

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

**UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL GENOTIPADO DE
MATERIALES ÚTILES EN LA MEJORA DE LA RESISTENCIA A NEMATODOS
EN PIMIENTO: GENOTIPOS DE *Capsicum annuum* L. Y *Capsicum
frutescens* L., HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS *C. annuum* X *C. frutescens* Y
PLANTAS DE PIMIENTO REGENERADAS EN CULTIVO DE ANTERAS.**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: ANDRÉS ELCIAS CRESPO IBOR

TUTORAS:

MARÍA DEL CARMEN GISBERT DOMENECH

ALICIA GEMMA SIFRES CUERDA

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, 22 DE MAYO DE 2015

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL GENOTIPADO DE MATERIALES ÚTILES EN LA MEJORA DE LA RESISTENCIA A NEMATODOS EN PIMIENTO: GENOTIPOS DE *Capsicum annuum* L. Y *Capsicum frutescens* L., HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS *C. annuum* X *C. frutescens* Y PLANTAS DE PIMIENTO REGENERADAS EN CULTIVO DE ANTERAS.

Abstract

In this paper we have used different molecular markers for genotyping interesting material in improving nematode resistance in pepper. In particular the objectives of this study were: to determine the presence of genes of interest in cultivars of *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*, check the hybrid nature of plants resulting from interspecific crosses (*C. annuum* x *C. frutescens*) and determine the haploid or double-haploid character in pepper plants regenerated by another culture. The interspecific hybrids come from trials embryo rescue in vitro culture. Markers used and work done have allowed cover all the objectives. Therefore, it offers a useful methodology and materials for use in various breeding programs.

Resumen

En el presente trabajo se han utilizado distintos marcadores moleculares para genotipar materiales de interés en la mejora de la resistencia a nematodos en pimiento. En concreto los objetivos de este trabajo han sido: determinar la presencia de genes de interés en cultivares de *Capsicum annuum* y *Capsicum frutescens*, comprobar el carácter híbrido de plantas resultantes de cruces interespecíficos *C. annuum* x *C. frutescens* y determinar el carácter haploide o doble-haploide en plantas de pimiento regeneradas por cultivo de anteras. Los híbridos interespecíficos provienen de ensayos de rescate de embriones en cultivo in vitro. Los marcadores utilizados y el trabajo realizado han permitido cubrir todos los objetivos planteados. Por lo tanto, se dispone de una metodología y de materiales muy útiles para su uso en distintos programas de mejora.

Key words: Molecular markers, microsatellites, resistance to nematodes, pepper, *C. frutescens*, *C. annuum*, breeding, PCR.

Palabras clave: Marcadores moleculares, microsatélites, resistencia a nematodos, pimiento, *C. frutescens*, *C. annuum*, mejora genética, PCR.

Alumno: Andrés Elcias Crespo Ibor

Valencia Mayo 2015

Tutores: María del Carmen Gisbert Doménech; Alicia Gemma Sifres Cuerda.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SITUACIÓN BOTÁNICA Y ORIGEN	1
1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA	3
1.3. EXIGENCIAS CLIMÁTICAS EN EL CULTIVO DEL PIMIENTO	4
1.4. PRINCIPALES PROBLEMAS EN EL CULTIVO DE PIMIENTO DULCE	5
1.4.1. Estreses de tipo biótico y abiótico	6
1.4.2. Los nematodos: programas de mejora	7
1.5. MARCADORES MOLECULARES	9
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. MATERIAL VEGETAL	15
3.2. EXTRACCIONES DE ADN	15
3.3. DETECCIÓN DE MARCADORES LIGADOS A LOS GENES DE RESISTENCIA	16
3.3.1. Condiciones de la amplificación de marcadores tipo SCAR	16
3.3.2. Condiciones de la amplificación de marcadores tipo CAPS	17
3.3.2.1. Digestion de la PCR F4_R4	18
3.3.3. Condiciones de la amplificación de marcadores tipo SSR	18
3.3.3.1. Separación de los productos amplificados.	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A NEMATODOS EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO	21
4.1.1. MARCADOR N_SCAR	21
4.1.2. MARCADOR SCAR_B94	22
4.1.3. MARCADOR CAPS_F4_R4	23
4.2. UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA DETERMINAR EL CARÁCTER HÍBRIDO DE PLANTAS RESULTANTES DE CRUCES <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	24
4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS DE PIMIENTO OBTENIDAS EN CULTIVOS DE ANTERAS	26
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla nutricional por 100 gr de pimiento y chiles.

Tabla 2. Enfermedades fungosas y efectos en la planta.

Tabla 3. Enfermedades bacterianas y efectos en la planta.

Tabla 4. Nematodos parasitarios y efectos en la planta.

Tabla 5. Enfermedades víricas y efectos en la planta.

Tabla 6. Cultivares utilizados para la realización de los experimentos.

Tabla 7. Marcadores específicos de PCR desarrollados a partir de AFLPs ligados a los genes de resistencia a nematodos Me (Fazari et al., 2012).

Tabla 8. Composición de la reacción de PCR por cada 15 μ l utilizando marcadores tipo SCAR.

Tabla 9. Secuencia de los cebadores correspondientes a los marcadores tipo SCAR.

Tabla 10. Composición de la reacción de PCR por cada 15 μ l utilizando marcadores tipo SCAR.

Tabla 11. Secuencia de los cebadores correspondientes a los marcadores tipo CAPS.

Tabla 12. Microsatélites utilizados en la caracterización de los diferentes individuos estudiados.

Tabla 13. Composición de la reacción de PCR por cada 15 μ l utilizando marcadores tipo SSR.

Tabla 14. Resultados en pb tras la separación de productos amplificados en los parentales utilizando SSR.

Tabla 15. Tamaños de los fragmentos amplificados (en pb) utilizando marcadores SSRs codominantes.

Tabla 16. Resultados en pb tras la separación de productos amplificados utilizando SSR de los individuos *C. annuum* y de los respectivos obtenidos por cultivo de anteras.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía género *Capsicum*.

Figura 2. Exportaciones de pimiento por comunidades autónomas en % (FEPEX, 2013).

Figura 3. Pimientos tipo Lamuyo.

Figura 4. Pimiento tipo California.

Figura 5. Modelo de un mapa integrado del extremo distal del cromosoma P9 de pimiento obtenido utilizando marcadores de mapeo común a los genes *N* y *Me* utilizando el software CARTHAGENE (Fazari et al., 2012).

Figura 6. Esquema de las condiciones de PCR empleadas para la amplificación utilizando los marcadores tipo SCAR.

Figura 7. Esquema de las condiciones de PCR empleadas para la amplificación utilizando los marcadores tipo CAPS.

Figura 8. Esquema de las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de los marcadores tipo SSR.

Figura 9. Patrón de picos obtenido en el secuenciador. Se observa el resultado de la amplificación de ocho loci microsatélites diferentes de una única muestra. En rojo aparece el patrón de pesos moleculares.

Figura 10. Separación de los productos amplificados N_SCAR mediante electroforesis en gel de acrilamida.

Figura 11. Separación de los productos amplificados SCAR_B94 mediante electroforesis en gel de acrilamida. El resultado obtenido se comprobó posteriormente mediante la separación de los productos amplificados con el secuenciador automático ABI/PRISM 3100.

Figura 12. Resultado de la digestión de los productos amplificados en la PCR CAPS_F4R4 con genotipos de la especie *C. annuum* (27, 28 y 34) y *C. frutescens* (94 y 97) en gel de agarosa al 1,5%.

Figura 13. Resultado de la digestión de los productos amplificados en la PCR CAPS_F4R4 con genotipos híbridos resultantes del cruce *C. annuum* x *C. frutescens* a excepción del genotipo F82 en gel de agarosa al 1,5%.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Dioxirribonucleico.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism.

BSA: Bulked Segregant Approach.

CAM: Conserved Avian Microsatellite.

CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence.

CMV: Celery Mosaic Virus.

cv.: Cultivar

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FEPEX: Federación Española de Asociación de Productores Exportadores.

g: gramos.

HR: Humedad Relativa.

IBA: Ácido indolbutírico.

Kb: Kilo bases.

kcal: Kilocalorías.

mA: Mili amperios.

MAAP: Multiple Arbitrary Amplicon Profiling.

mg: miligramos.

mM: Mili molar.

ng: nano gramos.

nm: nanómetro.

pb: pares de bases.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PVMV: Pepper Veinal Mottle Virus.

PVP: Polivinilpirrolidona.

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

SCAR: Sequence-Characterized Amplified Region.

SNP: Single-Nucleotide Polymorphism.

SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism.

SSR: Simple Sequence Repeat.

STS: Sequence Tagged Site.

TMV: Tobacco Mosaic Virus.

UI: Unidades Internacionales.

UV: Ultravioleta.

V: Voltios.

μl: Micro litro.

μM: Micro molar.

°C: Grados Celsius.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SITUACIÓN BOTÁNICA Y ORIGEN

El pimiento pertenece al género *Capsicum* que abarca muchas especies cultivadas en las que encontramos los tradicionalmente denominados pimientos, pebreras, chiles o ajíes utilizados durante toda la historia por los seres humanos en ámbitos de alimentación. *Capsicum*, podría proceder bien del griego *kapso* (picar) o bien *kapsakes* (cápsulas). La palabra “*Capsicum*” fue usada por primera vez por Tournefort en 1719 para describir el género, siendo adoptada más tarde por Linneo. Este género se incluye en la extensa familia de las solanáceas (Nuez et al., 2003)(Figura 1).

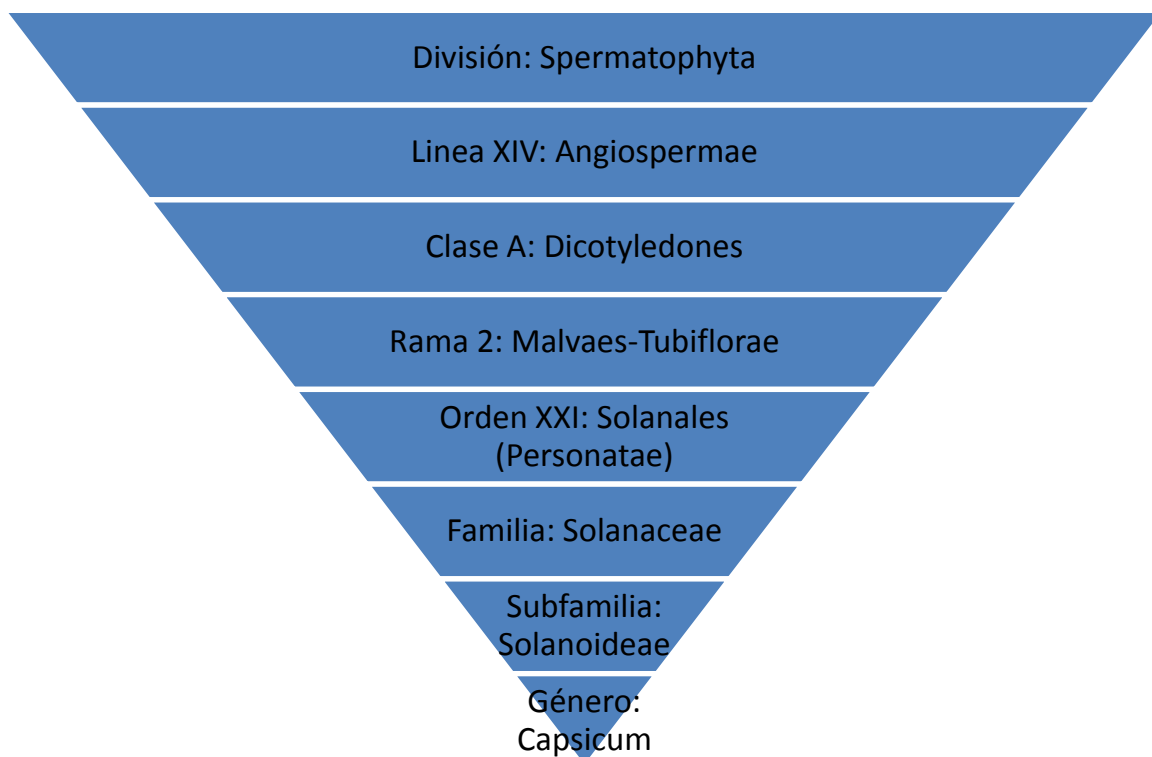


Figura 1. Taxonomía del género *Capsicum*.

