

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

MASTER INTERUNIVERSITARIO EN
MEJORA GENÉTICA VEGETAL



RESPUESTA DEL SISTEMA RADICULAR FRENTE A LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN EL CONTEXTO DE PLANTAS INJERTADAS, ANÁLISIS FENOTÍPICO Y DE EXPRESIÓN GÉNICA

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

ALUMNO:

Daniel Gil Villar

DIRECTORA ACADÉMICA

Prof^aDr^a Ana María Fita Fernández

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2017



La Doctora D^{ña}. Ana María Fita Fernández profesora del Máster Oficial Interuniversitario en Mejora Genética Vegetal, en calidad de directora del Trabajo de Fin de Máster, por la Presente,

RECONOCE/N

Que el Trabajo Fin de Máster realizado por el alumno D.: Daniel Gil Villar, con el título: “*Respuesta del sistema radicular frente a la deficiencia de fósforo en el contexto de plantas injertadas, análisis fenotípico y de expresión génica.*” y realizado bajo mi dirección, reúne las condiciones necesarias para completar la formación del alumno y por tanto,

AUTORIZA

La presentación del citado Trabajo Final de Máster para su defensa ante el correspondiente Tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos así lo firma,

Fdo: Ana María Fita Fernández
Máster Oficial en Mejora Genética Vegetal

Valencia, 21 de Septiembre de 2017

RESUMEN

El uso desmedido de fertilizantes tiene repercusiones medio ambientales por eutrofización y acumulación, y económicas por el aumento del precio de los insumos agrícolas debido a la escasez de materias primas, como es el caso del fosfato roca. Uno de los productos hortícolas más importantes, a nivel económico mundial, es el pimiento (*Capsicum annuum* L.). En España es uno de los 5 cultivos más importantes y uno a los que más superficie cultivada se le dedica, por ello, cultivar variedades más eficientes en la adquisición y uso del fósforo repercutiría positivamente en la economía de producción de esta hortaliza. Existen estudios anteriores que describe la diversidad genética dentro del género capsicum. La eficiencia en la adquisición de fósforo viene dada, entre otros, por una morfología más adaptada o a través de procesos bioquímicos que favorecen la adquisición de P. Por ello el uso como portainjertos de variedades descritas como tolerantes a la deficiencia en P podría ser una solución para conseguir reducir los abonados fosforados, junto con las herramientas genómicas y bioinformáticas que permiten utilizar la información disponible en las bases de datos para desentrañar la respuesta a la deficiencia en P.

Los objetivos del trabajo fueron comparar el uso como portainjertos tolerantes a bajo P de variedades analizando los factores responsables de dicha adaptación a nivel de morfología del sistema radicular y comparar la expresión génica para genes descritos anteriormente como involucrados en la tolerancia a la deficiencia de fósforo en raíces.

Se cultivaron hidropónicamente bajo dos niveles diferentes de abonado fosforado (0.5 mM y 1.5 mM) plantas de pimiento 'Adige' injertadas sobre: 1) 'Numex X', 2) Piquillo, y 3) autoinjertadas y un control sin injertar. En todas ellas se midieron los niveles de P en raíces y hojas, se evaluaron los pesos frescos y secos, se analizaron los sistemas radiculares y se obtuvieron muestras de ARN para realizar el análisis de expresión de genes descritos como influyentes en la respuesta a la deficiencia en P. A partir de secuencias de melón y arabidopsis de genes relacionados con la movilización del P, con señalización y transducción de señal o transporte se diseñaron cebadores adecuados para pimiento.

Las plantas cultivadas en condiciones de bajo P, mostraron niveles menores de concentración de P en los diferentes patrones, pero los niveles de P en las raíces fueron variables dependiendo de los distintos patrones. Aún así el tratamiento con bajo P no fue tan severo como para provocar grandes efectos sobre la biomasa. En cuanto a los sistemas radiculares existieron diferencias entre los patrones y en su respuesta a la deficiencia de P.

Se diseñaron cebadores válidos, pero dentro de este trabajo no se llegaron a realizar las reacciones de amplificación en tiempo real necesarias para conocer los niveles de expresión en las raíces de los patrones estudiados.

ABSTRACT

Disproportionate use of fertilizers has environmental issues derivate from soil and water bodies accumulation, as well as economic repercussions because of the increased price of agricultural inputs due to the limited availability of raw materials, is the case of phosphate rock. One of the most important horticultural product, in worldwide economic terms, is pepper (*Capsicum annum* L.). In Spain is one of the fifth most important crop and one which more cultivated area is dedicated, in fact, to cultivate more efficient varieties to acquisition and use of phosphorus will be positive for production economy of this vegetable. There exist previous studies where diversity of Capsicum is described. Acquisition efficiency of phosphorous is given, among other, by adaptive root morphology or by biochemical process that favour P acquisition. This is why using described tolerant varieties as rootstock could be the best solution to reduce P inputs. In addition, genomics and bioinformatic tools can be used to decode starvation response.

The objectives of this work were to compare resistant pepper rootstocks for low P analyzing factors involved in root morphology and compare the genetic expression of described genes involved in P starvation tolerance.

The plants were cultivated in an hydroponic system with two different P levels (0.5 mM y 1.5 mM) with Adige pepper plants grafted onto 1) 'Numex X', 2) Piquillo, y 3) auto-grafted and controls not grafted. P levels were measured at roots and leaves, fresh weight and dry weight were recorded too. Root systems were analyzed with Winrhizo and samples of RNA from the roots were taken to analyze the expression of previously described P responsive genes. Appropriate primers were designed for genes involved in P starvation signaling, sensing, changes in metabolism and P mobilization.

Plants cultivated under low P conditions showed lower levels of P concentration, however P levels in the roots were variable depending of the different rootstock used. Low P conditions wasn't severe as to make big effects over biomass. Regarding the root systems, there were differences between patterns and their response to P deficiency.

Valid primers for orthologous candidate genes were designed and checked but there was no time to perform de RT-PCR reactions to know the expression level of these genes.

AGRADECIMIENTOS

Ya han pasado diez años desde que empecé mi aventura universitaria, si bien es cierto que ha sido una trayectoria muy irregular, con idas y venidas, pero nunca desvinculándome de lo que fue una institución pública y ahora ha llegado a ser mi segunda casa. Pero llega lo que, a priori, es el final de una etapa de mi vida y digo "a priori" porque lo mismo pensé las dos últimas veces y acabe volviendo.

Durante este tiempo he conocido (y me han conocido) mucha gente que, de alguna forma, se ha quedado dentro de mí generando buenos recuerdos, situaciones muchas veces inverosímiles, y risas, muchas risas que hacen que jamás pueda olvidar esta gran etapa.

En primer lugar agradecer a aquellas personas sin las cuales no podría haber obtenido ningún título universitario, pues es gracias a que me acogieron para realizar mis TFC, y ahora este TFM, es porque los que los tengo y por haberme aguantado durante ya casi 4 años, ellos son Ana María Fita Fernández y Adrián Rodríguez Burruezo, mil gracias por toda la ayuda ofrecida y por prepararme.

No puedo olvidar a mucha gente que me ha ayudado en esta aventura y que ya tienen un hueco dentro de mí, me refiero a Lola Raigón, Vicente Castell y Fernádo Ricart (que en paz descanse) profesores que conocí en la antigua Facultad de Ingenieros Agrícolas y que no dudaron en echar un cable al alumnado cuando les hacía falta; a Emilio "el de reprografía" por tantos favores cuando me faltaba dinero para las fotocopias, Avelina y María que sin su ayuda los trámites administrativos no hubieran sido tan fáciles. A mis compañeros de fatigas Carla, Alba, Esther, Pepe, Sergio, Paco y por supuesto a Nacho quien me acompañó en buenos y malos momentos, sin ellos la carrera no hubiera sido tan llevadera. Agrícolas, aquella gran familia.

De agrónomos también me llevo a grandes personas a las que conocí pidiendo apuntes y se han vuelto parte de mi día a día, llegando a trabajar juntos en el laboratorio ayudándonos en todo aquello que podemos. Me refiero a Carla y Ana María, gracias por todo este tiempo. No tuve demasiado tiempo para conocer a profesorado pero sin duda recordaré siempre a Guillermo Palau por su trato, su paciencia y su peculiar forma de dar clase; a José y su mejora genética en animales, a Toñi, Paco y Pepe por hacer de las patologías vegetales algo ameno, y no olvidarme de Rosa que me ha sacado de más de un apuro administrativo también.

No puedo obviar al profesorado del Máster: Salva, M^a José, Carmelo, Jaime, Miguel...gracias por vuestro apoyo, comprensión y paciencia; a mis compañeros de clase en especial a José María Arroyo, Ángel Rodríguez y, por supuesto, Enrique Galán, que no se ha separado de mi en un año, gracias por estar tan locos como yo, por las noches de reunión y los buenos consejos. Y como no al gran Pablo Sipowicz, a quien le debo mis escasos conocimientos de bioinformática, sin su ayuda hubiera tardado mucho más en realizar este proyecto

No podría dejar de lado a mis compañeros de laboratorio Cristina, Elena, Leandro, Amparo, Miguel, Juan, Ana, Gorka y, sobre todo a David y Andrea que me han acompañado en este duro pero memorable verano. Gracias por aguantarme.

Me gustaría agradecer también su apoyo a aquella familia que no se elige, mis amigos de toda la vida Raúl, Borja, Miguel, Jorge, Juanjo, Efrén, Celia, Mila...y, aunque no los mencione, a todos los que después de más de 20 años aun siguen viviendo situaciones únicas.

