacenamiento en frío, lo que podría indicar que esta poliamina se cataboliza para formar GABA, metabolito que se ha asociado a la tolerancia al frío en fruto de calabacín (Palma, Carvajal, Jamilena, et al., 2014; Palma et al., 2019).

De nuestros resultados se puede concluir que el NO, debido principalmente al ciclo ASC-GSH, parece desempeñar un papel regulador en el equilibrio antioxidante en el fruto de calabacín durante la primera parte del almacenamiento en frío, manteniendo la homeostasis redox celular.

La interacción entre el ABA y el NO está siendo muy estudiada en los últimos años. Ha sido descrito que en condiciones de estrés ambiental, ABA interactúa con otras sustancias de señalización endógenas como puede ser el NO (Asgher et al., 2017), ya que participa en una serie de cascadas de señalización que controlan las respuestas de las plantas al estrés abiótico (Fancy et al., 2017). El NO se ha demostrado que actúa en la respuesta al ABA en las situaciones de estrés mediante la interacción con la proteína fosfatasa 2C (PPC2), que se une y estabiliza el complejo del receptor ABA (ABA-PYL / PYR / RCAR) (Santiago et al., 2009), en la activación de la cascada de señales MAPK derivada de la respuesta a ABA (A. Zhang et al., 2007) o mediante las modificaciones postranscripcionales de numerosas enzimas antioxidantes regulando el estrés oxidativo (Asgher et al., 2017; Prakash et al., 2019; Romero-Puertas & Sandalio, 2016).

En determinadas circunstancias, como la inducción del cierre estomático y la regulación positiva de la transcripción de genes de enzimas antioxidantes y de sus actividades, el NO actúa principalmente como un factor aguas abajo de la vía de señalización por ABA (Dong et al., 2017; Freschi,

2013; Tian et al., 2020; Qitong Zhang et al., 2019). En un estudio realizado por Qitong Zhang et al. (2019) en melocotón, observaron con el tratamiento con ABA aumenta las actividades de APX, CAT y SOD, pero sus efectos se vieron revertidos bloqueándose las actividades de las enzimas antioxidantes y el contenido de antioxidantes en presencia tanto de PTIO como del inhibidor de la síntesis de ABA (TS). En melocotones bajo estrés por frío el tratamiento con NO no modificó los niveles de ABA, apoyando que el NO es inducido por ABA (Tian et al., 2020; Qitong Zhang et al., 2019).

Durante el almacenamiento en frío de los frutos se producen cambios muy importantes en la transcripción génica para hacer frente a este estrés. El gen *MYB106-like* fue seleccionado para su estudio a partir de análisis transcriptómicos de variedades contrastantes (Carvajal et al., 2018), como gen implicado en la tolerancia al frío (Capítulo III). Se validaron los resultados anteriores estudiándose en profundidad la dinámica de expresión del gen a lo largo del periodo en frío del fruto, detectándose la inducción de la transcripción de *MYB106-like* en la variedad tolerante Natura a los 10 días de almacenamiento en frío. En los estudios realizados los tejidos vegetativos de plantas sometidas estrés por frío no se detectó inducción de la transcripción para este gen ni tampoco diferencias en la expresión entre las variedades más y menos tolerantes al frío, por lo que podemos concluir que la respuesta de este gen al estrés es específica de fruto. Los factores de transcripción de la familia MYB no se expresan igual entre los distintos tejidos, además de responder de forma distinta a las condiciones fisiológicas, lo que indica el gran potencial regulador de estos factores de transcripción. Yanhui et al. (2006) estudiaron los perfiles de expresión de 168 genes de la superfamilia MYB, comprobando que la mayoría de ellos respondían a hormonas y a situaciones de estrés.

El estudio de la interacciones para el factor de transcripción MYB106-like señaló su relación con el gen *HDG2* implicado en la formación de tricomas (Peterson et al., 2013), y con SHN1/WIN1 que ha sido catalogado

como uno de los principales reguladores transcripcionales en la biosíntesis de la cutícula (M. He et al., 2018).

Para poder profundizar en el estudio de genes seleccionados y para comprobar su relación con la tolerancia al frío en frutos se ha iniciado la puesta a punto de protocolos de regeneración y editado genético en *C. pepo*. En primer lugar, se realizaron estudios con vectores víricos (Capítulo IV) y se inició la puesta a punto de un sistema de transformación y regeneración (Capítulo V).

El estudio para la sobreexpresión y silenciamiento de genes de interés de forma transitoria se realizó mediante el uso del vector vírico atenuado ZYMV-AGII (Gal-On, 2000). Se realizaron distintas construcciones para la evaluación la infectividad de las mismas, los fenotipos provocados y su expresión en los distintos tejidos de la planta. Nuestros resultados confirmaron la infectividad de los constructos en las plantas de *C. pepo*, comprobándose tanto la expresión del virus como la correcta sobreexpresión y silenciamiento del gen *MYB106-like*. Se observó un aumento relativo de la expresión con respecto al control del 65 % y disminución del 75 % con ambas construcciones respectivamente, resultados similares se describieron por Shores et al. (2006) en la sobreexpresión y silenciamiento de los niveles de ARN mensajero del gen *TIPK en pepino*. Los vectores control, vector vírico vacío y con la proteína fluorescente verde no provocaron cambios en la expresión del *MYB106*.

El virus se distribuyó por toda la planta hospedante pero de manera no uniforme, lo que concuerda con lo encontrado previamente por otros autores con diversas construcciones del mismo vector vírico (Aly et al., 2005; Arazi et al., 2001, 2002; Shores et al., 2006). La sintomatología expresada en plantas infectadas mostró similitudes entre los vectores víricos control y la construcción para el silenciamiento, con fenotipos en mosaico muy leves. Sin embargo, en el caso de la sobreexpresión, las hojas mostraron una sintomatología distinta a las encontradas en las otras infecciones, además de

observarse distintos mosaicos provocada por el virus en la misma planta. En el estudio realizado por Arazi et al. (2002) la utilización del vector ZYMV-AGII para la expresión de dos proteínas distintas provocó también una sintomatología diferente entre las plantas infectadas con cada una de las construcciones.

El vector con el gen *MYB106-like* para sobreexpresión infectó la planta durante su desarrollo, llegando a expresarse en fruto, tanto en mesocarpo como en exocarpo. La sintomatología que provocó el vector vírico para la sobreexpresión fue bastante tenue en el mesocarpo, y se observaron en el exocarpo pequeñas deformaciones y mosaicos de distinto color que no afectaban a su típica morfología, sin embargo, estas alteraciones se acentuaban con el paso del tiempo. Arazi et al. (2001) en plantas infectadas con el mismo vector vírico usado en nuestro estudio, que incluía el interferón-alfa 2 humano, provocó síntomas visibles en las hojas de calabacín con mosaicos leves, pero sin sintomatología observable en los frutos, aunque si se detectó su presencia mediante RT-PCR.

En *Arabidopsis* y soja se ha demostrado la implicación de genes de la subfamilia R2R3 MYB en el desarrollo de los tricomas (Jakoby et al., 2008; S. Yang et al., 2018). En este estudio la sobreexpresión del factor de transcripción MYB106-like no provocó cambios detectables en los tricomas del fruto, aunque estos resultados no son concluyentes y deberían realizarse futuros estudios más detallados mediante microscopía.

En relación con la cutícula por su asociación con la adaptabilidad de las plantas al estrés por temperatura (J. He et al., 2019; Shepherd & Griffiths, 2006), sean desarrollado recientes estudios en nuestro grupo de investigación, detectado patrones diferenciales en el depósito de ceras cuticulares en frutos de calabacín de diferentes variedades y condiciones, por lo que estos resultados podrían indicar una composición diferencial de la misma. También se ha descrito la regulación positiva de la formación de la cutícula en *Arabidopsis* por el factor de transcripción MYB106, además de interactuar

con otros genes importantes para la biosíntesis de cutícula como SHN1 (Oshima et al., 2013; Oshima & Mitsuda, 2013) Futuros estudios sobre la composición de las ceras cuticulares en los frutos serán necesarios disponiendo en paralelo de las construcciones del vector vírico para la sobreexpresión y silenciamiento a la vez que el control con el vector vírico vacío descartando de este modo los propios efectos del vector.

Debido a las limitaciones de los vectores víricos, que no permiten la transformación estable, se intentó establecer un protocolo para la transformación y regeneración en *C. pepo*, asumiendo con ello un gran reto, ya que esta especie es una de las más recalcitrantes para la regeneración y transformación dentro de las cucurbitáceas.

Para la regeneración, la selección del tipo de explante es fundamental por lo que se evaluaron distintos explantes a partir de la semilla de calabacín, señalando como el más adecuado el uso de la zona del cotiledón próxima al hipocótilo. El mismo tipo de explantes fueron utilizados con éxito por Ananthkrishnan et al. (2003) en otras variedades de calabacín, y Y. Zhang et al. (2008) en *Cucurbita moschata*. La evaluación de distintas combinaciones de reguladores del crecimiento en diferentes concentraciones para establecer un protocolo rápido y eficiente de regeneración, mostró una mayor eficacia en la formación de brotes a partir de un medio de cultivo con una elevada proporción citoquinina/giberelina, mientras que la eficiencia de inducción de raíz fue mayor en el medio que contenía la menor concentración de citoquininas. Nuestros resultados concuerdan con lo observado en anteriores estudios, donde se enfatiza el papel de las citoquininas y su combinación con giberelinas en distintas especies (Afroz et al., 2009; Hernandez et al., 2009; Mali & Chavan, 2016; Moallem et al., 2012; Nanasato et al., 2011).