La taxonomía dentro del género *Capsicum* es compleja debido a la gran variedad de formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de criterios utilizados en la clasificación. Todas las especies del género *Capsicum* se originaron en los trópicos del Nuevo Mundo, siendo Méjico el centro de diversidad de *Capsicum annuum* L., la especie cultivada más importante. Las especies silvestres relacionadas con *C. annuum* se han encontrado desde el sur de Texas hasta Argentina, siendo las regiones del Amazonas en América del Sur el centro de diversidad de *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. y *Capsicum baccatum* L., todas estas especies cultivadas. A pesar de ello la cruzabilidad entre estas especies es limitada lo que dificulta la transferencia de genes de interés entre ellas.

La diversidad varietal de este género propicia que sean muchos los nombres que se utilizan comúnmente, chiles, ajíes, guindillas o pimiento, para referirse a las diferentes especies de *Capsicum*.

C. annuum var annuum, a la que llamamos comúnmente pimiento, es la más popular y económicamente importante de todas, y abarca muchas variedades (Rodríguez-Burruezo y Nuez, 2006). A esta especie pertenecen tipos varietales como los pimientos tipo California Wonder, Lamuyo, chiles serranos, pimientos morrones, guindillas de encurtir, pimientos de piquillo, jalapeños o pimientos del padrón.

C. chinense es otra especie dentro del género *Capsicum* donde el 'Chile Habanero' es la variedad más conocida. Los frutos de las plantas de esta especie se utilizan como condimento alimenticio en muchas culturas, como la mexicana, por su sabor picante. Otra especie conocida comúnmente como chile y utilizada para elaborar salsas picantes es *C. frutescens*, su tipo más conocido es el 'Chile Tabasco'. Esta especie es una especie semicultivada, pues aunque se han desarrollado varias líneas cultivadas en muchas regiones de Sudamérica sus frutos son recolectados de plantas que crecen espontáneamente en la naturaleza. Se trata de la especie menos domesticada, como consecuencia de esto, dentro del género *Capsicum*, *C. frutescens* cuenta con la mayor variabilidad morfológica (De Witt y Bosland, 1996).

Por último utilizamos el nombre de guindillas para referirnos comúnmente a los diferentes cultivares dentro de la especie *C. baccatum*. Aunque la mayoría de los genotipos de esta especie producen frutos de sabor pungente, es la única, junto a *C. annuum*, en la que se pueden encontrar algunos cultivares de fruto dulce.

Aunque se pensaba que la domesticación del pimiento pudo haberse dado hace 4000 años, se han encontrado restos de pimiento en yacimientos arqueológicos en Méjico datados en más de 7000 años A.C., hecho que apunta a una domesticación aún más temprana por parte de los nativos americanos (Crosby, 2008).

Se sabe que el pimiento fue introducido en el Viejo Mundo por Colón tras su viaje de regreso del nuevo continente descubierto en el año 1492. En el siglo XVI ya se había difundido su cultivo en España, desde donde se distribuyó a Europa y al resto del mundo con la colaboración de los portugueses. Su introducción en Europa supuso un avance culinario, ya que vino a complementar e incluso sustituir a otro condimento muy utilizado como era la pimienta negra (*Piper nigrum L.*), de gran importancia comercial entre Oriente y Occidente (Urríos y Aguilar-Amat, 2006).

La diversidad de frutos y tipos de plantas dentro de la especie *C. annuum* señala la enorme selección llevada a cabo por el hombre a lo largo de numerosas generaciones. Aunque la variabilidad a nivel de fruto que encontramos en pimiento es menor que en otras especies cultivadas, está claro que la selección por parte del hombre ha ocurrido de forma paralela en varias regiones y con diferentes objetivos. En los últimos cien años se le ha prestado mayor atención a la mejora y selección dentro de *C. annuum* que en las otras especies, probablemente este sea el resultado de la distribución más extensa de esta especie por parte de los primeros exploradores europeos por todo el mundo (Crosby, 2008).

1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

El pimiento aporta distintos compuestos importantes desde el punto de vista nutricional (Tabla 1) y se le atribuyen propiedades medicinales ya que es un producto con propiedades digestivas y diuréticas. En estado maduro proporciona a nuestro organismo una gran cantidad de Vitamina C, incluso más que los cítricos (Valdés, 2006). Su alto aporte de esta vitamina le hace especialmente importante en las dietas desintoxicantes, además de las innumerables ventajas que aporta esta vitamina al cuerpo humano, como la adecuada absorción de hierro, calcio y otros aminoácidos (Yoshioka et al., 1995).

Las diferentes especies del género *Capsicum* producen frutos que sintetizan y acumulan carotenoides, los tipos y niveles de estos difieren entre variedades y dependen del estado de maduración del fruto (Gómez & Ochoa-Alejo, 2013). En su estado maduro aproximadamente un 60% de los carotenoides totales son β -carotenos, además contiene un alto contenido en capsaicina, una oleoresina responsable del sabor picante a la cual se le atribuyen propiedades adelgazantes y analgésicas (Vidal et al., 2004).

Tabla 1. Tabla nutricional por 100 g de pimiento y chiles.

	Pimiento dulce		Pimientos picantes
	Crudos Verdes	Crudos Rojos	Chiles
Agua	92,1 g	92,1 g	92,5 g
Energía	113 kcal	113 kcal	21 kcal
Grasa	0,19 g	0,19 g	0,10 g
Proteína	0,89 g	0,89 g	0,90 g
Hidratos de carbono	6,43 g	6,43 g	5,3 g
Fibra	1,8 g	2 gr	1,3 g
Potasio	177 mg	177 mg	187 mg
Fósforo	19 mg	19 mg	17 mg
Magnesio	10 mg	10 mg	14 mg
Calcio	9 mg	9 mg	7 mg
Vitamina C	89,3 mg	190 mg	68 mg
Vitamina B2	0,03 mg	0,03 mg	0,05 mg
Vitamina B6	0,248 mg	0,248 mg	0,153 mg
Vitamina A	632 IU	5700 IU	610 IU
Vitamina E	0,69 mg	0,69 mg	0,69 mg
Niacina	0,5 mg	0,5 mg	0,8 mg
Carotenos	5-10 mg	50 mg	± 0,5 g

La superficie dedicada al cultivo de los distintos tipos varietales que existen de pimiento varía considerablemente en cada país, en función del uso, costumbres, volúmenes y destino de las exportaciones. En los países africanos y asiáticos, dominan los picantes, en los de Europa occidental los tipos dulces, en Europa oriental tienen gran importancia los del tipo paprika y en America tanto los picantes como los dulces. El continente que tiene mayor extensión de terreno dedicada al cultivo del pimiento es Asia, donde se concentra más de la mitad de la superficie destinada a este cultivo. En cuanto a producción, destacan países como China, Turquía e Indonesia con el primero, tercero y cuarto lugar respectivamente en el ranking mundial respecto a la superficie cultivada. El segundo continente en importancia por su producción es África, seguida muy cerca por Europa. En África

destaca principalmente Nigeria, ocupando el octavo lugar en el escalafón mundial, mientras que en Europa los mayores productores son, España, Holanda y Rumanía. En América los países con la mayor superficie son México y USA. Estos se destacan mundialmente por la superficie de dedicada a este cultivo, ocupando el segundo y quinto lugar respectivamente (FAO, 2013).

El pimiento es un cultivo con tres destinos de consumo: pimiento en fresco, para pimentón y para conserva. En los últimos años ha crecido la demanda de pimiento fresco en toda Europa provocando que aumente el cultivo de éste en invernaderos a lo largo de todo el litoral mediterráneo español. El pimiento es uno de los cultivos hortícolas bajo invernadero con mayor superficie cultivada en nuestro país, localizándose casi la mitad de la producción en Almería, Alicante y Murcia. En 2013, la exportación de hortalizas se incrementó en nuestro país un 11% en valor y un 10% en volumen, totalizando 4.331 millones de euros y 4,6 millones de toneladas. Las principales hortalizas exportadas han sido tomate con 988 millones de euros (+7%), pimiento con 718 millones de euros (+18%), lechuga con 568 millones de euros (-3,5%), y pepino con 464 millones de toneladas (+8%). Almería es la provincia que ocupa el primer lugar en la exportación española de pimiento, con gran diferencia sobre el resto de provincias. En el año 2013 el total de exportaciones españolas de pimiento alcanzó las 564.254 toneladas, de las que se exportaron desde Almería un total de 388.957 toneladas, seguida de Murcia con 70.048 y de Alicante con 47.395 toneladas (Figura 2)(FEPEX, 2013) .

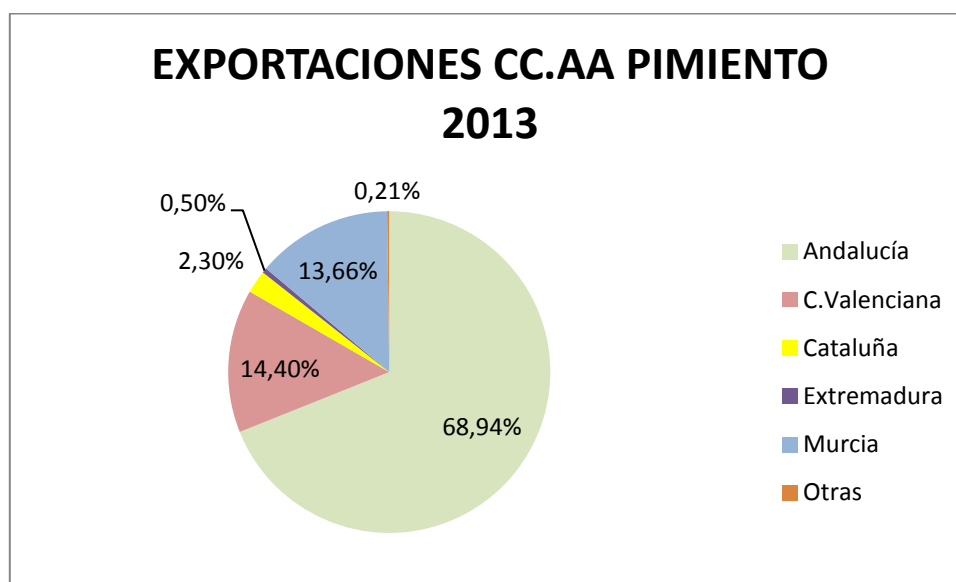


Figura 2. Exportaciones de pimiento por comunidades autónomas en % (FEPEX, 2013).

1.3. EXIGENCIAS CLIMÁTICAS EN EL CULTIVO DEL PIMIENTO

El pimiento es más exigente en temperatura que el tomate y soporta muy mal las temperaturas bajas (por debajo de 8-10 °C las plantas no vegetan), lo que puede provocar endurecimientos y parones en las plantas, que a su vez puede producir un exceso de cuajado de frutos pequeños y de muy mala calidad. Sin embargo, soporta mejor las temperaturas altas que el tomate, sobre todo si van acompañadas de una buena humedad relativa. Dichas temperaturas, en las cosechas de primavera-verano, producen una reducción de la calidad del fruto por pérdida de tamaño y color más deficiente; e incluso pueden aumentar la incidencia de Blossom. En las plantaciones tempranas de

pleno verano las altas temperaturas producen un crecimiento desbocado de las plantas que dificulta fuertemente el cuajado de las flores.

