



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

Universitat Politècnica de València

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana

# **Análisis de la Expresión de Genes en Pimiento (*Capsicum annuum*) en respuesta a deficiencia de fósforo en raíz**

Trabajo Final de Máster

Neus Ortega Alberó

Tutores: Cat. Adrián Rodríguez Burruezo y Dra. Ana María Fita Fernández

Director experimental: Miguel Antonio Bracho Gil

Máster en Mejora Genética Vegetal

Promoción 2018-2020

València, 29 de Julio de 2020

# **Análisis de la expresión de genes en pimiento (*Capsicum annuum*) en respuesta a deficiencia de fósforo en raíz**

Neus Ortega Albero

València, 29 de Julio de 2020

Tutores: Cat. Adrián Rodríguez Burruezo y Dra. Ana María Fita Fernández

## **RESUMEN**

El pimiento (*Capsicum annuum*) es una de las hortalizas económicamente más importantes en todo el mundo, tanto para cultivo en fresco como para su procesado culinario e industrial. Este hecho implica que hay numerosas variedades que se encuentran cultivadas en múltiples tipos de suelo, y sería probable encontrar genotipos adaptados a suelos de baja calidad o pobres en nutrientes, entre los que se pueden destacar el nitrógeno, el potasio o el fósforo.

El fósforo es un macronutriente esencial para las plantas presente en el suelo, absorbido por las raíces mediante transportadores de fosfato (Pi), sin embargo, en muchas zonas es deficitario debido a su baja movilidad y la incapacidad de las plantas por absorberlo. Puede ser una causa de fisiopatías en diferentes especies afectando gravemente a la producción. Las plantas presentan mecanismos diversos de respuesta ante la baja concentración de los diferentes nutrientes para tratar de adaptarse a las condiciones y sobrevivir. Es interesante, por tanto, encontrar los genes que se expresan en respuesta a estas deficiencias. Concretamente en pimiento, conocer los genes sobreexpresados en raíz permitiría desarrollar líneas tolerantes a suelos con bajo fósforo disponible.

El presente trabajo es un estudio preliminar sobre la búsqueda de genes candidatos sobreexpresados en raíz como respuesta a la deficiencia de fósforo en pimiento, como precursor a una posible búsqueda de mecanismos de tolerancia en pimiento a la falta de fósforo en suelo. Para ello se realizó un cultivo de plantas juveniles de pimiento de los genotipos cv. *Adige* y cv. *Númex* en condiciones de alto y bajo fósforo durante varias semanas, se extrajo ARN de raíz, se retrotranscribió a ADNc y se cuantificó la expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Se buscaron *in silico* genes que actuaban en las rutas de señalización del fósforo en diversas especies de la familia de las solanáceas y que, potencialmente, podrían modificar su expresión en deficiencia de fósforo. Como resultado se sintetizaron cebadores para 35 genes candidatos de los cuales fueron validados 17. Los resultados del trabajo no mostraron sobreexpresión de los genes candidatos seleccionados en relación al gen constitutivo de raíz *Beta tubulin* ( $\beta$ -TUB) en ninguna de las condiciones ensayadas. Sugerimos un cambio de diseño experimental en los tratamientos y en el tiempo de toma de muestra para maximizar la expresión de los genes y detectar más fácilmente cambios en su expresión.

## **PALABRAS CLAVE**

*Capsicum annuum*; ARN; expresión de genes; PCR cuantitativa; tolerancia a bajos insumos; déficit nutricional

# **Analysis of gene expression in pepper (*Capsicum annuum*) in response to root phosphorus deficiency**

Neus Ortega Albero

València, July 29<sup>th</sup> 2020

Tutors: Cat. Adrián Rodríguez Burruezo y Dra. Ana María Fita Fernández

## **ABSTRACT**

Pepper (*Capsicum annuum*) is one of the most economically important species cultivated worldwide for its consumption either for the fresh market, for cooking or for industrial processing. This fact implies that there are a lot of varieties that are grown in multiple types of soil, and it would be likely to find them in low quality soils or poor of nutrients, mainly nitrogen, potassium or phosphorus.

Phosphorus is an essential macronutrient for plants present in soils, absorbed by roots through phosphate (Pi) transporters, nevertheless, in some areas, is deficient due to its low mobility and the plant incapacity to absorb it. It might be cause of physiopathies in different species affecting yield dramatically. Plants present different mechanisms of response to low concentration of different nutrients. It's interesting, though, identify genes that might be expressed at different levels in response to these deficiencies. In pepper specifically, knowing the genes that are over-expressed in root might be a tool to develop new lines tolerant to soils with little phosphorus available.

The present work is a preliminary study on the search for root-overexpressed candidate genes in response to phosphorus deficiency in peppers, as a precursor work to a possible search for mechanisms of tolerance in pepper to the lack of phosphorus in soil. In order to do this, young pepper plants of the genotypes cv. Adige and cv. Numex were grown under high and low phosphorous conditions for several weeks. RNA was extracted from the root, backtranscribed to cDNA and expression of some candidate genes was quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Genes that act on phosphorus signaling pathways in various species of the *Solanaceae* family and could potentially modify their expression in phosphorus deficiency were searched *in silico*. As a result, primers were synthesized for 35 candidate genes from which 17 were validated. The results of the work showed no overexpression of the selected candidate genes in relation to the constitutive root Beta tubulin ( $\beta$ -TUB) gene under any of the conditions tested. We suggest a change in experimental design in treatments and sampling time to maximize gene expression and more easily detect changes in their expression.

## **KEY WORDS**

*Capsicum annuum*; RNA; gene expression; quantitative PCR; low input tolerance; nutritional deficit

## **ABREVIATURAS**

E = Factor de Eficiencia

N = Nitrógeno

P = Fósforo

PAP = Fosfatasas ácidas o *Purple Acid Phosphatases*

PF = Peso fresco

Pi= Grupo fosfato

PS = Peso seco

PSI =Fosfohidrolasa inducible

PUE = Eficiencia en el uso del fósforo

## **AGRADECIMIENTOS**

A los doctores Ana M<sup>a</sup> Fita Fernández y Adrián Rodríguez Burruezo por acompañarme en mis inicios en el mundo investigador y al futuro doctor Miguel Antonio Bracho Gil, por todas las horas compartidas en el laboratorio.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente con el proyecto INIA RTA2013-00022-C02-02 y fondos FEDER.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL PIMIENTO .....	1
1.2 TAXONOMÍA, RECURSOS GENÉTICOS, ORIGEN Y DOMESTICACIÓN.....	1
1.3 PECULIARIDADES DEL GENOMA .....	2
1.4 ESTRÉS ABIÓTICO Y DEFICIENCIA DE P.....	3
1.4.1 <i>Metabolismo de P y genes relacionados</i> .....	4
1.5 RT-QPCR Y EXPRESIÓN GÉNICA.....	8
1.5.1 <i>Genes de referencia</i> .....	9
1.5.2 <i>Análisis de expresión</i> .....	9
1.5.3 <i>Análisis de expresión diferencial en déficit de P</i> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
3.1 CULTIVO DE <i>CAPSICUM</i> .....	11
3.1.1 <i>Material vegetal</i> .....	11
3.1.2 <i>Diseño experimental</i> .....	11
3.2 CÁLCULO DEL CONTENIDO DE P Y PARÁMETROS DE EFICIENCIA .....	13
3.3 BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA GENES DE RESPUESTA A DEFICIENCIA DE P.....	13
3.4 DISEÑO DE CEBADORES .....	14
3.5 QPCR .....	15
3.5.1 <i>Extracción de ARN</i> .....	15
3.5.2 <i>Limpieza ARN y cuantificación</i> .....	15
3.5.3 <i>Síntesis de ADNc</i> .....	15
3.5.4 <i>Optimización protocolo qPCR</i> .....	16
3.5.5 <i>Cálculos expresión</i> .....	16
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
4.1 DATOS BIOMÉTRICOS DEL CULTIVO DE <i>CAPSICUM</i> .....	17
4.2 CONTENIDO EN P Y PARÁMETROS DE EFICIENCIA.....	19
4.3 GENES CANDIDATOS .....	19
4.4 IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES GENES HOMÓLOGOS .....	20
4.5 VALIDACIÓN DE CEBADORES .....	21
4.6 OPTIMIZACIÓN DE LA QPCR .....	23
4.6.1 <i>Optimización del control interno</i> .....	23
4.6.2 <i>Optimización para los genes seleccionados</i> .....	25
4.7 EXPRESIÓN GÉNICA.....	27
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>31</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PLANTAS INJERTADAS DE PIMIENTO CRECIENDO EN CONDICIONES HIDROPÓNICAS CON SOLUCIONES CON P Y SIN P. ....	12
FIGURA 2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DEL ARN EXTRAÍDO DE RAÍCES DE PIMIENTO Y LIMPIADO DE GENÓMICO MEDIANTE DANAGENE PLANT RNA KIT. ....	15
FIGURA 3. GRAMOS DE BIOMASA TOTAL (A), PESO FRESCO (PF) (B) Y PESO SECO (PS) (C) EN HOJA, TALLO Y RAÍZ EN PLANTAS CULTIVADAS DE LOS GENOTIPOS ADIGE/ADIGE (IZQUIERDA) Y ADIGE/NUMEX (DERECHA) SOMETIDAS A CONDICIONES DE ALTO Y BAJO FÓSFORO (1.5 Y 0.5 MM). ....	18
FIGURA 4. PORCENTAJE (%) DE CONTENIDO DE FÓSFORO (P) EN HOJAS, RAÍZ Y PROMEDIO EN PLANTAS CULTIVADAS DE LOS GENOTIPOS ADIGE/ADIGE (IZQUIERDA) Y ADIGE/NUMEX (DERECHA) SOMETIDAS A CULTIVO DE 1.5 Y 0.5 MM DE PI. LOS ASTERISCOS MARCAN LOS CASOS EN QUE HAY UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN EL CONTENIDO DE P ENTRE TRATAMIENTOS. ....	19
FIGURA 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR PCR EN GRADIENTE DE TEMPERATURA (DE 52 A 60° EN INTERVALOS DE 0'5 EN CADA POCILLO) PARA LOS CEBADORES DE LOS GENES (A) NAC-ERD1, (B) MYB108 Y (C) SQD2. 23	
FIGURA 6. CURVAS DE QPCR DEL GEN GADPH A CONCENTRACIONES DE CEBADOR (A) 100NM, (B) 150NM Y (C) 200NM EN UNA MUESTRA DEL GENOTIPO ADIGE/ADIGE EN CONDICIONES DE BAJO FÓSFORO. ....	24
FIGURA 7. CURVAS DE QPCR DEL GEN $\alpha$ -TUB A CONCENTRACIONES DE CEBADOR (A) 100NM Y (B) 200NM EN UNA MUESTRA DEL GENOTIPO ADIGE/ADIGE EN CONDICIONES DE BAJO FÓSFORO. ....	24
FIGURA 8. CURVA ESTÁNDAR DE LA QPCR DEL GEN PHO1 UNA MUESTRA DEL GENOTIPO ADIGE/ADIGE EN CONDICIONES DE BAJO FÓSFORO. ....	25
FIGURA 9. CURVA ESTÁNDAR DE LA QPCR DEL GEN LPR1 UNA MUESTRA DEL GENOTIPO ADIGE/ADIGE EN CONDICIONES DE BAJO FÓSFORO. ....	26
FIGURA 10. CURVA ESTÁNDAR DE LA QPCR DEL GEN PHR1 UNA MUESTRA DEL GENOTIPO ADIGE/ADIGE EN CONDICIONES DE BAJO FÓSFORO. ....	26
FIGURA 11. CURVA ESTÁNDAR DE LA QPCR DEL GEN PAP17 UNA MUESTRA DEL GENOTIPO ADIGE/ADIGE EN CONDICIONES DE BAJO FÓSFORO. ....	26
FIGURA 12. GRÁFICO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS GENES PHO1 (A) Y LPR1 (B) EN LOS GENOTIPOS ADIGE/ADIGE Y ADIGE/NUMEX EN CONDICIONES DE CULTIVO DE 1.5MM Y 0.5MM DE FÓSFORO EN EL MEDIO. ....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. SOLUCIÓN NUTRITIVA DE CULTIVO HIDROPÓNICO EN CONDICIONES DE 1.5 MM Y 0.5 MM DE ION PI.....	12
TABLA 2. GENES CANDIDATOS, LOCUS EN EL GENOMA DE CAPSICUM ANNUUM, DESCRIPCIÓN Y ACTIVIDAD A NIVEL CELULAR.....	20
TABLA 3. PAREJAS DE CEBADORES (DIRECTO Y REVERSO) MÁS EFICIENTE DISEÑADO PARA CADA GEN CANDIDATO Y TAMAÑO DEL AMPLICÓN EN PARES DE BASES. ....	21
TABLA 4. PAREJAS DE CEBADORES (DIRECTO Y REVERSO) Y SU TAMAÑO EN PARES DE BASES PARA CADA GEN CANDIDATO QUE AMPLIFICABA UN FRAGMENTO ÚNICO EN EL GENOMA. ....	23
TABLA 5. GENES CANDIDATOS SELECCIONADOS, LOCUS EN EL GENOMA DE CAPSICUM ANNUUM, DESCRIPCIÓN Y ACTIVIDAD A NIVEL CELULAR.....	25
TABLA 6. VALORES MEDIOS DE EXPRESIÓN DEL GEN PHO1 SIENDO P1, P2 Y P3 LA MEDIA DEL VALOR DE EXPRESIÓN DE 3 RÉPLICAS TÉCNICAS PARA CADA RÉPLICA BIOLÓGICA. ....	27
TABLA 7. VALORES MEDIOS DE EXPRESIÓN DEL GEN LPR1 SIENDO P1, P2 Y P3 LA MEDIA DEL VALOR DE EXPRESIÓN DE 3 RÉPLICAS TÉCNICAS PARA CADA RÉPLICA BIOLÓGICA. ....	27

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia económica del pimiento

El cultivo de pimiento, chiles y ajíes (*Capsicum annuum*) es uno de los cultivos de hortalizas más extendido en todo el mundo, con una producción anual de 36'7 millones de toneladas en casi 2 millones de hectáreas solo para consumo en fresco, destacando China como el principal productor mundial con más de 17 millones de toneladas (FAO, 2018).

En España ha crecido significativamente la producción de pimiento para consumo en fresco durante la última década hasta llegar a 1'275 millones de toneladas de producción anual en más de 20.500 hectáreas convirtiéndose así en el principal productor de la Unión Europea (FAO, 2018). Las exportaciones españolas para la Unión Europea alcanzan niveles de 400.000 toneladas, con distintas preferencias dependiendo del mercado al que van dirigido, pimientos rectangulares largos o tipo California para mercado de Francia, Suiza, o Suecia, amarillo o verde para mercado de Alemania y Portugal y en mallas tricolor para el centro y norte de Europa (Gobierno de España, 2020).

En el cultivo nacional destacan numerosas variedades tradicionales entre las cuales se pueden encontrar variedades con Denominación de Origen Protegida (D.O.P) como el pimiento de Herbón o el pimiento del piquillo de Lodosa y variedades con Indicación Geográfica Protegida (I.G.P) como el pimiento riojano, el pimiento de Fresno-Benavente o el 'pemento da Arnoia'. La principal comunidad productora es Andalucía con casi 750.000 toneladas de producción seguida a gran distancia por Murcia, con menos de 200.000 toneladas (Gobierno de España, 2020).

## 1.2 Taxonomía, recursos genéticos, origen y domesticación

El género *Capsicum* pertenece a la familia *Solanaceae* (orden Solanales), subfamilia *Solainoideae*, que comprende las tribus *Capsiceae*, *Datureae*, *Hyoscyameae*, *Jaboroseae*, *Lycieae*, *Mandragoreae*, *Nicandreae*, *Nolaneae*, *Physaleae*, *Solandrae* y *Solaneae*. El género *Capsicum* se engloba en la tribu *Capsiceae*, que solo incluye el género *Capsicum* y el género *Lycianthes*. *Capsicum* estaría formado por 27 especies, 5 domesticadas y 22 silvestres que, actualmente, se encuentran cultivadas en zonas de clima tropical y templado (Pickersgill, 1991).

La taxonomía de este género se estableció usando taxonomía numérica, estudios de fertilidad interespecífica e intergénica, y estudios citogenéticos, bioquímicos, geográficos y etnobotánicos. Su identificación y clasificación filogenética ha sido muy compleja debido a su diversidad morfológica y sus relaciones de cruzabilidad que, además, se ve muy afectada por factores agroclimáticos (Pickersgill, 1971; 1991) Sin embargo, las nuevas herramientas genómicas como *Genotyping by sequencing* (GBS) han corroborado las hipótesis anteriores respecto a la filogenia del género. Las 5 especies cultivadas serían *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* Ruiz et Pav. que tendrían un mismo ancestro común, pero sufrieron procesos de diversificación dependiendo de su zona de cultivo (Pereira-Dias et al., 2019).

Las especies del género *Capsicum* pueden agruparse en 3 complejos genéticos según la capacidad de cruce con la especie principal que da nombre al complejo y los análisis genéticos realizados mediante marcadores isozimas y marcadores moleculares, entre ellos *Single Nucleotide Polymorfism* (SNP), *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Restriction Fragment Length Polymorfism*

(RFLP), *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) y *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence* (CAPS). El complejo primario o complejo *C. annuum* estaría formado por las especies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chacoense*, *C. galapagoense* y *C. chinense* (las llamadas especies de flor blanca), y estarían relacionadas con el ancestro silvestre del pimiento *C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Hiser et Pickersgill. El segundo complejo genético o complejo de *C. baccatum* estaría formado por *C. baccatum*, su ancestro silvestre *C. baccatum* var. *baccatum* Esbaugh y las especies silvestres *C. praetermissum* y *C. tovarii*. Por último, la especie cultivada *C. pubescens* y las especies silvestres *C. eximium* Hunz. y *C. cardenasii* Heiser et. Smith conformarían el tercer complejo genético o complejo de *C. pubescens* (Eshbaugh, 1993; Ibiza et al., 2012; Ince, Karaca, y Onus, 2010; Loaiza-Figueroa et al., 1989; Martins et al., 2015; Pickersgill, 1971; Prince et al., 1995; Prince, Loaiza-Figueroa, y Tanksley, 1992; Prince, Pochard, y Tanksley, 1993; Rodriguez et al., 1999; Toquica et al., 2003; Walsh y Hoot, 2012).

En cuanto al pimiento para consumo en fresco, su domesticación tuvo lugar en Sudamérica desde donde migró a Europa en el año 1493 con el primer trayecto de Cristóbal Colón, aunque fueron ocurriendo numerosos progresos de migración y deriva a Europa y África en los siglos XVI y XVII y a Asia en los siglos XVII y XVIII. De esta forma, se ha diversificado masivamente el género *Capsicum*, apareciendo nuevas variedades tradicionales adaptadas a zonas edafoclimáticas muy variadas y que presentan una elevada diversidad fenotípica. Sin embargo, según los análisis genéticos más recientes, esta diversidad no va acompañada de una elevada diversidad genética, como sucede con otros géneros de la familia de las solanáceas, siendo más compleja la búsqueda de variación y la mejora genética del cultivo (Andrews, 1984; Bosland y Votava, 2000; Nuez Viñales, Costa García, y Gil Ortega, 1996; Somos, 1984).