El protocolo de regeneración aportó resultados positivos llegando a alcanzar la eficacia en la regeneración de los brotes un 40 % y de raíz casi un 90 %, además de la velocidad, ya que solo 2 semanas después de establecer

el cultivo de explantes, hasta un 30 % de los mismos produjeron brotes, los protocolos de regeneración indirecta pueden necesitar más de 6 meses para producir plántulas.

Para la transformación de los explantes de *C. pepo* a partir de los protocolos de regeneración seleccionados, se evaluaron 2 variedades (Cavili y Muc16) y 3 cepas de *Agrobacterium*, utilizándose como método de transformación la aplicación de vacío al cocultivo de cotiledones y *Agrobacterium*, basado en el trabajo de Nanasato et al. (2015) con modificaciones.

En ambas variedades la cepa de *Agrobacterium* que presentó mayor eficacia de infección fue AGL0, seguida por AGL1, y GV3101 que no aportó resultados positivos. Estudios previos demuestran una gran variabilidad en la eficacia de transformación usando distintas cepas (Shah et al., 2008). En tomate y melón las cepas con mejores resultados para la transformación han sido AGL1 y AGL0 (de Vetten et al., 2003; Rashid & Lateef, 2016).

En ambas variedades el porcentaje de transformación disminuyó en la semana 4, esto podría deberse a la gran capacidad infectiva que tienen las bacterias al inicio de la transformación, sin embargo, parte de estas células transformadas mueren y no siguen dividiéndose, por lo que a las 4 semanas encontramos un gran número de plántulas no transformadas. Del total de explantes transformados un 6 % se desarrollaron a plántulas, de los que un 50 % dieron positivo en la PCR de detección del transgén. Estos resultados son muy prometedores y sientan las bases de futuros estudios para la obtención de plantas transgénicas estables de *C. pepo*.

La presente Tesis Doctoral ha contribuido al conocimiento de la postcosecha de calabacín, aportando distintos tratamientos que mejoran la tolerancia al frío. Los estudios génicos y las herramientas biotecnológicas

desarrolladas permitirán seguir profundizando y desentrañando la fisiología y el comportamiento del fruto de *C. pepo* frente al estrés por frío.



# 6

CONCLUSIONES

*CONCLUSIONS*



1. ABA mediates the induction of chilling tolerance in zucchini fruit, since exogenous ABA increased tolerance in cold sensitive fruit and the variety with higher resistance accumulated ABA in fruit during cold storage. Our results could be used for the development of effective postharvest treatments to improve chilling defence responses as well as for the selection of new cold-resistant varieties.

2. NO reduces chilling injury damages and appears to play a regulatory role in the antioxidant balance, mainly by activating the ASC-GSH cycle, and maintaining the cellular redox homeostasis during the first part of cold storage. The application of NO to fruit of the sensitive variety Sinatra ameliorated the chilling injury symptoms, thereby improving the quality of zucchini fruit during cold storage. This treatment should be considered to prevent fruit decay during postharvest conservation at low temperature.

3. The gene encoding *MYB106-like* transcription factor was selected in a transcriptomic analysis of cold resistance. During cold storage this gene showed higher expression in fruits of the tolerant variety Natura compared to the sensitive variety Sinatra. These results associate this gene with the acquisition of cold tolerance in fruit at postharvest, thus being a good candidate for gene editing analysis.

4. All the viral constructions with the viral vector ZYMV-AGII successfully infected zucchini plants, constituting a simple and fast method for the study of gene function in plants. The viral vector was expressed in all the tissues of the fruit. This method however would be more suitable for young plants since, over time, the symptoms of the infection worsen, being able to mask or hinder the study of gene function in fruit.

## *Conclusions*

---

5. A protocol for efficient zucchini plant regeneration was optimized using cotyledon explants. The highest induction of shoot development was achieved in 40 % of the explants with the MSB medium (1: 0.1 mg / L; BAP: GA3) and up to 80 % of the explants developed roots with the MSC medium (0.1:1 mg/L; BAP:GA3). For the transformation experiments, the AGL0 strain of *A. tumefaciens* was selected as the most appropriated for *C. pepo* as it reached the best transformation indices for the zucchini varieties used.

# 7

# BIBLIOGRAFÍA

*Bibliography*





- Abdallah, N. A., Prakash, C. S., & McHughen, A. G. (2015). Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food*, 6(4), 183-205. <https://doi.org/10.1080/21645698.2015.1129937>
- Afroz, A., Chaudhry, Z., Khan, R., Rashid, H., & Khan, S. A. (2009). Effect of GA3 on regeneration response of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*). *Pakistan Journal of Botany*, 41(1), 143-151.
- Aghdam, M. S., Kakavand, F., Rabiei, V., Zaare-Nahandi, F., & Razavi, F. (2019).  $\gamma$ -Aminobutyric acid and nitric oxide treatments preserve sensory and nutritional quality of cornelian cherry fruits during postharvest cold storage by delaying softening and enhancing phenols accumulation. *Scientia Horticulturae*, 246, 812-817. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.064>
- Aghdam, M. S., Naderi, R., Jannatizadeh, A., Sarcheshmeh, M. A. A., & Babalar, M. (2016). Enhancement of postharvest chilling tolerance of anthurium cut flowers by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) treatments. *Scientia Horticulturae*, 198, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.019>
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00613>
- Alam, M. F., Mondol, P. C., Roy, S. K., Anisuzzaman, M., Parvez, S., Ray, S. K., Mahzabin, F., Tanny, T., & Alam, I. (2019). Determination of Apposite Plant Regeneration Protocol for Several Cucurbits through Direct and Indirect Organogenesis. *Horticultural Biotechnology Research*, 4-13. <https://doi.org/10.25081/hbr.2019.v5.5279>
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337-1344. Scopus. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Alós, E., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2013). Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 207, 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.007>
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Conrad, L. J., Gelvin, S. B., Jackson, D. P., Kausch, A. P., Lemaux, P. G., Medford, J. I., Orozco-Cárdenas, M. L., Tricoli, D. M., Eck, J. V., Voytas, D. F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z. J., & Stewart, C. N. (2016). Advancing Crop Transformation

## Bibliografía

---

- in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510-1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
- Aly, R., Mansour, F., Moch, F. A., Edelstein, M., Libman, D., Meiri, E., Shibolet, Y. M., & Gal-On, A. (2005). A novel approach to spider mite control based on expression of sarcotoxin IA peptide via a virus-vector system in plants. *Phytoparasitica*, 33(2), 177-186. <https://doi.org/10.1007/BF03029977>
- Ananthakrishnan, G., Xia, X., Amutha, S., Singer, S., Muruganatham, M., Yablonsky, S., Fischer, E., & Gaba, V. (2007). Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants in vitro. *Plant Cell Reports*, 26(3), 267-276. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0235-1>
- Ananthakrishnan, G., Xia, X., Elman, C., Singer, S., Paris, H. S., Gal-On, A., & Gaba, V. (2003). Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by in vitro organogenesis. *Plant Cell Reports*, 21(8), 739-746. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0584-y>
- Arasimowicz, M., & Floryszak-Wieczorek, J. (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172(5), 876-887. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.005>
- Arazi, T., Lee Huang, P., Huang, P. L., Zhang, L., Moshe Shibolet, Y., Gal-On, A., & Lee-Huang, S. (2002). Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2), 441-448. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6653>
- Arazi, T., Slutsky, S. G., Shibolet, Y. M., Wang, Y., Rubinstein, M., Barak, S., Yang, J., & Gal-On, A. (2001). Engineering zucchini yellow mosaic potyvirus as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits. *Journal of Biotechnology*, 87(1), 67-82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00229-2)
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M. F., Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2008). Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*, 132(4), 452-466. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01029.x>
- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (2000). Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 102-109. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1525>
- Asgher, M., Per, T. S., Masood, A., Fatma, M., Freschi, L., Corpas, F. J., & Khan, N. A. (2017). Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in

- plant responses to abiotic stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 2273-2285. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7947-8>
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Balandrán-Quintana, R. R., Mendoza-Wilson, A. Ma., Alvarez-Manilla, G., Bergmann, C. W., Vargas-Arispuro, I., & Martínez-Téllez, M. A. (2002). Effect of Pectic Oligomers on Physiological Responses of Chilling Injury in Discs Excised from Zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(1), 577-584. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6237>
- Barman, K., Siddiqui, Md. W., Patel, V. B., & Prasad, M. (2014). Nitric oxide reduces pericarp browning and preserves bioactive antioxidants in litchi. *Scientia Horticulturae*, 171, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.036>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., Aoyama, N., Chung, Y.-Y., Still, D. W., & Jones, R. L. (2007). The Arabidopsis Aleurone Layer Responds to Nitric Oxide, Gibberellin, and Abscisic Acid and Is Sufficient and Necessary for Seed Dormancy. *Plant Physiology*, 143(3), 1173-1188. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093435>
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., & Jones, R. L. (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 517-526. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj060>
- Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559-566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Bezirganoglu, I., Hwang, S. Y., Shaw, J. F., & Fang, T. J. (2014). Efficient production of transgenic melon via Agrobacterium-mediated transformation. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3218-3227. <https://doi.org/10.4238/2014.April.25.7>
- Bidarigh, S., & Azarpour, E. (2013). Study effect of BA, GA3 hormone and light rate of poinsettia under in-vitro condition. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)*, 5(10), 1058-1063.