Pero no hubiera llegado tan lejos si mi familia, mis hermanos, mis padres y mi tía, no me hubiera apoyado como lo ha hecho, aguantando mal humor, tensión, estrés y un revuelto de emociones que afloran en los momentos duros. Gracias por los consejos, gracias, simplemente, gracias por estar ahí, no podría

tener un mejor respaldo. Y, aunque no los mencione, los llevo muy muy dentro de mí.

Mil gracias a todos por todo!!

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

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL PIMIENTO.....	1
1.2. ORIGEN Y TAXONOMÍA DEL PIMIENTO	3
1.3. PRINCIPALES PROBLEMAS DEL CULTIVO	7
1.3.1 Estreses bióticos	7
1.3.2. Estreses abióticos y fisiopatías.....	8
1.4. EFICIENCIA DE LOS ABONADOS	9
1.4.1. Fósforo: elemento limitante y crucial para una agricultura más sostenible.....	9
.....
1.4.2. Estrategias para reducir el uso de abonados.	11
1.5 LOS SISTEMAS RADICULARES, LA ADQUISICIÓN DE P E INJERTO.....	12
1.6. GENES IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A BAJOS NIVELES DE P.....	14
1.7 DIVERSIDAD GENÉTICA EN PIMIENTO PARA P Y SISTEMAS RADICULARES.....	16
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL.	19
3.2 TOMAS DE MUESTRA Y MEDIDAS REALIZADAS.	22
3.2.1.Tomas de muestra.	22

3.2.2 Análisis mineral.	23
3.2.3 Análisis de los sistemas radiculares.....	24
3.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	24
3.3.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	24
3.3.2. Diseño de cebadores.....	27
3.3.3. Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real.....	29
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 ANÁLISIS DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS.....	31
4.1.1. Parámetros morfométricos de pesos y biomasa.....	31
4.1.2. Niveles de adquisición de fósforo.	33
4.1.3. Parámetros morfométricos de raíz.....	36
4.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	40
4.2.1. Extracción de ARN.....	40
4.2.2. Síntesis cDNA y amplificación DNA de doble cadena.....	43
4.2.3. Puesta a punto de cebadores y reacción en cadena de la polimerasa.....	44
4.3 PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).	48
5. CONCLUSIONES.....	49
6. BIBLIOGRAFIA	50
7. ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de pimiento por comunidades españolas (MAAMA, 2017).....	3
Figura 2. Centro de origen y centros de domesticación del género <i>Capsicum</i> antes de la llegada de los navegadores españoles (Heiser, 1976).....	4
Figura 3. De izquierda a derecha: <i>Fusarium Oxysporum</i> , <i>Alternaria Solani</i> y <i>Botrytis Cinerea</i>).....	7
Figura 4. De izquierda a derecha: <i>Spodopteralittoralis</i> y <i>Frankliniella occidentalis</i>	8
Figura 5. Virus del mosaico del pepino; virus del bronceado del tomate; virus del mosaico del tomate.....	8
Figura 6. Gráficas de las tendencias de la evolución en cuanto a la producción global (a) y la eficiencia de los aportes minerales (b)	11
Figura 7. Detalle del cultivo hidropónico y su distribución en invernadero.....	20
Figura 8. De izquierda a derecha, detalle de las placas Petri con semillas germinadas y bandejas de alveolos con plántulas de pimiento.....	21
Figura 9. Detalle del injerto y plantación en bandejas de alveolos.....	21
Figura 10. Raíces extendidas en papel de acetato. Escáner y software WinRhizo®	24
Figura 11. Materiales utilizados en el proceso de triturado de raíces. A la izquierda la balanza, morteros de cerámica, contenedores de nitrógeno y herramientas para el procesado. A la derecha los tubos Eppendorf y el tubo Falcon donde se almacenaron las muestras trituradas.....	25

Figura 12. Herramientas de cuantificación de RNA. De izquierda a derecha: NanoDrop y material para realizar el gel de agarosa.....	26
Figura 13. De izquierda a derecha: Reactivos del KIT DANAGEN utilizados en la limpieza de RNA; Esquema del procedimiento de limpieza.....	26
Figura 14. Tabla de genes implicados en la resistencia a déficit de fósforo en Arabidopsis y sus ortólogos en pimiento. Se muestra, además, su código en la base de datos de melón.....	28
Figura 15. A la izquierda los reactivos del KIT EXPAND REVERSE TRANSCRIPTASE; A la derecha el termocilcador utilizado para las PCR's	29
Figura16. HRM (High ResolutionMelt), maquinaria utilizada para realizar la PCR cuantitativa	30
Figura 17. Pesos en fresco de cada una de las partes de la planta y su biomasa total.....	32
Figura 18. Pesos en seco de las distintas partes de la planta.....	33
Figura 19. Cantidad de fósforo acumulado en función del peso seco de los diferentes genotipos para parte aérea y raíz.....	35
Figura 20. Gráficas de los niveles de eficacia de absorción de fósforo y eficacia de uso de fósforo.....	36
Figura 21. Valores de los parámetros evaluados de longitud total de raíz, diámetro medio y volumen total.....	38
Figura 22. Índice del número de raíces menores de 1mm frente al número de raíces mayores de 1mm.....	39
Figura 23. Geles de agarosa 1X dónde se muestra la existencia de RNA. En la parte superior aparecen unas bandas simples que corresponden a DNA genómico.....	41

Figura 24. Geles de agarosa 1X. Se muestra el RNA purificado y sin bandas de DNA genómico.....	43
Figura 25. Mezcla de las diferentes muestras de RNA distribuidas en la placa de PCR de 96 pocillos.....	44
Figura 26. Genes candidatos, código utilizado en el ensayo, temperaturas de activación y secuencias de los primers.....	45
Figura 27. Gel de agarosa 1X después de PCR. La flecha azul indica una banda de DNA genómico y la flecha roja las bandas de RNA degradado.....	45
Figura 28. Gel de agarosa 1X después de PCR con los cebadores diseñados.....	46
Figura 29. Gel de agarosa 1X para comparar la expresión del gen housekeeping y unos de los primers diseñados.....	47
Figura 30. De derecha a izquierda: Gel de agarosa 1X después de PCR para comprobar que amplifican todos los primers; Gel de agarosa 1.85X para separar, si las hubiera, las fases de las bandas de DNA.....	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de pimiento en fresco en toneladas por continentes (FAOSTAT, 2017).....	2
Tabla 2. Producción de pimiento en fresco (toneladas) en los principales países productores mundiales.....	2
Tabla 3. Clasificación botánica actual para el género Capsicum (DeWitt y Bosland, 1996).....	6

Tabla 4. Listado de las especies abarcadas en el género <i>Capsicum</i> . En destacado las especies cultivadas y sus hipotéticos ancestros (Adaptado de Nuez et al., 2003)	7
Tabla 5. Relación de códigos en función del injerto realizado. El código P1 pertenece a la variedad Numex X; el código P2 corresponde a la variedad Piquillo	19
Tabla 6. Relación de iones aportados en el agua de riego y en cada solución de riego a través del abonado.....	22
Tabla 7. ANOVA para parámetros morfométricos medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP con fertilización sin fósforo.....	31
Tabla 8. ANOVA para parámetros morfométricos medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP, fertilización sin fósforo	32
Tabla 9. ANOVA para parámetros morfométricos medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP, fertilización sin fósforo	34
Tabla 10. ANOVA para parámetros morfométricos medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP, fertilización sin fósforo	37
Tabla 12. Correlaciones entre la eficiencia de adquisición de P (EAP) y la eficiencia en el uso de P (EUP). Las correlaciones se calcularon sobre los datos medios de cada parámetro y genotipo.....	39
Tabla 13. Concentración de RNA por muestra extraída (ng/μl) y valores de limpieza de muestra (260/280-260/230).....	40
Tabla 14. Concentración de RNA por muestra extraída (ng/μl) y valores de limpieza de muestra (260/280-260/230).....	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL PIMIENTO

A lo largo y ancho del planeta podemos encontrar diferentes variedades de pimientos, chiles y ajíes, en especial la especie *Capsicum annum* L., los cuales se encuentran presentes en los hábitos alimentarios de casi todos los países y, por tanto, forman parte de la gastronomía de la gran mayoría de culturas del planeta. Estas hortalizas son apreciadas por los diferentes aspectos tanto culinarios como nutritivos que poseen sus frutos, diferentes en cada región en las que se cultiva debido a la gran variabilidad que existe dentro de la especie y, además, pueden cubrir las necesidades específicas de cada región. La importancia económica que posee este cultivo es precisamente su presencia dentro de la dieta de la mayor parte del planeta, ya que su consumo puede ser tanto en fresco como procesado industrialmente (Garcés-Claver *et al.*, 2007), dependiendo de la cultura propia de cada región o de las preferencias de la población. Podemos asegurar entonces que el pimiento, junto con el tomate, la berenjena y la patata, es una de las solanáceas más importantes de la agricultura mundial (Ince *et al.*, 2009). El pimiento posee otras propiedades nutritivas, además de sus propiedades nutritivas básicas, como es su alto contenido en vitamina C, antocianos y carotenoides. Además, posee numerosas aplicaciones no alimenticias como puede ser la de materia prima para la industria de cosméticos (Lahbib *et al.*, 2012) y la producción farmacéutica de analgésicos, diuréticos, dietéticos y agentes antitumorales (Caterina *et al.*, 2000; Paran *et al.*, 2007).