Los cultivos forzados tratan de disminuir el efecto negativo de las temperaturas bajas en el cultivo. Para conseguirlo se debe cubrir el invernadero con plásticos “térnicos”, materiales que son muy permeables a la radiación visible (solar) y poco permeables a las radiaciones de onda larga que enfrían el invernadero por la noche. La calefacción como técnica de forzado se ha instalado fuertemente en los invernaderos de Alicante-Murcia, dadas las mayores necesidades térmicas del tipo California, que son los que se cultivan en esta zona, y del aumento de los cultivos sin suelo, en los que la necesidad de calefacción es mayor, y gracias a la mejora en las estructuras de invernadero, más altos, mejor ventilados, más estancos y más automatizados. En Almería la calefacción es muy poco utilizada y no parece que haya perspectivas de incrementar su empleo; el ciclo de cultivo con planta adulta en invierno no tiene las mismas necesidades que la planta pequeña en invierno de Alicante-Murcia, mucho más sensible al frío y quizá por ello no se vea muy claro su rentabilidad (de Dios, 2006).

En los últimos años la mejora de las estructuras de los invernaderos, la utilización de mejores forzados (calefacción), las mejoras del material vegetal y, sobre todo, la demanda del mercado, ha motivado un fuerte avance de los pimientos tipo California, especialmente los de maduración en rojo, a costa especialmente de los tipo Lamuyo, siendo éstos menos sensibles al frío y por tanto de cultivo menos delicado (de Dios, 2006).

1.4. PRINCIPALES PROBLEMAS EN EL CULTIVO DE PIMIENTO DULCE

Los principales problemas en el cultivo del pimiento son los relacionados con la disminución de la producción debida a distintos estreses de tipo biótico y abiótico. Los programas de mejora intentan aumentar la producción sin mermar la calidad de los frutos. En estos programas se incluyen distintos tipos de pimiento, entre los que predominan los dulces Lamuyo (Figura 3) y California (Figura 4). La mayoría de estudios están relacionados con la obtención de resistencias o tolerancias a distintos tipos de estrés que merman la producción. En otros programas de mejora también se intenta obtener mayor precocidad y alargar el tiempo de cultivo.



Figura 3. Pimientos tipo Lamuyo.



Figura 4. Pimiento tipo California.

1.4.1. Estrés de tipo biótico y abiótico

El pimiento es un cultivo diana tanto de hongos, bacterias, nematodos y virus. En las tablas 2, 3, 4 y 5 se mencionan diferentes enfermedades producidas por los distintos organismos biológicos que atacan al pimiento y los efectos que tienen estos sobre la planta.

Tabla 2. Enfermedades fúngicas y efectos en la planta.

Hongo	Efectos
<i>Cercospora capsici</i> Heald & F.A. Wolf	Mancha de las hojas
<i>Colletotrichum capsici</i> , E.J. Butler & Bisby	Antracnosis
<i>Phytophthora capsici</i> , Leonian	Quemazón o Añublo
<i>Fusarium</i> , Link	Pudrición y marchitamiento
<i>Pythium spp</i> y <i>Rhizoctonia Solani</i> , Pringsheim	Mal del talluelo (Damping Off)
<i>Leveillula taurica</i> , G. Arnaud	Mildeo polvoso
<i>Stemphylium solani</i> , Weber	Mancha foliar grisácea

Tabla 3. Enfermedades bacterianas y efectos en la planta.

Bacteria	Efectos
<i>Erwinia caratovor</i> , Winslow et al.	Pudrición blanda del fruto
<i>Pseudomonas solanacearum</i> , Smith	Marchitamiento bacteriano

Tabla 4. Nematodos parasitarios y efectos en la planta.

Nematodos	Efectos
<i>Helicotylenchus</i> , Steiner	Parasitación
<i>Aphelenchus</i> , Bastian	Parasitación
<i>Meloidogyne ssp.</i>	Parasitación y formación de agallas

Tabla 5. Enfermedades víricas y efectos en la planta.

Virus	Efectos
Virus del mosaico del tabaco (TMV)	Pérdida efectos fenotípicos característicos
Virus moteado venal del pimiento (PVMV)	Pérdida parcial de pigmentación
<i>Potyvirus</i> (ej: CMV)	Pérdida parcial de pigmentación

En cuanto a los estrés de tipo abiótico existen multitud de ellos afectando a casi la totalidad de los cultivos. Existen ciertas especies que han desarrollado mecanismos contra estos tipos de estrés sin embargo la familia de las solanáceas es bastante susceptible a estos fenómenos de tipo abiótico que provocan alteraciones del metabolismo celular de la planta. Los estrés abióticos más comunes que se pueden observar en cultivares del género *Capsicum* son el exceso o la falta de luz, la presencia de temperaturas extremas, la falta o exceso de agua, la presencia de iones metálicos como Al^{+3} , Pb^{+2} o no metálicos como Na^{+} en los suelos y la presencia de contaminantes atmosféricos (O_3 , NO , N_2O , CO). Estos factores afectarán en mayor o menor medida dependiendo de las condiciones climáticas del lugar donde se encuentre el cultivar.

1.4.2. Los nematodos: programas de mejora

Dentro de los estreses de tipo biótico los nematodos del género *Meloidogyne* causan grandes pérdidas en pimiento y en otros cultivos (tomate, pepino y calabacín). Éstos producen los llamados “rosarios” o “agallas” en las raíces, induciendo a una distorsión de los tejidos y por consiguiente interfiriendo en la absorción de agua y nutrientes (Souza-Sobrinho et al., 2002). Dentro de este género las especies más importantes en hortícolas son *M. hapla*, *M. arenaria* y *M. javanica*, y principalmente *M. incognita*, que es la especie que ataca con mayor severidad. Estos nematodos son endoparásitos sedentarios de naturaleza polífaga y cuentan con una amplia gama de hospedantes alternos de climas cálidos, donde se desarrollan sobre todo en suelos arenosos (Oka et al., 2004). Los síntomas no suelen atribuirse con facilidad a esta enfermedad, y en muchas ocasiones se pueden confundir con deficiencias nutricionales de la planta o con manejos agronómicos inapropiados (fertilización, salinidad, etc.). Estos síntomas se manifiestan por un retraso en el crecimiento inicial, clorosis ascendente, menor vigor, menor cuajado y tamaño de los frutos y senescencia precoz. Además muchos de los problemas se agravan por el sinergismo existente entre nematodos y otros microorganismos patógenos (Nuez et al., 2003).

Los problemas debidos a estos patógenos han aumentado desde la retirada del bromuro de metilo como desinfectante de suelos, lo que ha incrementado el interés por la búsqueda de germoplasma resistente.

En pimiento se han descrito varios genes de resistencia dominantes (genes R) que están bien caracterizados por su espectro de resistencia a RKNs (Root-knot nematodes), los genes *Me* y los genes *N* (Hare, 1956; Hendy et al., 1985 a, b; Djian Caporalino et al., 1999; Thies y Fery, 2002). Djian Caporalino et al. (1999, 2001, 2007) lograron identificar varios genes dominantes independientes (genes *Me*) que confieren resistencia a nematodos en líneas puras de cultivares genéticamente distantes: PM217 derivada de PI 201234 (cultivar de India), PM687 derivada de PI322719 (América Central) y PM702 derivada de Criollo de Morelos 334 (Méjico). En concreto, encontraron tres genes de resistencia: *Me1* (en PM217), *Me3* (en PM687) y *Me7* (en PM702), que controlan la resistencia dominante y termoestable a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*. Actualmente, se piensa que *Me3* y *Me7* podrían ser alelos simples del mismo gen (Djian-Caporalino et al., 2011).

Además estos autores, descubrieron dos loci: *Mech1* (en PM702) y *Mech2* (en PM217) que controlaban la resistencia a *M. chitwoodi* y el gen *Me4* (en PM687) que confiere resistencia a *M. arenaria* Ain Taoujdate.

Los genes *Me* se mapearon usando marcadores AFLPs y el análisis en grupos segregantes (Bulked Segregant Approach, BSA). Todos ellos se encuentran agrupados en una región que comprende 28 cM en el cromosoma 9 colineal con otros loci de resistencia a nematodos en *Solanaceae* (Djian Carporalino et al., 2007). A partir de los marcadores AFLP ligados a los genes *Me* se desarrollaron marcadores específicos, los cuales se describen más adelante.

En cuanto al gen de resistencia *N* se encontró en primer lugar en ‘Mississippi Nameheart’ (*C. annuum*), este confiere resistencia a *M. arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* (Hare, 1957). Fery et al. (1998) introdujo el gen *N* en ‘Yolo Wonder B’ (*C. annuum*) y en ‘Keystone resistant giant’ (*C. annuum*) desarrollando dos líneas puras resistentes: ‘Carolina Wonder’ y ‘Charleston Bell’. Wang

et al. (2009) describieron un marcador ligado al gen de resistencia *N* (*N_SCAR*) que ha sido utilizado junto con los marcadores descritos para los genes *Me* para genotipar distintos cultivares de pimiento con tolerancia a nematodos (Gisbert *et al.*, 2013). Fazari *et al.* (2012) desarrollaron nuevos marcadores basados en PCR y demostraron que el gen *N* está localizado con los genes *Me* en el cromosoma P9, en concreto a 7cM de *Me1* y a 2 cM de *Me3* (Figura 5) el cual se confirmó que era alélico a *Me7*.

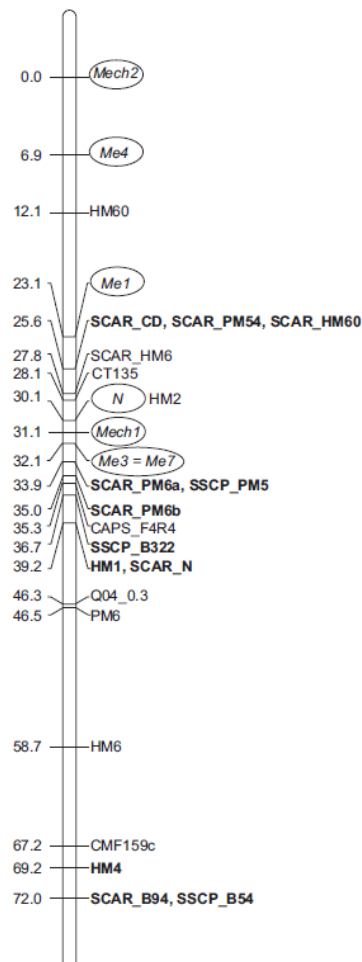


Figura 5. Modelo de un mapa integrado del extremo distal del cromosoma P9 de pimiento obtenido utilizando marcadores de mapeo común a los genes *N* y *Me* utilizando el software CARTHAGENE (Fazari *et al.*, 2012).

Mientras que los genes *N* presentan dependencia de la temperatura (Ammati *et al.*, 1986; Thies y Fery, 1998), los genes *Me3* y *Me1* son estables a altas temperaturas. Sin embargo, estos dos tipos de genes difieren en el modo de actuación, mientras que el primero actúa produciendo reacción hipersensible de manera temprana en la epidermis el segundo lo hace de forma tardía en el córtex (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998; Pegard *et al.*, 2005).

Además de los genes *Me* y *N*, existen fenómenos externos que modifican el grado de resistencia, como la temperatura del suelo, la variabilidad intrínseca en las poblaciones del suelo y los niveles de sinergismo que presentan los nematodos con otro grupo de microorganismos patógenos del suelo (Thies y Fery, 1998; Costa *et al.*, 2007).

Las variedades comerciales de pimiento actuales son sensibles a nematodos (Costa et al., 2007). Los programas de mejora relacionados con la resistencia a nematodos en pimiento están relacionados con la identificación de germoplasma portador de genes de resistencia y la introgresión de estos caracteres desde las fuentes de resistencia a cultivares sensibles. Los cultivares resistentes deben de ser un elemento clave para el control de los patógenos, ya que el uso de plaguicidas puede dar a lugar a la aparición de poblaciones de patógenos virulentos capaces de superar la resistencia. Djian-Caporalino et al seleccionaron los genes *Me1* y *Me3* como genes independientes con diferentes modos de acción frente a la virulencia, mediante la técnica 'gene pyramiding' consiguieron reducir hasta en un 90% la tasa de infestación del suelo, además se demostró que también puede aumentar la durabilidad del efecto de los genes de resistencia (Djian Caporalino et al., 2014).