## Bibliografía

---

- Boyer, L. A., Latek, R. R., & Peterson, C. L. (2004). The SANT domain: A unique histone-tail-binding module? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(2), 158-163. <https://doi.org/10.1038/nrm1314>
- Bruin, W. D., Rossouw, W., & Korsten, L. (2016). Comparison of Safe Alternative Dipping Treatments to Maintain Quality of Zucchini. *Journal of Food Quality*, 39(2), 109-115. <https://doi.org/10.1111/jfq.12186>
- Campos, P. S., Quartin, V. nia, Ramalho, J. chicho, & Nunes, M. A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. Plants. *Journal of Plant Physiology*, 160(3), 283-292. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833>
- Canli, F. A., & Tian, L. (2009). Assessment of Regeneration and Transient Expression Factors for Agrobacterium-mediated Transformation of Prunus salicina Lindl. *European Journal of Horticultural Science*, 74(2), 66.
- Cantín, C. M., Fidelibus, M. W., & Crisosto, C. H. (2007). Application of abscisic acid (ABA) at veraison advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 46(3), 237-241. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.017>
- Cao, F. Y., Yoshioka, K., & Desveaux, D. (2011). The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research*, 124(4), 489-499. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0409-y>
- Carvajal, F., Martinez, C., Jamilena, M., & Garrido, D. (2011). Differential response of zucchini varieties to low storage temperature. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.016>
- Carvajal, F., Palma, F., Jamilena, M., & Garrido, D. (2014). Preconditioning treatment induces chilling tolerance in zucchini fruit improving different physiological mechanisms against cold injury. *Annals of Applied Biology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/aab.12189>
- Carvajal, F., Palma, F., Jamilena, M., & Garrido, D. (2015). Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest cold storage in zucchini fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 108, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.013>
- Carvajal, F., Palma, F., Jiménez-Muñoz, R., Jamilena, M., Pulido, A., & Garrido, D. (2017). Unravelling the role of abscisic acid in chilling tolerance of zucchini during postharvest cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 133, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.07.004>

- Carvajal, F., Rosales, R., Palma, F., Manzano, S., Cañizares, J., Jamilena, M., & Garrido, D. (2018). Transcriptomic changes in Cucurbita pepo fruit after cold storage: Differential response between two cultivars contrasting in chilling sensitivity. *BMC Genomics*, *19*(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4500-9>
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., & Gal-On, A. (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology*, *17*(7), 1140-1153. <https://doi.org/10.1111/mpp.12375>
- Chee, P. P. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash Cucurbita pepo L cv. YC 60. *Plant Cell Reports*, *9*(11), 620-622. <https://doi.org/10.1007/BF00231801>
- Chee, P. P. (1992). Initiation and Maturation of Somatic Embryos of Squash (Cucurbita pepo). *HortScience*, *27*(1), 59-60. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.1.59>
- Chen, J., Mao, L., Lu, W., Ying, T., & Luo, Z. (2016). Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. *Planta*, *243*(1), 183-197. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2402-5>
- Chen, Ji, Wang, L., Chen, J., Huang, J., Liu, F., Guo, R., Yang, L., Grabon, A., Zhao, K., Kong, F., Liu, C., & Tian, M. (2018). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation system for the important medicinal plant Dendrobium catenatum Lindl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *54*(3), 228-239. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9903-4>
- Chen, L.-T., Luo, M., Wang, Y.-Y., & Wu, K. (2010). Involvement of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *Journal of Experimental Botany*, *61*(12), 3345-3353. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq154>
- Chen, L.-T., & Wu, K. (2010). Role of histone deacetylases HDA6 and HDA19 in ABA and abiotic stress response. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(10), 1318-1320. <https://doi.org/10.4161/psb.5.10.13168>
- Chen, P., Pei, Y. L., Liang, B., Zhang, Y. S., Zhai, X. W., He, S. H., Kai, W. B., Sun, Y. F., & Leng, P. (2016). Role of abscisic acid in regulating fruit set and ripening in squash (Cucurbita pepo L.). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *44*(4), 274-290. <https://doi.org/10.1080/01140671.2016.1212907>
- Chinnusamy, V., & Zhu, J.-K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(2), 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006>

## Bibliografía

---

- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, *90*(5), 856-867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Civello, P. M., Martínez, G. A., Chaves, A. R., & Añón, M. C. (1997). Heat Treatments Delay Ripening and Postharvest Decay of Strawberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(12), 4589-4594. <https://doi.org/10.1021/jf9700337>
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., & Lamattina, L. (2015). Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: Regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *Journal of Experimental Botany*, *66*(10), 2913-2921. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv073>
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Chapter 12—Phenolic Compounds. En E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- de Vetten, N., Wolters, A.-M., Raemakers, K., van der Meer, I., ter Stege, R., Heeres, E., Heeres, P., & Visser, R. (2003). A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology*, *21*(4), 439-442. <https://doi.org/10.1038/nbt801>
- Decker, D. S. (1988). Origin(s), evolution, and systematics of Cucurbita pepo (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, *42*(1), 4-15. <https://doi.org/10.1007/BF02859022>
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, *1*(4), 19-21
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: Robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server issue), W465-469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Desbiez, C., & Lecoq, H. (1997). Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, *46*(6), 809-829. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-87.x>
- Dong, N., Qi, J., Li, Y., Chen, Y., & Hao, Y. (2017). Effects of Abscisic Acid and Nitric Oxide on Chilling Resistance and Activation of the Antioxidant System in Walnut Shoots In Vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *142*(5), 376-384. <https://doi.org/10.21273/JASHS04197-17>

- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573-581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Dupeux, F., Santiago, J., Betz, K., Twycross, J., Park, S.-Y., Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Jensen, M. R., Krasnogor, N., Blackledge, M., Holdsworth, M., Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., & Márquez, J. A. (2011). A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *The EMBO Journal*, 30(20), 4171-4184. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.294>
- Edwards, E. A., Rawsthorne, S., & Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2), 278-284. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D427-D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Ellison, E. E., Nagalakshmi, U., Gamo, M. E., Huang, P., Dinesh-Kumar, S., & Voytas, D. F. (2020). Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nature Plants*, 6(6), 620-624. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0670-y>
- Fan, B., Shen, L., Liu, K., Zhao, D., Yu, M., & Sheng, J. (2008). Interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide in postharvest tomato resistance response to *Rhizopus nigricans*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), 1238-1244. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3212>
- Fan, W., Zhao, M., Li, S., Bai, X., Li, J., Meng, H., & Mu, Z. (2016). Contrasting transcriptional responses of PYR1/PYL/RCAR ABA receptors to ABA or dehydration stress between maize seedling leaves and roots. *BMC Plant Biology*, 16(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0764-x>
- Fancy, N. N., Bahlmann, A.-K., & Loake, G. J. (2017). Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 40(4), 462-472. <https://doi.org/10.1111/pce.12707>
- FEPEX. (2020). *Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas*. FEPEX. <https://www.fepex.es/inicio.aspx>

## Bibliografía

---

- Ferguson, I., Volz, R., & Woolf, A. (1999). Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), 255-262. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00089-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00089-1)
- Fernández-Trujillo, J. P., & Martínez, J. A. (2006). Ultrastructure of the onset of chilling injury in cucumber fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 80(2), 100-110.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 11. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Flores, H. E., & Galston, A. W. (1982). Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiology*, 69(3), 701-706. <https://doi.org/10.1104/pp.69.3.701>
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz, M., Milczarek, G., Jelen, H., & Jackowiak, H. (2007). Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytologist*, 175(4), 718-730. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02142.x>
- Fogelman, E., Kaplan, A., Tanami, Z., & Ginzberg, I. (2011). Antioxidative activity associated with chilling injury tolerance of muskmelon (*Cucumis melo* L.) rind. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.034>
- Foyer, C. H. (2019). *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press.
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 241-254. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2-18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>

- Freschi, L. (2013). Nitric oxide and phytohormone interactions: Current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00398>
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.-S. P., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal*, 39(6), 863-876. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02171.x>
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4), 509-525. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>
- Gaba, V., Zelcer, A., & Gal-On, A. (2004). Cucurbit biotechnology – the importance of virus resistance. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(4), 346-358. <https://doi.org/10.1079/IVP2004554>
- Gal-On, A. (2000). A Point Mutation in the FRNK Motif of the Potyvirus Helper Component-Protease Gene Alters Symptom Expression in Cucurbits and Elicits Protection Against the Severe Homologous Virus. *Phytopathology*, 90(5), 467-473. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.5.467>
- Gal-On, A. (2007). Zucchini yellow mosaic virus: Insect transmission and pathogenicity — the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 139-150. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00381.x>
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., & Raccach, B. (1992). A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *The Journal of General Virology*, 73 ( Pt 9), 2183-2187. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-9-2183>
- Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W. J., Raccach, B., & Gaba, V. (1995). Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *Journal of General Virology*, 76(12), 3223-3227. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-12-3223>
- Gal-On, A., Wolf, D., Antignus, Y., Patlis, L., Hyun Ryu, K., Eun Min, B., Pearlsman, M., Lachman, O., Gaba, V., Wang, Y., Moshe Shibolet, Y., Yang, J., & Zelcer, A. (2005). Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic Research*, 14(1), 81-93. <https://doi.org/10.1007/s11248-004-3802-7>
- Ganapathi, A., & Perl-Treves, R. (2000). AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION IN CUCUMIS SATIVUS VIA DIRECT