La producción mundial de pimiento al cierre del año 2014 sufrió un aumento de cerca de un 6% respecto a la producción obtenida en 2013, alcanzándose valores superiores a los 30 millones de toneladas (32,324 millones de toneladas, FAO 2017). Esta producción se repartió entre un total de 1.937.370 hectáreas (FAO, 2017), cuyas superficies individuales varían en función del continente. La mayor producción la encontramos en el continente asiático, al cual

le pertenece cerca del 70% de la producción mundial; por detrás encontramos el continente americano con poco más del 13% y África con casi un 10 %. El continente europeo lo encontramos en cuarto lugar en la lista con una producción algo menor al 10% (Tabla1). En lo referente a los valores individuales de producción de cada país, en la Tabla 2 se recogen los valores de los seis países con la producción más elevada. Como cabría esperar, a la cabeza encontramos a China, destacando significativamente del resto de países productores con algo más de 16 millones de toneladas, éste valor representa cerca de dos tercios de la producción mundial. El segundo mayor productor es México con casi 3 millones de toneladas, seguido por Turquía e Indonesia con alrededor de 2 millones de toneladas cada uno. España entra dentro del ranking de los países con mayor producción, ostenta el quinto puesto con una producción de algo más de 1 millón de toneladas (Tabla 2).

Tabla 1. Producción de pimiento en fresco en toneladas por continentes (FAOSTAT, 2017).

CONTINENTE	PRODUCCIÓN (TON)	% SOBRE TOTAL
Asia	21757606	67,31
America	4303419	13,31
Africa	3221701	9,97
Europe	2990230	9,25
Oceania	51390	0,16

Tabla 2. Producción de pimiento en fresco (toneladas) en los principales países productores mundiales.

PAÍS	PRODUCCIÓN (TON)
China	16147559
Mexico	2732635
Turkey	2127944
Indonesia	1875095
Spain	1130340
United States of America	914490

Si observamos los datos obtenidos en el año 2016 (MAPAMA, 2017), vemos que en España se destinan algo más de 19.000 hectáreas para el cultivo de pimiento, en dicha superficie, y tal como se comentó con anterioridad, se

producen anualmente algo más de 1 millón de toneladas. De toda esta superficie más de dos tercios se dedican al cultivo protegido, siendo éste el más representativo con una superficie total de 12.641 hectáreas. Aunque este cultivo se produce en todo el territorio español, Andalucía es la región en la que más se concentra la producción estatal con más del 60%, destinado fundamentalmente al cultivo protegido. Le siguen, aunque de lejos, la región de Murcia con un 12% de la producción y Galicia con una producción del 6% (Figura 1). Según los datos de la División de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), COMTRADE, y del servicio estadístico ESTACOM, en 2016 España, y más concretamente Almería, ocupó la segunda posición en la exportación mundial de pimiento por detrás de México y seguido por Holanda.

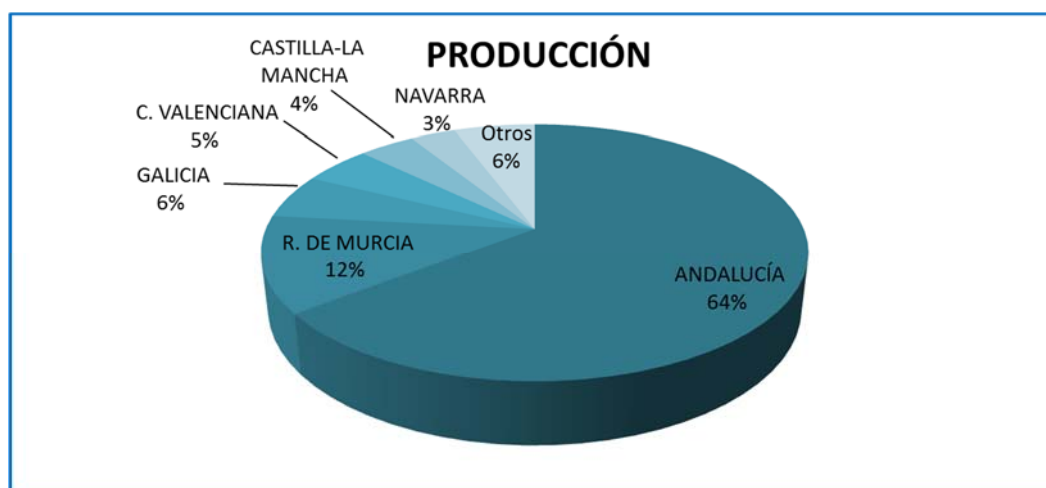


Figura 1. Producción de pimiento por comunidades españolas (MAAMA, 2017).

1.2. ORIGEN Y TAXONOMÍA DEL PIMIENTO

En la actualidad existen varias teorías sobre la procedencia del género *Capsicum*, aunque la más extendida y aceptada es la formulada por McLeod *et al.* (1982), ésta teoría ubica el origen de éste género en el continente sudamericano, localizándolo en el área del altiplano boliviano. Éste es el punto de partida desde el cual el género *Capsicum* empieza su migración tanto al norte, hacía la zona andina, como hacía el sur dirección a la zona amazónica, lo cual produjo un

cambio de comportamiento de las variedades en función de la zona en la que se instaló, favoreciendo así los cambios evolutivos que propiciaron cambios en la información genética y dieron origen a las distintas especies que hoy en día conocemos.

Los cambios evolutivos que se produjeron originaron los dos grandes grupos que diferencian las variedades en función del color de la flor: el grupo de flores blancas y el grupo de flores púrpura. Se piensa que el grupo de las flores blancas habría surgido de la migración y adopción del género en las tierras bajas de Bolivia, hacia la cuenca amazónica. Ésta es la zona dónde *C. baccatum*, el ancestro primario del grupo de flores blancas, encuentra su origen que se relaciona con el área seca del sur de Bolivia. Así pues, el origen del grupo de flores púrpuras, como no podría ser de otra forma, surge de la migración del género *Capsicum* hacia las tierras altas de la zona andina, dando como origen dos especies importantes: *C. cardenasii* como especie fundadora y *C. pubescens* como especie domesticada. Éstas especies son las especies antecesoras que acabarían dando lugar a las formas de los complejos grupos *C. annum*, *C. chinense* y *C. frutescens* (McLeod et al. 1982).

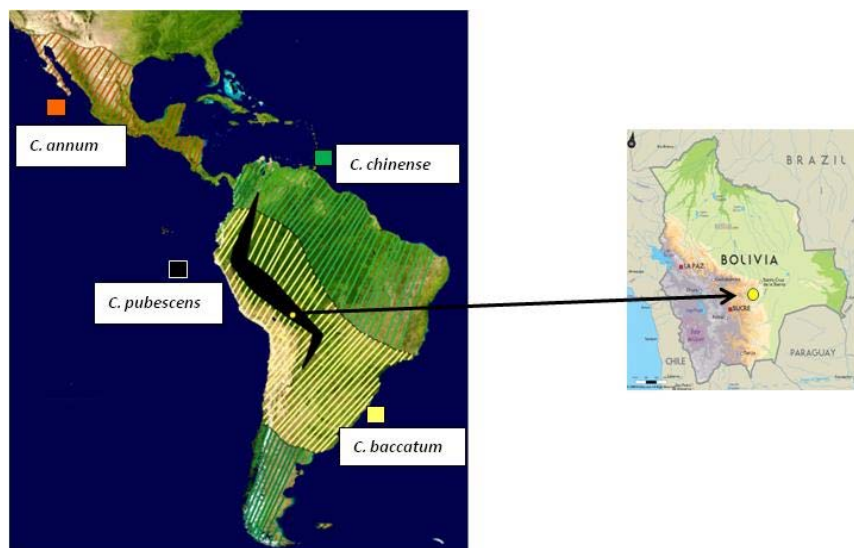


Figura 2. Centro de origen y centros de domesticación del género *Capsicum* antes de la llegada de los navegadores españoles (Heiser, 1976).

Los diferentes caminos evolutivos que se produjeron en la especie dieron como resultado diferentes variedades que fueron domesticadas de forma independiente según su región de implantación y, por tanto, hizo que fuera posible un notable alejamiento. El complejo *annuum* fue domesticado al menos dos veces, dando lugar a *C. annum* en México, y a *C. chinense* en la Amazonía (Pickersgill, 1989; Paran *et al.*, 1997; Votava *et al.*, 2004). Esta doble domesticación condujo a un amplio abanico de colores, tamaños, formas, intensidad de picor y dulzor (Pochard *et al.* 1992).

El pimiento se expandió por el mundo con mucho éxito, como podemos constatar por su presencia hoy en día en numerosos platos. En la Europa de los siglos XIV y XV, período de las expediciones marítimas, las especias suponían gran valor económico teniendo un papel muy importante tanto en la conservación de la comida como en saborizantes. Aquel que controlaba las rutas de las especias controlaba gran parte del planeta. Colón entra en la historia con el objetivo de encontrar un camino más corto hacia las islas del Extremo Oriente para adquirir especias y tomar control del mercado de esta riqueza y en vez de eso encontraron una nueva y gran diversidad de plantas alimenticias, entre ellas, los pimientos, chiles y ajíes que fueron una de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica y son, desde la época prehispánica, parte importante de la dieta regional (Paran *et al.*, 1997; Long-Solís, 1998; Votava *et al.*, 2004).