### 1.3 Peculiaridades del genoma

La familia *Solanaceae* es la familia de especies cultivadas que genera más beneficios económicos, solo por detrás de gramíneas y cereales. Ha sido sujeta a un intenso proceso de selección, que ha permitido estudiar los síndromes de domesticación en las más de 3000 especies cultivadas que la forman (Moore et al., 2005; Mueller et al., 2005). La filogenia de estas especies se construyó mediante el uso de marcadores moleculares del gen *ndhF* cloroplasto (Bohs y Olmstead, 1997), y el gen nuclear *SAMT* (Martins y Barkman, 2005) y, según estos estudios, el género *Capsicum* es el que se encontraría más lejano genética de la familia después de *Nicotiana*, es decir, fue uno de los primeros cultivos en domesticarse (Wu y Tanksley, 2010). Los avances en nuevas tecnologías genómicas y de secuenciación en las últimas décadas han permitido conocer más detalladamente características genéticas de la familia de las solanáceas. En el trabajo de Wu y Tanksley (2010), se realizaron estudios cromosómicos comparativos mediante marcadores ortólogos conservados de copia única (COSII), indicando que el género *Capsicum* podría haberse domesticado coetáneamente a la berenjena (*Solanum melongena*), más tarde de lo anteriormente propuesto. El descubrimiento de regiones reguladoras MITE (*Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements*) en el genoma asociadas a genes activos transcripcionalmente, han permitido conocer un nuevo mecanismo evolutivo en la familia *Solanaceae* basado en la inserción y silenciamiento (Kuang et al., 2009). Estos nuevos conocimientos genéticos son la base para encontrar los métodos que han desarrollado las plantas para adaptarse y tolerar estreses, de forma que se han abierto nuevas vías de mejora genéticas en especies cultivadas de importancia económica (Sharma et al., 2017).

El genoma del pimiento ( $2n=2x=24$ ) es el más grande de la familia de las solanáceas (3.5Gb) con una cantidad de información genética repetitiva estimada entre el 75 y el 80%, característica que ha dificultado la construcción de mapas genéticos y físicos. Se han desarrollado tres borradores del genoma ensamblados utilizando tecnologías de secuenciación de lectura corta para los que se han usado tres líneas diferentes: CM334, Zunla-1 y Chiltepin conformados por *scaffolds* de pequeño tamaño siendo CM334 el de mayor calidad, con una N50 de 2.47Mb (Kim et al., 2015). En cuanto a transcriptomas anotados de pimiento se ha utilizado la tecnología de secuenciación 454 para anotar el transcriptoma de las líneas parentales CM334 y Taean y su híbrido TF68 (Lu et al., 2011; 2012). Otro transcriptoma ensamblado es el transcriptoma DB, creado con las variedades Sonora, Anaheim y Serrano Tampiqueño usando las tecnologías Sanger y 454 (Góngora-Castillo et al., 2012). Estos transcriptomas han facilitado la anotación y ensamblaje de los genomas actuales, sin embargo, el bajo nivel de variabilidad genética en el pool genético de *Capsicum annuum* debido, en gran parte, a su modo de reproducción autógamo y las limitaciones en cuanto a la cruzabilidad, es uno de los motivos que ha dificultado la anotación de un genoma de referencia. Aún no se ha conseguido un mapa genético de pimiento saturado de marcadores, no obstante, los trabajos realizados durante todo el siglo XX han permitido situar en el mapa un gran número de marcadores RAPD, RFLP, AFLP, SSR y SNP (Moscone et al., 2003).

## 1.4 Estrés abiótico y deficiencia de P

La nutrición mineral constituye un punto clave en el manejo agronómico de los cultivos. Entre los macronutrientes esenciales que pueden presentar limitaciones y requerir fertilización se encuentran el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K). La planta necesita mantener estos nutrientes minerales en homeostasis para asegurar que todas sus funciones esenciales se lleven a cabo correctamente (Kochian, 2000).

El fósforo (P) existe en el suelo como fosfato (Pi) inorgánico insoluble acompañado con otros compuestos o como fosfato orgánico, pero su absorción es mucho menor que otros macronutrientes esenciales debido a su baja solubilidad en el suelo y la gran adsorción en el terreno. Entre el 30 y el 40% de toda la tierra cultivable del mundo se encuentra limitada por su deficiencia de P (Raghothama, 1999; Tadano y Sakai, 1991). Es el factor más limitante, junto con el N para la producción primaria de los cultivos, pero, a diferencia que el N, no se renueva tan fácilmente. Su deficiencia junto con la toxicidad de metales en el suelo limita el 70% de la producción global siendo habitual encontrar ambas condiciones juntas (López-Arredondo et al., 2014; Porder y Ramachandran, 2013). En suelos con elevada adsorción de P, tanto suelos ácidos como calcáreos, es habitual que haya poco P disponible para las plantas, haciendo necesaria la aplicación de fertilizantes ricos en Pi inorgánico, que no solo aumenta el coste de la producción, sino que implica la utilización de recursos no sostenibles cuyas reservas se están agotando favoreciendo un aumento del precio. Además, las plantas solo son capaces de absorber entre un 15 y un 40% del P procedente de fertilización (Haneklaus y Schnug, 2016).

En cultivos intensivos, con gran impacto en los ecosistemas, se ha estudiado una elevada erosión del suelo, debido en gran medida al exceso de fertilizantes solubles que, a su vez, puede llevar a la eutrofización y la hipoxia de las aguas subterráneas. Todo esto puede verse exacerbado por la creciente demanda de la población en cantidad y calidad de alimentos. En este sentido, se está haciendo patente la necesidad de utilizar cultivos con un uso eficiente de los nutrientes como es el P (PUE) (Ma, Zhang, y Zhang, 2005; Vance, Uhde-Stone, y Allan, 2003). Ya han sido estudiados cultivos importantes a nivel económico como la soja, el maíz, el trigo, algunas especies

de brásicas, leguminosas y otras solanáceas como el tomate. El uso de variedades adaptadas permitiría una reducción significativa en el uso de fertilizantes químicos, favoreciendo un cultivo más sostenible. En el caso de *Capsicum annum* L., es una especie diversa, presente en ambientes muy diferentes en todo el mundo, por tanto, es común encontrar variedades adaptadas a diversas condiciones de estrés abiótico. El Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana presenta en su banco de germoplasma un gran número de entradas de pimiento que podrían ser seleccionadas tras una caracterización exhaustiva para encontrar aquellas variedades más resilientes a cultivo en unas condiciones desfavorables determinadas (Pereira-Dias et al., 2020).

Las plantas han desarrollado mecanismos evolutivos para aumentar su supervivencia en condiciones de estrés abiótico, por ejemplo, la carencia de un nutriente esencial como el P, aumentando su ratio de absorción (Vance et al., 2003). Entre estos mecanismos se encuentran cambios morfológicos como modificar la arquitectura radicular y aumentar el número de pelos radiculares para aumentar la superficie de absorción; cambios fisiológicos como reducir el crecimiento, aumentar la expresión y actividad de los transportadores de P, aumentar la removilización de Pi nivel celular; y cambios metabólicos, reduciendo el metabolismo de compuestos en las etapas donde interviene el P (Fita, Nuez, y Picó, 2011; Raghothama, 1999). Cuando las plantas crecen en deficiencia de fósforo, las raíces producen y exudan ácidos orgánicos y fosfatasa como fosfatasa ácida (APasa) y de la familia PAP y ARNasas para degradar compuestos orgánicos presentes en el suelo y poder captar el fosfato inorgánico (Pi) y otros fosfatos insolubles (Raghothama, 1999; Tadano y Sakai, 1991). Para la nutrición de la planta el proceso y regulación de absorción de P a través de las raíces es clave, por ello, han sido muchos los genes estudiados de la ruta metabólica del fósforo en las especies modelo como *Arabidopsis thaliana* y otras de la familia de las solanáceas como el tomate, la patata, o melón.

Ante una situación de estrés nutricional para la planta, se ven afectados genes de muchas rutas metabólicas, no solo los directamente relacionados con el metabolismo de P, sino que el metabolismo de los nutrientes esenciales, su absorción y regulación está muy relacionado entre sí, y es posible encontrar expresión alterada de genes de las rutas de N, hierro (Fe), carbono (C) y zinc (Zn) en respuesta a deficiencia de P (Li y Lan, 2015). Hay genes modificados a corto, medio y largo plazo determinando la respuesta inmediata de la planta y su adaptación, respectivamente. También es habitual encontrar genes relacionados con la señalización, movilización, absorción y transporte del P (Wasaki et al., 2003).

### **1.4.1 Metabolismo de P y genes relacionados**

Existen numerosos estudios realizados en plantas frente a deficiencia de macro y micronutrientes, y la variación que se produce en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, no obstante, aun no se conoce en profundidad la variación en la respuesta génica. Concretamente, no es muy conocida la respuesta en raíces, principal vía de entrada de nutrientes a la planta, que podría indicar los mecanismos adaptación de diferentes especies ante la carencia de nutrientes. Cada especie necesita realizar un estudio propio, ya que los principales mecanismos de respuesta son distintos dependiendo de la familia y género al que pertenecen. Si bien es cierto que existen ortólogos y genes conservados de especies modelo, más de un tercio de los genes que pueden activarse son únicos y exclusivos de cada especie (Calderon-Vazquez et al., 2008).

El fósforo, en forma de ion fosfato (Pi), es un compuesto estructural presente en ácidos nucleicos, fosfolípidos y adenosín-trifosfato (ATP). La falta de P puede tener grandes impactos en los cultivos tanto a nivel agronómico como económico ya que actúa en las principales rutas metabólicas de azúcares, lípidos y proteínas, en la fotosíntesis y el metabolismo oxidativo como sustrato y como regulador, y participando en rutas de transducción de señales mediante la fosforilación y desfosforilación de proteínas señalizadoras (Fita et al., 2012; Misson et al., 2005; Raghothama, 1999; Vance et al., 2003). Las alteraciones debidas a la privación de P se pueden observar a nivel fenotípico, fisiológico y bioquímico. Por ejemplo, es habitual en *Arabidopsis thaliana* observar acumulación de antocianinas en hojas en respuesta a deficiencia prolongada de Pi así como una reducción del crecimiento de raíces primarias, inhibiendo crecimiento del meristemo apical de raíz (*Root Apical Meristem* o RAM). A nivel bioquímico, se reduce el K en hojas y aumentan las concentraciones de azufre (S) y otros micronutrientes como Fe y Zn. Toda la ruta metabólica de nutrientes puede verse afectada por la privación de P, debido a su importancia en procesos energéticos (Misson et al., 2005).

La tolerancia a estrés nutricional está determinada por una genética compleja, que incluye muchos mecanismos diversos (Hammond et al., 2003). Los nuevos estudios con microarrays, en *Arabidopsis thaliana* han permitido describir más de 8000 genes con expresión diferencial después de intervalos desiguales de tiempo sin aplicación de P. También son muchos los genes descritos en especies como maíz, patata, arroz, judía, trigo o tomate (Hammond et al., 2003; Raghothama, 1999; Schachtman, Reid, y Ayling, 1998). La expresión diferencial de genes en este contexto se explica por la necesidad de la planta sésil de adaptarse a su entorno, modificando las rutas metabólicas y energéticas para reducir el requerimiento de Pi y facilitar su absorción. Así, la inducción de ciertos genes de estrés estaría determinada por una comunicación con el ápice de la raíz (Wang, Garvin, y Kochian, 2002).

Es habitual que la expresión diferencial de genes sea mayor a medio plazo que a corto o largo plazo lo que estaría relacionado con una reducción de Pi soluble durante el corto y medio plazo activando los genes localizados en raíces (Calderon-Vazquez et al., 2008). Hay respuestas muy rápidas a la falta de un nutriente esencial, incluso menores a una hora desde el inicio del tratamiento, y si bien no se conoce el mecanismo de detección de la falta de P, es similar en privación de diversos nutrientes (N, Fe, S), indicando que hay una comunicación en las rutas de señalización y respuesta a todos los nutrientes esenciales. De hecho, hay un total de 579 genes actuando en las rutas del P y del Fe simultáneamente (Li y Lan, 2015).

El P se absorbe en forma inorgánica como iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , presentes en muy baja concentración en el suelo (2  $\mu\text{M}$ ). El Pi debe absorberse en contra de su gradiente de concentración que puede ser de hasta 40 mM dentro de la planta, por tanto, el sistema de transporte es uno de los puntos más importantes para el metabolismo de P. Los transportadores de la familia PHT (*PHOSPHATE TRANSPORTER*) descritos en *Arabidopsis* son los más expresados en tejidos de raíz y pueden agruparse en 4 familias filogenéticas (PHT1 a PHT4) (Sun et al., 2016). PHT1 es la que más miembros tiene y se encuentra en membranas celulares en células de raíces actuando como fosfohidrolasas inducibles (PSI) y relacionado con interacción con micorrizas. Los transportadores de la familia PHT2 y PHT4 actúan en las membranas de plástidos, muy relacionados con el metabolismo fotosintético; y los transportadores PHT3 y PHT4 actúan en membranas mitocondriales y del aparato de Golgi (Rausch y Bucher, 2002).

La familia de transportadores PHT aumenta su expresión en ausencia de Pi en el medio (Sun et al., 2016). Mutantes sin actividad en estos genes reducen su capacidad para adquirir Pi en bajas concentraciones en el suelo, siendo los 2 principales las PSI PHT1;1 y PHT1;2. Estos genes se encuentran muy conservados debido a su importancia y se pueden encontrar ortólogos en cientos de especies. Por ejemplo, los transportadores StPT3 y LePT3 en tomate on ortólogos de PHT1;3 en patata y tomate, respectivamente (Gordon-Weeks et al., 2003; Misson et al., 2005). Sin embargo, en trabajos anteriores, una reducción súbita de Pi en el medio no indujo los ortólogos PHT1;3, PHT1;4 o PHT 1;5 en pimiento, lo que da que entender que serían genes de interacción con micorrizas en patata y tomate (Chen et al., 2007). También existen numerosos parálogos que se han diferenciado funcionalmente gracias a duplicaciones en tándem, por ejemplo, en tomate los genes PHT1 se han dividido de LePT1 a LePT6. La mayoría se expresan en la raíz, en el tejido epidermal o los pelos radicales y modifican su regulación y patrones de expresión espacial (Chen et al., 2014; Gordon-Weeks et al., 2003). Utilizan mecanismos de simporte con cationes de hidrógeno (H<sup>+</sup>) para absorber Pi en contra del gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática. El transporte estará determinado por el pH en el citosol, que normalmente es de 7'1, que determina una forma predominante de Pi (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> o H<sub>2</sub>PO<sup>4-</sup> cuyo pK de 7,2) (Ayadi et al., 2015; Schachtman et al., 1997). Este mecanismo estaría acompañado por una activación de ATPasas para aumentar la acción de los cotransportadores en deficiencia de P (Schikora y Schmidt, 2002).

Mediante parámetros cinéticos y enzimáticos, se ha estimado que el Pi en el citosol se encuentra en un rango de concentraciones entre 1 y 10 mM. Aunque puede haber variaciones externas, se tampona el interior celular de forma que la variación sea muy estrecha en este rango. El transporte a vacuola, principal compartimiento de almacenaje en células vegetales, está determinado por la familia de transportadores PHT4, llamados transportadores de Pi a vacuola o *vacuolar phosphate transporter* (VPT) con dominios SPX-MFS (Liu et al., 2015; 2016). El dominio proteico SPX estaría relacionado con la detección y transporte de Pi ya que se encuentra presente en más de 20 proteínas y se ve inducido en deficiencia de P. El transporte de Pi a mitocondrias es clave para la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa, estaría determinado por canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), de la familia de transportadores PHT3 (Tateda et al., 2011). En el aparato de Golgi, Pi es un producto de la glicosilación de proteínas, lípidos y polisacáridos y es exportado desde el lumen al citosol para evitar su acumulación mediante transportadores PHT4;6 y PHO1 (Cubero et al., 2009). También se inducen transportadores de sulfato (SULTR1;3 Y 3;4) y de MGDG sintasas por la necesidad de aumentarla síntesis de sulfolípidos y galactolípidos que mantienen la homeostasis de Fe. La síntesis de lípidos no basados en P es un mecanismo para mantener la estabilidad de la membrana celular (Misson et al., 2005), por tanto los genes alterados del metabolismo de lípidos son UDP-sulfoquinovosa sintasa/SQD1 y UDP-galacosiltransferasa/DGD1 cuyo objetivo sería aumentar la PUE (Muneer y Jeong, 2015). Una de las proteínas más importantes con este dominio es PHO1, que regula la homeostasis de Pi con movimiento del ion a través del xilema (Versaw y Garcia, 2017).

El Pi es clave en las rutas de señalización en los primeros estadios de la respuesta ante un estímulo determinado. En concreto, forman parte de las Map kinasas (MEK1 y WIPK), clave en la ruta de transducción intracelular de señales. Además, ante un estímulo como el estrés nutricional, los factores de transcripción también tendrían alterada su expresión como reguladores de la expresión génica (Wang et al., 2002). En este sentido, se ha estudiado en *Arabidopsis* el gen PHR1 (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE*) como un factor de transcripción de la familia

MYB-CC que actúa junto con otra familia de factores de transcripción redundante, WRKY, uniéndose a un elemento cis 'GNATATNC' (secuencia P1BS) en regiones del promotor de genes de respuesta a Pi como transportadores de Pi, protein kinasas, RNAsas o APAs cuyo fin sería modificar la arquitectura radicular. También se ha visto la actuación del gen PHR2 y la acción de micro-RNAs involucrados en la respuesta a deficiencia de Pi para regular la homeostasis. Los genes cuya expresión se altera ante la deficiencia de fósforo están involucrados en procesos metabólicos, transporte de iones, regulación transcripcional, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), regulación hormonal, y síntesis y degradación de proteínas protectoras; aunque también se encontraría exacerbada la expresión de genes de respuesta a estrés general como proteínas de respuesta a patógeno (PR) o a estrés oxidativo (GSTs) (Misson et al., 2005; Muneer y Jeong, 2015). Los genes que más se ven alterados son los que se relacionan con la producción de metabolitos secundarios y que podrían ser clave en los procesos de tolerancia de la planta a medio y largo plazo (Ren et al., 2014; Sun et al., 2016).

Algunos de los genes que se han establecido como "sensores" de la raíz son *LOW PHOSPHATE ROOT* (LPR1 y LPR2), y *PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2* (PDR2) que se coexpresarían. Otras proteínas que se han propuesto como detectores de los niveles de Pi serían PHO1, SPX1 y SPX3, que comenzarían la transmisión de señales a otros órganos mediante los tejidos vasculares. Estos genes también pueden verse afectados por otros estreses bióticos o abióticos, destacando falta de otros nutrientes como Zn o Fe y por regulación post-transcripcional donde destacan miR399s o snARNs. Se ha planteado usar los transportadores en procesos de mejora, aunque se ha comprobado efectos deletéreos en su sobreexpresión asociados con acumulación y toxicidad de Pi, ya que la alteración de alguno de estos genes lleva a la alteración de otros factores de la cadena de señalización. Sería necesario realizar una mejora para un rendimiento eficiente, y se debería probar la diferencia entre lo que se obtiene experimentalmente y en condiciones reales (Su et al., 2009; Wu et al., 2003).