## Bibliografía

---

- ORGANOGENESIS. *Acta Horticulturae*, 510, 405-408. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.510.64>
- Garcia-Mata, C., & Lamattina, L. (2002). Nitric Oxide and Abscisic Acid Cross Talk in Guard Cells. *Plant Physiology*, 128(3), 790-792. <https://doi.org/10.1104/pp.011020>
- Garcia-Mata, C., & Lamattina, L. (2007). Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide*, 17(3), 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2007.08.001>
- Garcia-Ruiz, H., Garcia Ruiz, M. T., Gabriel Peralta, S. M., Miravel Gabriel, C. B., & El-Mounadi, K. (2016). Mecanismos, aplicaciones y perspectivas del silenciamiento génico de virus en plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(3), 286-307. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-8>
- Garg, N., & Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 143(1), 81-96. <https://doi.org/10.1080/11263500802633626>
- Gelvin, S. B. (2010). Plant Proteins Involved in Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 45-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081852>
- Gelvin, S. B. (2012). Traversing the Cell: Agrobacterium T-DNA's Journey to the Host Genome. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00052>
- German-Retana, S., Candresse, T., Alias, E., Delbos, R.-P., & Le Gall, O. (2000). Effects of Green Fluorescent Protein or  $\beta$ -Glucuronidase Tagging on the Accumulation and Pathogenicity of a Resistance-Breaking Lettuce mosaic virus Isolate in Susceptible and Resistant Lettuce Cultivars. En *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* (Vol. 13, Número 3).
- Gilding, E. K., & Marks, M. D. (2010). Analysis of purified glabra3-shapeshifter trichomes reveals a role for NOECK in regulating early trichome morphogenic events: Unexpected role for NOK in promoting cell outgrowth. *The Plant Journal*, 64(2), 304-317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04329.x>
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Pereira, E., & Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032>

- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(2), 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, *327*(5967), 812-818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Gong, L., Paris, H. S., Nee, M. H., Stift, G., Pachner, M., Vollmann, J., & Lelley, T. (2012). Genetic relationships and evolution in Cucurbita pepo (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, *124*(5), 875-891. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1752-z>
- Gosalbes, M. J., Zacarías, L., & Lafuente, M. T. (2004). Characterization of the expression of an oxygenase involved in chilling-induced damage in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *33*(3), 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.04.001>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*(3), 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Guo, Z., Liu, C., Xiao, W., Wang, R., Zhang, L., Guan, S., Zhang, S., Cai, L., Liu, H., Huang, X., Guo, J., Zhou, X., Du, X., Pan, G., & Chen, Z. (2019). Comparative Transcriptome Profile Analysis of Anther Development in Reproductive Stage of Rice in Cold Region Under Cold Stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, *37*(3), 129-145. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01137-6>
- Gupta, A. S., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burke, J. J., & Allen, R. D. (1993). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(4), 1629-1633. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1629>
- Halliwell, B., & Foyer, C. H. (1976). Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochemical Journal*, *155*(3), 697-700. <https://doi.org/10.1042/bj1550697>

## Bibliografía

---

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. A., & Fujita, M. (2019). Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. *Antioxidants*, 8(9), 384. <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Plant Response and Tolerance to Abiotic Oxidative Stress: Antioxidant Defense Is a Key Factor. En B. Venkateswarlu, A. K. Shanker, C. Shanker, & M. Maheswari (Eds.), *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* (pp. 261-315). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0_8)
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2010). Physiological and Biochemical Mechanisms of Nitric Oxide Induced Abiotic Stress Tolerance in Plants—SciAlert Responsive Version. *American Journal of Plant Physiology*, 5(6), 295-324. <https://doi.org/10.3923/ajpp.2010.295.324>
- He, J., Tang, S., Yang, D., Chen, Y., Ling, L., Zou, Y., Zhou, M., & Xu, X. (2019). Chemical and Transcriptomic Analysis of Cuticle Lipids under Cold Stress in *Theilungiella salsuginea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184519>
- He, M., He, C.-Q., & Ding, N.-Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hernandez, M. S., Hernández, C. S., Villanueva-Verduzco, C., Gil-Vásquez, I., Jiménez-Rojas, M. C., & Sánchez, I. (2009). Multiplicación in vitro vía organogénesis en calabaza. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 11-22.
- Hossain, M. A., & Asada, K. (1984). Inactivation of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts on Dark Addition of Hydrogen Peroxide: Its Protection by Ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, 25(7), 1285-1295. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076837>
- Hossain, M. A., Li, Z.-G., Hoque, T. S., Burritt, D. J., Fujita, M., & Munné-Bosch, S. (2018). Heat or cold priming-induced cross-tolerance to abiotic stresses in plants: Key

- regulators and possible mechanisms. *Protoplasma*, 255(1), 399-412. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1150-8>
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., & Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: A reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 2008, 420747. <https://doi.org/10.1155/2008/420747>
- Hu, M., Yang, D., Huber, D. J., Jiang, Y., Li, M., Gao, Z., & Zhang, Z. (2014). Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 97, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.06.013>
- Hu, W. H., Song, X. S., Shi, K., Xia, X. J., Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2008). Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling. *Photosynthetica*, 46(4), 581. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0098-5>
- Huang, M., & Guo, Z. (2005). Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biologia Plantarum*, 49(1), 81-84. <https://doi.org/10.1007/s00000-005-1084-3>
- Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: Biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., & Snyder, S. H. (2001). Protein S-nitrosylation: A physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology*, 3(2), 193-197. <https://doi.org/10.1038/35055104>
- Jakoby, M. J., Falkenhan, D., Mader, M. T., Brininstool, G., Wischnitzki, E., Platz, N., Hudson, A., Hülskamp, M., Larkin, J., & Schnittger, A. (2008). Transcriptional Profiling of Mature Arabidopsis Trichomes Reveals That *NOECK* Encodes the MIXTA-Like Transcriptional Regulator MYB106. *Plant Physiology*, 148(3), 1583-1602. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126979>
- Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S., & Ovesná, J. (2010). Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology*, 12(3), 395-405. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00299.x>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901-3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>

## Bibliografía

---

- Jeffrey, C. (1990). Systematics of the Cucurbitaceae: An overview. *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*, 3-9.
- Jiang, Q., Zhang, Y., Zhong, C., Zeng, B., Bogusz, D., & Franche, C. (2012). Establishment of an in vitro plant regeneration protocol for *Casuarina cunninghamiana* Miq. Via indirect organogenesis. *New Forests*, 43(2), 143-154. <https://doi.org/10.1007/s11056-011-9277-5>
- Jiang, T., Zhang, X.-F., Wang, X.-F., & Zhang, D.-P. (2011). Arabidopsis 3-Ketoacyl-CoA Thiolase-2 (KAT2), an Enzyme of Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation, is Involved in ABA Signal Transduction. *Plant and Cell Physiology*, 52(3), 528-538. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr008>
- Jiménez-Muñoz, R., Palma, F., Carvajal, F., Castro-Cegrí, A., Pulido, A., Jamilena, M., Romero-Puertas, M. C., & Garrido, D. (2021). Pre-storage nitric oxide treatment enhances chilling tolerance of zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by S-nitrosylation of proteins and modulation of the antioxidant response. *Postharvest Biology and Technology*, 171, 111345. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111345>
- Kang, M., Seo, J.-K., Choi, H., Choi, H.-S., & Kim, K.-H. (2016). Establishment of a Simple and Rapid Gene Delivery System for Cucurbits by Using Engineered of Zucchini yellow mosaic virus. *The Plant Pathology Journal*, 32(1), 70-76. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.08.2015.0173>
- Kant, R., & Dasgupta, I. (2017). Phenotyping of VIGS-mediated gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus. *Plant Cell Reports*, 36(7), 1159-1170. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2156-6>
- Kathiravan, K., Vengedesan, G., Singer, S., Steinitz, B., Paris, H. S., & Gaba, V. (2006). Adventitious regeneration in vitro occurs across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(3), 285-295. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9079-1>
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S. K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., & Bansal, K. C. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics*, 13, 544. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-544>
- Khoury, C. K., Bjorkman, A. D., Dempewolf, H., Ramirez-Villegas, J., Guarino, L., Jarvis, A., Rieseberg, L. H., & Struik, P. C. (2014). Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4001-4006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313490111>

