

Comportamiento postcosecha de tres mutantes insensibles a etileno en calabacín (*Cucurbita pepo* L.)

A. García¹, E. Aguado¹, Z. Megías¹, S. Manzano¹, C. Martínez¹, M.M. Reboloso², D. Garrido³, J. L. Valenzuela¹ & M. Jamilena¹.

¹Departamento de Biología y Geología; ²Departamento de Agronomía. Escuela Superior de Ingeniería. Campus de excelencia internacional en Agroalimentación (CeIA3), CEIMBITAL, Universidad de Almería, Almería, España.

³Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, España.

Resumen

El calabacín (*Cucurbita pepo* L.) es uno de los cultivos más importantes de la horticultura protegida de Almería. En la Universidad de Almería hemos desarrollado una plataforma de mutantes de *C. pepo* compuesta por más de 3800 familias M2. Tras realizar un screening de la colección para insensibilidad a etileno, hemos identificado tres familias mutantes insensibles a esta hormona (*ein1*, *ein2*, *ein3*). Puesto que la tolerancia al frío de calabacín está asociada con una disminución de la producción de etileno, y los tratamientos con 1-MCP disminuyen los daños por frío y la pérdida de peso de este fruto, hemos comparado el comportamiento postcosecha de los frutos de plantas WT y mutantes *ein1-3*. Las plantas se cultivaron bajo las mismas condiciones de invernadero, y los frutos en el mismo estadio de desarrollo se conservaron a 4 °C durante un total de 14 días. A los 0, 7 y 14 días de almacenamiento en frío se evaluaron los daños por frío, la pérdida de peso, así como la producción de etileno y la respiración. Las mutaciones *ein1* y *ein3* redujeron significativamente el índice de daños por frío de los frutos de calabacín, pero la mutación *ein2* los aumentó. La pérdida de peso de los frutos no se vió significativamente afectada en ninguna de los tres mutantes. Los frutos de los mutantes insensibles a etileno produjeron todos ellos más etileno inducido por frío, aunque la tasa de respiración fue similar a la mostrada por los frutos WT. Se discute el papel de los genes *EIN1*, *EIN2* y *EIN3* en la regulación de la producción de etileno y la calidad postcosecha de los frutos de calabacín.

Palabras clave: insensibilidad etileno, daños por frío, producción de etileno, tasa de respiración

Abstract

Zucchini (*Cucurbita pepo* L.) is one of the most important crops in protected horticulture of Almería. At the University of Almería we have developed a mutant platform of *C. pepo* composed of more than 3800 M2 mutant families. After screening the collection for ethylene insensitivity, we have identified three mutant families that were insensitive to this hormone (*ein1*, *ein2*, *ein3*). Since we have previously reported that cold tolerance in zucchini was associated with reduced ethylene production, and that treatments with 1-MCP decrease chilling injury and weight loss of this fruit, here we have compared the postharvest fruit quality from WT and mutant plants in each one of the ethylene insensitive families (*ein1-3*). Plants were grown under the same greenhouse conditions, and the WT and *ein* fruits at the same stage of development were stored at 4 °C for a total of 14 days. At 0, 7 and 14 days cold stored fruits were evaluated for chilling injury, weight loss, and ethylene production and respiration rate. The *ein1* and *ein3* mutations reduced chilling injury index in the fruit, but *ein2* mutation increased it. The fruit weight loss was not significantly affected in any of the three mutants. The fruits of ethylene insensitive mutants all produced more cold-induced ethylene, although the respiration rate was similar to that shown by the WT fruits. The role of *EIN1*, *EIN2* and *EIN3* genes in the regulation of ethylene production and postharvest fruit quality is discussed.

Keywords: ethylene insensitivity, chilling injury, ethylene production, and respiration rate.

Introducción

La mayor parte del calabacín que se produce en Almería y en España está destinado a la exportación. Es por tanto deseable que los frutos mantengan su calidad postcosecha durante su transporte y comercialización. El mantenimiento de la calidad del fruto dependerá de su manejo y de la tolerancia al frío que presente la variedad. La mayor parte de las variedades de calabacín son sensible a los daños por frío (DF) en los frutos, lo que se traduce en distintos síntomas en el fruto, tales como hundimientos y picado de la superficie del fruto, acompañados de pérdida de peso y ablandamiento (Serrano et al., 1998; Martínez-Téllez et al., 2002; Megías et al., 2014). Aunque el fruto de calabacín es no-climatérico, previamente hemos demostrado que la tolerancia al frío de algunas variedades está asociada con una disminución de la producción de etileno y en los metabolitos asociados al estrés oxidativo (Megías et al., 2014, 2015, 2016; Palma et al., 2016).