Con el fin de introgresar un carácter de interés se puede realizar cruzamientos entre especies distintas para la transferencia de genes existentes en una especie en el fondo genético de la especie deficitaria. El éxito de los cruzamientos va a depender de la compatibilidad sexual entre las especies a cruzar. Existen una serie de incompatibilidades como pueden ser barreras precigóticas, (si se dan antes de la fecundación), o postcigóticas, (si se dan con posterioridad a la formación del cigoto) que limitan la utilización de algunos materiales. En el caso de barreras postcigóticas la utilización de técnicas como el rescate de embriones en sus primeras fases del desarrollo (globular o corazón) utilizando técnicas de cultivo *in vitro* puede posibilitar la obtención de plantas híbridas. Otra técnica de cultivo *in vitro* de gran interés en los programas de mejora es el cultivo de anteras que consiste en cultivar anteras inmaduras en un medio de inducción donde las micrósporas competentes originarán callos, que serán transferidos a un medio apropiado para la regeneración de plantas. Con esta metodología se obtienen individuos haploides, que no tienen valor agronómico por sí mismos, son fundamentales para obtener líneas puras de plantas en una sola generación. Estas líneas, con genes en homocigosis son de gran utilidad para derivar posteriormente híbridos. Esta técnica puede aplicarse solo en aquellos genotipos que responden favorablemente a este tipo de cultivo.

Además de estas metodologías la utilización de marcadores moleculares es de gran ayuda en todos los programas de mejora. Como ya hemos citado en el caso de los nematodos se han descrito en pimiento diferentes tipos de marcadores que permiten detectar la presencia o ausencia de ciertos genes ligados a estos, en un principio AFLPs que fueron convertidos en marcadores específicos tipo SCAR, CAPS o SSCPs (Djian-Caporalino *et al.*, 2007, 2011, 2014). De la misma manera, los marcadores microsatélite pueden ser de ayuda para la detección del material haploide o doblehaploide de interés.

En el punto siguiente se describen todos estos marcadores moleculares.

1.5. MARCADORES MOLECULARES

Podemos definir los marcadores moleculares como biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético, entre estas encontramos proteínas como antígenos e isoenzimas y ADN ya sean genes conocidos o fragmentos de secuencia y/o función desconocida. Cuando se asocian varios marcadores moleculares con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Existen marcadores monomórficos los cuales son invariables en todos

los organismos estudiados y marcadores polimórficos cuando presentan diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariables.

A finales de los años 70 se empezaron a desarrollar los primeros marcadores moleculares basados en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Esto permitió tener un mayor conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre las diferentes especies (Lyrene, 2008). Pero esta técnica tenía una limitación muy importante ya que no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra.

Soller y Beckmann demostraron en 1983 la importancia del empleo de marcadores moleculares como una herramienta adicional en la descripción varietal, debido a que el control genético de caracteres morfológicos es mayoritariamente poligénico y su expresión depende de factores medioambientales. Se ha demostrado también que los marcadores moleculares son útiles para entender la mejora genética de los cultivos agrícolas. Los marcadores moleculares difieren de los morfológicos en diversos aspectos, en primer lugar, los marcadores moleculares suelen aparecer en mayor número; en segundo lugar, pueden distinguirse sin necesidad de que la planta complete su desarrollo; y en tercer lugar, su expresión no se ve alterada por el medio ambiente (Geleta et al., 2004).

Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en ADN, consiguiendo una cierta estabilidad en la identificación de especies y variedades.

A medida que avanzan los estudios existe un mayor número de técnicas descritas las cuales se pueden clasificar en tres categorías: RFLP, MAAP y STS.

RFLP (*Restriction fragment length polymorphism; Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción*).

Técnica desarrollada a finales de los 70 basada en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos. En esta técnica son más fáciles de analizar los fragmentos pequeños derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o cloroplastos, puesto que delecciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo a su peso molecular. En cambio, para moléculas de DNA de mayor tamaño, como el DNA cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot. Las sondas de DNA para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan DNA preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque los RFLP evalúan sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP (PubMed, 2014 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>).

SNP (*Single-nucleotide polymorphism; Polimorfismo de nucleótido simple*).

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) son un tipo de polimorfismo que produce una variación en un solo par de bases. Sin embargo, algunos autores consideran que cambios de unos pocos nucleótidos, como también pequeñas inserciones y deleciones pueden ser considerados como SNP, dicho cambio debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como SNP. La ventaja de este tipo de marcador es que existe una media de un SNP cada 200 pb, se puede entonces mapear muy estrechamente dónde se encuentra determinada mutación (Gibson y Muse, 2004).

MAAP (*Multiple arbitrary amplification profiles; Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación*).

Término genérico acuñado en 1994 por Caetano-Anolles con el que se designan las técnicas que emplean oligonucleótidos arbitrarios. Entre estas técnicas cabe destacar:

- **RAPD** (*Random Amplified Polymorphic DNA; DNA polimórfico amplificado al azar*): Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990. Es muy cómoda, rápida, requiere poco ADN que además no necesita estar muy purificado, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia, y se puede distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos (Williams et al., 1990). Algunos de los inconvenientes son que los fragmentos amplificados no suelen corresponder a ADN ligado a algún carácter, sino redundante y que no da información del número de copias que tiene la secuencia amplificada, es decir es un marcador dominante. Esta tecnología se ha utilizado para la catalogación de frutos, selección de variedades, y diferenciación de líneas clonales.
- **AFLP** (*Amplified fragment length polymorphism; Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados*): Técnica desarrollada en 1995 que combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, pudiendo obtenerse marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. El ADN se corta con dos enzimas de restricción uno de corte muy frecuente y otra de corte poco frecuente, a los fragmentos obtenidos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas usadas y se amplifica por PCR. Dependiendo de la complementariedad de oligonucleótidos con el sitio de restricción se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas. La principal ventaja es que es capaz de generar muchos marcadores moleculares en una sola reacción, por esto el resultado debe resolverse en un gel de poliacrilamida de alta resolución (Vos et al., 1995). Los marcadores AFLP fueron utilizados por diferentes autores (Djian-Corporalino et al., 2007; Fazari et al., 2012) para buscar marcadores ligados a los genes de resistencia a nematodos que fueron transformados en marcadores específicos de PCR tipo SCAR y CAPS que comentamos más adelante.
- **STS** (*Sequence-Tagged Sites; Sitios etiquetados por la secuencia*): Desarrollada a partir de 1989, aprovecha secuencias conocidas únicas dentro del genoma para amplificarlas por PCR. Permite detectar de manera rápida el polimorfismo cuando lo que se amplifica son intrones en lugar de exones. La principal ventaja es la velocidad con la que se pueden realizar los análisis. (Olson et al., 1989). Se combina por tanto la rapidez del RAPD con la especificidad de la AFLP. Por la manera en que se determinan los oligonucleótidos y por la forma de analizar

los polimorfismos, esta técnica ha derivado en otras que enumeramos a continuación, dentro de las cuales desarrollamos las utilizadas en el presente trabajo:

- **SSR o microsatellite** (*Simple Sequence Repeat; Repetición de secuencias discretas*): Descrita en 1989, los microsatélites son marcadores basados en PCR que han sido desarrollados en muchas especies, entre las que se incluyen la mayoría de los cultivos como maíz, sorgo, trigo y cebada, así como cultivos hortícolas. Los marcadores microsatélites tienen la ventaja de ser multialélicos, altamente polimórficos y codominantes, además han sido desarrollados y utilizados para el mapeo génico de solanáceas hortícolas entre las que se incluyen el tomate, la patata y la berenjena. Desafortunadamente, los marcadores microsatélites desarrollados en otras especies de solanáceas no pueden ser utilizados en la mejora de especies del género *Capsicum*, a pesar de que existe una estrecha relación poligénica entre las especies.

Desde 2006 se dispone de un mapa de ligamiento con marcadores microsatélites en pimiento, para ello han utilizado cruces interespecíficos entre *C. annuum* y *C. chinense*. Dicho mapa contiene 46 marcadores SSR, que muestran un nivel relativamente alto de polimorfismo en los cruces interespecíficos, que son los más utilizados dentro de los programas de mejora en pimiento (Minamiyama et al., 2006). Sin embargo, el nivel de polimorfismo puede descender en dentro de *C. annuum*. Actualmente se dispone del genoma completo del pimiento lo que facilita la localización de los diferentes marcadores (Kim et al., 2014).

- **Cola M13**: El genotipado con marcadores microsatélites marcados fluorescentemente resulta una técnica muy costosa económicamente hablando, para reducir este coste Oetting et al. (1995) propusieron una estrategia de PCR, con cebadores de “cola”, los cuales emplean un cebador directo, un cebador reverso y un tercer cebador universal marcado con fluorescencia M13. En esta técnica de tres cebadores, la detección se basa en la adición de una secuencia que no tiene homología con el genoma objetivo, al extremo 5' del cebador directo del SSR (Missiaggia et al., 2006; Arruda et al., 2010). Este cebador “cola” provee una secuencia complementaria al cebador universal fluorescente, generando un producto que puede ser detectado en un secuenciador automático de ADN (Missiaggia et al., 2006).
- **SCAR** (*Sequenced Characterized Amplified Region; Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas*): Descrita en 1993 por Paran and Michelmore. Esta técnica aprovecha bandas diferenciales encontradas con marcadores inespecíficos como RAPDs o AFLPs. Estos fragmentos se clonan y secuencian para elaborar

oligonucleótidos específicos, lo que nos permite amplificar únicamente ese fragmento.

En un principio se descubrieron tres marcadores tipo SCAR relacionados con la presencia de los genes *Me* en *C. annuum*. Djian-Carporalino et al. en 2007 desarrolló los marcadores SCAR_B94 y SCAR_CD a partir de los marcadores HM6 y PM54 de tipo AFLP ligados a los genes de resistencia *Me3-Me4* y *Me1-Mech2; Me7-Mech1* respectivamente. Más tarde Fazari et al. en 2012 concluyó que el marcador SCAR_B94 estaba relacionado con la presencia del gen *Me1* y no con el *Me3* y *Me4* que se creía anteriormente. Así mediante una PCR con el marcador SCAR_B94 se puede determinar la presencia o ausencia de los genes *Me1* en un genotipo, o utilizar SCAR_CD para los genes *Me1-Mech2; Me7-Mech1*. Se describió posteriormente el marcador N_SCAR basado en la secuencia de un fragmento del marcador AFLP 'E39M41_339', que se encuentra ligado al gen de resistencia a nematodos *N* (Wang et al., 2009). En la actualidad *Me3* y *Me7* se cree que son alelos del mismo gen, el gen *N* está localizado en la misma región del cromosoma 9 por lo que el marcador N_SCAR está siendo utilizado para detectar la presencia del gen *Me3/Me7*. Además, se han desarrollado nuevos marcadores SCAR en esta misma región (Figura 5).

- **CAPS** (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; Secuencia polimórfica amplificada y cortada*): Descrita en 1993. Los fragmentos amplificados se someten a una restricción enzimática y se migra en un gel de agarosa. Las variaciones se detectan por presencia o ausencia de sitios de restricción. Se pueden así localizar cambios finos en una zona específica (Konieczny et al., 1993). Es otro de los tipos de marcadores utilizados en el trabajo.

Un marcador tipo CAPS (CAPS_F4R4) fue desarrollado por Djian-Caporalino et al. en 2007 a partir del marcador HM58 de tipo AFLP el cual se encontraba ligado a los genes de resistencia a nematodos *Me7-Mech1*.

- **SSCP** (*Single-strand conformation polymorphism; Polimorfismo de conformaciones monocatenarias*): Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos de DNA monocatenario. Es especialmente útil cuando las reacciones de PCR producen bandas de DNA de gran tamaño o bien bandas de tamaño muy próximo.