Dado que la expedición fue financiada para buscar una ruta alternativa hacia Asia, evitando la ruta africana controlada por Portugal, Colón envió a España los pimientos que se presentaban como una excelente alternativa a la pimienta de Asia (*Pipernigrum* L.), hecho que explicaría su veloz difusión por el Viejo Mundo. Ya en el siglo XVI el pimiento aparece ampliamente difundido por Europa, en primer lugar desde España hacia el Mediterráneo, Inglaterra y Europa Central (Namesny, 2006) y, más tarde, de la mano de Portugal, se difundiría *C. frutescens* y *C. chinense*, desde sus colonias brasileñas hacia sus áreas de influencia en África e India (Greenleaf, 1986; Andrews, 1995). En los Estados

Unidos, el pimiento se introdujo por el suroeste gracias a los españoles de finales de siglo XVI, difundiéndose el cultivo hacia la costa y convirtiéndose, hoy en día, en un cultivo importante.

La taxonomía del género *Capsicum* extremadamente compleja debido a que existe una gran variedad de formas y colores dentro, no solo del género, sino también, dentro de la misma especie. En la tabla 3 se muestra la clasificación taxonómica actualmente aceptada (DeWitt y Bosland, 1996).

Tabla 3. Clasificación botánica actual para el género *Capsicum* (DeWitt y Bosland, 1996).

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN	<i>Solanales</i>
FAMILIA	<i>Solanaceae</i>
GÉNERO	<i>Capsicum</i>

La gran mayoría de las especies dentro del género *Capsicum* no es aprovechada a nivel agronómico y apenas un conjunto de cinco especies es aprovechada de alguna manera por la sociedad actual (Tabla 4).

Aun así, podemos aprovechar los caracteres de las plantas silvestres para realizar mejora de las variedades comerciales ya que las primeras están adaptadas a condiciones poco favorables

Tabla 4. Listado de las especies abarcadas en el género *Capsicum*. En destacado las especies cultivadas y sus hipotéticos ancestros (Adaptado de Nuez et al., 2003).

<i>Especies</i>	<i>Carácter</i>	<i>Distribución</i>
A). <i>Especies de flores púrpura.</i>		
• <i>C. cardenasii</i> Heiser & Smith	Silvestre	Bolivia.
• <i>C. eximium</i> A. T. Hunz.	Silvestre	Argentina (Salta, Tucumán), Bolivia.
• <i>C. pubescens</i> R. & P.	Cultivada	De Bolivia a Colombia, Costa Rica, Guatemala, Honduras, México.
• <i>C. "tovari"</i> nom. nud.	Silvestre	Perú.
B). <i>Especies de flores blancas.</i>		
• <i>C. annuum</i> L.		
• var. <i>aviculare</i>	Silvestre	De Colombia al Sur de EE.UU.
• var. <i>annuum</i>	Cultivada	A través de América Latina.
• <i>C. baccatum</i> L.		
• var. <i>baccatum</i>	Silvestre	Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú.
• var. <i>pendulum</i> Wild.	Cultivada	Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia meridional, Ecuador, Paraguay, Perú.
•		Argentina, Bolivia, Paraguay.
• <i>C. chacoense</i> A. T. Hunz.	Silvestre	Brasil (Amazonia), Ecuador, Perú.
• <i>C. chinense</i> Jacq.	Silvestre	Del Sur de Bolivia al Sur de Brasil, Belize, Costa Rica, México, Nicaragua, Indias Occidentales.
• <i>C. chinense</i> Jacq.	Cultivada	
• <i>C. coccineum</i> (Rusby) A. T. Hunz.	Silvestre	Bolivia, Perú.
• <i>C. frutescens</i> L.	Silvestre	A través de América Latina.
	Cultivada	Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Puerto Rico, Venezuela, EE.UU.
• <i>C. galapagoense</i> A. T. Hunz.	Silvestre	Islas Galápagos.
• <i>C. praetermissum</i> Heiser & Smith	Silvestre	Sur de Brasil.

1.3. PRINCIPALES PROBLEMAS DEL CULTIVO

1.3.1. Estrés bióticos

El cultivo del pimiento se puede ver afectado por hongos fitopatógenos de suelo y hongos que afectan al desarrollo vascular de las plantas como: *Fusarium Oxysporum*, *Phytophthora infestans* (Tizón tardío) y *P. capsici* (Tristeza del pimiento), *Alternaria solani* (Tizón temprano) y así como también otros hongos fitopatógenos que afectan a la parte aérea tales como *Leveillula Taurica* (Oidiopsis), *Botrytis Cinerea* (Botritis o podredumbre gris) o *Stemphyllum SP* (Manchas del ajo).



Figura 3. De izquierda a derecha: *Fusarium Oxysporum*, *Alternaria Solani* y *Botrytis Cinerea*.

Existen, además, una gran variedad de insectos y nematodos que pueden llegar a provocar pérdidas económicas importantes en los cultivos. Éste es el caso de la rosquilla negra (*Spodoptera Littoralis*), mosca blanca (*Trialeurodes Vaporarorum*), araña roja (*Tetranychus cinnabarinus*), pulgones (*Aphisgossypii* y *Myzuspersicae*), chinches (*Nezaraviridula L.*), gusanos grises (*Agrotis Sp.*), trips (*Frankliniella occidentalis*) o nematodos (*Meloydogine sp*).



Figura 4. De izquierda a derecha: *Spodopteralittoralis* y *Frankliniellaoccidentalis*

Estas plagas no solo producen daños físicos sino que, además, pueden jugar un papel importante a la hora de transmitir enfermedades relacionadas con bacterias y virus, de las cuales las más importantes de las son el mosaico del pepino (CMV), virus del bronceado del tomate (TSWV), virus del mosaico del tomate (ToMV) o el virus del moteado del pimiento (PMMV) (Maroto, 1992; Nuez et al 2003).

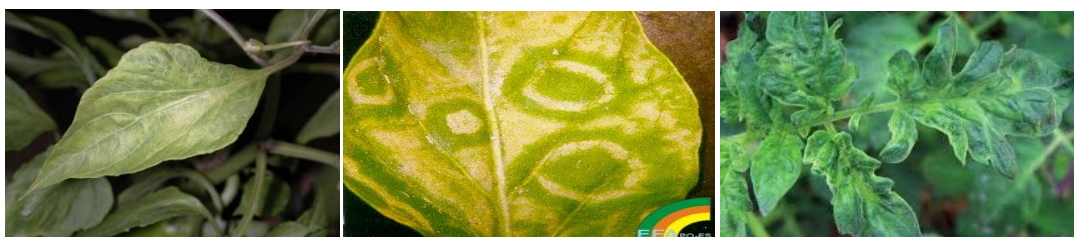


Figura 5. Virus del mosaico del pepino; virus del bronceado del tomate; virus del mosaico del tomate

1.3.2. Estrés abióticos y fisiopatías

Entre los problemas abióticos que nos podemos encontrar en un cultivo, los más estudiados son aquellos que derivan de factores como la sequía o la salinidad que posee el suelo, esto afecta al crecimiento vegetativo y la

producción, siendo un gran problema ya que deriva en una pérdida económica importante para un cultivo comercial. Otros de los problemas importantes de los cultivos son aquellos que derivan de una falta de nutrientes como es el caso del Ca que junto con la sequía produce podredumbre apical y lateral; la falta de K, Mg y Fe que, junto con temperaturas bajas, producen la falta de intensidad de color de los frutos en la madurez; la deficiencia de K también puede producir la necrosis apical o promover los antocianos en el fruto. Al igual que el déficit produce daños en la planta, un exceso de nutriente puede tener el mismo efecto, es el caso del apuntado de los frutos debido al exceso de N junto con el frío y la falta de luz o el cracking (o rayado de frutos) promovido, también, por un exceso de N junto con el frío y un exceso de humedad (Maroto, 1992; Nuez *et al* 2003). Cabe puntualizar, además, la relación que existe entre el exceso de abonado y problemas de salinidad.

Aunque no se citan como problema específico del pimiento los desajustes de fósforo son un problema a tener en cuenta, por tanto, ajustar las dosis de abonado a las necesidades de la planta es algo necesario desde el punto de vista económico, para minimizar los costes en insumos y desde el punto de vista ecológico, para minimizar las pérdidas por lixiviación que causan eutrofización de las aguas. En este sentido el pimiento es un cultivo bastante exigente en cuanto abonado y son conocidos los problemas de eutrofización de aguas en el campo de Cartagena y mar Menor (Murcia) (Martínez y Esteve 2005).

1.4. EFICIENCIA DE LOS ABONADOS

1.4.1. Fósforo: elemento limitante y crucial para una agricultura más sostenible.

El fósforo es, junto con el nitrógeno, el elemento más limitante para el crecimiento y producción de las plantas. El fósforo es adquirido por las plantas a través de las raíces, asimilable únicamente en su forma inorgánica, principalmente como iones ortofosfóricos ($H_2PO_4^-$). Este elemento precipita

fácilmente en el suelo por formar parte de sales cálcicas (Ca), ferrosas (Fe) o aluminicas (Al) así como muchas de las moléculas orgánicas, por tanto, aunque sea un elemento abundante en la naturaleza es, para las plantas, de difícil extracción y asimilación, de ahí su importancia económica y limitante para los cultivos. Debido a esta dificultad, ha sido necesario añadirlo en los abonos en su forma mineral, por ello, más del 30% de la superficie arable del planeta necesita una gran aportación de éste mineral para la producción de los cultivos, lo cual implica unos costes ambientales y económicos muy altos. Los costes ambientales derivados son, entre otros, la contaminación por eutrofización e hipoxia de acuíferos o aguas de escorrentía. Además, la precipitación del fósforo en el suelo puede derivarse en una acumulación subterránea formando rocas fosfóricas de difícil acceso, algo que degradaría la estructura del suelo pudiendo generar, a la larga, cambios medioambientales importantes. De forma indirecta también supondría un impacto ambiental derivado de las extracciones: alteración de ecosistemas, degradaciones de suelos o contaminación tanto de suelos como de acuíferos derivada de usos de maquinaria serían algunos ejemplos.