- Kim, H. J., Cho, H. S., Pak, J. H., Kwon, T., Lee, J.-H., Kim, D.-H., Lee, D. H., Kim, C.-G., & Chung, Y.-S. (2018). Confirmation of Drought Tolerance of Ectopically Expressed AtABF3 Gene in Soybean. *Molecules and Cells*, 41(5), 413-422. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2254>
- Kim, J.-M., To, T. K., Matsui, A., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Matsuda, F., Habu, Y., Ogawa, D., Sakamoto, T., Matsunaga, S., Bashir, K., Rasheed, S., Ando, M., Takeda, H., Kawaura, K., Kusano, M., Fukushima, A., Endo, T. A., Kuromori, T., ... Seki, M. (2017). Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants*, 3(7), 1-7. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.97>
- Kim, S., Kang, J., Cho, D.-I., Park, J. H., & Kim, S. Y. (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal*, 40(1), 75-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02192.x>
- Kocsy, G., Ballmoos, P. von, Rügsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., & Brunold, C. (2001). Increasing the Glutathione Content in a Chilling-Sensitive Maize Genotype Using Safeners Increased Protection against Chilling-Induced Injury. *Plant Physiology*, 127(3), 1147-1156. <https://doi.org/10.1104/pp.010107>
- Kocsy, G., Galiba, G., & Brunold, C. (2001). Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 113(2), 158-164. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130202.x>
- Komarova, T. V., Baschieri, S., Donini, M., Marusic, C., Benvenuto, E., & Dorokhov, Y. L. (2010). Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Review of Vaccines*, 9(8), 859-876. <https://doi.org/10.1586/erv.10.85>
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J., & Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(2), 263-276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00278.x>
- Kumar, N., Vijay Anand, K. G., & Reddy, M. P. (2011). Plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas*—Impacts of plant growth regulators, source and type of explants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20(1), 125-133. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0037-6>
- Lacroix, B., & Citovsky, V. (2013). The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8), 467-481. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130199b1>

## Bibliografía

---

- Lafuente, M. T., Martínez-Téllez, M. A., & Zacarías, L. (1997). Abscisic Acid in the Response of 'Fortune' Mandarins to Chilling. Effect of Maturity and High-Temperature Conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(4), 494-502. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199704\)73:4<494::AID-JSFA761>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199704)73:4<494::AID-JSFA761>3.0.CO;2-B)
- Lee, Y. K., Chung, W. I., & Ezura, H. (2003). Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). *Plant Science*, 164(3), 413-418. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00429-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00429-6)
- León, J., & Costa-Broseta, Á. (2020). Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 43(1), 1-15. <https://doi.org/10.1111/pce.13617>
- Li, D., Cheng, Y., Dong, Y., Shang, Z., & Guan, J. (2017). Effects of low temperature conditioning on fruit quality and peel browning spot in 'Huangguan' pears during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 131, 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.05.005>
- Li, X., Li, X., Li, M., Yan, Y., Liu, X., & Li, L. (2016). Dual Function of NAC072 in ABF3-Mediated ABA-Responsive Gene Regulation in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01075>
- Lico, C., Chen, Q., & Santi, L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal of Cellular Physiology*, 216(2), 366-377. <https://doi.org/10.1002/jcp.21423>
- Lim, C. S., Kang, S. M., Cho, J. L., & Gross, K. C. (2009). Antioxidizing Enzyme Activities in Chilling-sensitive and Chilling-tolerant Pepper Fruit as Affected by Stage of Ripeness and Storage Temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1), 156-163. <https://doi.org/10.21273/JASHS.134.1.156>
- Lindbo, J. A., Fitzmaurice, W. P., & della-Cioppa, G. (2001). Virus-mediated reprogramming of gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 181-185. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00158-8)
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., & Dougherty, W. G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *The Plant Cell*, 5(12), 1749-1759. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.12.1749>
- Liu, L., Gu, Q., Ijaz, R., Zhang, J., & Ye, Z. (2016). Generation of transgenic watermelon resistance to Cucumber mosaic virus facilitated by an effective Agrobacterium-

- mediated transformation method. *Scientia Horticulturae*, 205, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.013>
- Liu, Yujia, Ji, X., Nie, X., Qu, M., Zheng, L., Tan, Z., Zhao, H., Huo, L., Liu, S., Zhang, B., & Wang, Y. (2015). Arabidopsis AtbHLH112 regulates the expression of genes involved in abiotic stress tolerance by binding to their E-box and GCG-box motifs. *New Phytologist*, 207(3), 692-709. <https://doi.org/10.1111/nph.13387>
- Liu, Yunfen, Yang, X., Zhu, S., & Wang, Y. (2016). Postharvest application of MeJA and NO reduced chilling injury in cucumber (*Cucumis sativus*) through inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. *Postharvest Biology and Technology*, 119, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.003>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luan, V. Q., Cuong, L. K., Tung, H. T., Hien, V. T., Hieu, T., & Nhut, D. T. (2019). Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species. *Scientia Horticulturae*, 256, 108648. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108648>
- Luo, Z., Li, D., Du, R., & Mou, W. (2015). Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content. *Scientia Horticulturae*, 183, 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.021>
- Lyons, J. M. (1973). Chilling Injury in Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 445-466. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002305>
- Ma, L., Sun, N., Liu, X., Jiao, Y., Zhao, H., & Deng, X. W. (2005). Organ-Specific Expression of Arabidopsis Genome during Development. *Plant Physiology*, 138(1), 80-91. <https://doi.org/10.1104/pp.104.054783>
- Madani, B., Mirshekari, A., & Imahori, Y. (2019). Chapter 19—Physiological Responses to Stress. En E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 405-423). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00020-8>
- Malacrida, C., Valle, E. M., & Boggio, S. B. (2006). Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. *Physiologia Plantarum*, 127(1), 10-18. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00636.x>
- Mali, A. M., & Chavan, N. S. (2016). In vitro rapid regeneration through direct organogenesis and ex-vitro establishment of *Cucumis trigonus* Roxb.—An underutilized

## Bibliografía

---

- pharmaceutically important cucurbit. *Industrial Crops and Products*, 83, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.036>
- Mao, L., Pang, H., Wang, G., & Zhu, C. (2007). Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biology and Technology*, 44(1), 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.009>
- Marks, M. D., Wenger, J. P., Gilding, E., Jilk, R., & Dixon, R. A. (2009). Transcriptome analysis of Arabidopsis wild-type and gl3-sst sim trichomes identifies four additional genes required for trichome development. *Molecular Plant*, 2(4), 803-822. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp037>
- Martínez-Téllez, M. A., Ramos-Clamont, M. G., Gardea, A. A., & Vargas-Arispuro, I. (2002). Effect of infiltrated polyamines on polygalacturonase activity and chilling injury responses in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(1), 98-101. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00631-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00631-9)
- Massolo, J. F., Lemoine, M. L., Chaves, A. R., Concellón, A., & Vicente, A. R. (2014). Benzyl-aminopurine (BAP) treatments delay cell wall degradation and softening, improving quality maintenance of refrigerated summer squash. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.010>
- Matoba, N., Davis, K. R., & Palmer, K. E. (2011). Recombinant Protein Expression in Nicotiana. En J. A. Birchler (Ed.), *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols* (pp. 199-219). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-957-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-957-4_11)
- Matsuo, T., Ide, S., & Shitida, M. (1992). Correlation between chilling sensitivity of plant tissues and fatty acid composition of phosphatidylglycerols. *Phytochemistry*, 31(7), 2289-2293. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83266-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83266-2)
- Matus, J. T., Aquea, F., & Arce-Johnson, P. (2008). Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across Vitis and Arabidopsis genomes. *BMC Plant Biology*, 8(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-83>
- McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. J., & David, K. (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00079>
- Megías, Z., Manzano, S., Martínez, C., García, A., Aguado, E., Garrido, D., del Mar Reboloso, M., Valenzuela, J. L., & Jamilena, M. (2016). Postharvest cold tolerance

- in summer squash and its association with reduced cold-induced ethylene production. *Euphytica*, 213(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1805-0>
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., Barrera, A., Rosales, R., Valenzuela, J. L., Garrido, D., & Jamilena, M. (2014). Cold-induced ethylene in relation to chilling injury and chilling sensitivity in the non-climacteric fruit of zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.044>
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., del Mar Reboloso-Fuentes, M., Valenzuela, J. L., Garrido, D., & Jamilena, M. (2016). Ethylene biosynthesis and signaling elements involved in chilling injury and other postharvest quality traits in the non-climacteric fruit of zucchini (*Cucurbita pepo*). *Postharvest Biology and Technology*, 113, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.001>
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., Reboloso-Fuentes, M. del M., Garrido, D., Valenzuela, J. L., & Jamilena, M. (2015). Individual Shrink Wrapping of Zucchini Fruit Improves Postharvest Chilling Tolerance Associated with a Reduction in Ethylene Production and Oxidative Stress Metabolites. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133058>
- Mehrotra, R., Bhalothia, P., Bansal, P., Basantani, M. K., Bharti, V., & Mehrotra, S. (2014). Abscisic acid and abiotic stress tolerance – Different tiers of regulation. *Journal of Plant Physiology*, 171(7), 486-496. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.12.007>
- Messelink, G. J., Calvo, F. J., Marín, F., & Janssen, D. (2020). Cucurbits. En M. L. Gullino, R. Albajes, & P. C. Nicot (Eds.), *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops* (pp. 537-566). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5_19)
- Miguel, C., & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: Somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3713-3725. <https://doi.org/10.1093/jxb/err155>
- Mishina, T. E., Lamb, C., & Zeier, J. (2007). Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 30(1), 39-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01604.x>
- Mishra, K. B., Iannaccone, R., Petrozza, A., Mishra, A., Armentano, N., La Vecchia, G., Trtílek, M., Cellini, F., & Nedbal, L. (2012). Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Science*, 182, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.022>