Djian-Caporalino et al. en 2007 también desarrollo dos marcadores de este tipo SSCP_B54 y SSCP_B322 basados en los marcadores AFLPs, HM4 y PM6 los cuales demostró que estaban ligados a la presencia de los genes *Me3-Me4; Me7-Mech1* de resistencia a nematodos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo propuesto en el presente Trabajo Final de Carrera es la utilización de marcadores moleculares como herramienta para caracterizar materiales de importancia en distintos programas de mejora relacionados con la resistencia a nematodos. Se plantean para ello los siguientes subobjetivos:

- (1) Determinar la presencia de genes de resistencia a nematodos en germoplasma de *C. annuum* que incluye cultivares de pimiento dulce y picante y entradas de *Capsicum frutescens*.
- (2) Determinar el carácter híbrido de plantas resultantes de cruces interespecíficos *C. annuum* x *C. frutescens* que han necesitado del rescate de embriones *in vitro* para su obtención.
- (3) Comprobar el carácter haploide o doble-haploide de plantas de pimiento obtenidas por cultivo de anteras.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado (Tabla 6) incluye: híbridos interespecíficos (*C. annuum* x *C. frutescens*) obtenidos por rescate de embriones, los cultivares *C. annuum* y *C. frutescens* utilizados como parentales en los cruces anteriores y plantas regeneradas a partir de cultivo de anteras de los cultivares de pimiento 27, 28, 34 y 931. Todos estos materiales se han obtenido en el laboratorio que dirige la Dr. Carmina Gisbert en el COMAV (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana). Estos materiales mostraron resistencia a nematodos en suelos naturalmente infestados con estos patógenos.

Todas estas plantas se han mantenido *in vitro* en medio de cultivo MP (4.4 g/l sales minerales Murashige & Skoog con vitaminas, 2% Sacarosa, 100 mg de PVP, 3.5 g de Agar, 1 g de carbón activo y 0.1 mg/l de IBA (ac. indolbutírico)) en condiciones estándar de incubación (25 °C ± 2 °C; 70% HR; fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad) con la transferencia a medio fresco cada dos meses.

Tabla 6. Cultivares utilizados para la realización de los experimentos.

Especie	Genotipos
<i>C. annuum</i>	27 (Parental / cv.)
<i>C. annuum</i>	28 (Parental / cv.)
<i>C. annuum</i>	34 (Parentale / cv.)
<i>C. annuum</i>	931 (Parental / cv.)
<i>C. frutescens</i>	F82 (Parental / cv.)
<i>C. frutescens</i>	F94 (Parental / cv.)
<i>C. frutescens</i>	F97 (Parental / cv.)
<i>C. annuum</i>	P5 (Cultivo de antera cv.27)
<i>C. annuum</i>	P3(Cultivo de antera cv.27)
<i>C. annuum</i> (P28 Cultivo de antera cv.28)
<i>C. annuum</i>	34-47-1(Cultivo de antera cv.34)
<i>C. annuum</i>	34-1 (Cultivo de antera cv.34)
<i>C. annuum</i>	AP61 (Cultivo de antera cv.931)
<i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	34XF82 (Rescate de embriones)
<i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	27XF94 (Rescate de embriones)
<i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	28XF94 (Rescate de embriones)
<i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	931XF94 (Rescate de embriones)
<i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	27XF97 (Rescate de embriones)
<i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	27XF82 (Rescate de embriones)

3.2. EXTRACCIONES DE ADN

Se han realizado las extracciones de ADN utilizando hojas de plantas en alveolos y cultivadas en un fitotrón y hojas de plantas cultivadas en condiciones *in vitro* de los genotipos que se muestran en la tabla 6. El protocolo que se siguió para la obtención del material genómico fue el método CTAB modificado (Doyle, 1987)(ANEXO 1), resuspendiendo el DNA en agua ultrapura. La cuantificación del

ADN se realizó con un espectrofotometro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) y la calidad del ADN se evaluó por las relaciones de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm .

Una vez cuantificadas las muestras se preparó una dilución de cada muestra a una concentración de 50 ng/μl para su posterior amplificación.

3.3. DETECCIÓN DE MARCADORES LIGADOS A LOS GENES DE RESISTENCIA

Las muestras 27-3, 27-4, 28-3, 28-4, 34-2, 34-3, 931 de *C. annuum* y F82, F94, F97 de *C. frutescens* se analizaron para buscar la posible presencia de los genes de resistencia a nematodos *Me* y *N* utilizando los marcadores estrechamente ligados SCAR_B94, N_SCAR y CAPS_F4R4 mostrado en la tabla 7.

En el caso de los marcadores SCAR tras la PCR se comprobaron las amplificaciones de todas las muestras en geles de agarosa al 1%. Posteriormente se comprobaron los tamaños de las bandas amplificadas en geles de poliacrilamida al 8% teñidos con BrEt. En el caso del marcador CAPS tras la amplificación y posterior digestión se comprobó el tamaño de los fragmentos digeridos en un gel de agarosa al 1,5% teñido con BrEt.

Tabla 7. Marcadores específicos de PCR desarrollados a partir de AFLPs ligados a los genes de resistencia a nematodos Me (Fazari et al., 2012).

Marcador PCR	AFLP Correspondiente	Genes Me ligados	Tamaño de banda (Posible presencia)	Dominancia/Codominancia
SCAR_B94	HM6	<i>Me1</i>	± 240 pb	Codominancia
CAPS_F4R4	HM58	<i>Me7-Mech1</i>	± 430 pb	Codominancia
N_SCAR	E39/M41	<i>Me3, Me7, N</i>	± 331 pb	Codominancia

3.3.1. Condiciones de la amplificación de marcadores tipo SCAR

Se amplificó en cada caso 50 ng de DNA genómico en 15 μl totales, utilizando los reactivos mostrados en la tabla 8 y los cebadores en la tabla 9.

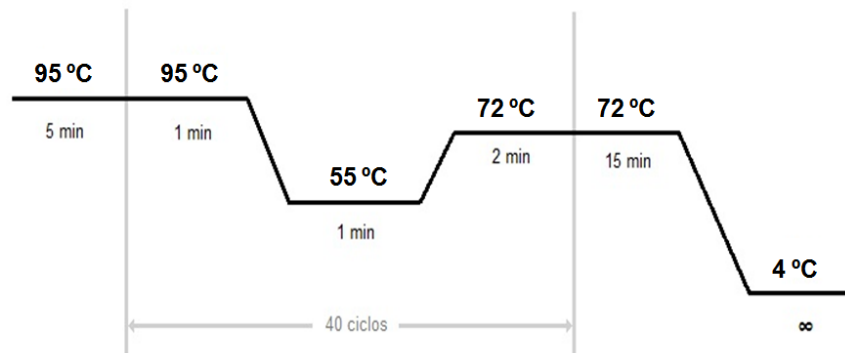
Tabla 8. Composición de la reacción de PCR por cada 15 μl utilizando marcadores tipo SCAR.

Reactivos	Cantidad
Tampón 10X	1.5 μl
MgCl ₂ (50mM)	0.6 μl
dNTPs (10mM)	0.3 μl
Cebador directo (SCAR_CD, SCAR_B94 y N_SCAR) (10 μM)	0.6 μl
Cebador reverso (SCAR_CD, SCAR_B94 y N_SCAR) (10 μM)	0.6 μl
Taq Polimerasa Roche (1UI/μl)	0.5 μl

Tabla 9. Secuencia de los cebadores correspondientes a los marcadores tipo SCAR.

Marcador PCR-específico (SCAR)	Cebadores
SCAR_B94	Directo: 5'-GCTTATCATGGCTAGTAGGG-3'
	Reverso: 5'-CGGACCATACTGGGACGATC-3'
N_SCAR	Directo: 5'-AATTCAGAAAAAGACTTGAAGG-3'
	Reverso: 5'-TAAAGGGATTCATTTTATGCATAC-3'

La amplificación se realizó con el termociclador Mastercycler® (Eppendorf), con las condiciones iniciales de 5 min a 95°C para desnaturalizar el ADN. A continuación, se realizaron 40 ciclos, de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C (para favorecer el anillado de los oligonucleótidos) y 2 min a 72°C (extensión). Por último, una etapa final de extensión, de una duración de 15 min a 72°C (Figura 6).

**Figura 6. Esquema de las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de los marcadores tipo SCAR.**

3.3.2. Condiciones de la amplificación de marcadores tipo CAPS

Se amplificó en cada caso 100 ng de DNA genómico en 25 µl totales, utilizando los reactivos mostrados en la tabla 10 y los cebadores de la tabla 11.

Tabla 10. Composición de la reacción de PCR por cada 25 µl utilizando marcadores tipo CAPS.

Reactivos	Cantidad
Tampón 10X	2.5 µl
MgCl ₂ (50Mm)	0.5 µl
dNTPs (10Mm)	1 µl
Cebador directo (CAPS_F4R4) (10 µM)	1 µl
Cebador reverso (CAPS_F4R4) (10 µM)	1 µl
Taq Polimerasa Roche (5 UI/µl)	0.2 µl

Tabla 11. Secuencia de los cebadores correspondientes a los marcadores tipo CAPS.

Marcador PCR-específico (CAPS)	Cebadores
CAPS_F4R4	Directo: 5'-AGAACAATAGAATCTCTCTTG-3'
	Reverso: 5'-CTTCAGGAACCCCTCAGC-3'

La amplificación se realizó con el termociclador Mastercycler® (Eppendorf), con las condiciones iniciales de 5 min a 95°C para desnaturalizar el ADN. A continuación, se realizaron 40 ciclos, de 1

min a 95°C (desnaturalización), 1 min a 55°C (anillado) y 2 min a 72°C (extensión). Por último una etapa final de extensión, de una duración de 15 min a 72°C (Figura 7).

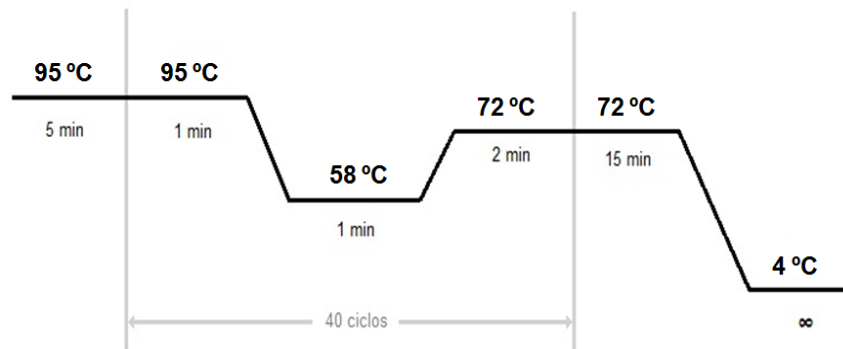


Figura 7. Esquema de las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de los marcadores tipo CAPS.

3.3.2.1. Digestion de la PCR F4_R4

La digestión se realizó en 20 µl finales por muestra, añadiendo para cada muestra 2 µl de Tampón 10x de Roche, 0,2 µl de la enzima MseI (10 UI/µl) y 7 µl de la dilución producto de la PCR. Se incubaron las muestras a 37 °C unas 3 horas.

3.3.3. Condiciones de la amplificación de marcadores tipo SSR

Se escogieron 8 marcadores de tipo microsatélite de la bibliografía existente pertenecientes a diferentes grupos de ligamiento (Minamiyama et al., 2006; Lee et al., 2004)(Tabla 12).

Tabla 12. Microsatélites utilizados en la caracterización de los diferentes individuos estudiados.

MICROSATÉLITE	CEBADORES (Directo/Reverso)	GRUPO LIGAMIENTO	TAMAÑO ESPERADO	FLUOROFORO
CAMS 117	TTGTGGAGGAAACAAGCAA/ CCTCAGCCCAGGAGACATAA	11	223 pb	NED™ (AMARILLO)
CAMS 194	TCATGGAAAATTAACAACGCATA/ GGGGGTTGGAGAAGAAAGTT	1	245 pb	FAM™ (AZUL)
CAMS 336	GGTGGAACTTGCTTGGAGA/ CCCAGAACCATCCACTACT	3	157 pb	VIC® (VERDE)
CAMS 398	ATGGTCCATGGTCAGCAGAT/ GGGCAGAACAGTGGATGATT	7	165 pb	PET® (ROJO)
CAMS 644	CGCATGAAGCAAATGTACCA/ ACCTGCAGTTTGTGTTGGA	4	206 pb	FAM™ (AZUL)
CAMS 806	TGTCACAAGTGTCAGGTAGGAG/ CCCCAAAATTTCCCTCAT	10	227 pb	VIC® (VERDE)
CAMS 885	AACGAAAAACAAACCCAATCA/ TTGAAATTGCTGAAACTCTGAA	2	248 pb	PET® (ROJO)
HPMS 1-5	CCAAACGAACCGATGAACACTC/ GACAATGTTGAAAAAGGTGGAAGAC	6	311 pb	NED™ (AMARILLO)

A los cebadores directos utilizados se les añadió una cola M13 5'-CACGACGTTGTTAAACGAC-3' para poder marcar los fragmentos amplificados con los diferentes fluoróforos. De esta manera, para cada reacción de PCR se emplearon los cebadores directo con la cola M13, reverso y el cebador M13 marcado, de manera que pudieran ser detectados en un secuenciador capilar.