En la Universidad de Almería hemos desarrollado una colección de 3.800 familias mutantes de calabacín mediante tratamiento con etilmetanosulfonato (EMS) sobre la línea pura MUC16. Puesto que conocemos que el etileno regula negativamente la calidad postcosecha y los daños por frío de esta hortícola (Megías et al., 2014, 2015, 2016), la detección de mutantes alterados en la percepción de esta hormona podría suponer un avance para la mejora genética de caracteres relacionados con la calidad de fruto y la postcosecha de calabacín. Tras realizar un screening masivo de la colección de mutantes M2 mediante el test de triple respuesta a etileno se han identificado 3 familias que presentan insensibilidad a esta hormona: *ein1*, *ein2*, *ein3*. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar los efectos de estas mutaciones sobre la calidad postcosecha de los frutos de calabacín, incluyendo los daños por frío, la pérdida de peso y la producción de etileno inducido por frío.

Material y métodos

Material vegetal. Se realizó un screening masivo de la colección de mutantes M2 para detectar mutantes de calabacín insensibles a etileno. Para ello se utilizó el test de triple respuesta a etileno (García et al., 2015). De las 3800 familias testadas, se identificaron 3 familias (*ein1*, *ein2*, *ein3*) que no mostraban la típica respuesta al etileno en plántulas crecidas en oscuridad. Esta respuesta consiste en una reducción del tamaño y engrosamiento del hipocotilo, una reducción del tamaño de la raíz y una mayor curvatura del gancho apical. Estas familias fueron trasplantadas al invernadero y las plantas insensibles a etileno de cada una de las familias fueron retrocruzadas dos veces con MUC16. Siendo esta línea pura el fondo genético sobre el que se realizó la mutagénesis. Después de dos generaciones de retrocruzamiento (BC2), las plantas de cada familia se autopolinizaron para obtener las tres poblaciones segregantes para el fenotipo de insensibilidad a etileno que hemos estudiado. En estas poblaciones se separaron las plántulas sensibles (WT) e insensibles a etileno (*ein1*, *ein2* y *ein3*) mediante un test de triple respuesta, y plantas de fenotipo mutante y WT se cultivaron bajo las mismas condiciones de invernadero en Almería. Los frutos de plantas sensibles e insensibles a etileno de cada familia se cosecharon en el mismo estadio de desarrollo, y se conservaron a 4 °C en cámaras de refrigeración durante 14 días. De cada uno de los fenotipos se tomaron muestras de frutos a los 0, 7 y 14 días para estudiar su calidad postcosecha y su producción de CO₂ y etileno.

Producción de etileno y tasa respiratoria. La producción de etileno y el CO₂ fue determinada a 0, 7 y 14 días después del almacenamiento a 4 °C. Fueron analizados 12 frutos, cuatro réplicas de tres frutos para cada uno de los fenotipos bajo estudio (WT-*ein1*, WT-*ein2*, WT-*ein3*). Para medir la producción de etileno los frutos se guardaron en contenedores herméticos durante 6 horas. Después de la incubación la producción de etileno fue determinada mediante un cromatógrafo de gases Varian 3900 equipado con un detector de ionización de llama (FID). Una vez medida la producción de etileno, los botes que contenían los frutos se abrieron, se cambiaron los frutos de bote y se incubaron durante 30 min para medir la producción de CO₂ con un medidor de gases Check mate II headspace analyzers (Dansenor).

Daños por frío y pérdida de peso. Se calculó el porcentaje de pérdida de peso durante la conservación en frío a 7 y 14 días después de la cosecha utilizando un mínimo de 12 frutos por genotipo y tiempo de conservación. Para determinar los daños por frío medimos la superficie y la severidad de los daños en cada uno de los frutos después de 7 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Analizamos 12 frutos de cada fenotipo y tiempo de conservación. El porcentaje de la

superficie del fruto afectado por daños por frío fue usado para clasificar los frutos de acuerdo a la siguiente escala: 0 = no daño, 1 = 5% daño, 2 = 6–15% daño, 3 = 16–25% daño, 4 = 26–50% daño, 5 = > 50% daño. Por otra parte, para determinar la severidad de los síntomas de daños por frío la escala fue: 0 = no daño, 1 = daño muy superficial, 2 = superficial, 3 = daño moderado, 4 = daño severo, 5 = daño muy severo. El índice de daños por frío final fue calculado como la media de ambos parámetros.