Tampoco se debe olvidar los costes económicos que supone la obtención de éste mineral. Por un lado tendremos, en primer lugar, el gasto y dificultad de extracción que supone este mineral dónde se incluyen la mano de obra, la maquinaria y mantenimiento de ésta y otros recursos incluidos en el funcionamiento y el proceso de extracción (uso de combustibles fósiles, tratamientos químicos, agua, electricidad...); y segundo por los costes de procesamiento de las rocas fosfóricas para transformarlas en sus formas asimilables por las plantas así como sus costes derivados como pueden ser las instalaciones hidráulicas necesarias para los procesos de transformación, el consumo de agua y sus procesos de depuración posteriores, el almacenamiento, mantenimiento o transporte, que varían en función de las fluctuaciones que sufre el valor del petróleo, normalmente en el aumento del precio. El transporte es, quizá, el factor más importante en el aumento de costes.

1.4.2. Estrategias para reducir el uso de abonados.

En el último siglo, y debido a la denominada revolución verde, los cultivos han sido sometidos a un alta presión de selección así como al aumento de insumos para aumentar la producción por unidad de superficie (y este aumento de producción irá cada vez más en aumento debido al crecimiento demográfico) que se realizó mediante el uso de variedades mejor adaptadas y mejoradas, el uso de abonos sintéticos diferentes a los abonos naturales usados hasta ese momento y, sobretodo, por el uso de nuevas tecnologías que optimizaban el tiempo y reducían la mano de obra necesaria. Hoy se consiguen cosechas record pero no se optimizan los recursos ya que se ha observado (Figura 1) que a lo largo de los años la eficiencia por parte de las plantas en cuanto al uso de recursos minerales ha disminuido (Tilman *et al.* 2002).

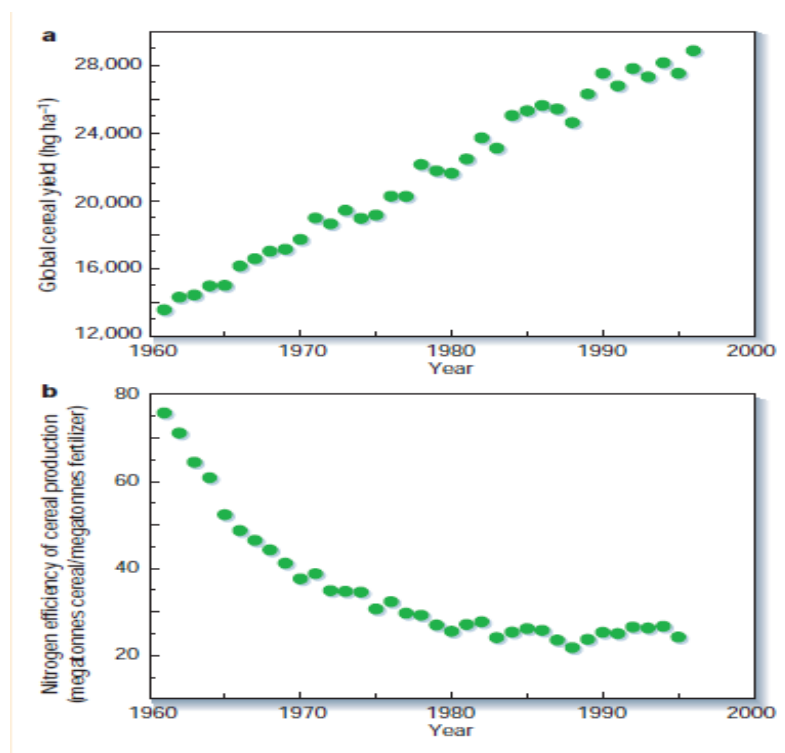


Figura 6. Gráficas de las tendencias de la evolución en cuanto a la producción global (a) y la eficiencia de los aportes minerales (b) (Fuente Tilman *et al.* 2002).

Para abordar la problemática de la baja optimización en el uso de abonados podemos estudiar varios factores como serían la mejora de la

disponibilidad para las plantas, ajustar lo mejor posible la dosis a las necesidades del cultivo, el estudio de aquellos factores que componen el sistema (lixiviación, precipitación e inmovilización de los excesos de abonado, etc...), el estudio de los factores simbióticos como la micorrización, o conseguir una mejora genética de las plantas cultivadas, seleccionando aquellas que tengan una mayor tasa de adquisición y uso de nutrientes, que sería la mejor estrategia para potenciar la reducción del aporte de abonados y promover el mejor aprovechamiento de los recursos existentes en el suelo. El hecho de que el acervo genético de las plantas cultivadas sea generalmente estrecho y que las plantas silvestres sean capaces de absorber nutrientes en condiciones menos favorables indica que existe diversidad genética para mejorar este tipo de caracteres y que sería posible desarrollar este tipo de estrategia para reducir el aporte de insumos al suelo (Lynch, 2007).

1.5 LOS SISTEMAS RADICULARES, LA ADQUISICIÓN DE PE INJERTO

Las plantas poseen adaptaciones morfológicas y fisiológicas para asimilar y usar los nutrientes del suelo, en este caso el fósforo, a su disposición. Para poder crecer en un ambiente con bajo fósforo las plantas utilizan dos estrategias posibles y complementarias: (1) la eficacia de utilización del fósforo por movilización y adaptación del metabolismo de la planta y (2) la eficacia de adquisición del fósforo que se mejora mediante la modificación del sistema radicular y movilizándolo el fósforo del suelo (Vance *et al.* 2003; Fang *et al.* 2009). Con respecto a la segunda estrategia los cambios morfológicos derivados de la deficiencia de fósforo pueden ser el incremento de brotes radiculares, incremento en la longitud y número de raíces laterales, cambios en la gravitacionalidad de la raíz y la formación de una mayor barbada (Bates and Lynch 2001; Lynch and Brown 2001; Lopez-Bucio *et al.* 2003, Hammond *et al.*, 2004).

Dado que una de las principales respuestas de las plantas a la deficiencia en P es modificar su sistema radicular, parece que el injerto sobre variedades con

sistemas radiculares más desarrollados podría mejorar la adquisición de este mineral. El injerto herbáceo ha experimentado en los últimos años un auge sin precedentes (Bhatt *et al* 2013). Esto es debido fundamentalmente al aumento de la incidencia de enfermedades del suelo y el abaratamiento de la técnica en los viveros. El injerto comenzó a captar interés y a utilizarse en mayor medida desde que, en 2005, se prohibiera finalmente el uso de bromuro de metilo como desinfectante para patógenos del suelo. Sin embargo, actualmente se están estudiando de forma más amplia los beneficios que aporta el uso del patrón, sobre todo en cuanto a la resistencia a estreses abióticos (MohdNor *et al* 2014; García-Bañuelos *et al* 2017). En el ámbito de las hortalizas se han conseguido plantas de tomate y pimiento injertadas para contrarrestar los efectos de la salinidad del agua (Penella *et al.*, 2016; Estañ *et al.* 2005), para cultivar tomate en épocas de baja temperatura (Venema *et al* 2008), injertos de melón, sandía o pepino para su cultivo en épocas de baja temperatura (Lee 2003), para incrementar la tolerancia al encharcamiento (Yetisir *et al.* 2006) o para alterar las características cualitativas del fruto (Ruiz *et al.* 2005). La efectividad del injerto es debida al genotipo del patrón, a la compatibilidad del patrón/variedad y a la modulación del comportamiento de la variedad por la interacción patrón-variedad. En este sentido existen todavía pocos estudios que expliquen el comportamiento de los portainjertos en la tolerancia a estreses abióticos y mucho menos en pimiento.

1.6. GENES IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A BAJOS NIVELES DE P

En los últimos años pocos han sido los estudios dirigidos al conocimiento de genes de resistencia a un estrés derivado de la deficiencia de fósforo en hortalizas, si bien es cierto que existe información sobre estos genes gracias a las

investigaciones realizadas durante las dos últimas décadas en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, estudios que han contribuido de manera notable a la comprensión de la señalización y respuesta a este tipo de estrés. Hasta la fecha se han descrito en *A. thaliana* cuatro factores de transcripción: PHR1, PHR2, WRKY75, ZAT6 y BHLH32, calificados como fundamentales en la regulación de la expresión genética de los cambios sufridos por la planta sometida a una deficiencia de fósforo. También se han localizado genes ortólogos para los factores PHR1 y PHR2 en cultivos comerciales tales como el arroz (*Oryza sativa*), y la judía (*Phaseolus vulgaris*) (Valdés-López *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2008).