Las condiciones de PCR para los marcadores tipo microsatélites se muestran en la tabla 13:

Tabla 13. Composición de la reacción de PCR por cada 15 µl de volumen total para los marcadores tipo SSR.

Reactivos	Cantidad
Tampón 10X	1.5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0.15 µl
dNTPs (10mM)	0.3 µl
Cebador directo (SSR) (10 µM)	0.06 µl
Cebador reverso (SSR) (10 µM)	0.3 µl
Cola M13 (10 µM)	0.2µl
Taq Polimerasa Roche (5 UI/µl)	0.07 µl

Una vez preparadas las muestras se incubaron en el termociclador con un programa TD (Touch Down) de 30 ciclos con una temperatura de hibridación inicial de 65°C, bajando 1°C por ciclo durante 10 ciclos, seguido de 20 ciclos a una temperatura de 55°C (Figura 8).

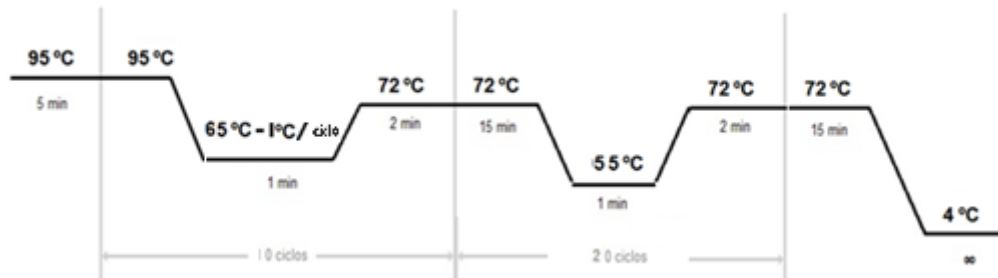


Figura 8. Esquema de las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de los marcadores tipo SSR.

Se seleccionaron los marcadores SSR por parejas en función de su tamaño de manera que durante la separación de los productos amplificados no se obtengan resultados confusos debido al solapamiento de bandas marcadas con el mismo fluoróforo.

3.3.3.1. Separación de los productos amplificados

Se utilizó un secuenciador automático ABI/PRISM 3100 de PE Biosystems. Su sistema de lectura es capaz de detectar cinco fluoróforos diferentes en una única reacción. Esto nos permitió resolver el producto de la amplificación de ocho cebadores marcados con los fluoróforos que emitían en cuatro longitudes de onda diferentes y cuyos rangos de tamaño eran suficientemente diferentes (citados en el punto anterior). El quinto fluoróforo fue el empleado en el patrón de pesos moleculares (LIZ de color naranja).

Las muestras se prepararon en 12 μl de formamida, añadiendo 0,5 μl de cada una de las seis reacciones diluidas y 0,25 μl de marcador de peso molecular GeneScan-500HD.

Los fragmentos amplificados se visualizaron en forma de picos, cada uno correspondiente a un fragmento de ADN amplificado, mediante el programa de análisis GeneScan (v.3.1.2) (Figura 9).

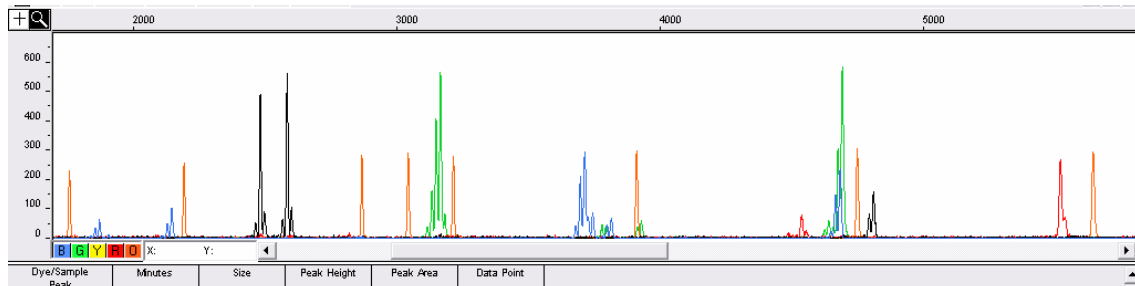


Figura 9. Patrón de picos obtenido en el secuenciador. Se observa el resultado de la amplificación de ocho loci microsatélites diferentes de una única muestra. En naranja aparece el patrón de pesos moleculares.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A NEMATODOS EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO

Se han utilizado los marcadores N_SCAR, SCAR_B94 y CAPS_F4R4 para determinar la presencia de los genes de resistencia *N*, *Me1*, *Mech1*, *Me7*, *Mech1*, *Me3* y *Me* en los genotipos 27, 28, 34 y 931 correspondientes a la especie *C. annuum* y en los genotipos F.82, F.94 y F.97 correspondientes a la especie *C. frutescens*. Los marcadores SCAR_B94, CAPS_F4R4 fueron descritos por Djian-Caporalino et al. (2007), y están basados en la amplificación por PCR a partir de marcadores AFLP que estaban ligados a los genes *Me* mostrados en la tabla 7. Por otra parte, Wang et al. (2009) desarrollaron el marcador N_SCAR usando cebadores de marcadores AFLP asociados al gen *N* de resistencia a nematodos. Estos marcadores se utilizaron en nuestro grupo para evaluar la presencia de estos genes en distintas accesiones de pimiento (*C. annuum*) y de chile (*C. frutescens*) (Gisbert et al., 2013). Era interesante conocer si los cultivares de pimiento (24, 28 y 34) que presentan buena adaptación a climas secos son portadores de algunos de estos genes ya que habían mostrado buena aptitud en el cultivo en suelos infestados con nematodos. También se pretendía determinar si el cv. 931 y las accesiones de *C. frutescens*, que también mostraron tolerancia a nematodos en un ensayo de campo, eran portadores de algún gen de resistencia a estos patógenos.

4.1.1. MARCADOR N_SCAR

En 1957 ya se describió que el gen *N* confería resistencia a *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanaica* en el cultivar 'Mississippi Nemaheart' (Hare, 1957). La descripción de un marcador para este gen (Wang et al., 2009) nos ha facilitado la detección de este gen en los genotipos analizados.

Mediante PCR con los cebadores N_SCAR descritos en Wang et al. (2009) se logró la amplificación de un fragmento de 350 pb aprox. que se visualizó en una electroforesis con gel de acrilamida (Figura 10) en todos los genotipos analizados (931, 27, 28, 34, F82, F94, F97). Este tamaño se correspondería con la presencia del alelo *N* resistente además de la posible presencia de los genes *Me3* y *Me7* (Wang et al., 2009; Fazari et al., 2012).

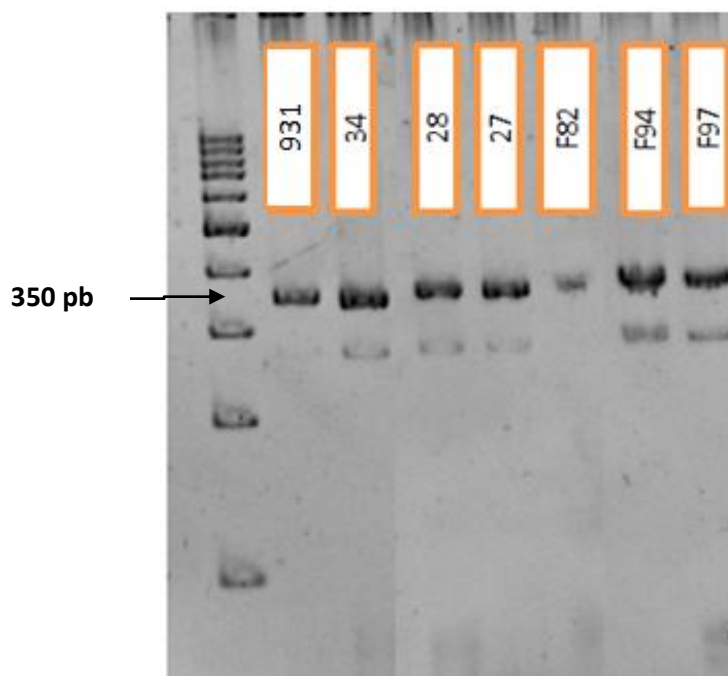


Figura 10. Separación de los productos amplificados N_SCAR mediante electroforesis en gel de acrilamida.

El resultado obtenido se comprobó posteriormente mediante la separación de los productos amplificados con el secuenciador automático ABI/PRISM 3100. Por lo que podemos presumir que estos genotipos son portadores de este gen de resistencia.

4.1.2. MARCADOR SCAR_B94

En el caso del marcador SCAR_B94 se obtuvo un patrón de bandas de dudosa interpretación por lo que se separaron los productos de PCR en un secuenciador capilar con el fin de determinar la presencia/ausencia del gen. Los resultados que se muestran en la figura 11 indican la posible presencia del gen *Me1* en los genotipos de *C. frutescens* (± 236 pb) y la ausencia (± 269 pb) en *C. frutescens*. La diferencia de los tamaños obtenidos con respecto a los descritos en el trabajo de Dijan-Caporalino et al. (2007) en los que se indica una amplificación de 260 para la ausencia y de 240 para la posible presencia sería debido a la adición de la cola M13 en los oligonucleótidos utilizados para la amplificación.

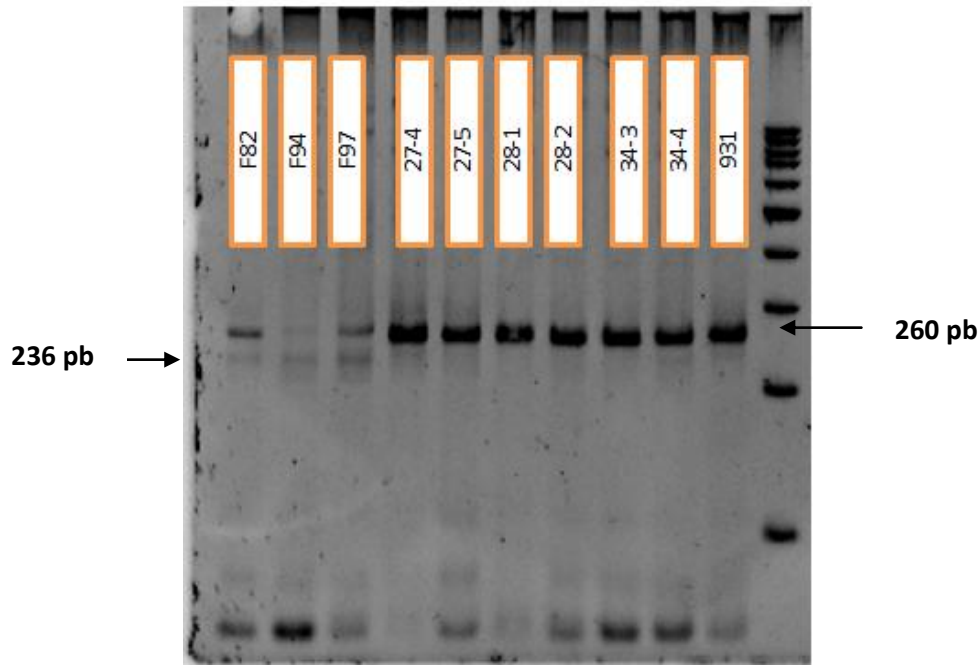


Figura 11. Separación de los productos amplificados SCAR_B94 mediante electroforesis en gel de acrilamida. El resultado obtenido se comprobó posteriormente mediante la separación de los productos amplificados con el secuenciador automático ABI/PRISM 3100.