Resultados y discusión

Comparación de la calidad postcosecha de los frutos WT y mutantes insensibles a etileno. El calabacín es muy sensible a la frigoconservación por lo que puede desarrollar fácilmente daños por frío cuando se conserva a bajas temperaturas, por encima del punto de congelación. Al ser un fruto que se cosecha inmaduro, aún es más propenso a desarrollar daños por frío, y mermas en su valor comercial (Carvajal et al., 2011). En estudios previos, se ha visto que la disminución en los síntomas de DF está asociada con una reducción significativa en la producción de etileno inducido por frío (Megías, 2014), y que los tratamientos con el inhibidor de etileno 1-MCP reduce los DF en los cultivares más sensibles a la frigoconservación (Megías et al., 2016). En esta cucurbitácea el etileno también regula la expresión sexual, de tal manera que una reducción en la biosíntesis o respuesta a etileno en los botones florales, convierte las flores femeninas en hermafroditas y las plantas monoicas en andromonoicas (Manzano et al., 2011). Las tres mutaciones de insensibilidad a etileno detectadas fueron capaces de modificar la expresión sexual de las plantas de calabacín, pues todas ellas fueron andromonoicas en comparación con las plantas WT sensibles a etileno, que eran monoicas (García et al., 2016). Los frutos de las plantas mutantes insensibles a etileno también presentaron el síndrome denominado flor pegada (Peñaranda et al., 2007). Sin embargo, los frutos de los mutantes insensibles a etileno no mostraron mayor tolerancia a frío que los frutos de las plantas WT. A los 7 días de conservación a 4 °C sólo se han visto significativamente reducidos los daños por frío en el mutante *ein1*, mientras que en los otros dos mutantes los daños fueron similares a los de los frutos WT. A los 14 días de frigoconservación hemos encontrado un aumento significativo de los daños por frío en el mutante *ein2* y una disminución en el mutante *ein3* (Fig. 1). Por lo que respecta a la pérdida de peso de los frutos, otro síntoma de daños por frío en calabacín (Megías, 2014, 2015), tampoco hemos detectado diferencias significativas entre frutos mutantes insensibles a etileno y frutos WT sensibles a etileno de ninguna de las tres familias estudiadas (datos no mostrados). Por tanto, las mutaciones *ein1* y *ein3* redujeron ligeramente los daños por frío en el fruto de calabacín. En el mutante *ein2* los frutos mostraron un nivel de síntomas parecidos a los frutos WT o incluso mayor porcentaje de síntomas por frío. Para los mutantes *ein1* y *ein3*, los resultados son similares a los reportados en *Arabidopsis thaliana* o *Medicago trunculata*, donde se ha observado que las plántulas de los mutantes de insensibilidad a etileno muestran mayor tolerancia al frío y a la congelación que las plántulas WT (Shi et al 2012; Zhao et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que no todos los mutantes insensibles a etileno son más tolerantes a frío, lo que podría estar asociado con la regulación de estos genes durante la postcosecha de los frutos. En este sentido, es posible que el gen *EIN2*, aunque parece regular la ruta de señalización de etileno en plántulas y flores, no controla la señalización de esta hormona en el fruto.

Comparación de la producción de etileno y la tasa respiratoria en frutos WT y mutantes insensibles a etileno. Si tras la conservación en frío, los frutos de calabacín se acondicionan durante unas horas a temperatura ambiente, la producción de etileno en el fruto se induce enormemente (Megías et al., 2014). Este etileno inducido por frío está asociado con una mayor sensibilidad de los frutos a sufrir daños por frío en calabacín (Megías et al., 2015, 2016). En los mutantes de etileno estudiados, la producción de etileno inducido por frío fue mayor en los frutos mutantes (*ein1*, *ein2* y *ein3*) que en sus respectivos frutos WT, aunque no significativa en el mutante *ein3* (Fig. 2). Estos resultados indican que la biosíntesis del etileno inducido por frío parece estar autorregulada por el propio etileno, y que la falta respuesta para esta hormona dispara la producción de etileno inducido por este estrés (Fig. 2). Dado que los mutantes estudiados parecen tener bloqueada la señalización de etileno, este etileno inducido por frío no parece estar asociado con la inducción de los daños por frío que solo se dispara también en los frutos del mutante *ein2*. Si esto es así, deben de existir otros genes de señalización en el fruto que suplan las

funciones de esta mutación en el gen *EIN2*, favoreciendo el desarrollo de daños por frío en aquellos frutos que producen mayor cantidad de etileno.