Actualmente el conocimiento sobre la resistencia al déficit fosfórico se ha extendido no sólo al arroz y la judía sino también a otros cultivos de importancia económica como los altramuces (*Lupinus albus*), repollo chino (*Brassica rapa*), patata (*Solanum tuberosum*) o maíz (*Zea mays*), entre otros. Por ejemplo, se han localizado algunos loci implicados en caracteres cuantitativos (QTL's) para la adquisición de nutrientes que co-localizan con parámetros de la arquitectura radicular por ejemplo en judía (Araujo *et al.* 2005; Beebe *et al.* 2006), soja (Liang *et al.* 2010), arroz (Li *et al.* 2009), brásicas (Yang *et al.* 2010) y en melón (Fita *et al.* 2008). Esta expansión del estudio de la tolerancia al estrés fosfórico en otras especies diferentes de la planta modelo nos ha mostrado cuán compleja puede llegar a ser la red de genes implicados en la respuesta a la baja disponibilidad de fósforo y lo dificultosa que puede llegar a ser su manipulación.

Aquellos genes que se han detectado que se encuentran involucrados en la adaptación a condiciones de baja disponibilidad fosfórica han sido descritos para diferentes respuestas: la regulación de la adquisición de fósforo, remobilización interna y la modificación del metabolismo y transducción de las señales que las células reciben.

Entre estos genes podemos encontrar aquellos que codifican las ribonucleasas (RNS), que normalmente aumentan cuando la cantidad de fósforo inorgánico es insuficiente, y los que codifican para las fosfatasas ácidas púrpuras

(PAP's), que intervienen en la liberación de fósforo inorgánico, de forma tanto interna como externa, a partir de productos orgánicos para que pueda ser transportados y usados allí donde la planta lo requiera como respuesta a las variaciones nutritivas. Su importancia trasciende a la movilización del fósforo orgánico presente en el suelo para hacerlo asimilable por las raíces, remobilización del fósforo orgánico existente en los órganos senescentes así como en tejidos de almacenamiento y compartimentos intracelulares. Esto es importante ya que se han realizado estudios en Arabidopsis, arroz y altramuz donde ha quedado demostrado que la falta de fósforo inorgánico repercute en el metabolismo del carbono dando como resultado mayor acumulación de almidón en las hojas y un aumento en la síntesis de antocianinas para proteger la maquinaria fotosintética.

Otro de los problemas derivados de la deficiencia de fósforo es la modificación que se produce en la composición estructural de la membrana lipídica lo que provoca una disminución de la cantidad de fosfolípidos presentes en ella. Como consecuencia de ello la respuesta que se obtiene, en un medio carente de fósforo, es la regulación y síntesis tanto de sulfolípidos como de galactolípidos.

Aunque en pimiento no existe demasiada información sobre su sistema radicular, ni los ideotipos adecuados para los diferentes estreses, ni sobre la diversidad genética existente y aprovechable para el desarrollo de patrones y, mucho menos, su control genético, hoy en día se puede aprovechar la información obtenida a lo largo de estos años en cuanto a genes y su función disponible para otras plantas, en concreto Arabidopsis, y en los genes que dieron una buena respuesta a la deficiencia al fósforo en melón (Fita et al., 2010). Para poder correlacionar genes descritos en estas especies y obtener los ortólogos en pimiento podemos utilizar diferentes herramientas genómicas y bioinformáticas, como el genoma del pimiento (<https://solgenomics.net/>) y herramientas de alineamiento masivo (BLAST) que permiten realizar estudios *in silico* que faciliten

el diseño de cebadores específicos para la detección de los genes candidatos para pimiento con función implicada en la tolerancia al déficit de fósforo.

1.7 DIVERSIDAD GENÉTICA EN PIMIENTO PARA P Y SISTEMAS RADICULARES

Se ha demostrado, gracias a estudios previos realizados por el grupo de investigación, que existe una gran variabilidad fenotípica para la arquitectura de la raíz entre variedades en lo que se refiere a adaptación a sequía y a condiciones subóptimas de los niveles de los nutrientes, aunque estas características no son iguales en el estadio joven y el adulto (Peláez, 2011). El estudio se realizó mediante el uso de marcadores micro satélite lo cual permitió detectar 59 alelos SSR que son de utilidad en el estudio de diversidad e identificación varietal y así distinguir los posibles candidatos para ser usados como patrones.

Así mismo se realizó un estudio previo a este que se presenta dónde se ensayaron variedades de pimiento para ver su respuesta morfológica frente al estrés producido por un déficit de fósforo y se observó que, efectivamente, las plantas reaccionaban al estrés promoviendo la formación de raíces finas, comúnmente llamada barbada, y alargando sus raíces principales (Gil 2015). De la misma forma, se detectaron variedades candidatas para ser usadas como patrón y que, además, si se combinan ambos estudios se puede llegar a obtener unos buenos resultados.

2. OBJETIVOS

Gracias a trabajos anteriores el grupo disponía de variedades de pimiento con una respuesta diferencial al bajo aporte de P. En el presente trabajo se propuso:

- Comparar el uso como portainjertos tolerantes a bajo P de variedades descritas anteriormente como tales.
- Analizar los posibles factores de dicha adaptación en especial aquellos relacionados con la morfología del sistema radicular.
- Comparar la expresión génica entre los diferentes portainjertos para genes descritos anteriormente como involucrados en la tolerancia a la deficiencia de fósforo en las raíces.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos que se plantean en el trabajo se escogieron variedades de pimiento con valores altos de EAP y EUP, derivados de ensayos previos (Gil 2013 y Pereira-Dias *et al* 2016), y se realizaron injertos para comprobar la eficacia de estas variedades como patrón de la variedad comercial expuestas a una deficiencia en los niveles de fósforo.

En concreto se usaron las variedades Numex X y Piquillo como pie, o portainjertos, sobre los cuales se injertó la variedad Adige, que también se usó como portainjertos de sí misma y sin injertar. Todas ellas contaban con una réplica tanto en tratamiento sin aporte de fósforo como en tratamiento convencional (o con abonado fosfórico). Los códigos usados en el ensayo fueron:

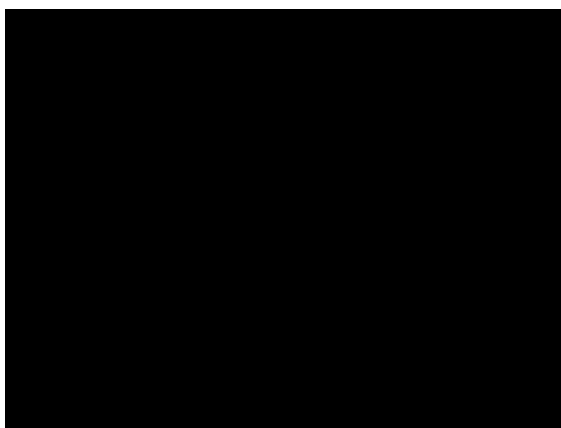


Tabla 5. Relación de códigos en función del injerto realizado. El código P1 pertenece a la variedad Numex X; el código P2 corresponde a la variedad Piquillo.

El código "Adige/P1" está referido a aquellas plantas de la variedad Adige injertadas sobre pie de la variedad Numex X, mientras que el código "Adige/P2" se refiere a las plantas de Adige injertadas sobre la variedad Piquillo.

Se diseñó un experimento con dos niveles de aportación de fósforo: dos abonados diferentes para la colección de plantas: un tratamiento consistió en un

abonado con déficit de fósforo y el otro ensayo se realizó un abonado con aporte de fósforo estándar para la especie, o lo que es lo mismo, un abonado convencional. El experimento se realizó mediante cultivo hidropónico con los requisitos de abonado planteados anteriormente, emplazado en los invernaderos de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Se cultivaron 20 plantas por genotipo y tratamiento (160 plantas totales). Los genotipos y tratamientos se distribuyeron por el invernadero en bloques al azar.



Figura 7. Detalle del cultivo hidropónico y su distribución en invernadero.

Todas las variedades se sembraron en ciclo de primavera. Las semillas se desinfectaron antes de sembrarlas, para ello se sumergieron 5 minutos en agua con lejía al 30% (80 g de cloro activo por litro) y realizando, posteriormente, tres lavados de 1, 5 y 10 minutos para eliminar el exceso de lejía antes de ser sembradas. Una vez desinfectadas las semillas se pusieron a germinar en placas petri, en las cuales había, por este orden, papel de filtro, una capa de algodón, un papel de filtro, las semillas y por último otra capa de papel de filtro, y todo ello mantenido bajo condiciones de alta humedad. Como preventivo de la aparición de hongos en las placas se utilizó un producto fungicida, thiram.

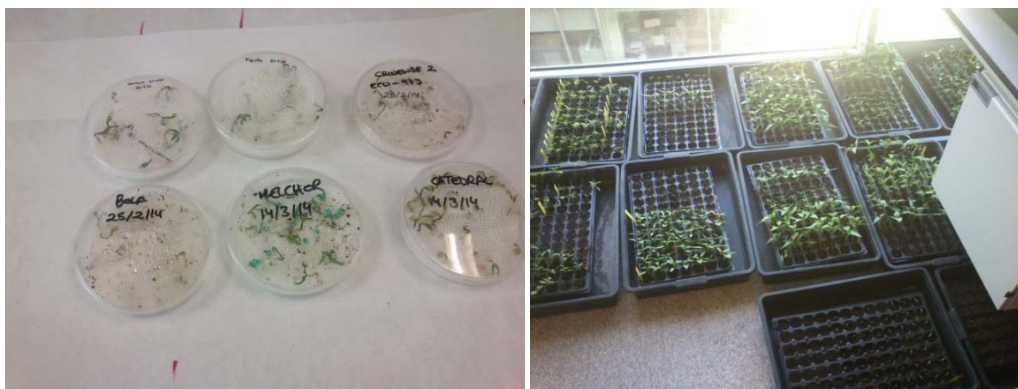


Figura 8. De izquierda a derecha, detalle de las placas Petri con semillas germinadas y bandejas de alveolos con plántulas de pimienta.