## Bibliografía

---

- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Moallem, S., Behbahani, M., Mousavi, E., & Karimi, N. (2012). Direct regeneration of *Rosa canina* through tissue culture. *TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES*, 10(3), 3.
- Mysore, K. S., & Senthil-Kumar, M. (Eds.). (2015). *Plant Gene Silencing: Methods and Protocols* (Vol. 1287). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0>
- Nakatsubo, N., Kojima, H., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Maeda, D., Imai, Y., Irimura, T., & Nagano, T. (1998). Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: Diaminofluoresceins. *FEBS Letters*, 427(2), 263-266. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00440-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00440-2)
- Nam, K.-H., Kim, D. Y., Kim, H. J., Park, I.-S., Kim, H. J., Chung, Y. S., Kim, S. Y., & Kim, C.-G. (2019). Global metabolite profiling based on GC-MS and LC-MS/MS analyses in ABF3-overexpressing soybean with enhanced drought tolerance. *Applied Biological Chemistry*, 62(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0425-5>
- Nanasato, Y., Konagaya, K., Okuzaki, A., Tsuda, M., & Tabei, Y. (2011). Agrobacterium-mediated transformation of kabocha squash (*Cucurbita moschata* Duch) induced by wounding with aluminum borate whiskers. *Plant Cell Reports*, 30(8), 1455-1464. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1054-6>
- Nanasato, Y., Konagaya, K., Okuzaki, A., Tsuda, M., & Tabei, Y. (2013). Improvement of Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 267-276. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0260-1>
- Nanasato, Y., & Tabei, Y. (2015). Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and Kabocha Squash (*Cucurbita moschata* Duch). En K. Wang (Ed.), *Agrobacterium Protocols* (Vol. 1223, pp. 299-310). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5_24)
- Nee, M. (1990). The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44(3), 56. <https://doi.org/10.1007/BF02860475>

- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 249-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Ntui, V. O., Thirukkumaran, G., Iioka, S., & Mii, M. (2009). Efficient plant regeneration via organogenesis in “Egusi” melon (*Colocynthis citrullus* L.). *Scientia Horticulturae*, 119(4), 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.031>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). FAO. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Oshima, Y., & Mitsuda, N. (2013). The MIXTA-like Transcription factor MYB16 is a major regulator of cuticle formation in vegetative organs. *Plant Signaling & Behavior*, 8(11), e26826. <https://doi.org/10.4161/psb.26826>
- Oshima, Y., Shikata, M., Koyama, T., Ohtsubo, N., Mitsuda, N., & Ohme-Takagi, M. (2013). MIXTA-Like Transcription Factors and WAX INDUCER1/SHINE1 Coordinately Regulate Cuticle Development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri*. *The Plant Cell*, 25(5), 1609-1624. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110783>
- Osorio, S., Scossa, F., & Fernie, A. (2013). Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00198>
- Palma, F., Carvajal, F., Jamilena, M., & Garrido, D. (2014). Contribution of polyamines and other related metabolites to the maintenance of zucchini fruit quality during cold storage. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 82, 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.001>
- Palma, F., Carvajal, F., Jiménez-Muñoz, R., Pulido, A., Jamilena, M., & Garrido, D. (2019). Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid treatment improves the cold tolerance of zucchini fruit during postharvest storage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 136, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.023>
- Palma, F., Carvajal, F., Lluch, C., Jamilena, M., & Garrido, D. (2014). Changes in carbohydrate content in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) under low temperature stress. *Plant Science*, 217-218, 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.004>
- Palma, F., Carvajal, F., Ramos, J. M., Jamilena, M., & Garrido, D. (2015). Effect of putrescine application on maintenance of zucchini fruit quality during cold storage: Contribution of GABA shunt and other related nitrogen metabolites. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.08.010>

## Bibliografía

---

- Palma, F., López-Gómez, M., Tejera, N. A., & Lluch, C. (2014). Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Science*, 223, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.005>
- Paradiso, V. M., Castellino, M., Renna, M., Leoni, B., Caponio, F., & Santamaria, P. (2018). Simple tools for monitoring of chlorophyll in broccoli raab and radish microgreens on their growing medium during cold storage. *Progress in Nutrition*, 20(3), 415-422. <https://doi.org/10.23751/pn.v20i3.7097>
- Paris, H. S., Lebeda, A., Křístková, E., Andres, T. C., & Nee, M. H. (2012). Parallel Evolution Under Domestication and Phenotypic Differentiation of the Cultivated Subspecies of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 66(1), 71-90. <https://doi.org/10.1007/s12231-012-9186-3>
- Paris, H. S., & Maynard, D. N. (2008). *The encyclopedia of fruits & nuts*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=The%20encyclopedia%20of%20fruits%20%26%20nuts&pages=292-299&publication\\_year=2008&author=Paris%20CHS&author=Maynard%20CDN](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20encyclopedia%20of%20fruits%20%26%20nuts&pages=292-299&publication_year=2008&author=Paris%20CHS&author=Maynard%20CDN)
- 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(6), 971-978. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1157-0>
- Perrella, G., Lopez-Vernaza, M. A., Carr, C., Sani, E., Gosselé, V., Verduyn, C., Kellermeier, F., Hannah, M. A., & Amtmann, A. (2013). Histone Deacetylase Complex1 Expression Level Titrates Plant Growth and Abscisic Acid Sensitivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(9), 3491-3505. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114835>
- Peterson, K. M., Shyu, C., Burr, C. A., Horst, R. J., Kanaoka, M. M., Omae, M., Sato, Y., & Torii, K. U. (2013). *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper IV proteins promote stomatal development and ectopically induce stomata beyond the epidermis. *Development*, 140(9), 1924-1935. <https://doi.org/10.1242/dev.090209>
- Pizzio, G. A., Rodriguez, L., Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Yunta, C., Merilo, E., Kollist, H., Albert, A., & Rodriguez, P. L. (2013). The PYL4 A194T Mutant Uncovers a Key Role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA Interaction for Abscisic Acid Signaling and Plant Drought Resistance. *Plant Physiology*, 163(1), 441-455. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224162>

- Pniewski, T., & Kapusta, J. (2005). *Efficiency of transformation of Polish cultivars of pea (Pisum sativum L.) with various regeneration capacity by using hypervirulent Agrobacterium tumefaciens strains.* 46(2), 9.
- Prakash, V., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Sharma, S., & Corpas, F. J. (2019). Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signalling molecules in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.033>
- Purkayastha, A., & Dasgupta, I. (2009). Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(11), 967-976. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.09.001>
- Qian, H. F., Peng, X. F., Han, X., Ren, J., Zhan, K. Y., & Zhu, M. (2014). The stress factor, exogenous ascorbic acid, affects plant growth and the antioxidant system in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(4), 467-475. <https://doi.org/10.1134/S1021443714040141>
- Qiao, W., & Fan, L.-M. (2008). Nitric Oxide Signaling in Plant Responses to Abiotic Stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1238-1246. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00759.x>
- Qu, G.-Q., Liu, X., Zhang, Y.-L., Yao, D., Ma, Q.-M., Yang, M.-Y., Zhu, W.-H., Yu, S., & Luo, Y.-B. (2009). Evidence for programmed cell death and activation of specific caspase-like enzymes in the tomato fruit heat stress response. *Planta*, 229(6), 1269-1279. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0908-4>
- Rabiei, V., Kakavand, F., Zaare-Nahandi, F., Razavi, F., & Aghdam, M. S. (2019). Nitric oxide and  $\gamma$ -aminobutyric acid treatments delay senescence of cornelian cherry fruits during postharvest cold storage by enhancing antioxidant system activity. *Scientia Horticulturae*, 243, 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.034>
- Rashid, A. H. A., & Lateef, D. D. (2016). Novel Techniques for Gene Delivery into Plants and Its Applications for Disease Resistance in Crops. *American Journal of Plant Sciences*, 7(1), 181-193. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.71019>
- Ré, D. A., Capella, M., Bonaventure, G., & Chan, R. L. (2014). *Arabidopsis AtHB7 and AtHB12* evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress. *BMC Plant Biology*, 14(1), 150. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-150>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization

## Bibliografía

---

- essay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ren, Y., He, J., Liu, H., Liu, G., & Ren, X. (2017). Nitric oxide alleviates deterioration and preserves antioxidant properties in 'Tainong' mango fruit during ripening. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 58(1), 27-37. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0001-z>
- Robertson, D. (2004). VIGS VECTORS FOR GENE SILENCING: Many Targets, Many Tools. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 495-519. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141803>
- Robinson, R. W., & Decker-Walters, D. S. (1997). Cucurbits. *Cucurbits*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19970300408>
- Romero, P., Rodrigo, M. J., Alférez, F., Ballester, A.-R., González-Candelas, L., Zacarías, L., & Lafuente, M. T. (2012). Unravelling molecular responses to moderate dehydration in harvested fruit of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) using a fruit-specific ABA-deficient mutant. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2753-2767. <https://doi.org/10.1093/jxb/err461>
- Romero, P., Rodrigo, M. J., & Lafuente, M. T. (2013). Differential expression of the *Citrus sinensis* ABA perception system genes during postharvest fruit dehydration. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.09.010>
- Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., & Sandalio, L. M. (2013). Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: An overview. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00373>
- Romero-Puertas, M. C., & Sandalio, L. M. (2016). Nitric Oxide Level Is Self-Regulating and Also Regulates Its ROS Partners. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00316>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725-738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Ruiz, M. T., Voinnet, O., & Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. *The Plant Cell*, 10(6), 937-946. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.937>