Por lo que respecta a la tasa de respiración sólo hemos encontrado una reducción de la producción de CO₂ en el mutante insensible a etileno de la familia *ein1*. En las otras dos familias, no se han encontrado diferencias significativas en la tasa de respiración de frutos mutantes y WT (datos no mostrados).

Conclusión

Los frutos de los mutantes *ein1* y *ein3* insensibles a etileno mostraron mayor tolerancia al frío respecto al control y fue dependiente del tiempo de conservación. El etileno inducido por frío aumentó en las tres mutaciones y no estuvo asociado con la insensibilidad al etileno.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2014-54598-C2-1-R, financiado por el ERDF (European Regional Development Fund) y por el Ministerio de Educación, Ciencia e Innovación, y el proyecto P12-AGR-1423 financiado por la Junta de Andalucía, España. A.G. y E.A. están contratadas gracias a los programas FPI y “garantía juvenil” del MINECO, España.

Referencias

- Carvajal, F., Martínez, C., Jamilena, M. & Garrido, D. 2011. Differential response of zucchini varieties to low storage temperature. *Scientia Horticulturae* 130:90-96.
- García, A., Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Gázquez, J.C. & Jamilena, M. 2015. Isolation and characterisation of ethylene insensitive mutants from a collection of *Cucurbita pepo* L. In: Gomez Guillamon M.L., Perez Alfocea F. (eds) Cucurbits 2015, Programme and Book of Abstracts. Cartagena. ISHS.
- García, A., Manzano, S., Aguado, E., Martínez, C., Megías, Z., Martínez, C., Garrido, D. & Jamilena, M. 2016. Isolation and characterization of three recessive andromonoecious mutants of *Cucurbita pepo*. *Cucurbitaceae 2016*. Warsaw, Poland 24-28 July.
- Manzano, S., Martínez, C., Megías, Z., Gómez, P., Garrido, D. & Jamilena, M. 2011. The role of ethylene and brassinosteroids in the control of sex expression and flower development in *Cucurbita pepo*. *Plant Growth Regulation* 65:213-221.
- Martínez-Téllez, M. A., Ramos-Clamont, M. G., Gardea, A. A., and Vargas-Arispuro, I. 2002. Effect of infiltrated polyamines on polygalacturonase activity and chilling injury responses in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Biochemistry and Biophysical Research Communication* 295:98-101.
- 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* 57:194-199.
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., Del Mar Reboloso-Fuentes, 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) e0133058.
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., Reboloso-Fuentes, M. del Mar, 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.
- Palma, F., Carvajal, F., Jamilena, M. & Garrido, D. 2016. Putrescine treatment increases the antioxidant response and carbohydrate content in zucchini fruit stored at low temperature. *Postharvest Biology and Technology* 118:68-70.
- Peñaranda, A., Payan, M. C., Garrido, D., Gómez, P., & Jamilena, M. 2007. Production of fruits with attached flowers in zucchini squash is correlated with the arrest of

maturation of female flowers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82(4):579-584.

Serrano, M., Pretel, M. T., Martínez-Madrid, M. C., Romojaro, F. & Riquelme, F. 1998. CO₂ treatment of zucchini squash reduces chilling-induced physiological changes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46:2465-2468.

Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H. & Yang, S. 2012. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24:2578-2595.

Zhao, M., Liu, W., Xia, X., Wang, T. & Zhang, W. H. 2014. Cold acclimation-induced freezing tolerance of *Medicago truncatula* seedlings is negatively regulated by ethylene. *Physiologia plantarum* 152(1):115-129.