4.1.3. MARCADOR CAPS_F4_R4

Por último se analizó el marcador CAPS_F4R4, el cual se encuentra ligado a los genes *Me7-Mech1*.

Se consiguió amplificación en todos los genotipos y tras la digestión se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, (figura 12). En el gel se pudo observar varias bandas, detectando la presencia de una banda de algo más de 400 pb en las entradas de *C. frutescens* lo que se corresponde con el tamaño observado en las plantas resistentes descritas anteriormente en Gisbert et al. (2013) en los fenotipos Fru1, Fru2 y Fru3. Este tamaño está relacionado con la presencia de los genes *Me7-Mech1* (Djian- Caporalino et al., 2007). En las plantas de *C. annuum* se observó una banda de mayor tamaño, próximo a 500 pb que no se correspondería con la resistencia.

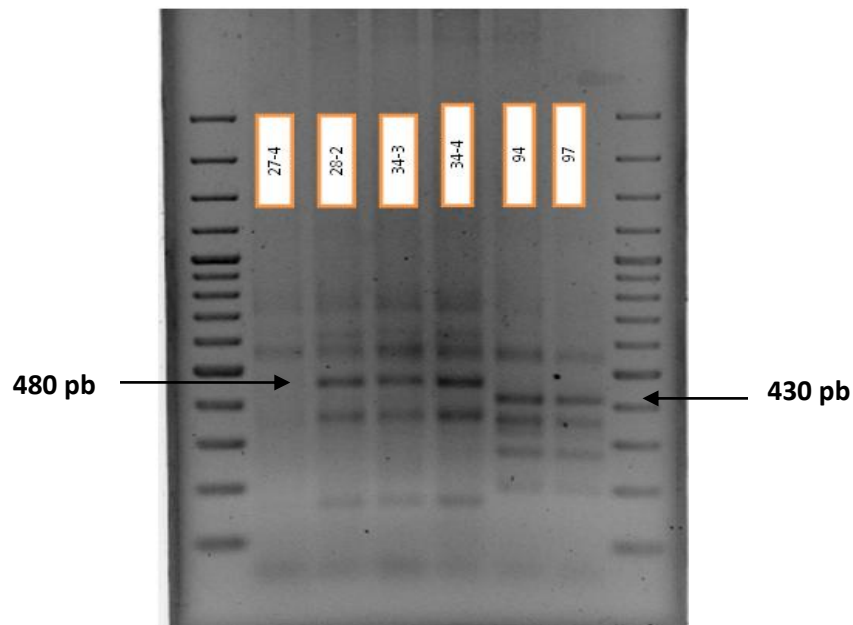


Figura 12. Resultado de la digestión de los productos amplificados en la PCR CAPS_F4R4 con genotipos de la especie *C. annuum* (27, 28 y 34) y *C. frutescens* (94 y 97) en gel de agarosa al 1,5%.

Estos resultados indican la presencia de los genes *Me7-Mech1* en los genotipos de *C. frutescens* que conferiría resistencia a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (que sería conferida por el gen *Me7*) y resistencia a *M. chitwoodi* (que les vendría conferida por el gen *Mech1*).

4.2. UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA DETERMINAR EL CARÁCTER HÍBRIDO DE PLANTAS RESULTANTES DE CRUCES *C. annuum* X *C. frutescens*

Para poder determinar el carácter híbrido de las plantas obtenidas tras el rescate de embriones se tiene que seleccionar marcadores polimórficos para los parentales en estudio. Para ello se ha utilizado el marcador CAPS_F4R4 y 8 marcadores SSR que estaban descritos en la bibliografía (Minamiyama et al., 2006; Lee et al., 2004). Para ello se comprobó si los marcadores eran heterocigotos en los parentales. Se seleccionaron microsatélites pertenecientes a distintos grupos ligamiento con el fin de abarcar la mayor parte del genoma. Tras la separación de los productos amplificados con el secuenciador automático ABI/PRISM 3100 de PE Biosystems, se obtuvieron los resultados reflejados en la siguiente tabla (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados en pb tras la separación de productos amplificados en los parentales utilizando SSR ('+': tamaño de amplificación no determinado, 'no': no amplificación).

MARCADOR	TINCIÓN	27.1	27.2	28.1	28.2	34.1	34.2	931	F82	F94	F97
CAMS 336	VIC®	no	181	no	no	181/192	178/181	no	171	171	171
CAMS 806	VIC®	+	+	+	+	+	+	no	no	no	no
CAMS 194	FAM™	265/267	265/267	265	265	265	265	278	no	no	no
CAMS 644	FAM™	226	226/233	226/233	226	233	226/233	224	208	208	208
CAMS 117	NED™	238/243	238/243	243/249	250	243	238/243	no	214	214	214
HPSM1-5	NED™	no	338	338	no	no	338	340	no	no	no
CAMS 398	PET®	187/189	187	191	191	189/191	189/191	187	186/191	191	186/191
CAMS 885	PET®	240	240	234/236	234	240	240	262	156	186	170

No se obtuvo amplificación en algunas de las muestras (indicado en la tabla X como 'no'). Tampoco se pudo determinar el tamaño en algunas de las muestras ('+'), en este caso sí que hubo amplificación pero no se pudo diferenciar el tamaño de las bandas en el electroferograma del secuenciador capilar. Los picos obtenidos en la secuenciación indicaron que los marcadores CAMS 806 y HPSM1-5 eran homocigotos mientras que CAMS 336, CAMS 194, CAMS 644, CAMS 117, CAMS 398 y CAMS 885 mostraban heterocigosis (alelos de diferente tamaño). Por lo tanto se utilizaron los marcadores que resultaron ser heterocigotos en los parentales para determinar el carácter híbrido de las plantas resultantes de los cruces *C. annuum* x *C. frutescens*, excepto CAMS 194 con el que se tuvo dificultad para la amplificación. Se realizó el mismo proceso que en el caso de los parentales pero esta vez se analizaron los híbridos resultantes del cruce (Tabla 15).

Tabla 15. Tamaños de los fragmentos amplificados (en pb) utilizando marcadores SSRs codominantes ('N': no amplificación).

CAMS	27XF94-10-1	28XF94-3-7	28XF94-3-6	931XF94-11-1	931XF94-11-2	931XF94-11-X	27XF97-9-1	34XF82-14-1	34XF82-15-2	27XF82-12-2	27XF82-5-4
336	171/181	N	N	N	N	N	171/181	171/178	171/178	171/181	171/181
644	208/233	208/233	208/233	208/224	208/224	208/224	208/233	208/233	208/233	208/233	208/233
885	186/240	186/236	186/236	186/262	186/262	186/262	170/240	156/240	N	156/240	156/240
117	N	214/249	214/249	N	N	N	N	214/238	214/238	214/247	N
398	N	N	N	N	N	N	N	N	N	186/189	186/189

Los resultados que se muestran en la tabla 15 indican el carácter híbrido de los individuos procedentes de los diferentes cruces *C. annuum* x *C. frutescens* que requirieron rescate de embriones para su desarrollo. Así por ejemplo, dos plantas híbridas resultantes del cruce de *C. annuum* 27 x *C. frutescens* F82 (12-2; 5-4) muestran los alelos correspondientes a cada parental (Tabla 15) para los cinco marcadores utilizados. En el resto de plantas también se ha comprobado el carácter híbrido puesto que ha observado heterocigosis para los marcadores que han amplificado (de 2 a 4 dependiendo del genotipo). En algunos casos no se consiguió la amplificación o no dio resultados concluyentes marcados como 'N' en la tabla.

Además, utilizando el marcador CAPS F4_R4 se ha podido confirmar el carácter híbrido en las plantas regeneradas de los cruces anteriormente estudiados mostrados en la tabla 14. Una muestra de estos resultados se puede observar en la figura 13.

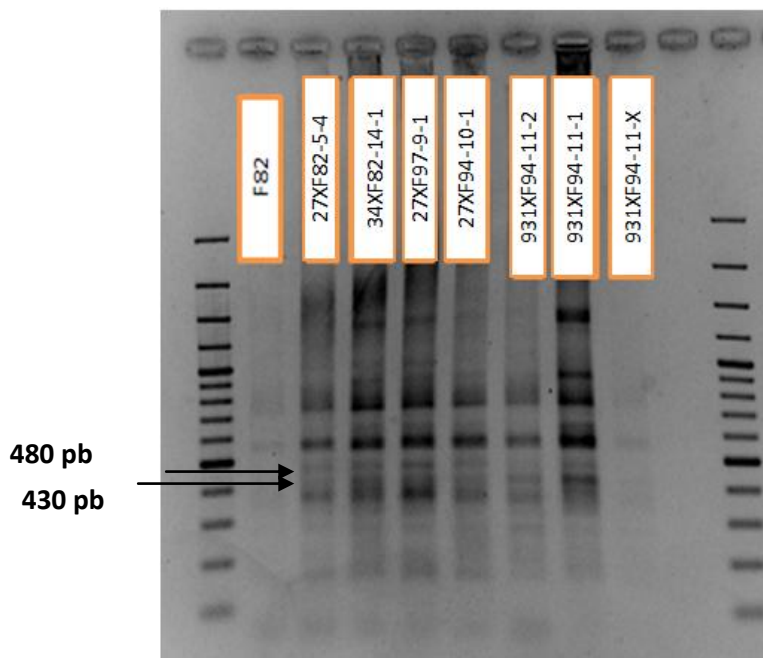


Figura 13. Resultado de la digestión de los productos amplificados en la PCR CAPS_F4R4 con genotipos híbridos resultantes del cruce *C. annuum* x *C. frutescens* a excepción del genotipo F82 en gel de agarosa al 1,5%.

En el gel que se muestra en la (figura 13) puede comprobarse que los fragmentos correspondientes a los parentales utilizados en los cruces *C. annuum* y *C. frutescens* difieren en el tamaño/patrón de bandas. El patrón de bandas difiere claramente entre los parentales (Figura 12). Así los genotipos de *C. annuum* han amplificado una banda de ± 750 pb y una de ± 480 pb que está ausente en los genotipos de *C. frutescens*. En la figura 13 que muestra el patrón de bandas de las plantas híbridas puede verse que todas ellas contienen las bandas resultantes de la combinación de los patrones obtenidos en los parentales.

Tras confirmar el carácter híbrido de estas plantas se valorará su posible utilización como portainjertos. Además podrían utilizarse como parentales en otros programas de mejora.

4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS DE PIMIENTO OBTENIDAS POR CULTIVO DE ANTERAS

Con el fin de determinar el carácter haploide o doblehaploide de plantas de pimiento obtenidas in vitro a partir de cultivo de anteras de cuatro genotipos de *C. annuum* (27, 28, 34 y 931), se han utilizado los mismos ocho marcadores SSR. En la tabla 16 se muestran los tamaños obtenidos tras la amplificación que resultaron homocigotos o heterocigotos (en negrita) en los parentales. Los resultados obtenidos con los marcadores heterocigotos indican que las plantas regeneradas de los genotipos 27, 28 y 34 son haploides o dobles haploides, ya que se amplifica una única banda. En el caso del genotipo 931 es necesario ensayar otros marcadores puesto que los utilizados no han resultado heterocigotos.

El carácter haploide de las plantas de los genotipos 27, 28 y 34 se ha comprobado también mediante citometría de flujo (datos no incluidos en este proyecto).

Tabla 16. Resultados en pb tras la separación de productos amplificados utilizando SSR de los individuos *C. annuum* y de los respectivos obtenidos por cultivo de anteras.