Las fosfatasa ácidas (PAP) catalizan la liberación de un grupo fosfato Pi de ésteres y anhídridos (Tran, Hurley y Plaxton, 2010). Son clave en procesos de estrés de la planta, ya que son parte de las PSI y actúan sobre la movilización, absorción y removilización de P orgánico. PAP10.2 podría ser una PAP interna removilizada en condiciones de bajo P. Otras como PAP12, PAP25 y PAP26 descritas en *Arabidopsis*, estarían encargadas de reciclar el Pi de monoésteres citoplásmicos para mantener la concentración de P estable. Se ha demostrado su importancia en especies cultivadas como soja, tomate y cebolla. Además, PAP10 estaría relacionada con un aumento de la biomasa y del PUE ya se encuentra en la epidermis de raíces, por tanto, sería una de las encargadas de la adaptación a condiciones de estrés por falta de P (Del Vecchio et al., 2014).

Ante una privación de P, se reduce la fotosíntesis ya que se reduce la síntesis de pigmentos fotosintéticos y la transferencia de electrones en la membrana tilacoidal. Algunos genes codificantes de proteínas relacionadas con la fotosíntesis también se inducen como la RuBisCO, y clorofilas a/b, dependiendo del tiempo de exposición a las condiciones de estrés. Sí que se ha observado un aumento del metabolismo energético y de carbohidratos para mantener la homeostasis celular (Misson et al., 2005). En cuanto a la glicólisis, podrían verse afectados genes como fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), aumentando la fosforilación de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y exudando más ácidos orgánicos (Fita et al., 2012). De igual forma se puede ver alterado el metabolismo de síntesis de aminoácidos y proteínas para evitar la degradación de proteínas clave en el desarrollo y el metabolismo de síntesis de lignina para mantener integridad de la pared celular, así como otros metabolitos secundarios participando

en cambios en arquitectura de raíces y conductividad de nutrientes (Calderon-Vazquez et al., 2008).

## 1.5 RT-qPCR y expresión génica

La reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real o RT-qPCR es la técnica por excelencia para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos en muestras biológicas. Es una modificación de la PCR, que incluye una etapa de retrotranscripción de ARNm a ADNc para una posterior amplificación mediante PCR con un seguimiento a tiempo real de la reacción durante su evolución de forma que permite cuantificar la cantidad de una determinada molécula de ARNm (Higuchi et al., 1992). Se considera una técnica sencilla, sin embargo, la optimización y validación que requiere la convierte en una técnica muy precisa, sensible y reproducible. En muchos casos, el nivel de expresión de un determinado gen es tan bajo que es la única técnica conocida capaz de detectarlo. Se ha usado principalmente para cuantificación absoluta de ácidos nucleicos y análisis de expresión de genes (Bustin, 2000; Kozera y Rapacz, 2013; Taylor et al., 2019).

Hay una serie de pasos críticos en el proceso RT-qPCR tanto previos a la técnica como durante el análisis para asegurar que los resultados obtenidos se corresponden con la realidad. Es necesario comprobar, entre otros aspectos, la eficiencia de la polimerasa, el anillamiento de los cebadores diseñados y la pureza de las muestras. Los pasos previos al análisis deben estar estandarizados (preparación del material vegetal, extracción de ARN, almacenaje en condiciones óptimas y control de cantidad y calidad) y los datos obtenidos deben ser evaluados con programas que aseguren su robustez estadística (Huggett y Bustin, 2011).

Existen diversas estrategias para la cuantificación de transcritos. Se ha propuesto la cuantificación absoluta, relativa, e incluso, la cuantificación comparativa, sin embargo, las estrategias más utilizadas son la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa (Pfaffl, 2007). En la cuantificación absoluta, se relaciona un número de copias de ácidos nucleicos con una señal y se cuantifica con una curva estándar de calibración, establecida mediante la señal obtenida por productos de PCR diluidos en diluciones seriadas. La cuantificación absoluta presenta algunos sesgos ya que depende de la curva de calibración y, por tanto, en ocasiones el número de copias puede correlacionarse con parámetros biológicos como la cantidad de tejido, cantidad de células o cantidad total de ARN (Pfaffl y Hageleit, 2001; Tyburski et al., 2008). En cambio, la cuantificación relativa mide los cambios relativos en el nivel de expresión en respuesta a un estímulo analizando los cambios en cantidad de ARNm. Para ello, únicamente es necesario un control o estándar de secuencia conocida con el que comparar el número de transcritos del gen de interés (Bustin, 2000). Es la estrategia ideal para investigar cambios fisiológicos a pequeña escala como cambios en los niveles de expresión de genes ante un estrés. La expresión génica puede relativizarse mediante:

- Control endógeno, un gen de referencia u otro gen de interés constantemente expresado en la muestra a estudiar.
- Control exógeno, una molécula de ADN o ARN universal.
- Un índice de un gen referenciado, una media de diversos controles endógenos.
- Índice del gen objetivo, una media de los genes de interés analizados en el mismo estudio (Livak y Schmittgen, 2001; Wittwer et al., 2001).

## 1.5.1 Genes de referencia

Para llevar a cabo un análisis cuantitativo de muestras biológicas mediante RT-qPCR, la elección de los genes control que se van a usar es uno de los puntos críticos para asegurar precisión y reproducibilidad en los resultados. Los genes de referencia son el control interno de la reacción cuya secuencia debe ser diferente a la del gen de interés que se quiera cuantificar. Además, la normalización de los genes de interés debe realizarse respecto a genes que no varían su expresión, los genes constitutivos o *housekeeping genes*. Estos genes se expresan en todos los tejidos independientemente de las condiciones experimentales ya que sus productos génicos realizan actividades esenciales para el ciclo celular. Los genes de referencia no solo permiten analizar cuánto ha aumentado la expresión de un gen de interés en unas condiciones experimentales determinadas, sino que, además, permiten analizar posibles errores durante las etapas experimentales asegurando que cualquier variación genética se vea igual en el gen de referencia y el de interés (Kozera y Rapacz, 2013; Wan et al., 2011).

No se puede hablar de unos genes de referencia universales para todos los ensayos experimentales, sino que dependen de cada caso particular (condiciones de cultivo, tejido a analizar, momento del ciclo biológico, etc.). Según se ha comprobado en la literatura más reciente, en pimiento los tres genes que presentan mayor estabilidad en diferentes condiciones son  $\beta$ -TUB, UBI-3 y GADPH (Wan et al., 2011). Sin embargo, la controversia respecto a los genes más adecuados para cualquier ensayo de expresión aun sigue patente, ya que es habitual encontrar desviaciones de expresión en genes control en condiciones determinadas, sobretodo en estudios de tolerancia a estreses abióticos. Es importante que el gen de referencia no esté involucrado en las rutas de señalización o regulación del proceso de estrés, en caso contrario, será imposible calcular un aumento o disminución de la expresión. Aun así, la complejidad de las rutas de señalización y expresión celulares pueden producir variaciones inesperadas. Por todo ello, es necesaria la validación de los genes constitutivos en cada ensayo RT-qPCR (Paolacci et al., 2009; Thellin et al., 2009).

## 1.5.2 Análisis de expresión

En los primeros estudios de expresión, el nivel de expresión se determinaba estableciendo las diferencias entre el *Threshold cycle* (Ct) o punto de cruce (Cp) con los llamados métodos  $\Delta$ Cp (*Ecuación 1*). Sin embargo, los métodos que se usan para los estudios actuales de expresión son más complejos. En ellos, se relativiza la expresión del gen de interés respecto a un control sin tratamiento, a la misma muestra a tiempo cero, o a individuos sanos (dependiendo del ensayo), con los métodos llamados  $\Delta\Delta$ Cp (*Ecuación 2*) (Livak y Schmittgen, 2001). Para obtener resultados óptimos es necesario contar con una buena estrategia de normalización, para ello será clave contar con un buen gen control y obtener ADNc de alta calidad (Pfaffl, 2007).

$$\text{Ratio de expresión} = 2^{(Cp \text{ muestra} - Cp \text{ control})} = 2^{\Delta Cp} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Ratio de expresión} = 2^{-(\Delta Cp \text{ muestra} - \Delta Cp \text{ control})} = 2^{-\Delta\Delta Cp} \quad (\text{Ecuación 2})$$

El ratio de expresión relativo se calcula usando diversos modelos matemáticos, con o sin corrección de eficiencia de la reacción de qPCR. La expresión del gen de interés se normaliza con uno o más genes de referencia siendo el mayor problema que puedan variar su expresión con el

tratamiento aplicado. Todos los métodos tienen como base el cálculo del valor Ct o Cp, sin embargo, este valor es muy sensible y se puede ver afectado por numerosos artefactos de la reacción, debiendo separarse claramente de la fluorescencia de fondo, el punto decisivo para el cálculo. El valor límite o *threshold* suele calcularse como 10 veces la fluorescencia basal, valor a partir del cual se podrá calcular la expresión de un gen de interés. Para determinar el ratio de amplificación existen métodos directos, basados en un métodos de dilución (requiere un análisis de eficiencia muestra por muestra que debe tener valores entre 1'6 y 2) o en la medida del aumento de fluorescencia relativa en la fase exponencial de la PCR (fácil de calcular estableciendo los límites de Ct con eficiencia entre 1'5 y 1'9). Y también se han desarrollado métodos indirectos, calculando el ratio según un modelo matemático sigmoideal, cuya mayor ventaja es que todos los puntos son incluidos en el análisis (Kozera y Rapacz, 2013; Pfaffl, 2007; Taylor et al., 2019).

El primer programa informático comercial de cuantificación relativa fue LightCycler® (2001). Para calcular el valor de expresión de los genes de interés se triplica el valor Ct o Cp del gen de interés frente al de referencia y se corrige mediante el cálculo de la media del triplete en sus repeticiones. La eficiencia de la corrección (E) se calcula a partir de la pendiente de la curva de calibración (*Ecuación 3*) siendo E=1 el mínimo y E=2 el máximo teórico y óptimo. Sin embargo, con este primer programa no es posible realizar comparaciones estadísticas mediante un test.

$$E = 10^{-1/\text{Pendiente curva calibración}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

En 2002, Pfaffl, desarrolló un nuevo programa llamado REST, basado en la comparación de expresión de genes mediante nivel de Cp. Este método compara dos tratamientos, la muestra frente a la condición control, y calcula el ratio de diferencia entre ellos, normalizado posteriormente con la media de la desviación de Cp del gen de referencia (*Ecuación 4*). La gran ventaja de esta estrategia frente a la del LightCycler®, es que permite la realización de tests estadísticos con los datos de Cp mediante el test *Pair-wise Fixed Reallocation Radomization*. Se basa en que los tratamientos han sido asignados aleatoriamente, y realiza múltiples mediciones de ambos tratamientos para ver los efectos aparentes en cada vez (Pfaffl, 2001; 2007).

$$\text{Ratio de expresión} = \frac{(E \text{ gen de interés})^{\Delta C_p \text{ gen de interés}} (\text{MEDIA control} - \text{MEDIA muestra})}{(E \text{ gen control})^{\Delta C_p \text{ gen control}} (\text{MEDIA control} - \text{MEDIA muestra})} \quad (\text{Ecuación 4})$$

### 1.5.3 Análisis de expresión diferencial en déficit de P

Para conocer los genes expresados en condiciones de estrés abióticos causado por deficiencia de P hay 2 aproximaciones a nivel experimental, que traen consigo efectos secundarios diferentes en la planta. La primera aproximación consiste en estudiar el efecto de eliminar P del medio de cultivo cuando las plántulas lleguen a un estado de crecimiento determinado, siendo difícil estimar el momento adecuado para ello, además de añadir estrés a las raíces por el cambio drástico en las condiciones (Müller et al., 2007). La segunda aproximación consiste en estudiar el efecto de añadir P a plantas que se encuentran cultivadas en deficiencia nutricional obteniendo patrones diferentes de expresión, ya que, a nivel celular, se modifican los ARNm ya existentes (Wu et al., 2003). Los estudios de expresión de estrés nutricional son muy complejos debido a que, muchas veces, el nivel de expresión no alcanza el límite necesario para su detección.

En este tipo de trabajos es necesario realizar el cultivo agronómico de forma óptima para asegurar la respuesta deseada de las plantas. Debido a la variabilidad del suelo, se deben establecer

unas condiciones muy restringidas con los controles adecuados para que el nivel de estrés permita ver una expresión de genes diferencial. Es habitual encontrar alteraciones morfológicas, así como correlaciones entre las alteraciones morfológicas y la sobreexpresión de ciertos genes.

Actualmente, no se ha publicado ningún estudio en pimiento sobre expresión diferencial de genes como consecuencia de un déficit de P, por tanto, este trabajo se plantea como el primero en analizar la sobreexpresión de genes de raíces en pimiento en respuesta a déficit de P mediante la técnica RT-qPCR.

## **2. OBJETIVOS**

En el contexto del programa de estudio del pimiento que se desarrolla actualmente en el COMAV, los objetivos que se plantean en este trabajo son:

1. Analizar la respuesta de pimiento ante la deficiencia de fósforo, concretamente, estudiar la sobreexpresión de genes en la parte implicada en el primer contacto con el suelo y sus componentes, las raíces.
2. Optimizar el proceso de RT-qPCR para el análisis de genes de respuesta a deficiencia de P en raíz, manipulando los principales puntos críticos del proceso.
3. Discutir la implicación del conocimiento de estos genes en los programas de mejora, la existencia de posibles tolerancias y su futura utilización mediante métodos de mejora tradicionales y novedosos.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Cultivo de *Capsicum***

#### **3.1.1 Material vegetal**

Teniendo en cuenta resultados de evaluación anteriores se utilizó como patrón Numex X por su buen comportamiento como patrón de pimiento y como variedad Adige (ambas variedades de la Colección del grupo de mejora de Pimiento UPV). Para evitar un posible sesgo por efecto del injerto, los controles Adige se injertaron sobre sí mismos.

#### **3.1.2 Diseño experimental**

Las semillas se sembraron en placas Petri con algodón y papel de filtro. Tras la germinación, las plántulas se trasplantaron a una mezcla de 45% de arena fina (0'4 mm), 45% de grava de sílice (2'5 mm) y 10% de turba.

Cuando las plantas tenían 6 hojas verdaderas se realizó el injerto, con las combinaciones Adige sobre sí mismo de aquí en adelante denominado adige/adige y Adige sobre patrón Numex X, denominado de aquí en adelante adige/numex. El injerto fue de aproximación, decapitando al patrón con un corte en visel y eliminando la raíz de la variedad con el mismo corte. Las dos partes de unieron mediante clips de plástico para injerto. Después las plantas se transfirieron durante dos días a una cámara oscura con alta humedad y quedaron aclimatándose durante una semana con

alta humedad y luz. Cuando los injertos prendieron, las plantas se trasladaron a un cultivo hidropónico (*Figura 1*) en recipientes de 2 L con dos niveles de abonado de P: P alto (1.5 mM) y bajo (0.5 mM), el resto de nutrientes fue el típico de soluciones nutritivas de hidroponía en pimiento (*Tabla 1*). La solución se aireaba en pulsos de 1 minuto cada 15 minutos.



*Figura 1. Plantas injertadas de pimiento creciendo en condiciones hidropónicas con soluciones con P y sin P.*

Tras 20 días en crecimiento se tomaron medidas de crecimiento de parte aérea y se tomaron muestras de las raíces.

Por cada combinación de injerto se testaron 8 plantas que se encontraban distribuidas aleatoriamente.

*Tabla 1. Solución nutritiva de cultivo hidropónico en condiciones de 1.5 mM y 0.5 mM de ion Pi.*

Solución ideal (Mmol/L)		
	Alto P	Bajo P
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	15.50	15.50
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	1.50	0.50
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	1.75	1.75
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	0.50	0.50
<b>Cl<sup>-</sup></b>	0.00	0.00
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1.50	1.50
<b>K<sup>+</sup></b>	6.50	6.50
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	4.75	4.75
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	1.50	1.50
<b>Na<sup>+</sup></b>	0.00	0.00
<b>pH</b>	8.15	8.15
<b>CE (MS/l)</b>	0.99	0.99

### 3.2 Cálculo del contenido de P y Parámetros de Eficiencia

Una vez obtenidas las muestras de hoja, tallo y raíz, se calculó su peso y se dejaron secar en un horno a 60°C durante 72 horas para volver a calcular su peso. Las muestras se digirieron con 2 mL de ácido nítrico por cada 0.3 g de material seco, y se procesó en microondas cerrado mediante digestión ácida (MARSXpress; CEM Corporation, Matthews, NC, USA). Las muestras se diluyeron en agua desionizada y se analizaron usando espectrometría de masas acoplada a inductor de plasma (ICP-ES; JY Ultima 2, Jobin Yvon Ltd., Stanmore, Middlesex, UK) para calcular las concentraciones de P expresados en porcentaje respecto a mg de materia seca.

Con los datos biométricos de los 2 tratamientos en los 2 genotipos, se calculó el ratio raíz/tallo (Ecuación 5).

$$\text{Ratio raíz/tallo} = \frac{PF \text{ raíz}}{PF \text{ tallo}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Siendo PF el peso fresco en mg medio de las 8 plantas testadas para cada combinación.

Además, para caracterizar mejor el comportamiento de ambos genotipos, se calcularon los parámetros de eficiencia de absorción y uso del P:

Eficiencia en la absorción de P (Ecuación 6):

$$PUpE \text{ (mg P)} = ([P]_{\text{Control}} \times PS_{\text{Biomasa Control}}) - ([P]_{\text{NoP}} \times PS_{\text{Biomasa NoP}}) \quad (\text{Ecuación 6})$$

Eficiencia en el uso de P (Ecuación 7):

$$PUtE \text{ (mg PS/mg P)} = \frac{PS_{\text{Biomasa Control}} - PS_{\text{Biomasa NoP}}}{([P]_{\text{Control}} \times PS_{\text{Biomasa Control}}) - ([P]_{\text{NoP}} \times PS_{\text{Biomasa NoP}})} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Eficiencia fisiológica en el uso del P (Ecuación 8):

$$PPUE \text{ (mg}^2 \text{ PS/mg P)} = \frac{PS_{\text{Biomasa Control}}}{[P]_{\text{Control}}} \text{ y } \frac{PS_{\text{Biomasa NoP}}}{[P]_{\text{NoP}}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Ratio de eficiencia de P (Ecuación 9):

$$PER \text{ (mg PS/mg P)} = \frac{PS_{\text{Biomasa Control}}}{[P]_{\text{Control}} \times PS_{\text{Biomasa Control}}} \text{ y } \frac{PS_{\text{Biomasa NoP}}}{[P]_{\text{NoP}} \times PS_{\text{Biomasa NoP}}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Siendo PS el peso seco medio de las 8 plantas testadas de cada combinación en mg y [P] la concentración de fósforo en cada tratamiento en Mmol/L. La PPUE y el PER se calcularon para condiciones control y para el tratamiento de bajo P.