Las placas se mantuvieron bajo temperaturas controladas de 25-18°C (día/noche) y con luminosidad baja hasta su germinación. Una vez germinadas las semillas se trasplantaron a las bandejas de alveolos, con una mezcla de arena y turba (75%-25%), controlando la posición y distribución de las diferentes variedades para no mezclarlas e inducir a error. Se mantuvieron en las bandejas de alveolos durante 20 días. En ese momento se realizó el injerto que consistió en un corte en visel del pie y la variedad y la posterior unión de las mismas con un clip de plástico. Se mantuvieron las plantas en condiciones de humedad superior al 95 % y oscuridad durante 5 días y después se fueron aclimatando en el invernadero hasta que los injertos cogieron fuerza. Un mes después de realizar el injerto las plantas se trasplantaron a los botes con la solución hidropónica según el tratamiento.



Figura 9. Detalle del injerto y plantación en bandejas de alveolos.

Una vez en los botes las plantas cultivaron durante 30 días con un sistema hidropónico con dos tratamientos alternativos: uno con una solución nutritiva convencional con un aporte normal de fósforo (tratamiento control o Alto P 1.5 mM) y otro con la misma solución nutritiva donde la aportación de P fue de 0.5 durante 20 días y ninguna en los últimos 10 días. Las características de las dos soluciones nutritivas se muestran a continuación en la tabla de proporciones de los distintos elementos incluidos en el abonado (Tabla 5).

Después de estos 30 días de cultivo se recogieron las plantas y se procedió con el análisis de la planta, tanto para morfología como para expresión génica.

Tabla 6. Relación de iones aportados en el agua de riego y en cada solución de riego a través del abonado.

	iones	Agua de riego	Tratamiento control	Tratamiento NoP
Aniones (mMol/l)	NO ₃ ⁻	0,11	15,40	15,4
	H ₂ PO ₄ ⁻	0	1,50	0,5-0
	SO ₄ ²⁻	2,45	0,00	0
	HCO ₃ ⁻	3,1	-2,60	-2,6
	Cl ⁻	1,61	0,00	0
Cationes (mMol/l)	NH ₄ ⁺	0	1,50	1,5
	K ⁺	0,4	1,50	6,1
	Ca ²⁺	3,15	1,60	1,6
	Mg ²⁺	1,51	1,75	1
	Na ⁺	0	0,00	0

3.2 TOMAS DE MUESTRA Y MEDIDAS REALIZADAS

3.2.1 Tomas de muestra.

Al finalizar el cultivo, 30 días tras el trasplante (DTT), se seleccionaron 8 plantas de cada tipo de injerto y tratamiento y se tomó 1 gr de cada uno de los sistemas radiculares para poder realizar la extracción de ARN, también se tomaron muestras de hojas y raíces para evaluar el contenido en P y otras medidas fisiológicas que no forman parte de este trabajo. Las partes aéreas y las raíces se pesaron en fresco, y en seco. El resto de plantas se pesaron en fresco y

se conservó la raíz en etanol al 70% para poder realizar posteriormente el estudio de la arquitectura radicular.

3.2.2 Análisis mineral

El análisis mineral de partes aéreas y raíces se realizó mediante digestión ácida y análisis con espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES), según el protocolo que se detalla a continuación.

Se pesaron entre 0,5 y 1 gramos de tejido vegetal y se pusieron en tubos de digestión a los cuales se les añadió ácido nítrico concentrado (HNO₃). Se dejó en reposo 24h. Transcurrido este tiempo se colocaron los tubos en el termobloque digestor con el siguiente programa de tiempos y temperaturas: 10 minutos a 120°C y 20- 25 minutos a 170°C. Tras lo cual se sacaron las muestras y se enfriaron para después añadir 2ml de ácido perclórico al 70% (HClO₄). Una vez realizado este procedimiento, se volvieron a colocar las muestras en el termobloque a 200°C hasta finalizar la digestión, quedando un líquido de color amarillo limón o incoloro. Tras este paso se dejó enfriar y se ajustaron los volúmenes con agua destilada. De la misma forma se prepararon muestras blanco.

Una vez preparadas las muestras se analizaron mediante ICP-AES. El ICP funciona usando un plasma de argón en el que se inyecta una muestra líquida atomizada. La muestra se ioniza en el plasma y los iones emiten luz a diferentes longitudes de onda características que posteriormente se miden. Con este método se midió la concentración de P en las muestras como porcentaje en peso seco.

Además, se calcularon los valores de la eficiencia en la adquisición de fósforo (EAP) como la diferencia entre el P total de la planta en condiciones óptimas (control) y el P total de la planta en condiciones restrictivas de P, y los

valores de la eficiencia en el uso del P (EUP) como el incremento de biomasa debido a la diferencia de P total en la planta (Hammond et al. 2009).

3.2.3 Análisis de los sistemas radiculares

La estructura radicular se estudió mediante el escaneo de la raíz y posterior análisis con el software WinRhizo[®]. Dada la gran cantidad de raíces laterales de cada uno de los sistemas radiculares estos se diseccionaron de tal manera que las raíces laterales se podían extender en varias láminas de papel de acetato para obtener una captura de imagen adecuada para su posterior análisis (figura X). Con el programa se midió la longitud total de raíces (cm), el volumen de la raíz (cm³) el diámetro medio de raíces (mm), y la longitud total de raíces de menores de 1 mm y mayores de 1 mm en diámetro. El peso en seco se midió una vez analizadas las raíces mediante el escaneo y después de permanecer en estufa a 60°C durante 3 días, asegurándonos así que había perdido toda la humedad presente en las raíces.



Figura 10. Raíces extendidas en papel de acetato. Escáner y software WinRhizo[®].

3.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.3.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Las muestras de raíces obtenidas para la extracción de ARN se envolvieron en papel de aluminio, se etiquetaron y se introdujeron en nitrógeno líquido y se trasladaron a un congelador a -80°C para preservarlas y evitar la degradación de RNA.

El proceso de extracción RNA y síntesis de cDNA se realizó en cuatro fases. Fueron las siguientes:

- 1) Triturado de raíces:** Cada raíz se trituró en un mortero de porcelana, previamente lavado y enfriado para que no pudiera interferir en la contaminación ni degradación del RNA. Una vez triturada la raíz se dividía en tres tubos Eppendorf de 2 ml y se pesaba 100 mg de muestra en cada uno mediante una balanza de precisión (previamente tarada con un tubo vacío). Durante el proceso de triturado, las muestras ya procesadas se mantenían en nitrógeno líquido antes de almacenarlas en un congelador a -80°C .

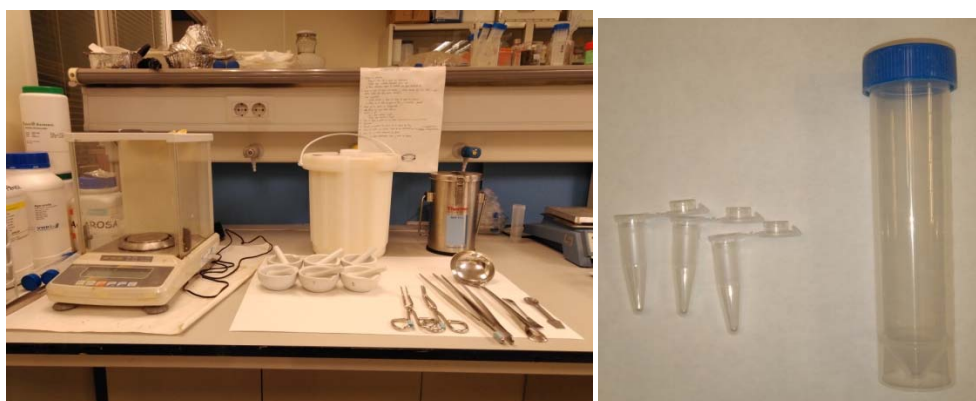


Figura 11. Materiales utilizados en el proceso de triturado de raíces. A la izquierda la balanza, morteros de cerámica, contenedores de nitrógeno y herramientas para el procesado. A la derecha los tubos Eppendorf y el tubo Falcon donde se almacenaron las muestras trituradas.

- 2) Extracción de RNA:** Para realizar la extracción se usó un procedimiento convencional basado en la extracción mediante TRIZOL[®], junto con otros reactivos como cloroformo, isopropanol y etanol (Anexo I). Las muestras se mantuvieron en todo momento en frío para mantener estable el RNA.

- 3) Cuantificación del RNA y análisis de degradación:**

Una vez realizada la extracción se procedió a la medición cuantitativa de RNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) mediante un NanoDrop[®] y posteriormente se procedió a la medición cualitativa mediante un gel de agarosa (1%, TAE 1X).