- Saba, M. K., & Moradi, S. (2017). Sodium nitroprusside (SNP) spray to maintain fruit quality and alleviate postharvest chilling injury of peach fruit. *Scientia Horticulturae*, *216*, 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.009>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Sala, J. M. (1998). Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharvest Biology and Technology*, *13*(3), 255-261. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00011-8)
- Sánchez-Vicente, I., Fernández-Espinosa, M. G., & Lorenzo, O. (2019). Nitric oxide molecular targets: Reprogramming plant development upon stress. *Journal of Experimental Botany*, *70*(17), 4441-4460. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz339>
- Sanità di Toppi, L., Pecchioni, N., & Durante, M. (1997). Cucurbita pepo L. can be transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *51*(2), 89-93. <https://doi.org/10.1023/A:1005955012372>
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.-Y., Márquez, J. A., Cutler, S. R., & Rodriguez, P. L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant Journal*, *60*(4), 575-588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03981.x>
- Sato, Y., Masuta, Y., Saito, K., Murayama, S., & Ozawa, K. (2011). Enhanced chilling tolerance at the booting stage in rice by transgenic overexpression of the ascorbate peroxidase gene, OsAPXa. *Plant Cell Reports*, *30*(3), 399-406. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0985-7>
- Sato, Y., Murakami, T., Funatsuki, H., Matsuba, S., Saruyama, H., & Tanida, M. (2001). Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany*, *52*(354), 145-151. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.354.145>
- Sebastiani, M. S., & Ficcadenti, N. (2016). In vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var. *Cantalupensis* and genetic stability evaluation using RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *124*(1), 69-79. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0875-3>
- Sedeek, K. E. M., Mahas, A., & Mahfouz, M. (2019). Plant Genome Engineering for Targeted Improvement of Crop Traits. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00114>

## Bibliografía

---

- Serrano, M., Pretel, M. T., Martínez-Madrid, M. C., Romojaro, F., & Riquelme, F. (1998). CO<sub>2</sub> Treatment of Zucchini Squash Reduces Chilling-Induced Physiological Changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2465-2468. <https://doi.org/10.1021/jf970864c>
- Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M. T., Romojaro, F., & Flores, F. B. (2009). Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 555-573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3468>
- Shabanian, S., Nasr Esfahani, M., Karamian, R., & Tran, L.-S. P. (2018). Physiological and biochemical modifications by postharvest treatment with sodium nitroprusside extend vase life of cut flowers of two gerbera cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 137, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.009>
- Shah, P., Singh, N. K., Khare, N., Rathore, M., Anandhan, S., Arif, M., Singh, R. K., Das, S. C., Ahmed, Z., & Kumar, N. (2008). Agrobacterium mediated genetic transformation of summer squash (*Cucurbita pepo* L. cv. Australian green) with cbf-1 using a two vector system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(3), 363-371. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9450-5>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012, abril 24). *Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions* [Review Article]. *Journal of Botany; Hindawi*. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma, S., Barman, K., Prasad, R. N., & Singh, J. (2020). Chilling Stress During Postharvest Storage of Fruits and Vegetables. En A. Rakshit, H. B. Singh, A. K. Singh, U. S. Singh, & L. Fraceto (Eds.), *New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture* (pp. 75-99). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1322-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1322-0_6)
- Shepherd, T., & Griffiths, D. W. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3), 469-499. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01826.x>
- Shi, H.-T., Li, R.-J., Cai, W., Liu, W., Fu, Z.-W., & Lu, Y.-T. (2012). In vivo role of nitric oxide in plant response to abiotic and biotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 7(3), 437-439. <https://doi.org/10.4161/psb.19219>
- Shiboleth, Y. M., Arazi, T., Wang, Y., & Gal-On, A. (2001). A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. *Journal of Biotechnology*, 92(1), 37-46. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00363-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00363-7)

- Shoresh, M., Gal-On, A., Leibman, D., & Chet, I. (2006). Characterization of a Mitogen-Activated Protein Kinase Gene from Cucumber Required for Trichoderma-Conferred Plant Resistance. *Plant Physiology*, 142(3), 1169-1179. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082107>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Smarrelli, J., Watters, M. T., & Diba, L. H. (1986). Response of Various Cucurbits to Infection by Plasmid-Harboring Strains of Agrobacterium. *Plant Physiology*, 82(2), 622-624. <https://doi.org/10.1104/pp.82.2.622>
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 229-235. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)80070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80070-9)
- Smith, R. H. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Academic Press.
- Stamler, J. S., Lamas, S., & Fang, F. C. (2001). Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism. *Cell*, 106(6), 675-683. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00495-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00495-0)
- Stracke, R., Werber, M., & Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 447-456. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00199-0)
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(Database issue), D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Teribia, N., Tijero, V., & Munné-Bosch, S. (2016). Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries. *New Biotechnology*, 33(6), 824-833. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.015>
- Tian, W., Huang, D., Geng, B., Zhang, Q., Feng, J., & Zhu, S. (2020). Regulation of the biosynthesis of endogenous nitric oxide and abscisic acid in stored peaches by exogenous nitric oxide and abscisic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5), 2136-2144. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10237>

## Bibliografía

---

- To, T. K., Nakaminami, K., Kim, J.-M., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Yokoyama, S., Shinozaki, K., & Seki, M. (2011). Arabidopsis HDA6 is required for freezing tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(3), 414-419. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.058>
- Toivonen, P. M. A. (2016). Postharvest physiology of vegetables. En *Postharvest Ripening Physiology of Crops* (pp. 90-121). CRC Press. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Postharvest+physiology+of+vegetables&author=Toivonen,+P.M.&publication\\_year=2010&pages=199%E2%80%933220](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Postharvest+physiology+of+vegetables&author=Toivonen,+P.M.&publication_year=2010&pages=199%E2%80%933220)
- Toivonen, P. M. A., & Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.004>
- Trulson, A. J., & Shahin, E. A. (1986). In vitro plant regeneration in the genus Cucumis. *Plant Science*, 47(1), 35-43. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90008-7)
- United Nations Population Division / Department of Economic and Social Affairs. (s. f.). Recuperado 9 de junio de 2020, de <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/factsheets/index.asp>
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. *The Plant Journal*, 57(6), 1065-1078. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03748.x>
- Urtubia, C., Devia, J., Castro, A., Zamora, P., Aguirre, C., Tapia, E., Barba, P., Dell Orto, P., Moynihan, M. R., Petri, C., Scorza, R., & Prieto, H. (2008). Agrobacterium-mediated genetic transformation of Prunus salicina. *Plant Cell Reports*, 27(8), 1333-1340. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0559-0>
- Valenzuela, J. L., Manzano, S., Palma, F., Carvajal, F., Garrido, D., & Jamilena, M. (2017). Oxidative Stress Associated with Chilling Injury in Immature Fruit: Postharvest Technological and Biotechnological Solutions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1467. <https://doi.org/10.3390/ijms18071467>
- Vallarino, J. G., Osorio, S., Bombarely, A., Casañal, A., Cruz-Rus, E., Sánchez-Sevilla, J. F., Amaya, I., Giavalisco, P., Fernie, A. R., Botella, M. A., & Valpuesta, V. (2015). Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *The New Phytologist*, 208(2), 482-496. <https://doi.org/10.1111/nph.13463>

- Vandelle, E., & Delledonne, M. (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science*, *181*(5), 534-539. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.002>
- Vanderauwera, S., Hoerberichts, F. A., & Van Breusegem, F. (2009). Hydrogen Peroxide-Responsive Genes in Stress Acclimation and Cell Death. En L. A. Rio & A. Puppo (Eds.), *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling* (pp. 149-164). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00390-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00390-5_9)
- Vasudevan, A., Selvaraj, N., Ganapathi, A., Choi, C. W., Manickavasagam, M., & Kasthuriengan, S. (2007). Direct plant regeneration from cucumber embryonal axis. *Biologia Plantarum*, *51*(3), 521-524. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0111-z>
- Vengadesan, G., Anand, R. P., Selvaraj, N., Perl-Treves, R., & Ganapathi, A. (2005). Transfer and expression of nptII and bar genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *41*(1), 17-21. <https://doi.org/10.1079/IVP2004602>
- Venzhik, Y., Talanova, V., & Titov, A. (2016). The effect of abscisic acid on cold tolerance and chloroplasts ultrastructure in wheat under optimal and cold stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(3), 63. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2082-1>
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>
- Walker, M. A., & Mckersie, B. D. (1993). Role of the Ascorbate-Glutathione Antioxidant System in Chilling Resistance of Tomato. *Journal of Plant Physiology*, *141*(2), 234-239. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80766-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80766-2)
- Wang, C. Y. (1995). Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, *5*(1), 67-76. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(94\)00020-S](https://doi.org/10.1016/0925-5214(94)00020-S)
- Wang, C. Y., & Ji, Z. L. (1989). Effect of low-oxygen storage on chilling injury and polyamines in Zucchini squash. *Scientia Horticulturae*, *39*(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90031-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90031-9)
- Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y., Liu, Y.-G., & Zhao, K. (2016). Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. *PLOS ONE*, *11*(4), e0154027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154027>