### 3.3 Búsqueda bibliográfica genes de respuesta a deficiencia de P

Se realizó una búsqueda exhaustiva en bibliografía reciente en el ámbito científico, concretamente, en trabajos relacionados con estrés abiótico debido a deficiencia de nutrientes. El objetivo fue encontrar genes previamente descritos involucrados en la respuesta a deficiencia de P en especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, especies de la familia *Solanaceae* como *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* o *Cucumis melo* y especies de otras familias de interés como *Brassica napus* o *Phaseolus vulgaris* y especies de interés económico como *Oryza sativa*, *Zea mays* o *Triticum sp.* La bibliografía empleada se encuentra en el Anexo I y se puede

destacar como artículo principal el trabajo de Nilsson, Müller y Nielsen (2010). Finalmente, se incluyeron en la primera lista del presente estudio, genes descritos cuya expresión se veía alterada en raíz, principal órgano donde se espera obtener respuesta a las condiciones propuestas.

Para identificar posibles genes homólogos en el genoma de *Capsicum*, se realizó un BlastP en la base de datos de proteínas de *Capsicum annum* (cultivar CM334, versión 1.55 (Kim et al., 2014)) disponible en la base de datos de solanáceas (Fernandez-Pozo et al., 2015). Se realizó un BlastP ya que las proteínas se encuentran mejor conservadas que las secuencias nucleotídicas entre especies. Una vez definida la lista de proteínas que presentaban un alineamiento mayor al 65%, se buscaron en EnsemblPlants (Howe et al., 2020) las secuencias de ARNm a las que correspondían las proteínas para compararlas mediante BlastN con el transcriptoma de *Capsicum* y obtener así los genes candidatos.

Se seleccionaron un total de 71 genes candidatos de los cuales 32 se incluyeron por relevancia en el análisis de expresión. Además, se seleccionaron 3 genes constitutivos para controlar la expresión basal: UBI-3, GADPH y  $\beta$ -TUB (Kozera y Rapacz, 2013).

### 3.4 Diseño de cebadores

Con la secuencia de los 35 genes seleccionados, se diseñaron dos pares de cebadores para cada gen con el programa informático *Primer3* (Untergasser et al., 2012), teniendo en cuenta que debe ser cercano al extremo 3', mejor conservado, y debe incluirse en el amplicón la región donde se unen dos exones. Actúa, por tanto, como un control interno que asegura que se amplifica ADNc y no ADN genómico. La calidad y fiabilidad de los cebadores diseñados se comprobó mediante el programa *Oligonucleotid análisis de geneinfinity* (Gene Infinity, 2016) que permite comprobar si los parámetros establecidos en *Primer3* para el diseño se cumplen. Finalmente, se pidieron 35 cebadores de los genes candidatos seleccionados con mayor calidad.

Los parámetros para el diseño de cebadores fueron: tamaño de entre 18 y 22 pares de bases, amplificación de un único producto de PCR de tamaño entre 100 y 200 pares de bases, temperatura de anillamiento ( $T_m$ ) mínima de 57°C, máxima de 65°C y  $T_m$  óptima de 62°C, con una diferencia máxima de 3°C respecto a los valores establecidos. Además, se comprobó que los cebadores presentaran contenido de guanina-citosina (%GC) entre el 50 y el 60% y que este valor fuera similar entre el primer directo o *forward* y el indirecto o *reverse*. Se eliminaron de la selección cebadores con alto nivel de nucleótidos repetidos y con elevada auto complementariedad.

Posteriormente, se validaron los cebadores mediante una PCR con gradiente de temperatura. La PCR se realizó usando un termociclador (©Eppendorf AG) con un volumen final de 15  $\mu$ L que contiene 1  $\mu$ L de ADNc (10 ng/ $\mu$ L), *Taq* polimerasa, tampón 10X,  $MgCl_2$ , dNTPs a concentración 10 mM y los cebadores directo e indirecto a una dilución de 0'5  $\mu$ L. El programa de PCR constó de las siguientes etapas: desnaturalización a 92° durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización 30 segundos a 92°, 30 segundos a una temperatura en gradiente positivo de 55 a 62°, y 1 minuto a 72°, para dejarlo en elongación final a 72° durante 5 minutos. Se realizó la electroforesis de los fragmentos en geles de agarosa a concentración 3% que se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio para corroborar que se producía una amplificación específica por reacción de PCR a temperatura óptima de un fragmento único.

Por último, se validó la eficiencia, que incluye el factor de amplificación de los cebadores (*Ecuaciones 10 y 11*) basada en la pendiente de la curva estándar obtenida de las diluciones seriadas de los cebadores en una qPCR. El máximo de eficiencia es el 100% y el valor de factor de amplificación 2, se obtendrían con una pendiente de -3'32.

$$Eficiencia (\%) = \left( 10^{\frac{-1}{Pendiente}} - 1 \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$Factor \ de \ amplificación \ (E) = 10^{\frac{-1}{Pendiente}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

## 3.5 qPCR

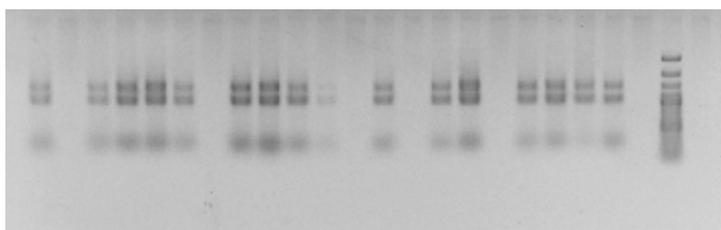
### 3.5.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo con TRIzol basado en la separación fenol-cloroformo establecido por Chomczynski y Sacchi (1987) modificado en algunos pasos para maximizar la extracción y calidad del ARN con 3 repeticiones de cada genotipo. Todos los pasos del protocolo modificado se encuentran en el Anexo II.

### 3.5.2 Limpieza ARN y cuantificación

La limpieza del ARN se llevó a cabo usando el kit *Danagene Plant RNA kit* (Danagen-Bioted S.L., Badalona, SP) para la eliminación de posibles restos de impurezas y presencia de ADN genómico y posteriormente se realizó la cuantificación del ARN mediante espectrofotómetro (Nanodrop™).

Para corroborar que la limpieza se había llevado a cabo eficientemente y había una cantidad significativa de ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa concentración 1% hasta visualizar las bandas de ARN gruesas, sin observar degradación por contaminantes o mala calidad (*Figura 2*).



*Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído de raíces de pimiento y limpiado de genómico mediante Danagene Plant RNA kit.*

### 3.5.3 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc a partir del ARNm se realizó con el kit *FastGene® Scriptase II cDNA kit* (Nippon Genetics Co. Ltd.), cuyo protocolo asegura la obtención una eficiencia de reacción de, al menos, el 99% de una concentración máxima de ARN de 10 ng/μL. Por lo tanto, se asume que la concentración obtenida de ADNc es de 10 ng/μL.

### 3.5.4 Optimización protocolo qPCR

Los cebadores se reconstruyeron a una concentración de 10 mM. Posteriormente, se seleccionaron aquellos genes con mayor aptitud para el estudio, concretamente, aquellos que potencialmente presentaran sobreexpresión en condiciones de deficiencia de P, con un amplicón claro y condiciones de qPCR adecuadas.

La qPCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit *Kapa SYBR® Fast qRT-PCR Master Mix (2X) Kit* (©Roche Sequencing) y con el programa informático LightCycler® 480 versión 1.5 (©Roche Molecular Systems, Inc.) cuyo programa consta de los siguientes pasos: 3 minutos a 95° para activación enzimática, 40 ciclos que constan de dos pasos: amplificación mediante desnaturalización a 95° durante 10 segundos, 30 segundos a 60° para el anillamiento, 1 segundo a 72° y toma del valor de Ct mediante curva de *melting* con 5 segundos a 95°, 1 minuto a 65° y de 5 a 10 minutos de 95° para la toma del valor de Ct finalizando con un enfriamiento a 40° durante 10 minutos. Para la optimización del método de qPCR para los genes de raíz, los parámetros que se modificaron fueron la concentración de cebador, la concentración de ADNc y el gen control que se adecuaba mejor a las condiciones establecidas. Se probaron las concentraciones de cebador 100, 150 y 200 nM y concentraciones de ADNc 0,1, 1 y 10 ng/μL.

Para la realización de la qPCR, se usó una placa de 96 pocillos donde se incluía una curva de calibración para el gen constitutivo y una para el gen de interés, con las concentraciones 0,1, 1 y 10 ng/μL. Tanto para el gen constitutivo como para el gen de interés, se incluyeron los dos genotipos adige/adige y adige/numex, con 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas. En la placa diseñada para optimización, de 96 pocillos, se incluyeron dos genes constitutivos, dos concentraciones de cebadores, y las tres concentraciones de ADNc, con 3 réplicas técnicas para un mismo genotipo adige/adige en bajo P. Finalmente, cada pocillo para la reacción de qPCR contenía 10 μL, 0,2 μL de cada cebador a concentración 200 nM, 5 μL del MasterMix del kit y 1 μL de ADNc a concentración final de 1 ng/μL.

### 3.5.5 Cálculos expresión

El cálculo de la expresión génica se realizó utilizando el método establecido por Pfaffl (2001) de cuantificación relativa de los genes respecto a la curva estándar de los genes control.

Este método matemático se desarrolló con el objetivo de obtener resultados de alta precisión y reproducibilidad, con desviaciones en los resultados menores al 2,5%. Con este método, el ratio de expresión relativa se calcula basándose en las eficiencias de amplificación de los transcritos y la desviación del punto de cruce de las muestras respecto al control sin necesidad de establecer una curva previa de calibración (Pfaffl, 2007).

Según la fórmula de Pfaffl, el ratio de expresión génica se puede calcular de la siguiente manera (*Ecuación 12*):

$$\text{Ratio de expresión génica} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{(E_{HKG})^{\Delta Ct_{HKG}}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

donde  $E_{GOI}$  es la eficiencia de amplificación del gen candidato y  $E_{HKG}$  es la eficiencia del gen control calculado según la siguiente ecuación (*Ecuación 13*):

$$E_{GOI/HKG} = \left( \frac{\text{Eficiencia (\%)}}{100} \right) + 1 \quad (\text{Ecuación 13})$$

utilizando los valores de eficiencia obtenidos con la *Ecuación 7*.

Los valores de  $\Delta Ct_{GOI/HKG}$  se calculan como la diferencia entre el valor medio de Ct del gen constitutivo ( $\bar{x}_{HKG}$ ) y el valor Ct medio de las 3 repeticiones de cada muestra ( $\bar{x}_{GOI}$ ) (*Ecuación 14*).

$$\Delta Ct = \bar{x}_{HKG} - \bar{x}_{Ct\ GOI} \quad (\text{Ecuación 14})$$

La cuantificación se llevó a cabo con los genes LPR1 y PHO1, que dieron los mejores resultados durante la optimización con el gen constitutivo  $\beta$ -TUB.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Datos biométricos del cultivo de *Capsicum*

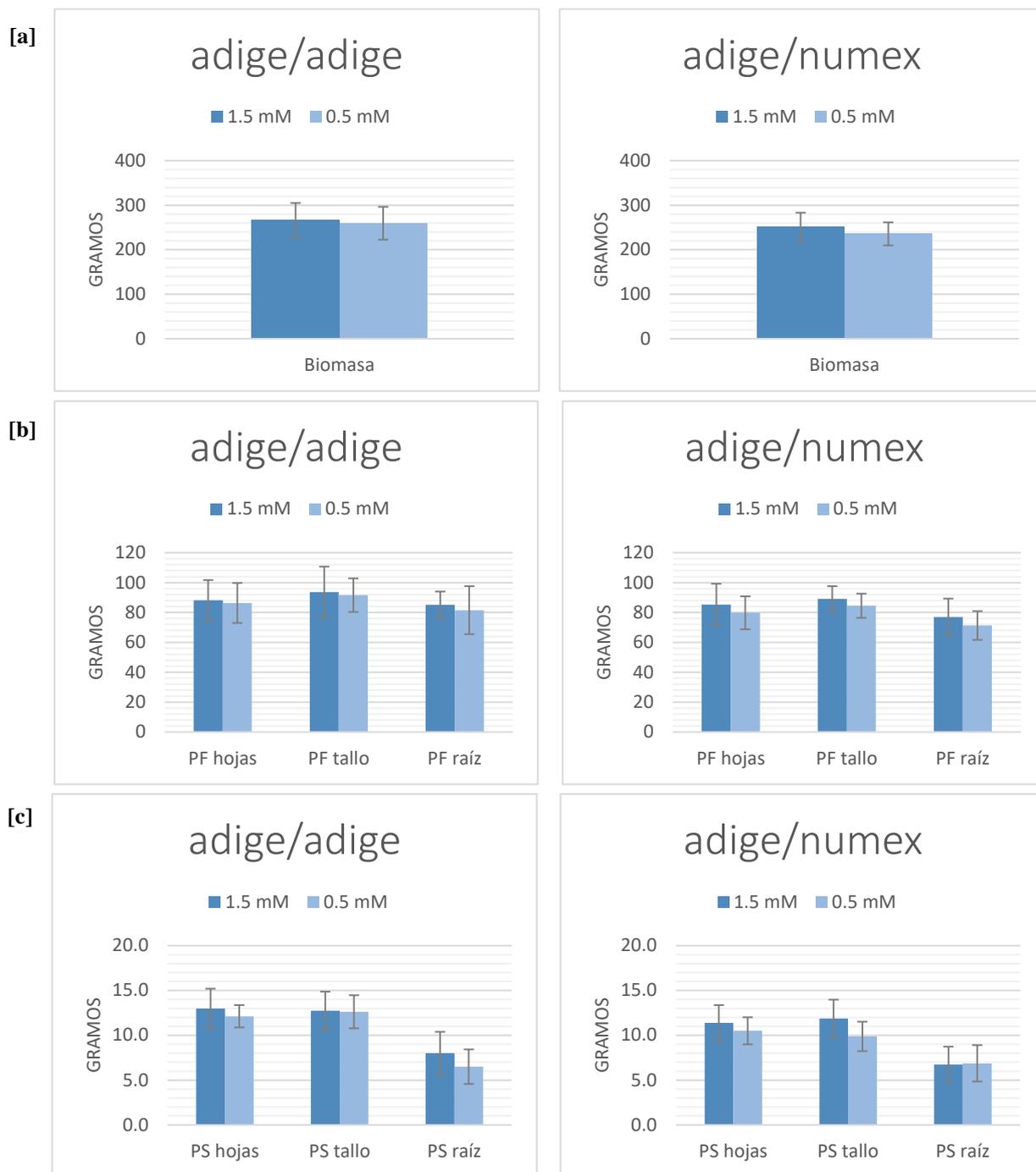
Con los datos fenotípicos obtenidos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con el programa Statgraphics Centurion XVII (Statgraphics.net). Según los resultados del ANOVA, no hubo diferencias significativas en cuanto a biomasa total entre ambos genotipos (*Figura 3a*).

El peso fresco (PF) de hojas no varió entre genotipos ni entre tratamientos. El PF en tallo tampoco tenía diferencias significativas entre genotipos o entre tratamientos. En cuanto al PF de raíz sí existen diferencias significativas entre variedades,  $83'34 \pm 12'7$  g en adige/adige y  $74'09 \pm 11'1$  g en adige/numex, pero no existen diferencias significativas en cuanto a los tratamientos (*Figura 3b*).

En el peso seco (PS), obtenido tras 3 días de desecado del material vegetal, se observaron diferencias significativas entre genotipos en cuanto a PS en hojas,  $12'6 \pm 2$  g en adige/adige y  $10'9 \pm 2$  g en adige/numex y tallo,  $12'7 \pm 2$  g en adige/adige y  $10'9 \pm 2$  g en adige/numex, pero no se observaron diferencias con el tratamiento. Con el PS de raíz, no se obtuvieron diferencias significativas debido al genotipo o al tratamiento (*Figura 3c*).

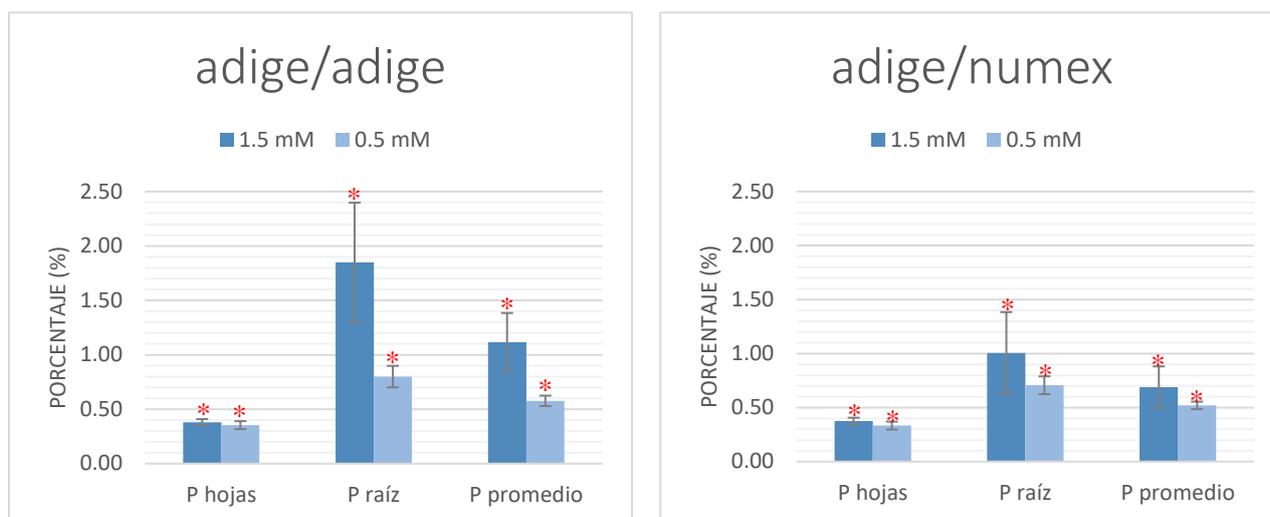
Los valores obtenidos en el ratio raíz/tallo para adige/adige fueron 0'909 en alto P y 0'891 en bajo P; y para adige/numex fueron 0'863 para alto P y 0'844 para bajo P. En ambos casos, los valores eran ligeramente menores en condiciones de estrés por falta de P.

**Figura 3. Gramos de biomasa total (a), peso fresco (PF) (b) y peso seco (PS) (c) en hoja, tallo y raíz en plantas cultivadas de los genotipos adige/adige (izquierda) y adige/numex (derecha) sometidas a condiciones de alto y bajo fósforo (1.5 y 0.5 mM).**



## 4.2 Contenido en P y Parámetros de Eficiencia

Se realizaron diversos ANOVA con los valores de contenido en P de diferentes órganos de la planta. En este análisis se observaron diferencias significativas en hojas dependiendo del tratamiento,  $0.38 \pm 0.03\%$  en alto P y  $0.34 \pm 0.04\%$  en bajo P, muy similar en ambos genotipos. Para el contenido en raíces y el contenido promedio se observaron diferencias significativas dependiendo del genotipo, del tratamiento y de su interacción. Es decir, cada genotipo variaba su contenido dependiendo de las condiciones de cultivo de la planta de pimiento obteniendo valores mayores en adige/adige en cultivo con alto P en el medio. Los valores obtenidos fueron para raíz:  $1.85 \pm 0.5\%$  en alto P y  $0.80 \pm 0.1\%$  en bajo P en adige/adige; y  $1.01 \pm 0.4\%$  en alto P y  $0.71 \pm 0.1\%$  en bajo P en adige/numex. Y los valores promedio fueron:  $1.11 \pm 0.3\%$  en alto P y  $0.58 \pm 0.05\%$  en bajo P para adige/adige; y  $0.69 \pm 0.2\%$  en alto P y  $0.52 \pm 0.03\%$  en bajo P para adige/numex (Figura 4).