Tablas y Figuras

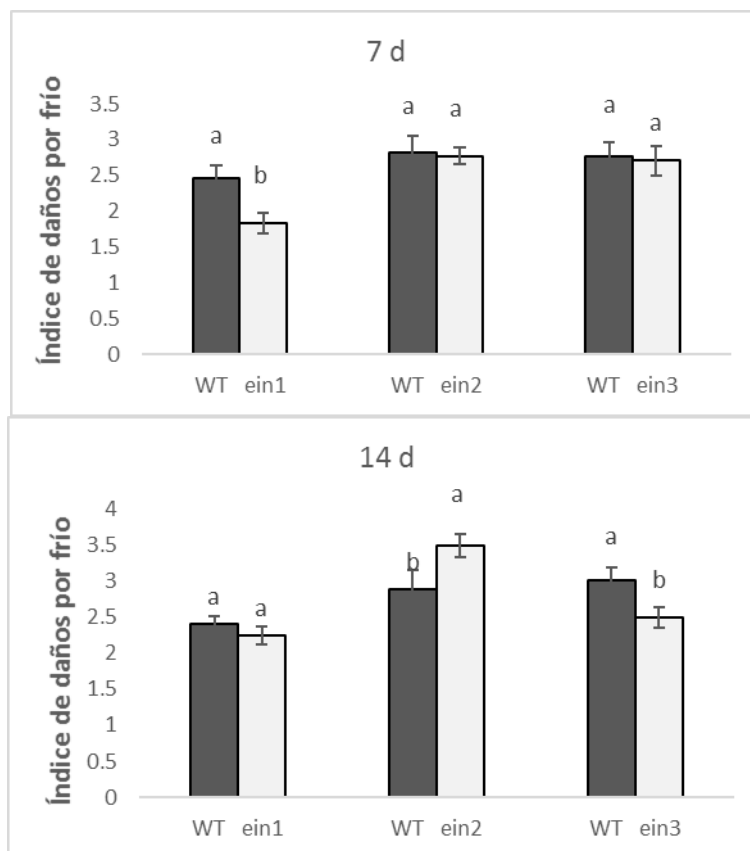


Figura 1. Índice de daños por frío en conservación a 4 °C (7 o 14 d) en frutos WT y mutantes de las familias *ein1*, *ein2* y *ein3*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre frutos WT y mutantes.

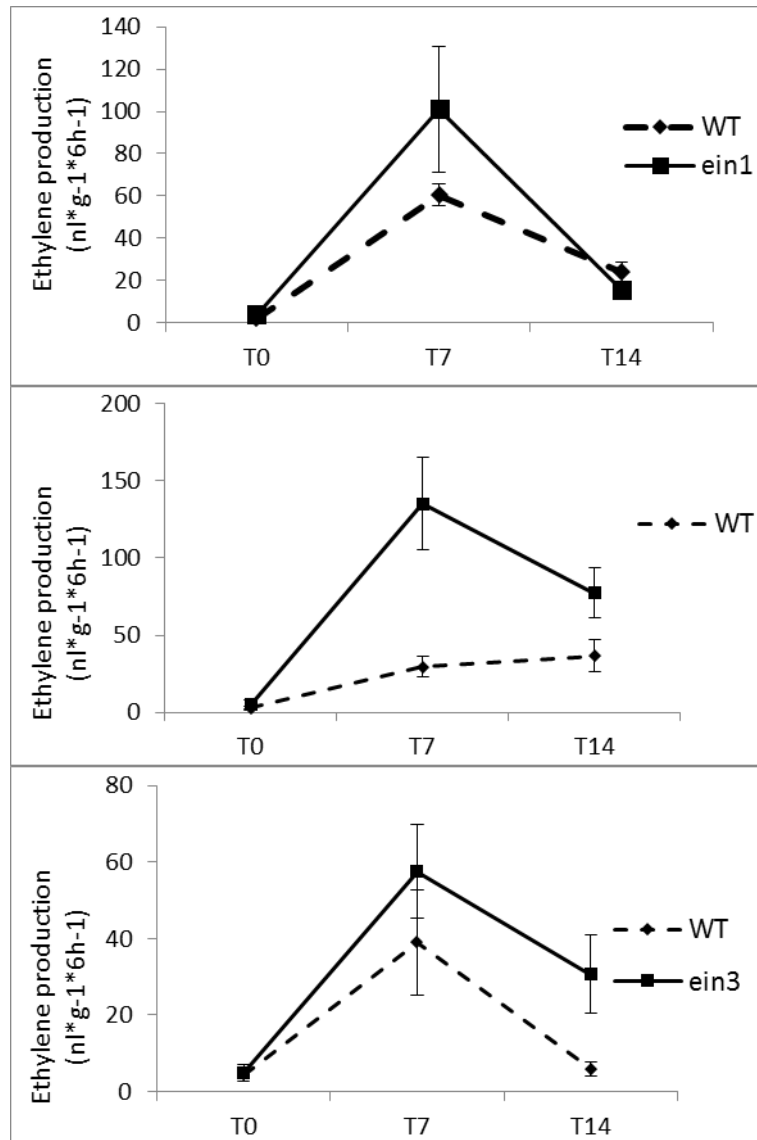


Figura 2. Evolución de la producción de etileno en frutos WT y mutantes insensibles a etileno *ein1*, *ein2* y *ein3*. Los frutos se conservaron durante 0, 7 y 14 días a 4 °C. Las barras de error representan la desviación estándar.