## Bibliografía

---

- Wang, H. (2011). Desarrollo de un protocolo de transformación genética de albaricoquero independientemente del genotipo. *Universidad de Murcia, CEBAS-CSIC*.
- Wang, J., Li, Q., Mao, X., Li, A., & Jing, R. (2016). Wheat Transcription Factor TaAREB3 Participates in Drought and Freezing Tolerances in Arabidopsis. *International Journal of Biological Sciences*, 12(2), 257-269. <https://doi.org/10.7150/ijbs.13538>
- Wang, Y., Luo, Z., & Du, R. (2015). Nitric oxide delays chlorophyll degradation and enhances antioxidant activity in banana fruits after cold storage. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(4). Scopus. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1821-z>
- Wang, Y., Luo, Z., Du, R., Liu, Y., Ying, T., & Mao, L. (2013). Effect of nitric oxide on antioxidative response and proline metabolism in banana during cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), 8880-8887. Scopus. <https://doi.org/10.1021/jf401447y>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Waterhouse, P. M., Wang, M.-B., & Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411(6839), 834-842. <https://doi.org/10.1038/35081168>
- Watson, J. M., Fusaro, A. F., Wang, M., & Waterhouse, P. M. (2005). RNA silencing platforms in plants. *FEBS Letters*, 579(26), 5982-5987. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.014>
- Whitaker, B. D. (1995). Lipid changes in mature-green bell pepper fruit during chilling at 2°C and after transfer to 20°C subsequent to chilling. *Physiologia Plantarum*, 93(4), 683-688. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb05117.x>
- Wills, R. B. H., Pristijono, P., & Golding, J. B. (2015). Nitric oxide and postharvest stress of fruits, vegetables and ornamentals. En *Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants* (pp. 221-238). Scopus. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-17804-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-17804-2_14)
- Winkelmann, T., Kaviani, K., & Serek, M. (2005). Development of a shoot regeneration protocol for genetic transformation in *Pelargonium zonale* and *Pelargonium*

- peltatum hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(1), 33-42. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-5788-5>
- Wu, B., Guo, Q., Li, Q., Ha, Y., Li, X., & Chen, W. (2014). Impact of postharvest nitric oxide treatment on antioxidant enzymes and related genes in banana fruit in response to chilling tolerance. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.017>
- Wu, F., Yang, H., Chang, Y., Cheng, J., Bai, S., & Yin, J. (2012). Effects of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant capacity in Chinese Bayberry during storage. *Scientia Horticulturae*, 135, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.011>
- Wu, H., Sparks, C., Amoah, B., & Jones, H. D. (2003). Factors influencing successful Agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*, 21(7), 659-668. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0564-7>
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., & Carrington, J. C. (2004). Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *PLOS Biology*, 2(5), e104. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020104>
- Xiong, J.-S., Ding, J., & Li, Y. (2015). Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding. *Horticulture Research*, 2(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.19>
- Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of Heat Treatment on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 330-335. <https://doi.org/10.1021/jf0625171>
- Xu, J., Hua, K., & Lang, Z. (2019). Genome editing for horticultural crop improvement. *Horticulture Research*, 6. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0196-5>
- Xu, M., Dong, J., Zhang, M., Xu, X., & Sun, L. (2012). Cold-induced endogenous nitric oxide generation plays a role in chilling tolerance of loquat fruit during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 65, 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.10.008>
- Xu, P.-L., Guo, Y.-K., Bai, J.-G., Shang, L., & Wang, X.-J. (2008). Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum*, 132(4), 467-478. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01036.x>

## Bibliografía

---

- Yang, H., Wu, F., & Cheng, J. (2011). Reduced chilling injury in cucumber by nitric oxide and the antioxidant response. *Food Chemistry*, *127*(3), 1237-1242. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.011>
- Yang, Huanjie, Mu, J., Chen, L., Feng, J., Hu, J., Li, L., Zhou, J.-M., & Zuo, J. (2015). S-Nitrosylation Positively Regulates Ascorbate Peroxidase Activity during Plant Stress Responses. *Plant Physiology*, *167*(4), 1604-1615. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255216>
- Yang, S., Cai, Y., Liu, X., Dong, M., Zhang, Y., Chen, S., Zhang, W., Li, Y., Tang, M., Zhai, X., Weng, Y., & Ren, H. (2018). A CsMYB6-CsTRY module regulates fruit trichome initiation in cucumber. *Journal of Experimental Botany*, *69*(8), 1887-1902. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery047>
- Yang, Z., Cao, S., Zheng, Y., & Jiang, Y. (2012). Combined Salicylic Acid and Ultrasound Treatments for Reducing the Chilling Injury on Peach Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(5), 1209-1212. <https://doi.org/10.1021/jf2041164>
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G., & Li-Jia, Q. (2006). The MYB Transcription Factor Superfamily of Arabidopsis: Expression Analysis and Phylogenetic Comparison with the Rice MYB Family. *Plant Molecular Biology*, *60*(1), 107-124. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2910-y>
- Yao, W., Xu, T., Farooq, S. U., Jin, P., & Zheng, Y. (2018). Glycine betaine treatment alleviates chilling injury in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by modulating antioxidant enzymes and membrane fatty acid metabolism. *Postharvest Biology and Technology*, *144*, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.05.007>
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X., & Tan, M. (2007). Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist*, *175*(1), 36-50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02071.x>
- Zhang, L., Zhao, G., Jia, J., Liu, X., & Kong, X. (2012). Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, *63*(1), 203-214. <https://doi.org/10.1093/jxb/err264>
- Zhang, Mei, Yuan, B., & Leng, P. (2009). The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, *60*(6), 1579-1588. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp026>

- Zhang, Min, Liu, W., Li, C., Shao, T., Jiang, X., Zhao, H., & Ai, W. (2019). Postharvest hot water dipping and hot water forced convection treatments alleviate chilling injury for zucchini fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 249, 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.058>
- Zhang, Qin, Liu, Y., He, C., & Zhu, S. (2015). Postharvest Exogenous Application of Abscisic Acid Reduces Internal Browning in Pineapple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), 5313-5320. <https://doi.org/10.1021/jf506279x>
- Zhang, Qitong, Zhang, L., Geng, B., Feng, J., & Zhu, S. (2019a). Interactive effects of abscisic acid and nitric oxide on chilling resistance and active oxygen metabolism in peach fruit during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(7), 3367-3380. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9554>
- Zhang, Qitong, Zhang, L., Geng, B., Feng, J., & Zhu, S. (2019b). Interactive effects of abscisic acid and nitric oxide on chilling resistance and active oxygen metabolism in peach fruit during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(7), 3367-3380. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9554>
- Zhang, T., Che, F., Zhang, H., Pan, Y., Xu, M., Ban, Q., Han, Y., & Rao, J. (2017). Effect of nitric oxide treatment on chilling injury, antioxidant enzymes and expression of the CmCBF1 and CmCBF3 genes in cold-stored Hami melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 127, 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.01.005>
- Zhang, Y., Zhou, J., Wu, T., & Cao, J. (2008). Shoot regeneration and the relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 323. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9380-2>
- Zhang, Z., Xu, J., Chen, Y., Wei, J., & Wu, B. (2019). Nitric oxide treatment maintains postharvest quality of table grapes by mitigation of oxidative damage. *Postharvest Biology and Technology*, 152, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.01.015>
- Zhang, Zhengke, Zhu, Q., Hu, M., Gao, Z., An, F., Li, M., & Jiang, Y. (2017). Low-temperature conditioning induces chilling tolerance in stored mango fruit. *Food Chemistry*, 219, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.123>
- Zhao, M. G., Chen, L., Zhang, L.-L., & Zhang, W.-H. (2009). Nitric Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved in Cold Acclimation and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151(2), 755-767. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140996>

## Bibliografía

---

- Zhao, R., Sheng, J., Lv, S., Zheng, Y., Zhang, J., Yu, M., & Shen, L. (2011). Nitric oxide participates in the regulation of LeCBF1 gene expression and improves cold tolerance in harvested tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 62(2), 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.05.013>
- Zhao, X., Wang, F., Chen, S., Lu, Z., Yang, Y., & Tigabu, M. (2020). *De novo transcriptome sequencing and gene expression profiling of Pinus sibirica under different cold stresses* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-24960/v1>
- Zheng, J., Liu, T., Zheng, Q., Li, J., Qian, Y., Li, J., & Zhan, Q. (2020). Identification of cold tolerance and analysis of genetic diversity for major wheat varieties in Jianghuai region of China. *Pakistan Journal of Botany*, 52(3). [https://doi.org/10.30848/PJB2020-3\(23\)](https://doi.org/10.30848/PJB2020-3(23))
- Zheng, Y., Fung, R. W. M., Wang, S. Y., & Wang, C. Y. (2008). Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to superatmospheric oxygen. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.016>
- Zhou, Y., Li, S., & Zeng, K. (2016). Exogenous nitric oxide-induced postharvest disease resistance in citrus fruit to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 505-512. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7117>
- Zhu, S., Liu, M., & Zhou, J. (2006). Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 42(1), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.05.004>
- Zhu, S., Sun, L., Liu, M., & Zhou, J. (2008). Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2324-2331. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3353>
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology*, 136(1), 2621-2632. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046367>
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23(1), 11-28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00808.x>