**Figura 4. Porcentaje (%) de contenido de fósforo (P) en hojas, raíz y promedio en plantas cultivadas de los genotipos adige/adige (izquierda) y adige/numex (derecha) sometidas a cultivo de 1.5 y 0.5 mM de Pi. Los asteriscos marcan los casos en que hay una diferencia significativa en el contenido de P entre tratamientos.**

Los valores de PUpE para adige/adige y adige/numex fueron  $47.38 \text{ mg P}$  y  $31.375 \text{ mg P}$  respectivamente y para PUTE fueron  $0.575 \text{ mg PS/mg P}$  y  $0.088 \text{ mg PS/ms P}$ . La PPUE y el PER se calcularon para alto y bajo P. Para el PPUE se obtuvieron valores para adige/adige de  $22.5 \text{ mg}^2 \text{ PS/mg P}$  para  $1.5 \text{ mM}$  de P y  $13 \text{ mg}^2 \text{ PS/mg P}$  para  $0.5 \text{ mM}$  de P y para adige/numex  $20 \text{ mg}^2 \text{ PS/mg P}$  para  $1.5 \text{ mM}$  de P y  $54.5 \text{ mg}^2 \text{ PS/mg P}$  para  $0.5 \text{ mM}$  de P. Por último, los valores de PER fueron iguales para ambos genotipos,  $0.667 \text{ mg PS/mg P}$  en alto P y  $2 \text{ mg PS/mg P}$  en bajo P.

## 4.3 Genes candidatos

Mediante búsqueda bibliográfica, fueron seleccionados 71 genes candidatos a presentar una sobreexpresión ante condiciones de estrés nutricional por déficit de P. Estos genes pueden agruparse en las siguientes categorías: genes que actúan en la ruta de movilización del Pi, genes relacionados con las rutas de detección y transporte de Pi, factores de transcripción y genes que actúan en el metabolismo de lípidos y esfingolípidos. Además, se seleccionaron los 3 genes

constitutivos de raíz más adecuados para actuar como gen control en pimiento: GADPH, UBI-3 y  $\beta$ -TUB (Paolacci et al., 2009; Wan et al., 2011).

Dado que no hay un estudio previo de genes de respuesta a falta de P en *Capsicum*, los genes han sido descritos en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 2015; Müller et al., 2007; Nilsson et al., 2010; Tran et al., 2010; Wu et al., 2003), especies de la familia *Solanaceae*, como *Solanum lycopersicum* (Chen et al., 2007; Muneer y Jeong, 2015; Sung et al., 2015), *Solanum tuberosum* (Gordon-Weeks et al., 2003) y *Cucumis melo* (Fita et al., 2011; 2012) y otras familias de interés económico como la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (Hernández et al., 2007) y la brásica *Brassica napus* (Ren et al., 2014). Además, se añadieron al estudio genes descritos en especies de cereales de alto interés económico como *Oryza sativa* (Wasaki et al., 2003), *Zea mays* (Calderon-Vazquez et al., 2008; Sun et al., 2016) y *Triticum sp.* (Schachtman et al., 1997).

#### 4.4 Identificación de posibles genes homólogos

Los trabajos con *Arabidopsis thaliana*, han permitido el descubrimiento de numerosos genes, la mayoría transportadores de Pi y factores de transcripción relacionados con el metabolismo de P y otros nutrientes esenciales. Estos genes presentan ortólogos en las principales especies de las solanáceas, por tanto, es probable encontrar genes con las mismas funciones en *Capsicum annuum*.

Con las secuencias proteicas de los 71 genes seleccionados principalmente de *Arabidopsis* y *Solanum lycopersicum* y realizando un BlastP con la base de datos de proteínas de *Capsicum annuum* (cultivar CM334 versión 1.55), se encontraron los genes potencialmente homólogos. En algún caso, cada gen potencial obtenía más de una secuencia alineada en la base de datos. Concretamente, 50 secuencias obtuvieron únicamente un alineamiento, 15 secuencias obtuvieron dos alineamientos y 6 secuencias obtuvieron 3 alineamientos obteniendo un total de 98 secuencias proteicas de *Capsicum annuum* candidatas a ser genes homólogos. Se eliminaron aquellas secuencias que no presentaban una identidad mayor al 60% y un HSP (*High Scoring Pairs*) mayor a 200 dejando un total de 41 genes potencialmente homólogos. Posteriormente, se seleccionaron un total de 32 genes para realizar los análisis de expresión por su mayor relevancia en los puntos clave en el metabolismo de Pi y teniendo en cuenta su expresión diferencial en raíz según trabajos previos (Tabla 2).

**Tabla 2. Genes candidatos, locus en el genoma de *Capsicum annuum*, descripción y actividad a nivel celular.**

Gen	Locus	Descripción	Actuación
$\beta$ -TUB	CA04g21850	<i>Beta tubuline</i>	Control
CaLB	CA03g30840	<i>Calcium-dependent lipid-binding family protein</i>	Metabolismo de lípidos
G3P1	CA03g15600	<i>Glycerol-3-phosphate transporter (putative)</i>	Detección y transporte de P
G3P4	CA06g12740	<i>Transporter (putative)</i>	Detección y transporte de P
GADPH	CA10g00750	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	Control
LPR1	CA00g59390	<i>Low Phosphate Root 1 - multicopper oxidase</i>	Metabolismo secundario de estrés
MYB108	CA05g16530	<i>MYB transcription factor (putativo)</i>	Factor de transcripción
NAC42	CA02g04820	<i>NAC domain protein</i>	Factor de transcripción
NAC-ERD1	CA09g12970	<i>Jasmonic acid 2</i>	Factor de transcripción

NITF	CA12g10100	<i>ASF-1/G13 protein</i>	Factor de transcripción
PAP17	CA03g22880	<i>Purple acid phosphatase 17</i>	Movilización de fosfato
PAP5	CA04g21260	<i>Purple acid phosphatase 5</i>	Movilización de fosfato
PDR2	CA08g09830	<i>p-type ATPase transporter (Fragment)</i>	Detección y transporte de P
PEPC1	CA03g36140	<i>Phosphatase (putative)</i>	Factor de transcripción
PGDH1	CA03g25870	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (putative)</i>	Detección y transporte de P
PHF1	CA12g05520	<i>Phosphate transporter traffic facilitator 1</i>	Detección y transporte de P
PHO1	CA03g04840	<i>Pho1-like protein (Fragment)</i>	Detección y transporte de P
PHO2	CA02g16120	<i>PHO2</i>	Detección y transporte de P
PHR1	CA06g01530	<i>Transcription factor (putative)</i>	Factor de transcripción
PHR2	CA03g24810	<i>DNA photolyase (putative)</i>	Factor de transcripción
PHT1;1	CA03g05830	<i>Inorganic phosphate transporter</i>	Detección y transporte de P
PHT1;4	CA04g00530	<i>PT2</i>	Movilización de fosfato
PLDP2	CA08g12640	<i>Phospholipase d zeta (putative)</i>	Metabolismo de lípidos
PPC3	CA10g01650	<i>Phosphoenolpyruvate carboxylase (putative)</i>	Movilización de fosfato
PTF1	CA10g20700	<i>BHLH transcription factor</i>	Factor de transcripción
S6K2	CA03g11330	<i>Ribosomal protein S6 kinase (putative)</i>	Detección y transporte de P
SPX1	CA09g17720	<i>Xenotropic and polytropic murine leukemia virus receptor ids-4 (putative)</i>	Detección y transporte de P
SQD1	CA08g02360	<i>UDP-sulfoquinovose synthase</i>	Metabolismo de lípidos
SQD2	CA09g06550	<i>GDP-mannose-dependent alpha-mannosyltransferase-like (putative)</i>	Metabolismo de lípidos
SULTR1;3	CA12g10670	<i>Sulfate transporter 2</i>	Detección y transporte de P
TSP	CA07g11180	<i>Tyrosine specific protein phosphatase family protein</i>	Movilización de fosfato
UBI-3	CA06g03040	<i>Ubiquitin-40S ribosomal protein</i>	Control
UDP-Gt	CA09g02190	<i>UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein</i>	Detección y transporte de P
WRKY6/42	CA02g18540	<i>WRKY1a transcription factor (putative)</i>	Factor de transcripción
WRKY75	CA11g12710	<i>WRKY transcription factor 75-like (putative)</i>	Factor de transcripción

## 4.5 Validación de cebadores

Se diseñaron dos parejas de cebadores (*forward* o directo y *reverse* o reverso) para cada gen candidato, seleccionando finalmente, la pareja que tuviese mayor aptitud para obtener una amplificación efectiva (Tabla 3).

**Tabla 3. Parejas de cebadores (directo y reverso) más eficiente diseñado para cada gen candidato y tamaño del amplicón en pares de bases.**

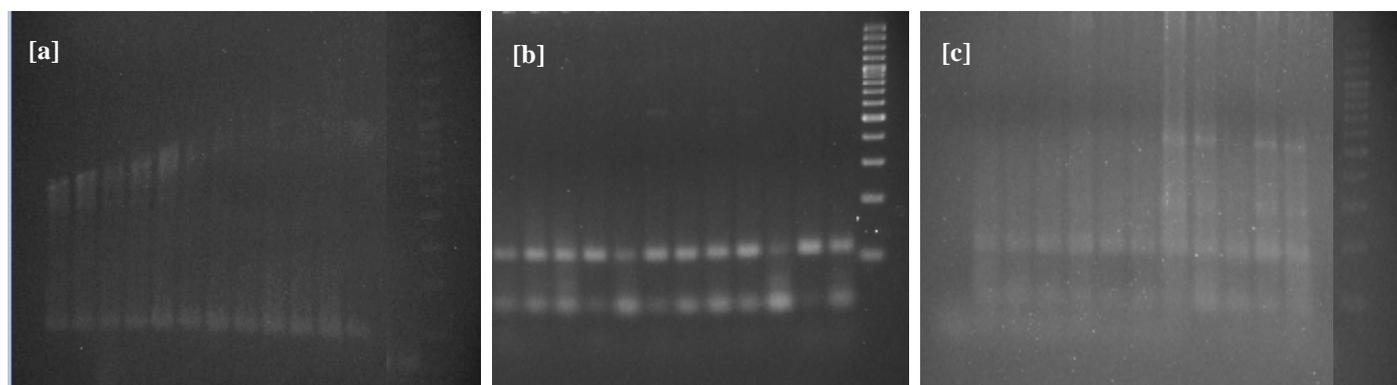
Gen	Forward	Reverse	Tamaño (pb)
β-TUB	TGGTGGAGAATGCTGATGAATGT	TTCACAGCCAACTTCCGCAA	193
CaLB	GCGGTTTCGTGATGTTTCGTAGC	CCATAGGGTCATCTTTGCTGAAC	196
G3P1	AGCCGTGGGTTTTATTGAAGCA	ACAAGTTTCCAGCCTCCTCAT	170
G3P4	CCCTCGGGTTGGTTCGAC	AGCAGAGAGATTCCAGCAGA	199

GADPH	GGGAAGCTCACTGGAATGGC	TGCCTTTAAGTGGACCCTCTGA	142
LPR1	TCCAGTTGAGCTTCGTGAACT	GCTGTGTCAACCTGGCGATG	198
MYB108	CGACCAGATGTTTCGACGTGG	TCCAGGAAGATGTTGAGCAATCT	111
NAC42	CCACCAAACACCTTCATGCTGA	CCACTGGGTCATTTTGCTGTCT	144
NAC-ERD1	AGCACCAAAGGATCCAAGACT	TGGCTGTATTCATTGCTGCGT	174
NITF	TCCTTCCACAAATGACCGCT	TCCCAAGGCAAGGAGACCC	149
PAP17	GCCACGATCATTGCCTTGAG	ATGCCTTTGATCCTGCCCCA	81
PAP5	TCAAACGTCGCCTACAACATCA	CCTTGGCTGTGGTTGTGTCA	135
PDR2	GTGGATGCTTGGCTGTTGTTCT	ACTTCTTGTGGGTCCTCTAGC	197
PEPC1	ACACTTGCTCTCATGGCTGC	TCTTTTCTTCCCTTCCTTAGCCA	110
PGDH1	GCAGTTGTTGGCGCTTTGAA	CCACTTCCACCGGCAACAAG	152
PHF1	TGAGAACATTGAGCTCTGCAGGT	AGTGATGTCCCAAAGTCAATCA	106
PHO1	GCTGGCGATCGTCTTGGTGA	ACCCAAGCAACTCTCAAGACCA	189
PHO2	TGAGGCTGGATATGATGCACAGA	TCCATCGGTTACCAAAGTGCTCT	167
PHR1	AGCATTGCGGTTACAGATGGA	ACATCATTTGGAGGCAGCGT	110
PHR2	ATGGGGCTCAACTGGCTGAT	GCTCCACACAAGCGGTTAC	119
PHT1;1	TGGTCCAAACGCCACAACAT	TTTGGGATCCGTGGGCTGAG	154
PHT1;4	CGAATTTTGGACCTAACGCGACT	CGCAGCGTATAGGAATCCGT	143
PLDP2	GGACCACCTTGCCGAGATGT	ACTTTCGACCTCAACTTCTCTGC	162
PPC3	TTGCGGTCCAACACTACGAGGA	CGCAGTCTGAGTCGTTGTTCA	104
PTF1	TCAATGAGACTTGCTGCGGT	GGTTTGTCCCTCGGTCCAGA	138
S6K2	AGGGACAAGATTAAGCTGCCA	GCGCTTTCTTGCCCTCCTTGT	87
SPX1	TGGAATAATTACAGTGCCCTCAAC	GACGGGAATAGACGGTCTGA	188
SQD1	CAGGCTGCTGTTGGACATCC	CCTGGTTGTGCTGGATTGGC	122
SQD2	GATAGACTTCCAGATGCTCGGA	ACAAGCCCCAATGTCTCCGA	185
SULTR1;3	AGTCACAAGGCCGCGAACAG	TCCTCATCCATTAGCCATCTCAA	185
TSP	TGTTGATTCACTGCAAACGCG	GATGTTAGGCACCACTTCTGC	85
UBI-3	TCTCAAGGAGCAGTGGAGTCC	GGGTCCGTCAACAGAGAGCA	75
UDP-Gt	TGTGGACTGAACCTGCTTTGG	ACCCTATGAACCACAGTCCAAA	190
WRKY6/42	AAAGCTCGTGTCTCCGTCCG	ACAACCAACAGCCATCGTGC	141
WRKY75	ACCAAGGTACGCTTTCCAAACA	ACTCCTTCATCCTTGGACAACC	180

Mediante PCR en gradiente de temperatura y electroforesis en gel de agarosa se vio que solo 17 de los cebadores amplificaban de forma óptima, ya que 8 amplificaban inespecíficamente y 9 no amplificaban ningún fragmento, dejando un total de 17 genes para poder optimizar las condiciones de qPCR y realizar el análisis de expresión génica (*Tabla 4*). Por ejemplo, la pareja de cebadores del gen NAC-ERD1 amplificaba específicamente a partir de una  $T_m$  de  $57.5^\circ$  (*Figura 5a*), en cambio, la pareja de cebadores de MYB108 siempre amplificaba 2 fragmentos (*Figura 5b*), la pareja de cebadores de SQD2 presentaba diversas amplificaciones inespecíficas (*Figura 5c*) y la pareja PAP5 no presentaba ningún amplicón.

**Tabla 4. Parejas de cebadores (directo y reverso) y su tamaño en pares de bases para cada gen candidato que amplificaba un fragmento único en el genoma.**

Gen	Forward	Reverse	Tamaño
$\beta$ -TUB	TGGTGGAGAATGCTGATGAATGT	TTCACAGCCAACTTCCGCAA	193
CaLB	GCGGTTCGTGATGTTTCGTAGC	CCATAGGGTCATCTTTGCTGAAC	196
G3P1	AGCCGTGGGTTTTATTGAAGCA	ACAAGTTTCCAGCCTCCTCAT	170
GADPH	GGGAAGCTCACTGGAATGGC	TGCCTTTAAGTGGACCCTCTGA	142
LPR1	TCCAGTTGAGCTTCGTGAACT	GCTGTGTCAACCTGGCGATG	198
NAC-ERD1	AGCACAAAAGGATCCAAGACT	TGGCTGTATTCATTGCTGCGT	174
PAP17	GCCACGATCATTGCCTTGAG	ATGCCTTTGATCCTGCCCA	81
PHF1	TGAGAACATTGAGCTCTGCAGGT	AGTGATGTCCCAAAGTCAATCA	106
PHO1	GCTGGCGATCGTCTTGGTGA	ACCCAAGCAACTCTCAAGACCA	189
PHR1	AGCATTGCGGTTACAGATGGA	ACATCATTTGGAGGCAGCGT	110
PHR2	ATGGGGCTCAACTGGCTGAT	GCTCCACACAAGCGGTTAC	119
PTF1	TCAATGAGACTTGCTGCGGT	GGTTTGTCCCTCGGTCCAGA	138
SPX1	TGAAAATTACAGTGCCCTCAAC	GACGGGAATAGACGGTCCGA	188
SULTR1;3	AGTCACAAGGCCGGAACAG	TCCTCATCCATTAGCCATCTCAA	185
UBI-3	TCTCAAGGAGCAGTGGAGTCC	GGGTCCGTCAACAGAGAGCA	75
WRKY6/42	AAAGCTCGTGTCTCCGTCCG	ACAACCAACAGCCATCGTGC	141
WRKY75	ACCAAGGTACGCTTTCCAACA	ACTCCTTCATCCTTGGACAACC	180



**Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos por PCR en gradiente de temperatura (de 52 a 60° en intervalos de 0'5 en cada pocillo) para los cebadores de los genes (a) NAC-ERD1, (b) MYB108 y (c) SQD2.**

## 4.6 Optimización de la qPCR

### 4.6.1 Optimización del control interno

Las curvas estándar del gel GADPH mostraron eficiencias de valores  $E=12'89$  para una concentración de cebador de 100nM,  $E=34'62$  para 150 nM y  $E=6'319$  para 200nM (Figura 6). Las curvas del gen  $\beta$ -TUB mostraron valores de  $E=1'952$  para 100nM y  $E=1'897$  para 200nM (Figura 7). Por tanto, como control interno, el mejor resultado se obtuvo usando el gen  $\beta$ -TUB

como gen constitutivo a una concentración de los cebadores de 100nM, y una temperatura de anillamiento de 60° con 40 ciclos de amplificación.