	Parental	Antera		Parental	Antera	Parental	Antera		Parental	Antera
SSRs	27	p3	p5	28	p28	34	34-47	34-1-1	931	AP61
336	192	178	181	no	178	181/192	192	192	no	192
806	+	d	+	+	d	+	d	d	no	+
194	265/267	265	265	265	265	265	265	265	278	278
644	226/233	233	233	226/233	233	233	no	233	224	224
117	238/243	238	238	243/249	249	243	243	243	no	243
HPSM1-5	338	338	338	338	338	no	no	340	338	338
398	189	189	189	191	189	189/191	191	191	187	187
885	240	240	240	234/262	262	240	240	240	262	262

Los resultados indican la capacidad del cultivo de anteras en *C. annuum* para la obtención de individuos haploides o doble haploides a partir de parentales heterocigotos para ciertos marcadores, estas poblaciones presentan mayor variación genética aditiva y ausencia de varianza genética debida a la dominancia, si se comparan con poblaciones segregantes. De esta manera se eliminan las complejidades del estado heterocigoto y se facilita el análisis genético así se podrán distinguirse de forma inmediata las mutaciones recesivas haciendo que el proceso de selección sobre una población de haploides resulte más eficiente. Las plantas que resultaron ser haploides son muy útiles para derivar líneas puras y utilizarlas en programas de mejora para la obtención de híbridos.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La utilización de distintos marcadores moleculares basados en la PCR ligados a distintos genes de resistencia a nematodos ha sido de gran utilidad para determinar la presencia de genes de resistencia en los distintos genotipos analizados:
 - 1.1 Como resultado de la utilización del marcador N_SCAR, se ha confirmado la presencia del gen *N* en todos los genotipos utilizados, en concreto en los cultivares 24, 27, 28 y 931 de *C. annuum* y en los genotipos F82, F94 y F97 de *C. frutescens*.
 - 1.2 La posible presencia de los genes *Me1* en los genotipos de *C. frutescens* y su ausencia en *C. annuum* es el resultado obtenido con la utilización del marcador SCAR_B94.
 - 1.3 La presencia del gen *Me7* (alelo del gen *Me3*) en los genotipos de *C. frutescens* y su ausencia en los genotipos de *C. annuum* es la interpretación de los resultados obtenidos con el marcador CAPS F4_R4.

Por lo tanto, se dispone de materiales que portan genes de resistencia y que son adecuados para utilizar o incorporar en distintos programas de mejora.

2. Utilizando marcadores microsatélites y el marcador CAPS F4_R4 se ha confirmado el carácter híbrido de todas las plantas regeneradas a partir de embriones cultivados in vitro de 6 cruces interespecíficos *C. annuum* y *C. frutescens*. Estos híbridos podrían ser útiles como portainjertos o utilizarse en programas de mejora para introgresar genes de resistencia en otros cultivares de pimiento. Por otra parte, se confirma la utilidad del protocolo que se desarrolló en el laboratorio para el rescate de estos materiales.
3. Por último, la utilización de marcadores tipo microsatélite nos ha permitido determinar el carácter haploide o doble-haploide en plantas regeneradas a partir de cultivo de anteras en tres de los genotipos de *C. annuum* utilizados en este proyecto. Estas plantas son muy útiles para derivar líneas puras y utilizarlas en programas de mejora para la obtención de híbridos.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **AMMATI, M., THOMASON, I. J., & MCKINNEY, H. E.** (1986). Retention of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon* genotypes at high soil temperature. *Journal of Nematology*, 18(4), 491.
2. **BECKMANN, J. S., & SOLLER, M.** (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 67(1), 35-43.
3. **BLEVE-ZACHEO, T., BONGIOVANNI, M., MELILLO, M. T., & CASTAGNONE-SERENO, P.** (1998). The pepper resistance genes Me1 and Me3 induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science*, 133(1), 79-90.
4. **CAETANO-ANOLLES, G.** (1994). MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant molecular biology*, 25(6), 1011-1026.
5. **COSTA, J.; CATALÁ, M.S.; GOMARIZ, J.; LÓPEZ, A.; MORALES M.A.; SÁNCHEZ, E.** (2007) Utilización de nuevos patrones del genero *Capsicum*, obtenidos mediante cruzamientos interespecíficos, como método de lucha contra la fatiga del suelo. *Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Actas de Horticultura* 48: 125-128.
6. **CROSBY, K.M.** (2008). Pepper. p. 221-248. In: Prohens, J.; Nuez, F., eds. *Vegetables II*. Springer, New York, NY, USA.
7. **DE ARRUDA, M. P., GONÇALVES, E. C., SCHNEIDER, M. P. C., DA SILVA, A. L. D. C., & MORIELLE-VERSUTE, E.** (2010). An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Molecular biology reports*, 37(4), 2031-2036.
8. **DE DIOS, J.** (2006). El cultivo protegido del pimiento. En: *Pimientos*: 54-63. Ediciones de Horticultura S.L. Reus. España.
9. **DE WITT, D., & BOSLAND, P. W.** (1996). *Peppers of the world. An identification guide*. Ten Speed Press.
10. **DJIAN-CAPORALINO, C., PIJAROWSKI, L., JANUEL, A., LEFEBVRE, V., DAUBEZE, A., PALLOIX, A. Y ABAD P.** (1999) Spectrum resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 99: 496-502.
11. **DJIAN-CAPORALINO, C., PIJAROWSKI, L., FAZARI, A., SAMSON, M., GAVEAU, L., O'BYRNE, C., ... & ABAD, P.** (2001). High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annum* L.) resistance loci Me3 and Me4 conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 103(4), 592-600.
12. **DJIAN-CAPORALINO, C., FAZARI, A., ARGUEL, M.J., T. VERNIE, T., VANDECASTEELE, C., FAURE, I., BRUNOUD, G., PIJAROWSKI, L. A. PALLOIX, A. LEFEBVRE, V. Y ABAD, P.** (2007) Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annum* L.) are clustered on the P9 chromosome, *Theor. Appl. Genet.* 114: 473-486.
13. **DJIAN-CAPORALINO, C., MOLINARI, S., PALLOIX, A., CIANCIO, A., FAZARI, A., MARTEU, N., ... & CASTAGNONE-SERENO, P.** (2011). The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. *European journal of plant pathology*, 131(3), 431-440.

14. **DJIAN-CAPORALINO, C., PALLOIX, A., FAZARI, A., MARTEU, N., BARBARY, A., ABAD, P., ... & CASTAGNONE-SERENO, P.** (2014). Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC plant biology*, 14(1), 53.
15. **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2013)** http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E Fecha de Consulta: 20 de Octubre 2014.
16. **FAZARI, A., PALLOIX, A., WANG, L., YAN HUA, M., SAGE-PALLOIX, A. M., ZHANG, B. X., & DJIAN-CAPORALINO, C.** (2012). The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding*, 131(5), 665-673.
17. **DOYLE J.J.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19, 11-15.
18. **FEPEX (Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas...)**(2013).Base de datos estadísticos. <http://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-esp%C3%B1ola-frutas-hortalizas> . Fecha de consulta: 13 Octubre 2014.
19. **FERY, R. L., DUKES, P. D., & THIES, J. A.** (1998). Carolina Wonder'andCharleston Belle': Southern Root-knot Nematode-Resistant Bell Peppers. *HortScience*, 33(5), 900-902.
20. **GELETA, L. F., LABUSCHAGNE, M. T., & VILJOEN, C. D.** (2004). Relationship between heterosis and genetic distance based on morphological traits and AFLP markers in pepper. *Plant Breeding*, 123(5), 467-473.
21. **GIBSON, G., & MUSE, S. V.** (2004). *Précis de génomique*. De Boeck Supérieur.
22. **GISBERT, C., TRUJILLO-MOYA, C., SÁNCHEZ-TORRES, P., SIFRES, A., SÁNCHEZ-CASTRO, E., & NUEZ, F.** (2013). Resistance of pepper germplasm to *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology*, 162(1), 110-118.
23. **GÓMEZ-GARCÍA, M. D. R., & OCHOA-ALEJO, N.** (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *International journal of molecular sciences*, 14(9), 19025-19053.
24. **HARE, W.W.** (1957) Inheritance of resistance to root knot nematodes in pepper. *Phytopathology*. 47: 455-459.
25. **HENDY, H., POCHARD, E. Y DALMASSO, A.** (1985) Identification de deux nouvelles souches de résistance aux nématodes du genre *Meloidogyne* chez le piment, *Capsicum annum* L. C.R. Seances Acad Agrid. Fr.69 : 817-822.
26. **KONIECZNY, A., & AUSUBEL, F. M.** (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4(2), 403-410.
27. **KIM, S., PARK, M., YEOM, S. I., KIM, Y. M., LEE, J. M., LEE, H. A., & CHOI, H. S.** (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, 46(3), 270-278.
28. **LEE, S., KIM, S. Y., CHUNG, E., JOUNG, Y. H., PAI, H. S., HUR, C. G., & CHOI, D.** (2004). EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Functional & integrative genomics*, 4(3), 196-205.
29. **LYRENE, P.** (2008). An Introduction to Plant Breeding. *HortScience*, 43(7), 2270-2270.
30. **MINAMIYAMA, Y., TSURO, M., & HIRAI, M.** (2006). An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 18(2), 157-169.

31. **MISSIAGGIA, A., & GRATTAPAGLIA, D.** (2006). Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genetics and molecular research: GMR*, (5), 72-8.
32. **NUEZ, F., GIL, R. Y COSTA, R.** (2003) El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ediciones Mundi-Prensa. España. 607 pp.
33. **OETTING, W. S., LEE, H. K., FLANDERS, D. J., WIESNER, G. L., SELLERS, T. A., & KING, R. A.** (1995). Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*, 30(3), 450-458.
34. **OKA, Y., OFFENBACH, R. Y PIVONIA, S.** (2004) Pepper Rootstock Graft Compatibility and Response to *Meloidogyne javanica* and *M. Incognita*. *Journal of Nematology* 36(2):137-141.
35. **OLSON, M., HOOD, L., CANTOR, C., & BOTSTEIN, D.** (1989). A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245(4925), 1434-1435.
36. **PARAN, I., & MICHELMORE, R. W.** (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(8), 985-993.
37. **PEGARD, A., BRIZZARD, G., FAZARI, A., SOUCAZE, O., ABAD, P., & DJIAN-CAPORALINO, C.** (2005). Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology*, 95(2), 158-165.
38. **PUBMED "POLYMORPHISM, RESTRICTION FRAGMENT LENGTH"** (Base de datos) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrfpl/>. Fecha de consulta: 18 de Octubre 2014.
39. **RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A., & VIÑALS, F. N.** (2006). Mejora de la calidad del pimiento. In *Mejora genética de la calidad en plantas* (pp. 361-392). Universidad Politécnica de Valencia.
40. **SOUZA-SOBRINHO, F. DE MALUF, W.R., GOMES, L.A.A. Y CAMPOS, V.P.** (2002) Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* race 2 in the hot pepper cultivar Carolina Cayenne (*Capsicum annum* L.). *Genet. Mol. Res.* 1:271-279.
41. **THIES, J.A. Y FERY, R.L.** (2002) Heat stability of resistance to southern root-knot nematode in bell pepper genotypes homozygous and heterozygous for the N gene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127:371-375.
42. **URRIOS, J., AGUILAR-AMAT, J.** (2006). Diversidad de tipologías del pimiento en el mundo. En: *Pimientos: 17-31*. Ediciones de Horticultura S.L. Reus. España.
43. **VALDÉS, F.** (2006). Vitamina C. *Actas dermo-sifiliográficas*, 97(9), 557-568.
44. **VIDAL, M. C., PÉREZ, D., & TORRES, F.** (2004). L.—Capsaicina tóxica en el tratamiento del dolor neuropático “. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 11(5), 306-318.
45. **VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., ... & ZABEAU, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
46. **WANG, L. H., GU, X. H., HUA, M. Y., MAO, S. L., ZHANG, Z. H., PENG, D. L., ... & ZHANG, B. X.** (2009). A SCAR marker linked to the N gene for resistance to root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientia horticulturae*, 122(2), 318-322.
47. **WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., & TINGEY, S. V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
48. **YOSHIOKA, M., LIM, K., KIKUZATO, S., KIYONAGA, A., TANAKA, H., SHINDO, M., & SUZUKI, M.** (1995). Effects of red-pepper diet on the energy metabolism in men. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 41(6), 647-656.