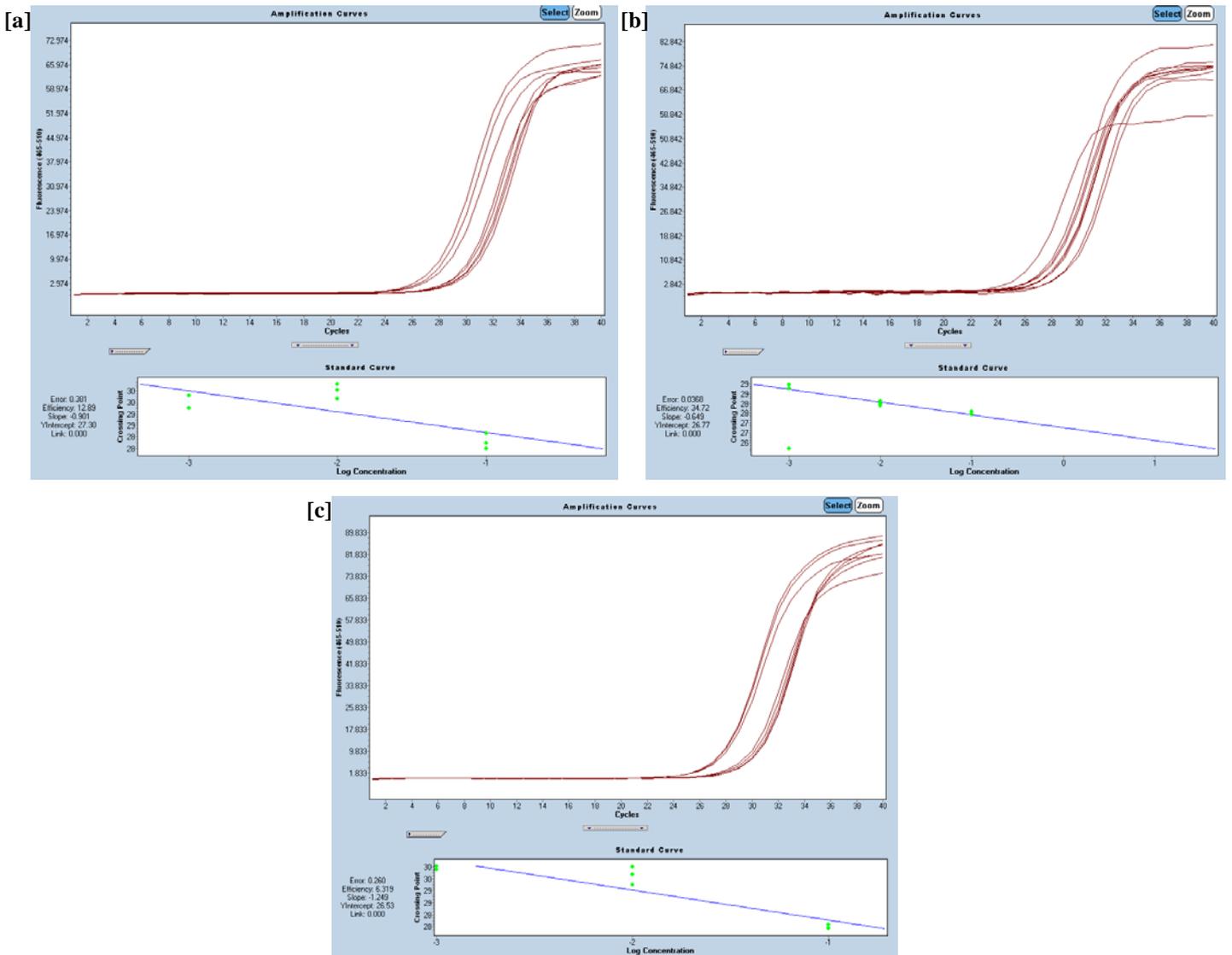


Figura 6. Curvas de qPCR del gen GADPH a concentraciones de cebador (a) 100nM, (b) 150nM y (c) 200nM en una muestra del genotipo adige/adige en condiciones de bajo fósforo.

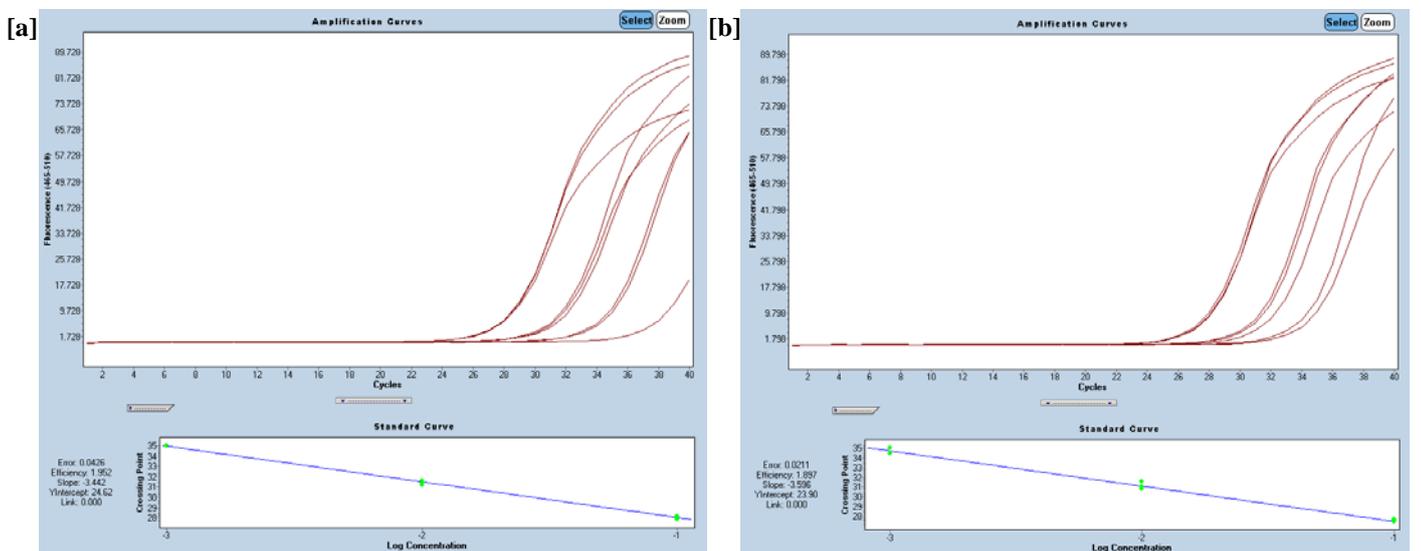


Figura 7. Curvas de qPCR del gen  $\beta$ -TUB a concentraciones de cebador (a) 100nM y (b) 200nM en una muestra del genotipo adige/adige en condiciones de bajo fósforo.

## 4.6.2 Optimización para los genes seleccionados

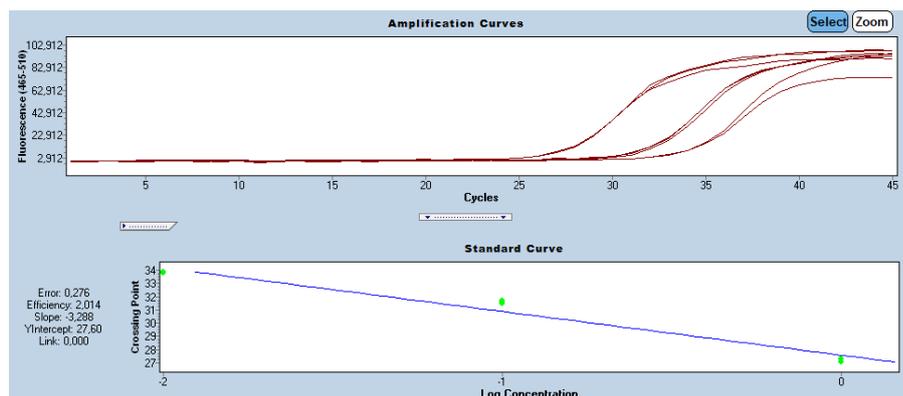
Los 5 genes candidatos que finalmente se seleccionaron por representar todos los procesos de respuesta de la planta fueron PAP17 (movilización de fósforo), PHO1 (detección y transporte de P), LPR1 (respuesta a estrés) y PHR1 y PHR2 (factores de transcripción). Estos genes, según estudios anteriores, presentaban mayor expresión diferencial en raíz en las condiciones estudiadas (Tabla 5).

**Tabla 5. Genes candidatos seleccionados, locus en el genoma de *Capsicum annuum*, descripción y actividad a nivel celular.**

Gen	Locus	Descripción	Actuación
LPR1	CA00g59390	<i>Low Phosphate Root 1 - multicopper oxidase</i>	Metabolismo secundario de estrés
PAP17	CA03g22880	<i>Purple acid phosphatase 17</i>	Movilización de fósforo
PHO1	CA03g04840	<i>Pho1-like protein (Fragment)</i>	Detección y transporte de P
PHR1	CA06g01530	<i>Transcription factor (putative)</i>	Factor de transcripción
PHR2	CA03g24810	<i>DNA photolyase (putative)</i>	Factor de transcripción

Los genes candidatos que presentaron mejores resultados durante la optimización de qPCR fueron PHO1 y LPR1. Estos genes fueron seleccionados para realizar los primeros ensayos de expresión dado que tenían los valores de eficiencia de amplificación más elevados:  $E_{PHO1}=2'014$  (Figura 8) y  $E_{LPR1}=2'036$  (Figura 9).

. En el caso del gen PHR1 (Figura 10) ( $E_{PHR1}=18'35$ ), así como en el caso del gen PHR2 ( $E_{PHR2}=2'976$ ) (Figura 11), no fue posible la cuantificación ya que las curvas estándar no representaban una recta cuantificable. En estos genes, junto con el PAP17 (recta inexistente), no se consiguieron ver diferencias en las curvas entre las condiciones de alto y bajo P, por tanto, era esperable que no existieran diferencias cuantificables en la expresión y se decidió no realizar los cálculos



**Figura 8. Curva estándar de la qPCR del gen PHO1 una muestra del genotipo adige/adige en condiciones de bajo fósforo.**



## 4.7 Expresión génica

Para los genes PHO1 y LPR1 se realizó la cuantificación. Tras normalizar los valores de Ct obtenidos con la qPCR y calcular los valores de expresión con el método Pfaffl, estos variaban en valor medio entre 0'758 y 1'585 en alto P y 0'649 y 1'122 en bajo P para el gen PHO1 (Tabla 6) y 0'805 y 1'856 en alto P y 0'530 y 1'879 para el gen LPR1 (Tabla 7). Es decir, no se observó sobreexpresión de PHO1 y LPR1 en raíces en condiciones de déficit de P dado que los valores son muy heterogéneos y no llegan a un valor suficientemente elevado.

**Tabla 6. Valores medios de expresión del gen PHO1 siendo P1, P2 y P3 la media del valor de expresión de 3 réplicas técnicas para cada réplica biológica.**

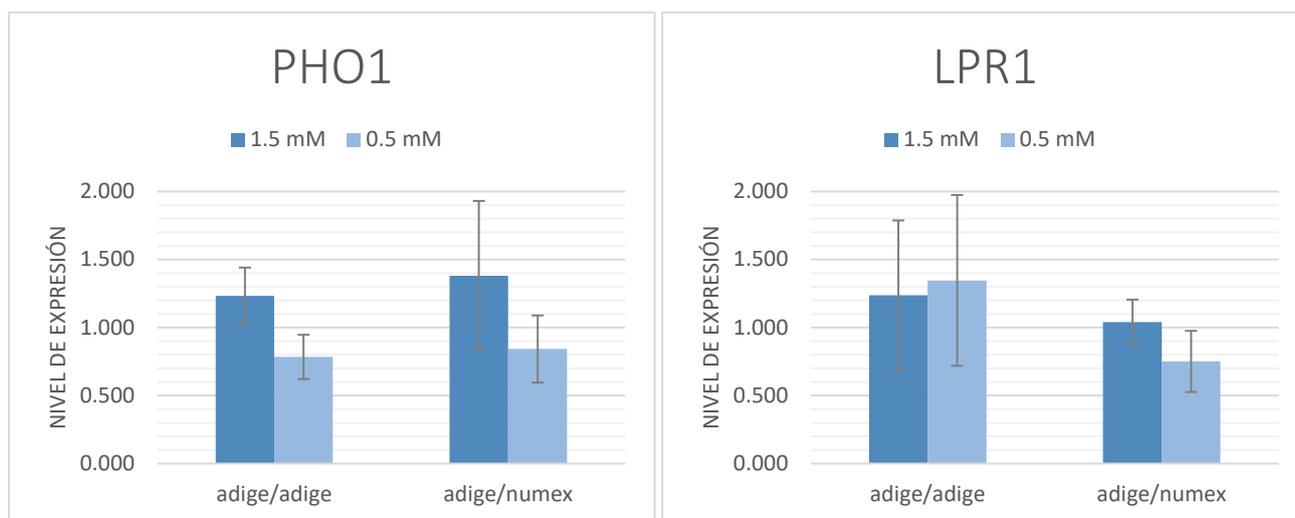
	Ratio de expresión			
	adige/adige		adige/numex	
	1.5 mM	0.5 mM	1.5 mM	0.5 mM
<b>P1</b>	1.311	0.965	1.585	0.653
<b>P2</b>	0.996	0.739	1.800	0.752
<b>P3</b>	1.391	0.649	0.758	1.122

**Tabla 7. Valores medios de expresión del gen LPR1 siendo P1, P2 y P3 la media del valor de expresión de 3 réplicas técnicas para cada réplica biológica.**

	Ratio de expresión			
	adige/adige		adige/numex	
	1.5 mM	0.5 mM	1.5 mM	0.5 mM
<b>P1</b>	1.052	1.879	0.852	0.530
<b>P2</b>	1.856	1.506	1.124	0.745
<b>P3</b>	0.805	0.655	1.147	0.980

En cuanto a los genotipos, los datos parecen indicar que las expresiones son un poco más elevadas en condiciones de alto P en adige/numex en el caso del gen PHO1 y expresiones más elevadas en condiciones de bajo P en adige/adige en el gen LPR1. Sin embargo, en ningún caso se observó homogeneidad en los valores ni diferencias estadísticamente significativas (Figura 12).

Dada la baja respuesta fenotípica a los tratamientos de P y las pocas diferencias observadas entre los genes evaluados, no se procedió a realizar el análisis de expresión con los genes PHR1, PHR2 y PAP17.



**Figura 12. Gráfico comparativo de los niveles de expresión en los genes PHO1 (a) y LPR1 (b) en los genotipos adige/adige y adige/numex en condiciones de cultivo de 1.5mM y 0.5mM de fósforo en el medio.**

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados del ensayo biométrico parecen indicar que ambas combinaciones tienen el mismo vigor en su crecimiento, no hay evidencia de una diferencia de comportamiento durante el cultivo. El tratamiento de bajo insumo en P parece que redujo un poco el crecimiento de las plantas, pero no suficiente para ser significativo. Esto puede ser debido a que las plantas poseían reservas de la fase inicial de formación del injerto, donde no fueron sometidas a diferencias de abonado.

La concentración de fósforo de las hojas tampoco se vio demasiado alterado al contrario que el de las raíces. Cabe recordar que la parte aérea era en ambos casos de Adige, mientras que las raíces diferían. La raíz era Adige acumulaba más P en el tratamiento 1'5 mM, cosa que no ocurrió en el caso de Numex X. Esto puede indicar que Adige y Numex X son patrones distintos para mantener la homeostasis de P. Como ya se ha dicho, este aumento de P no se vio reflejado en la parte aérea. Así, Adige en condiciones de alto P estaría adquiriendo más P, pero no lo estaría translocando a la parte aérea. En el caso de Numex X, la adquisición de P se mantiene en los dos tratamientos tanto en raíz como en parte aérea. Al no llegar a haber deprivación importante de P no podemos declarar si Numex X sería apto para condiciones de bajo P, pero sí podemos decir que Adige respondería acumulando más P en la raíz con incrementos en la fertilización.

La respuesta diferencial frente a los aportes de fósforo ha sido descrita anteriormente en pimiento, donde algunos genotipos destacan por su eficiencia en la adquisición de P y otros en la eficiencia en su uso o PUE (Pereira-Dias et al., 2020). Estos valores también son coherentes con los obtenidos en trabajos anteriores de tomate (Wang et al., 2002; Xu et al., 2007; Muneer and Jeong, 2015), arroz (Wasaki et al. 2003) y maíz (Calderón-Vázquez et al., 2008; Sun et al., 2016). Sin embargo, en este trabajo se obtienen valores de PUE y PUE significativamente bajos. Esto indica que las plantas no respondieron correctamente al tratamiento de fertirrigación y no fueron capaces de absorber P, concretamente, los bajos valores de PUE en bajo P indican que no son capaces de transformar este P en biomasa. El PER relaciona la biomasa cosechada con el P total acumulado en planta, y valores elevados, como en este caso, indicarían que, en bajo P, son capaces

de generar biomasa con bajo P, sin embargo, con los valores anteriores, la hipótesis más razonable es que no fueron capaces de absorber y utilizar P del suelo, sino que las plantas crecieron gracias a sus reservas de P acumuladas durante el cultivo.

Todos los trabajos tienen algo en común y es la drástica reducción de valores de acumulación de P en tallos y hojas respecto a raíces, que aquí se observa también en cierta manera si consideramos los valores del tratamiento de 1'5 mM como los habituales.

El hecho de que no se observaran diferencias importantes a nivel de biomasa y concentración de P entre tratamientos parece indicar que las cantidades de P del tratamiento de bajo P eran suficientes para sustentar el desarrollo de la planta en el estadio en que se evaluaron. Las cantidades de fertirrigación de P para pimiento suelen ir entre los 0'5 y 1'5 mM (Pereira-Dias et al., 2020). Para futuros estudios recomendamos una deprivación total de P para poder observar diferencias claras.

Ante la gran cantidad de genes potencialmente candidatos que se obtuvieron en primera instancia, fue necesario establecer unos criterios de selección que dejaran aquellos los genes que, potencialmente, presentaran mayor expresión en raíz. Para ello se seleccionaron, de los 71 genes potencialmente candidatos, aquellos que, según la bibliografía del Anexo I presentaban mayor diferencia positiva de expresión en raíces dejando el total de 32 genes candidatos. Sin embargo, con los cebadores diseñados se redujo la lista a 17 genes candidatos, ya que, aunque son diseñados teniendo en cuenta que solo alineen en una región del transcriptoma, en algunos casos las condiciones fueron demasiado restrictivas y no se pudo amplificar correctamente el fragmento, y en otros casos, los cebadores amplificaban diferentes puntos del transcriptoma. Es posible que, al diseñar teniendo en cuenta los puntos de unión de los exones, los cebadores diseñados se alinearan con otra secuencia no específica. En el caso de la selección de genes para la optimización de la qPCR, se decidió analizar genes que representaran los principales procesos metabólicos en los que intervenía el P. En primer lugar, un gen de respuesta a estrés tanto biótico como abiótico, como es LPR1, en segundo lugar, un gen de detección y transporte de P, PHO1, en tercer lugar, el gen PAP17, involucrado en la movilización del fosfato, uno de los genes principales de respuesta ante deficiencia de P; y por último, dos factores de transcripción, PHR1 y PHR2, de respuesta a Pi (Del Vecchio et al., 2014; Müller et al., 2007; Nilsson et al., 2010).

Durante la optimización de la qPCR, se vio que los 5 genes candidatos seleccionados no presentaban grandes diferencias de expresión dependiendo del tratamiento. PHR1 intervendría en el aumento de absorción de P por las raíces, controlando respuestas como acumulación de antocianinas y relacionado con el metabolismo de azúcares acumulando almidón necesario para la fotosíntesis y el metabolismo energético. En los mutantes *phr1*, se veía interrumpido el transporte de P. PHR2 no se encuentra descrito tan detalladamente, no obstante, su actividad radicaría en unirse a motivos P1BS en el promotor de genes que expresan fosfohidrolasas inducibles (PSI) para sobreexpresarlas y aumentar la absorción y removilización de Pi para mantener la homeostasis (Wang et al., 2002). Sin embargo, este no es el primer trabajo donde no se ha observado una respuesta significativa de ambos factores de transcripción, por tanto, no sería uno de los responsables potenciales de la respuesta a deficiencia de P (Misson et al., 2005; Morcuende et al., 2007; Müller et al., 2007; Rubio et al., 2001). LPR1 sería otro regulador de la actividad del meristemo apical radicular (RAM) y la arquitectura radicular mediante actividad oxidasa. Ante unas condiciones en las que se reduce el crecimiento radicular, sería esperable una variación en la expresión de LPR1 ya que ha sido considerado uno de los llamados sensores para la detección de los niveles de P externos (Svistonoff et al., 2007). PHO1 tendría como función transportar el Pi al xilema y también ser un sensor externo de los niveles de P, por lo tanto se

encontrarían alterados ante deficiencia de Pi para tratar de aumentar la absorción de Pi del medio y recobrar la homeostasis (Delhaize y Randall, 1993; Stefanovic et al., 2007). Las PAP son uno de los principales enzimas necesarios para la movilización de Pi dentro y fuera de la planta. PAP17 concretamente, permitiría la degradación de tejidos antiguos en la planta para la translocación de Pi al resto de la planta (Del Pozo et al., 1999; Del Vecchio et al., 2014).

Finalmente, se seleccionaron para realizar los primeros cálculos de expresión (Pfaffl, 2001; 2007) los genes LPR1 y PHO1, que actúan directamente sobre el metabolismo primario de Pi y, por tanto, era más probable que se vieran sobreexpresados ante su deficiencia. Al ver que estos genes no presentaban diferencias de expresión, se decidió no analizar los genes candidatos PAP17, PHR1 y PHR2 y revisar cada paso del ensayo con detenimiento, para encontrar en qué punto se había podido cometer un error de diseño que impedía que los genes presentaran una expresión diferencial. Dado que cada paso del ensayo en el laboratorio había tenido un punto de control de calidad posterior, se llegó a la conclusión que había sido durante el cultivo en el invernadero cuando no se habían puesto a punto las condiciones para que las plantas tuvieran un estímulo suficiente que modificara su patrón de expresión.

La expresión génica es variable en el tiempo, los genes implicados en el metabolismo, transporte y homeostasis del P participan en multitud de procesos. La variabilidad de expresión celular, sumada a la variabilidad debida a las plantas, muestreo y subsiguientes pasos del análisis hacen que para ver diferencias entre genes implicados en varias funciones se necesite un estímulo fuerte y muestrear en un tiempo corto tras el estímulo (Fita et al., 2012; Gordon-Weeks et al., 2003; Li y Lan, 2015; Misson et al., 2005; Muneer y Jeong, 2015; Xu et al., 2007). De otra forma, la respuesta por así decirlo, se diluye. Esta acción sumada al hecho de que las dos concentraciones de P no eran muy distintas entre sí hizo que fuera difícil observar diferencias entre los genes estudiados. Por tanto, se puede establecer un nuevo diseño experimental que permita, durante el cultivo, establecer un estrés controlado en la planta que favorezca la sobreexpresión de genes interesantes en el metabolismo de Pi. Según distintos estudios, el modo óptimo de obtener respuesta es crear un estrés corto e intenso. Es decir, un mejor diseño experimental sería eliminar por completo el P de la nutrición vegetal en un cultivo hidropónico cuando la planta llegue a un crecimiento de un número determinado de hojas verdaderas. Además, para poder generar un mapa de expresión temporal en raíces, se podrían coger muestras a distintos tiempos del experimento, para ver distintas etapas en la respuesta y evitar así que la planta se adapte a las nuevas condiciones y se establezca la expresión génica.

Todos los trabajos parecen indicar que el momento óptimo para aplicar el estrés por deficiencia nutricional es cuando las plántulas llevan en cultivo con medio equilibrado 10 días. En cambio, hay mucha diversidad en la forma de aplicar el tratamiento y el tiempo al que se deben coger las muestras. En trabajos en especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, se eliminó por completo el P del medio de cultivo (Li y Lan, 2015; Misson, 2005) así como ocurrió en trabajos de la familia de las solanáceas como tomate, patata y melón (Wang et al., 2002; Xu et al., 2007; Fita et al., 2012; Gordon-Weeks et al., 2013; Muneer and Jeong, 2015) o en cereales como el maíz (Calderón-Vázquez et al., 2008; Sun et al., 2016) o el arroz donde, además, fue necesario eliminar de la semilla las reservas de P con un tratamiento de CaCl<sub>2</sub> (Wasaki et al. 2003). En leguminosas o brásicas, en cambio, no es posible la eliminación total de P del medio, como en judía donde se dejó creciendo a 5  $\mu\text{m}$  (Hernández et al. 2007) o la colza, que se dejó a 1  $\mu\text{m}$  (Ren et al., 2014). Todo parece indicar que *Arabidopsis thaliana*, las solanáceas o los cereales son más resilientes a una falta total de Pi, sin embargo, otras especies de cultivo como las brásicas o leguminosas, no pueden sobrevivir sin un mínimo de Pi en el medio de cultivo. En cuanto al momento de

recolección de las muestras, hay poco consenso en cual es el momento más adecuado para la recolección. Por ello, en numerosos trabajos se decanta por un ensayo de expresión más amplio, teniendo en cuenta la respuesta a corto (1, 2, 3 horas) medio (12, 24, 48 horas) y largo plazo (1, 2, 3 semanas) (Chen et al., 2014).

En conclusión, hay una gran diversidad en el diseño experimental para un mismo objetivo, ya que depende de la respuesta fisiológica y la capacidad de adaptación de las especies. En este trabajo no se ha conseguido ver diferencias en los principales genes de respuesta al metabolismo de P. Sin embargo, se ha establecido un protocolo optimizado de extracción de ARNm, retrotranscripción, diseño de cebadores, y qPCR en tiempo real para futuros estudios de cuantificación de genes de raíz en pimiento ante deficiencia de nutrientes. Concretamente, se han descrito los principales genes candidatos con sus respectivos cebadores para realizar un nuevo estudio de expresión en deficiencia de P en *Capsicum*.

## **6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

Este trabajo no ha obtenido los resultados esperados debido a que el cultivo no se dio de forma óptima para activar los genes de respuesta. De forma genérica, se concluye que las condiciones de deficiencia de fósforo deberían ser más acusadas durante el periodo de cultivo. Además, se plantea en este trabajo la necesidad de evaluar la respuesta ante un estrés a corto, medio y largo plazo, que permitiría conocer los mecanismos de tolerancia. Para ello, sería necesario el cultivo en deficiencia de fósforo durante diferentes estadios de desarrollo de la planta y en aplicaciones asimétricas con réplicas en exposición a condiciones de estrés durante periodos de tiempo crecientes.

Sin embargo, es necesario destacar que sí se ha permitido optimizar el protocolo de análisis de expresión mediante RT-qPCR, desarrollando a su vez cebadores de alta calidad para los genes implicados, y es el primer trabajo del que se tiene constancia de búsqueda de genes en respuesta a carencia de P en pimiento. Por tanto, podríamos decir que este informe siembra las bases para establecer nuevos estudios génicos de expresión en raíz de pimiento en condiciones de falta de P.

En el marco biotecnológico y de mejora actual, donde uno de los principales objetivos es el desarrollo de nuevos cultivares con caracteres que aporten mayor eficiencia y rendimiento, la comprensión de los mecanismos de respuesta de las especies de mayor interés económico es clave. Estudios como el que se presenta, permitirán la comprensión y el desarrollo de plantas con tolerancia a estreses abióticos para utilizar nuevas tierras de cultivo y adaptarse así a los cambios que se prevén, climáticos y poblacionales.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ANDREWS, J. (1984). *Peppers, the domesticated Capsicums*. University of Texas Press.
- AYADI, A., DAVID, P., ARRIGHI, J. F., CHIARENZA, S., THIBAUD, M. C., NUSSAUME, L., & MARIN, E. (2015). Reducing the genetic redundancy of arabidopsis phosphate transporter1 transporters to study phosphate uptake and signaling. *Plant Physiology*, 167(4), 1511-1526. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252338>
- BOHS, L., & OLMSTEAD, R. G. (1997). Phylogenetic Relationships in Solanum (Solanaceae) Based on ndhF Sequences. *Systematic Botany*, 22(1), 5. <https://doi.org/10.2307/2419674>
- BOSLAND, P. W., & VOTAVA, E. J. (2000). Peppers: vegetable and spice capsicums. In *Peppers: Vegetable And Spice Capsicums*. Wellingford: CABI Publishing.
- BUSTIN, S. A. (2000). Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- CALDERON-VAZQUEZ, C., IBARRA-LACLETTE, E., CABALLERO-PEREZ, J., & HERRERA-ESTRELLA, L. (2008). Transcript profiling of Zea mays roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *Journal of Experimental Botany*, 59(9), 2479-2497. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern115>
- CHEN, A., CHEN, X., WANG, H., LIAO, D., GU, M., QU, H., SUN, S., & XU, G. (2014). Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles and genetic redundancy of Pht1 family genes in response to Pi deficiency in tomato. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-61>
- CHEN, A., HU, J., SUN, S., & XU, G. (2007). Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species. *New Phytologist*, 173(4), 817-831. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01962.x>
- CHOMCZYNSKI, P., & SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- CUBERO, B., NAKAGAWA, Y., JIANG, X. Y., MIURA, K. J., LI, F., RAGHOTHAMA, K. G., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., & PARDO, J. M. (2009). The phosphate transporter PHT4;6 is a determinant of salt tolerance that is localized to the golgi apparatus of Arabidopsis. *Molecular Plant*, 2(3), 535-552. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp013>
- DEL POZO, J. C., ALLONA, I., RUBIO, V., LEYVA, A., DE LA PEÑA, A., ARAGONCILLO, C., & PAZ-ARES, J. (1999). A type 5 acid phosphatase gene from Arabidopsis thaliana is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant Journal*, 19(5), 579-589. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00562.x>
- DEL VECCHIO, H. A., YING, S., PARK, J., KNOWLES, V. L., KANNO, S., TANOI, K., & PLAXTON, W. C. (2014). The cell wall-targeted purple acid phosphatase AtPAP25 is critical for acclimation of Arabidopsis thaliana to nutritional phosphorus deprivation. *Plant Journal*, 80(4), 569-581. <https://doi.org/10.1111/tpj.12663>
- DELHAIZE, E., & RANDALL, P. (1993). Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology* 107, 207-213. <https://doi.org/10.1104/pp.107.1.207>
- ESHBAUGH, W. H. (1993). The Taxonomy of the Genus Capsicum. En *Peppers: Botany, Production and Uses* (pp. 14-28). CABI Publishing.

- FAO. (2018). Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Accedido el 25 de abril de 2020, de <http://www.fao.org/>
- FERNANDEZ-POZO, N., MENDA, N., EDWARDS, J. D., SAHA, S., TECLE, I. Y., STRICKLER, S. R., BOMBARELY, A., FISHER-YORK, T., PUJAR, A., FOERSTER, H., YAN, A., & MUELLER, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D1036-D1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>
- FITA, A., BOWEN, H. C., HAYDEN, R. M., NUEZ, F., PICÓ, B., & HAMMOND, J. P. (2012). Diversity in expression of Phosphorus (P) responsive genes in cucumis melo l. *PLoS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035387>
- FITA, A., NUEZ, F., & PICÓ, B. (2011). Diversity in root architecture and response to P deficiency in seedlings of Cucumis melo L. *Euphytica*, *181*(3), 323-339. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0432-z>
- GENE INFINITY. (2016). Oligonucleotide Analysis. Accedido el 20 de septiembre de 2019, de [http://www.geneinfinity.org/sms/sms\\_primanalysis.html#](http://www.geneinfinity.org/sms/sms_primanalysis.html#)
- GOBIERNO DE ESPAÑA. (2020). Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Accedido el 25 de abril de 2020, de <https://www.mapa.gob.es/es/>
- GÓNGORA-CASTILLO, E., FAJARDO-JAIME, R., FERNÁNDEZ-CORTES, A., JOFREGARFIAS, A. E., LOZOYA-GLORIA, E., MARTÍNEZ, O., OCHOA-ALEJO, N., & RIVERA-BUSTAMANTE, R. (2012). The capsicum transcriptome DB: a «hot» tool for genomic research. *Bioinformatics*, *8*(1), 43-47. <https://doi.org/10.6026/97320630008043>
- GORDON-WEEKS, R., TONG, Y., DAVIES, T. G. E., & LEGGEWIE, G. (2003). Restricted spatial expression of a high-affinity phosphate transporter in potato roots. *Journal of Cell Science*, *116*(15), 3135-3144. <https://doi.org/10.1242/jcs.00615>
- HAMMOND, J. P., BENNETT, M. J., BOWEN, H. C., BROADLEY, M. R., EASTWOOD, D. C., MAY, S. T., RAHN, C., SWARUP, R., WOOLAWAY, K.E., & WHITE, P.J. (2003). Changes in Gene Expression in Arabidopsis Shoots during Phosphate Starvation and the Potential for Developing Smart Plants. *Plant Physiology*, *132*, 578-596. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020941>
- HANEKLAUS, S. H., & SCHNUG, E. (2016). Assessing the Plant Phosphorus Status. In *Phosphorus in Agriculture: 100% Zero* (pp. 95-125). Springer, Dordrecht.
- HERNÁNDEZ, G., RAMÍREZ, M., VALDÉS-LÓPEZ, O., TEFAYE, M., GRAHAM, M. A., CZECHOWSKI, T., SHLERETH, A., WANDREY, M., ERBAN, A., CHEUNG, F., WU, H.C., LARA, M., TOWN, C.D., KOPLA, J., UDVARDI, M.K., & VANCE, C. P. (2007). Phosphorus stress in common bean: Root transcript and metabolic responses. *Plant Physiology*, *144*(2), 752-767. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096958>
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., & GRIFFITH, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA sequences. *Nature Biotechnology*, *10*, 413-417.
- HOWE, K. L., CONTRERAS-MOREIRA, B., DE SILVA, N., MASLEN, G., AKANNI, W., ALLEN, J., ALVAREZ-JARRETA, J., BARBA, M., BOLSER, D.M., CAMBELL, L., CARBAJO, M., CHAKLACHVILL, M., CHRISTENSEN, M., CUMMINS, C., CUZICK, A., DAVIS, P., FEXOVA, S., GALL, A., GEORGE, N., GIL, L., GUPTA, P., HAMMOND-KOSACK, K.E., HASKELL, E., HUNT, S.E., JAISWAL, P., KANACEK, S.H., KERSEY, P.J., LANGRIDGE, N., MAHESWARI, U., MAUREL, T., MCDOWALL, M.D., MOORE, B., MUFFATO, M., NAAMATI, G., NAITHANI, S., OLSON, A., PAPTAEODOROU, I., PATRICIO, M., PAULINI, M., PEDRO, H.,

- PERRY, E., PREECE, J., ROSELLO, M., RUSSELL, M., SITNIK, V., STAINES, D.M., STEIN, J., TELLO-RUIZ, M.K., TREVANION, S.J., URBAN, M., WEI, S., WARE, D., WILLIAMS, G., YATES, A.D. & FLICEK, P. (2020). Ensembl Genomes 2020-enabling non-vertebrate genomic research. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D689-D695. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz890>
- HUGGETT, J., & BUSTIN, S. A. (2011). Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. *Accreditation and Quality Assurance*, 16(8), 399-405. <https://doi.org/10.1007/s00769-011-0769-y>
- IBIZA, V. P., BLANCA, J., CAÑIZARES, J., & NUEZ, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated Capsicum species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(6), 1077-1088. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9744-z>
- INCE, A. G., KARACA, M., & ONUS, A. N. (2010). Genetic relationships within and between capsicum species. *Biochemical Genetics*, 48(1-2), 83-95. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9297-4>
- KIM, S., PARK, M., YEOM, S. I., KIM, Y. M., LEE, J. M., LEE, H. A., CHOI, D. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in Capsicum species. *Nature Genetics*, 46(3), 270-278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877>
- KOCHIAN, L. V. (2000). Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport, and utilization. En *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 1204-1249). WILEY Blackwell.
- KOZERA, B., & RAPACZ, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391-406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- KUANG, H., PADMANABHAN, C., LI, F., KAMEI, A., BHASKAR, P. B., OUYANG, S., JIANG, J., BUELL, C.R. & BAKER, B. (2009). Identification of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the Solanaceae: New functional implications for MITEs. *Identification of Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the Solanaceae: New functional implications for MITEs*, 42-56. <https://doi.org/10.1101/gr.07816.108.7>
- LI, W., & LAN, P. (2015). Genome-wide analysis of overlapping genes regulated by iron deficiency and phosphate starvation reveals new interactions in Arabidopsis roots. *BMC Research Notes*, 8(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1524-y>
- LIU, J., YANG, L., LUAN, M., WANG, Y., ZHANG, C., ZHANG, B., SHI, J., ZHAO, F., LAN, W., & LUAN, S. (2015). A vacuolar phosphate transporter essential for phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), E6571-E6578. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514598112>
- LIU, T. Y., HUANG, T. K., YANG, S. Y., HONG, Y. T., HUANG, S. M., WANG, F. N., CHIANG, S.F., TSAI, S.Y., LU, W.U., & CHIOU, T. J. (2016). Identification of plant vacuolar transporters mediating phosphate storage. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11095>
- LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LOAIZA-FIGUEROA, F., RITLAND, K., CANCINO, J. A. L., & TANKSLEY, S. D. (1989). Patterns of genetic variation of the genus Capsicum (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 165(3-4), 159-188. <https://doi.org/10.1007/BF00936000>
- LÓPEZ-ARREDONDO, D. L., LEYVA-GONZÁLEZ, M. A., GONZÁLEZ-MORALES, S. I.,

- LÓPEZ-BUCIO, J., & HERRERA-ESTRELLA, L. (2014). Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 95-123. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035949>
- LU, F. H., CHO, M. C., & PARK, Y. J. (2012). Transcriptome profiling and molecular marker discovery in red pepper, *Capsicum annuum* L. TF68. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 3327-3335. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1102-x>
- LU, F. H., YOON, M. Y., CHO, Y. IL, CHUNG, J. W., KIM, K. T., CHO, M. C., CHEONG, S.R., & PARK, Y. J. (2011). Transcriptome analysis and SNP/SSR marker information of red pepper variety YCM334 and Taeon. *Scientia Horticulturae*, 129(1), 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.003>
- MA, W. Q., ZHANG, F. S., & ZHANG, W. F. (2005). Fertilizer production and consumption and the resources, environment, food security and sustainable development in China. *Resource Sci.*, 27(3), 33-40.
- MARTINS, K. C., PEREIRA, T. N. S., SOUZA, S. A. M., RODRIGUES, R., & DO AMARAL JUNIOR, A. T. (2015). Crossability and evaluation of incompatibility barriers in crosses between capsicum species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15(3), 139-145. <https://doi.org/10.1590/1984-70332015v15n3a25>
- MARTINS, T. R., & BARKMAN, T. J. (2005). Reconstruction of Solanaceae Phylogeny Using the Nuclear Gene SAMT. *Systematic Botany*, 30(2), 435-447. <https://doi.org/10.1600/0363644054223675>
- MISSION, J., RAGHOTHAMA, K. G., JAIN, A., JOUHET, J., BLOCK, M. A., BLIGNY, R., ORTET, P., CREFF, A., SOMERVILLE, S., ROLLAND, N., DOUMAS, P., NACRY, P., HERRERA-ESTRELLA, L., NUSSAUME L., & THIBAUD, M. C. (2005). A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11934-11939. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505266102>
- MOORE, S., PAYTON, P., WRIGHT, M., TANKSLEY, S., & GIOVANNONI, J. (2005). Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2885-2895. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri283>
- MORCUENDE, R., BARI, R., GIBON, Y., ZHENG, W., PANT, B. D., BLÄSING, O., USADEL, B., CZECHOWSKI, T., UDVARDI, M.K., STITT, M., & SCHEIBLE, W. R. (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. *Plant, Cell and Environment*, 30(1), 85-112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01608.x>
- MOSCONE, E. A., BARANYI, M., EBERT, I., GREILHUBER, J., EHRENDORFER, F., & HUNZIKER, A. T. (2003). Analysis of nuclear DNA content in Capsicum (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Annals of Botany*, 92(1), 21-29. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg105>
- MUELLER, L. A., TANSKLEY, S. D., GIOVANNONI, J. J., VAN ECK, J., STACK, S., CHOI, D., KIM, B.D., CHEN, M., CHENG, Z., LI, C., LING, H., XUE, Y., SEYMOUR, G., BISHOP, G., BRYAN, G., SHARMA, R., KHURANA, J., TYAGI, A., CHATTOPADHYAY, D., SINGH, N.K., STIEKEMA, W., LINDHOUT, P., JESSE, T., LANKHORST, R.K., BOUZAYEN, M., SHIBATA, D., TABATA, S., GRANELL, A., BOTELLA, M.A., GIULIANO, G., FRUSCIANTE, L., CAUSSE, M., & ZAMIR, D. (2005). The tomato sequencing project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). *Comparative and Functional Genomics*, 6(3), 153-158. <https://doi.org/10.1002/cfg.468>

- MÜLLER, R., MORANT, M., JARMER, H., NILSSON, L., & NIELSEN, T. H. (2007). Genome-wide analysis of the arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiology*, *143*(1), 156-171. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090167>
- MUNEER, S., & JEONG, B. R. (2015). Proteomic analysis provides new insights in phosphorus homeostasis subjected to pi (inorganic phosphate) starvation in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS ONE*, *10*(7), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134103>
- NILSSON, L., MÜLLER, R., & NIELSEN, T. H. (2010). Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiologia Plantarum*, *139*(2), 129-143. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01356.x>
- NUEZ VIÑALES, F., COSTA GARCÍA, J., & GIL ORTEGA, R. (1996). *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*. Ediciones Mundi-Prensa.
- PAOLACCI, A. R., TANZARELLA, O. A., PORCEDDU, E., & CIAFFI, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, *10*, 1-27. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11>
- PEREIRA-DIAS, L., GIL-VILLAR, D., CASTELL-ZEISING, V., QUIÑONES, A., CALATAYUD, Á., RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A., & FITA, A. (2020). Main root adaptations in pepper germplasm (*Capsicum* spp.) to phosphorus low-input conditions. *Agronomy*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/agronomy10050637>
- PEREIRA-DIAS, L., VILANOVA, S., FITA, A., PROHENS, J., & RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. (2019). Genetic diversity, population structure, and relationships in a collection of pepper (*Capsicum* spp.) landraces from the Spanish centre of diversity revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Horticulture Research*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0132-8>
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 45e - 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- PFAFFL, M. W. (2007). Relative quantification. In *Real-time PCR*, 64-82. BIOS Advanced Methods.
- PFAFFL, M.W., & HAGELEIT, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, *23*(4), 275-282. <https://doi.org/10.1023/A:1005658330108>
- PICKERSGILL, B. (1971). Relationships Between Weedy and Cultivated Forms in Some Species of Chili Peppers (Genus *capsicum*). *Evolution*, *25*, 683-691. <https://doi.org/10.2307/2406949>
- PICKERSGILL, B. (1991). Cytogenetics and Evolution of *Capsicum* L. En P. K. Gupta & T. Tsuchiya (Eds.), *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution* (pp. 139-160). Elsevier Inc.
- PORDER, S., & RAMACHANDRAN, S. (2013). The phosphorus concentration of common rocks-a potential driver of ecosystem P status. *Plant and Soil*, *367*(1-2), 41-55. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1490-2>
- PRINCE, J. P., LACKNEY, V. K., ANGELES, C., BLAETH, J. R., & KYLE, M. M. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*, *38*(2), 224-231. <https://doi.org/10.1139/g95-027>
- PRINCE, J. P., LOAIZA-FIGUEROA, F., & TANKSLEY, S. D. (1992). Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*. *Genome*, *35*(5), 726-732. <https://doi.org/10.1139/g92-112>

- PRINCE, J. P., POCHARD, E., & TANKSLEY, S. D. (1993). Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome*, *36*(3), 404-417. <https://doi.org/10.1139/g93-056>
- RAGHOTHAMA, K. G. (1999). Phosphate acquisition. *Plant Physiology*, *50*, 665-693. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-2005-6>
- RAUSCH, C., & BUCHER, M. (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, *216*(1), 23-37. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0921-3>
- REN, F., ZHAO, C. Z., LIU, C. SEN, HUANG, K. L., GUO, Q. Q., CHANG, L. L., XIONG, H., & LI, X. B. (2014). A Brassica napus PHT1 phosphate transporter, BnPht1;4, promotes phosphate uptake and affects roots architecture of transgenic Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, *86*(6), 595-607. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0249-y>
- RODRIGUEZ, J. M., BERKE, T., ENGLE, L., & NIENHUIS, J. (1999). Variation among and within Capsicum species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *99*(1-2), 147-156. <https://doi.org/10.1007/s001220051219>
- RUBIO, V., LINHARES, F., SOLANO, R., MARTÍN, A. C., IGLESIAS, J., LEYVA, A., & PAZ-ARES, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes and Development*, *15*(16), 2122-2133. <https://doi.org/10.1101/gad.204401>
- SCHACHTMAN, D. P., KUMAR, R., SCHROEDER, J. I., & MARSH, E. L. (1997). Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(20), 11079-11084. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.11079>
- SCHACHTMAN, D. P., REID, R. J., & AYLING, S. M. (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology*, *116*(2), 447-453. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.447>
- SCHIKORA, A., & SCHMIDT, W. (2002). Formation of transfer cells and H<sup>+</sup>-ATPase expression in tomato roots under P and Fe deficiency. *Planta*, *215*(2), 304-311. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0738-0>
- SHARMA, S., PANDEY, S., MUTHAMILARASAN, M., CHAUDHRY, V., DULANI, P., & PRASAD, M. (2017). Genomics Resources for Abiotic Stress Tolerance in Solanaceae Crops, 195-216. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3_12)
- SOMOS, A. (1984). *The paprika*. (A. Kiadó, Ed.). Budapest.
- STEFANOVIC, A., RIBOT, C., ROUACHED, H., WANG, Y., CHONG, J., BELBAHRI, L., DELESSERT, S. & POIRIER, Y. (2007). Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant Journal*, *50*(6), 982-994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03108.x>
- SU, J. Y., ZHENG, Q., LI, H. W., LI, B., JING, R. L., TONG, Y. P., & LI, Z. S. (2009). Detection of QTLs for phosphorus use efficiency in relation to agronomic performance of wheat grown under phosphorus sufficient and limited conditions. *Plant Science*, *176*(6), 824-836. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.03.006>
- SUN, Y., MU, C., CHEN, Y., KONG, X., XU, Y., ZHENG, H., ZHANG, H., WANG, Q., XUE, Y., LI, Z., DING, Z., & LIU, X. (2016). Comparative transcript profiling of maize inbreds in response to long-term phosphorus deficiency stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *109*, 467-481. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.017>
- SUNG, J., LEE, S., LEE, Y., HA, S., SONG, B., KIM, T., WATERS, B.M., & KRISHNAN, H. B. (2015). Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum*)

- L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Science*, 241, 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.027>
- SVISTOONOFF, S., CREFF, A., REYMOND, M., SIGOILLOT-CLAUDE, C., RICAUD, L., BLANCHET, A., NUSSAUME, L., & DESNOS, T. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics*, 39(6), 792-796. <https://doi.org/10.1038/ng2041>
- TADANO, T., & SAKAI, H. (1991). Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 37(1), 129-140. <https://doi.org/10.1080/00380768.1991.10415018>
- TATEDA, C., WATANABE, K., KUSANO, T., & TAKAHASHI, Y. (2011). Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4773-4785. <https://doi.org/10.1093/jxb/err113>
- TAYLOR, S. C., NADEAU, K., ABBASI, M., LACHANCE, C., NGUYEN, M., & FENRICH, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761-774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- THELLIN, O., ELMOUALIJ, B., HEINEN, E., & ZORZI, W. (2009). A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection. *Biotechnology Advances*, 27(4), 323-333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.010>
- TOQUICA, S. P., RODRÍGUEZ, F., MARTÍNEZ, E., DUQUE, M. C., & TOHME, J. (2003). Molecular characterization by AFLPs of Capsicum germplasm from the Amazon Department in Colombia, characterization by AFLPs of Capsicum. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(6), 639-647. <https://doi.org/10.1023/A:1024429320771>
- TRAN, H. T., HURLEY, B. A., & PLAXTON, W. C. (2010). Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science*, 179(1-2), 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.005>
- TYBURSKI, J., STUDZINSKA, A., DACA, P., & TRETYN, A. (2008). PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. *Biotechnologia*, 1(1), 86-96.
- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M., & ROZEN, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1-12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- VANCE, C. P., UHDE-STONE, C., & ALLAN, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3), 423-447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>
- VERSAW, W. K., & GARCIA, L. R. (2017). Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.015>
- WALSH, B. M., & HOOT, S. B. (2012). Phylogenetic Relationships of Capsicum (Solanaceae) Using DNA Sequences from Two Noncoding Regions: The Chloroplast atpB -rbcl Spacer Region and Nuclear waxy Introns. *Chicago Journals*, 162(6).
- WAN, H., YUAN, W., RUAN, M., YE, Q., WANG, R., LI, Z., ZHOU, G., ZHUPING, Y., ZHAO, J., LIU, S., & YANG, Y. (2011). Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416(1-2), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.105>

- WANG, Y. H., GARVIN, D. F., & KOCHIAN, L. V. (2002). Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiology*, *130*(3), 1361-1370. <https://doi.org/10.1104/pp.008854>
- WASAKI, J., YONETANI, R., KURODA, S., SHINANO, T., YAZAKI, J., FUJII, F., SHIMBO, K., YAMAMOYO, K., SAKATA, K., SASAKI, T., KISHIMOTO, N., KIKUCHI, YAMAGISHI, M., & OSAKI, M. (2003). Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell and Environment*, *26*(9), 1515-1523. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01074.x>
- WITTWER, C. T., HERRMANN, M. G., GUNDRY, C. N., & ELENITOBA-JOHNSON, K. S. J. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, *25*(4), 430-442. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1265>
- WU, F., & TANKSLEY, S. D. (2010). Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genomics*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-182>
- WU, P., MA, L., HOU, X., WANG, M., WU, Y., LIU, F., & DENG, X. W. (2003). Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiology*, *132*(3), 1260-1271. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021022>
- XU, G. H., CHAGUE, V., MELAMED-BESSUDO, C., KAPULNIK, Y., JAIN, A., RAGHOTHAMA, K. G., LEVY, A.A., & SILBER, A. (2007). Functional characterization of LePT4: A phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany*, *58*(10), 2491-2501. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm096>

# ANEXO I.

## Bibliografía utilizada para la búsqueda de genes candidatos

- ABEL, S. (2017). Phosphate scouting by root tips. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.016>
- CALDERON-VAZQUEZ, C., IBARRA-LACLETTE, E., CABALLERO-PEREZ, J., & HERRERA-ESTRELLA, L. (2008). Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *Journal of Experimental Botany*, 59(9), 2479–2497. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern115>
- CHEN, A., CHEN, X., WANG, H., LIAO, D., GU, M., QU, H., SUN, S., & XU, G. (2014). Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles and genetic redundancy of Pht1 family genes in response to Pi deficiency in tomato. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-61>
- CHEN, A., HU, J., SUN, S., & XU, G. (2007). Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species. *New Phytologist*, 173(4), 817–831. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01962.x>
- DEL VECCHIO, H. A., YING, S., PARK, J., KNOWLES, V. L., KANNO, S., TANOI, K., SHE, Y., & PLAXTON, W. C. (2014). The cell wall-targeted purple acid phosphatase AtPAP25 is critical for acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphorus deprivation. *Plant Journal*, 80(4), 569–581. <https://doi.org/10.1111/tpj.12663>
- FITA, A., BOWEN, H. C., HAYDEN, R. M., NUEZ, F., PICÓ, B., & HAMMOND, J. P. (2012). Diversity in expression of Phosphorus (P) responsive genes in cucumis melo l. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035387>
- GORDON-WEEKS, R., TONG, Y., DAVIES, T. G. E., & LEGGEWIE, G. (2003). Restricted spatial expression of a high-affinity phosphate transporter in potato roots. *Journal of Cell Science*, 116(15), 3135–3144. <https://doi.org/10.1242/jcs.00615>
- GU, M., CHEN, A., SUN, S., & XU, G. (2016). Complex Regulation of Plant Phosphate Transporters and the Gap between Molecular Mechanisms and Practical Application: What Is Missing? *Molecular Plant*, 9(3), 396–416. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.012>
- HERNÁNDEZ, G., RAMÍREZ, M., VALDÉS-LÓPEZ, O., TEFAYE, M., GRAHAM, M. A., CZECHOWSKI, T., SCHLERETH, A., WANDREY, M., ERBAN, A., CHEUNG, F., WU, H.C., LARA, M., TOWN, C.D., KOPKA, J., UDVARDI, M.K., & VANCE, C. P. (2007). Phosphorus stress in common bean: Root transcript and metabolic responses. *Plant Physiology*, 144(2), 752–767. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096958>
- KOZERA, B., & RAPACZ, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- LI, W., & LAN, P. (2015). Genome-wide analysis of overlapping genes regulated by iron deficiency and phosphate starvation reveals new interactions in *Arabidopsis* roots. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1524-y>
- MISSON, J., RAGHOTHAMA, K. G., JAIN, A., JOUHET, J., BLOCK, M. A., BLIGNY, R., CREFF, A., SOMERVILLE, S., ROLLAND, N., DOUMAS, P., NACRY, P., HERRERA-ESTRELLA, L., NUSSAUME, L., & THIBAUD, M. C. (2005). A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant

- responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11934–11939. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505266102>
- MUNEER, S., & JEONG, B. R. (2015). Proteomic analysis provides new insights in phosphorus homeostasis subjected to pi (inorganic phosphate) starvation in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS ONE*, 10(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134103>
- NILSSON, L., MÜLLER, R., & NIELSEN, T. H. (2010). Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiologia Plantarum*, 139(2), 129–143. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01356.x>
- REN, F., ZHAO, C. Z., LIU, C. SEN, HUANG, K. L., GUO, Q. Q., CHANG, L. L., HUAN, X., & LI, X. B. (2014). A Brassica napus PHT1 phosphate transporter, BnPht1;4, promotes phosphate uptake and affects roots architecture of transgenic Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 86(6), 595–607. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0249-y>
- SCHIKORA, A., & SCHMIDT, W. (2002). Formation of transfer cells and H<sup>+</sup>-ATPase expression in tomato roots under P and Fe deficiency. *Planta*, 215(2), 304–311. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0738-0>
- SU, J. Y., ZHENG, Q., LI, H. W., LI, B., JING, R. L., TONG, Y. P., & LI, Z. S. (2009). Detection of QTLs for phosphorus use efficiency in relation to agronomic performance of wheat grown under phosphorus sufficient and limited conditions. *Plant Science*, 176(6), 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.03.006>
- SUN, Y., MU, C., CHEN, Y., KONG, X., XU, Y., ZHENG, H., ZHANG, H., WANG, Q., XUE, Y., LI, Z., DING, Z., & LIU, X. (2016). Comparative transcript profiling of maize inbreds in response to long-term phosphorus deficiency stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 467–481. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.017>
- SUNG, J., LEE, S., LEE, Y., HA, S., SONG, B., KIM, T., WATERS, B.M., & KRISHNAN, H. B. (2015). Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Science*, 241, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.027>
- TAYLOR, S. C., NADEAU, K., ABBASI, M., LACHANCE, C., NGUYEN, M., & FENRICH, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- VERSAW, W. K., & GARCIA, L. R. (2017). Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.015>
- WAN, H., YUAN, W., RUAN, M., YE, Q., WANG, R., LI, Z., ZHOU, G., YAO, Z., ZHAU, J., LIU, S., & YANG, Y. (2011). Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416(1–2), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.105>
- WANG, Y. H., GARVIN, D. F., & KOCHIAN, L. V. (2002). Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiology*, 130(3), 1361–1370. <https://doi.org/10.1104/pp.008854>
- WASAKI, J., YONETANI, R., KURODA, S., SHINANO, T., YAZAKI, J., FUJII, F., SHIMBO, K., YAMAMOTO, K., SAKATA, K., SASAKI, T., KISHIMOTO, N., KIKUCHI, S., YAMAGISHI, M., & OSAKI, M. (2003). Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell and Environment*, 26(9), 1515–1523.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01074.x>

XU, G. H., CHAGUE, V., MELAMED-BESSUDO, C., KAPULNIK, Y., JAIN, A., RAGHOTHAMA, K. G., LEVY, A.A., & SILBER, A. (2007). Functional characterization of LePT4: A phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany*, 58(10), 2491–2501. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm096>

## **ANEXO II.**

### **Metodología empleada para extracción de ARN. Método del TRIzol modificado.**

1. Triturar 50-100 gramos de material vegetal en un tubo eppendorf
2. Añadir 500  $\mu$ L de TRIzol en campana de extracción de gases y mezclar
3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
4. Añadir 100  $\mu$ L de cloroformo y agitar durante 15 minutos en campana de extracción
5. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente
6. Centrifugar 15 minutos a 12.000 rpm y 4°
7. En la bancada, añadir en un tubo eppendorf limpio 250  $\mu$ L de isopropanol y, posteriormente, el sobrenadante de la centrifugación
8. Precipitar la fase acuosa incubando 10 minutos a 4° y eliminar el isopropanol
9. Lavar con 1 mL de etanol al 75% y resuspender el precipitado
10. Centrifugar 5 minutos a 7.500 rpm y 4°
11. Eliminar el etanol
12. Secar y resuspender en 30-40  $\mu$ L de agua pura (según el tamaño del precipitado)
13. Congelar las muestras a -80 °