Figura 12. Herramientas de cuantificación de RNA. De izquierda a derecha: NanoDrop y material para realizar el gel de agarosa

4) Limpieza RNA: Este paso se realizó mediante un KIT de limpieza de DANAGEN (Anejo II). El método consiste en la separación del RNA y el DNA genómico presente en la muestra para obtener una muestra pura de RNA. Para ello, al principio del procedimiento, se utiliza un tampón de unión que junto con etanol 100% se añade a la muestra y se pasa a una columna de "gDNA removal" colocada en un tubo de recogida. Seguidamente se centrifuga 1 minuto a 8.000 revoluciones para obtener un sobrenadante al que se le añadió etanol 100%. Después de este paso también se procedió a la cuantificación del RNA resultante mediante NanoDrop y su medición cualitativa mediante el gel de agarosa.

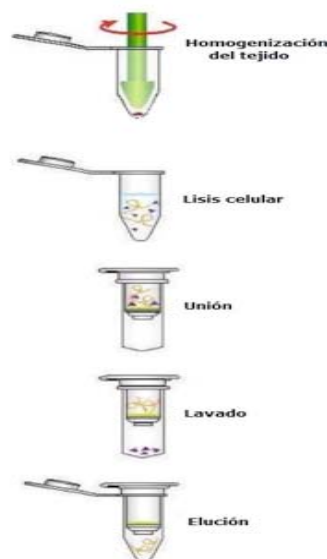


Figura 13. De izquierda a derecha: Reactivos del KIT DANAGEN utilizados en la limpieza de RNA; Esquema del procedimiento de limpieza.

5) Transcripción RNA-cDNA: Para convertir el RNA extraído en una cadena simple de DNA (cDNA) utilizamos un kit de ROCHE®, EXPAND REVERSE TRANSCRIPTASE (Anejo III), una placa de 96 dónde se realizó la mezcla de los reactivos junto con la muestra de RNA extraída. En los pocillos de la placa se pusieron las muestras de RNA, los oligos (oligodT), agua pura, un tampón para favorecer la formación de la cadena simple de DNA, dNTPs y la transcriptasa que será la encargada de formar esa cadena de DNA; para realizar esta parte del proceso se necesitó la ayuda de un termociclador dónde se acondicionaron las temperaturas para los diferentes pasos del protocolo y así poder sintetizar la cadena simple (cDNA).

3.3.2. Diseño de cebadores

Para nuestro estudio seleccionamos 16 genes que estaban relacionados con diferentes niveles de la respuesta a la deficiencia de fósforo tanto en *Arabidopsis* como en melón (Fita et al., 2012) (Figura 14). En la tabla podemos ver el código de identificación para *Arabidopsis* (TAIR 6 locus), el código de identificación para melón (Gen Bank Nucleotide) y su correspondencia en el genoma de pimiento (Código Capsicum).

MATERIALES Y MÉTODOS

COMMON	DESCRIPTION	GENBANK NUCLEOTIDE	TAIR 6 locus	TAIR 6 description	Código capiscum
At1g08650	phosphoenolpyruvate carboxylase kinase, putative identical to phosphoenolpyruvate carboxylase kinase [Arabidopsis thaliana] gi 6318613 gb AAF06968; contains protein kinase domain, Pfam:PF00069	NM_100738	AT1G08650	phosphoenolpyruvate carboxylase kinase, identical to phosphoenolpyruvate carboxylase kinase (Arabidopsis thaliana) gi:6318613;gb:AAF06968; contains protein kinase domain, Pfam:PF00069	CA05g04290 CA06g10360 CA06g25820
At2g02990	ribonuclease, RNS1 identical to ribonuclease SP:P42813, GI:561998 from [Arabidopsis thaliana]	NM_126351	AT2G02990	ribonuclease 1 (RNS1), identical to ribonuclease SP:P42813 Ribonuclease 1 precursor (EC 3.1.27.1) {Arabidopsis thaliana}, GI:561998 from (Arabidopsis thaliana)	CA11g04200 CA11g04150
At2g16430	purple acid phosphatase (PAP10) identical to purple acid phosphatase (PAP10) GI:20257482 from [Arabidopsis thaliana]	NM_127196	AT2G16430	purple acid phosphatase (PAP10), identical to purple acid phosphatase (PAP10) GI:20257482 from (Arabidopsis thaliana)	CA01g19520 CA04g21260
At2g26660	SPX domain gene 2 (SPX2); CONTAINS InterPro DOMAIN/s: SPX, N-terminal (InterPro:IPR004331); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: SPX domain gene 1 (TAIR:AT5G20150.1); Has 1206 Blast hits to 1202 proteins in 209 species: Archae - 0; Bacteria - 6; Metazoa - 245; Fungi - 512; Plants - 320; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 123 (source: NCBI BLink).	NM_128223	AT2G26660	ARABIDOPSIS THALIANA SPX DOMAIN GENE 2, ATSPX2, SPX DOMAIN GENE 2, SPX2 SPX domain-containing protein 2 (SPX2).	CA09g17720 CA02g00990 CA02g28040
At3g11670	digalactosyldiacylglycerol synthase 1 (MGDG:MGDG galactosyltransferase) (galactolipid galactosyltransferase) (DGD1) identical to digalactosyldiacylglycerol synthase (DGD1) GI:5354158 [Arabidopsis thaliana]	NM_111999	AT3G11670	digalactosyldiacylglycerol synthase 1 (DGD1) / MGDG:MGDG galactosyltransferase / galactolipid galactosyltransferase, identical to digalactosyldiacylglycerol synthase (DGD1) GI:5354158 (Arabidopsis thaliana)	CA10g17170 CA08g06590 CA10g06400
At4g33030	UDP-sulfoquinovose synthase (sulfite:UDP-glucose sulfotransferase) (sulfolipid biosynthesis protein) (SQD1) identical to gi:2736155	NM_119457	AT4G33030	UDP-sulfoquinovose synthase / sulfite:UDP-glucose sulfotransferase / sulfolipid biosynthesis protein (SQD1), identical to gi:2736155	CA08g02360
At5g39090	Catalysis of the transfer of a group, e.g. a methyl group, glycosyl group, acyl group, phosphorus-containing, or other groups, from one compound (generally regarded as the donor) to another compound (generally regarded as the acceptor). Transferase is the systematic name for any enzyme of EC class 2.	NM_123271	AT5G39090	HXXXD-type acyl-transferase family protein. Transferase family protein, similar to anthocyanin 5-aromatic acetyltransferase	CA07g13040 CA10g03640

Figura 14. Tabla de genes implicados en la resistencia a déficit de fósforo en Arabidopsis y sus ortólogos en pimienta. Se muestra, además, su código en la base de datos de melón.

Para ello utilizamos la biblioteca genética de Arabidopsis, a la cual se puede acceder libremente mediante su portal de internet, denominado TAIR (The Arabidopsis Information Resource). A partir de la referencia TAIR de los genes en los que estábamos interesados obtuvimos su secuencia FASTA. Para encontrar las secuencias homólogas en pimienta usamos el portal de SolGenómics donde podemos identificar secuencias de DNA genómico, secuencias de cDNA, secuencias proteicas (que transcribiremos mediante el portal ExPasy) y las secuencias intrónicas. A partir de las secuencias de los genes ortólogos en pimienta a los genes de partida se diseñaron los cebadores de tal manera que estuvieran en los extremos de los exones. De esta manera nos asegurábamos de que si existía alguna contaminación con DNA genómico sería fácilmente identificable por una diferencia en el amplicón resultante.

Para diseñar los cebadores se utilizó el portal PRIMER3 input (versión 0.4.0) mediante las secuencia sexónicas obtenidas previamente en el portal de SolGenomics, indicando una longitud máxima de cebadores de 20 b, un tamaño

de amplicón entre 100 y 150 pb, que tuvieran un cepo GC, y que evitaran la formación de horquillas y dímeros de cebadores.



Figura 15. A la izquierda los reactivos del KIT EXPAND REVERSE TRANSCRIPTASE; A la derecha el termocilcador utilizado para las PCR's.

3.3.3. Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real

Una vez realizada la síntesis de cDNA se procedió con la amplificación de DNA usando los cebadores que previamente diseñamos (Anejo IV). La comprobación de la especificidad y buen diseño de los cebadores se realizó mediante PCR ajustando la temperatura de alineamiento a partir de la temperatura teórica de fusión de los cebadores. Se ajustó la cantidad y concentración de reactivos para obtener amplificaciones abundantes.

Una vez optimizados los parámetros de la reacción en cadena de la polimerasa estaba programado realizar las reacciones en tiempo real mediante el equipo Roche Light Cycler® 480/384. Como gen control de la expresión constitutiva se eligió el gen CaUBI-3 por su gran estabilidad en condiciones de estrés (Wang et al 2011).



Figura 16. Maquinaria utilizada para realizar la PCR cuantitativa

Una vez realizada la PCR cuantitativa se estudiarán los resultados observando las curvas obtenidas. Para ello se tendrá una muestra de control negativo, una muestra sin RNA y, por tanto, sin síntesis de DNA, y una muestra control positiva de un gen que se exprese indiferentemente de las condiciones externas. Éstos controles nos darán una semirrecta o una recta en el control negativo y una curva sigmoidea en el caso del control positivo.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa StatgraphicsCenturion, y se realizaron análisis de la varianza calculándose, a su vez, las correlaciones de Pearson.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

4.1.1. Parámetros morfométricos de pesos y biomasa.

El análisis de la varianza nos mostró diferencias significativas entre los distintos patrones para todos los pesos, incluyendo la biomasa, y los tratamientos realizados en cuyo caso el único que no se mostró significativo fue el peso de la hoja. De cualquier modo, el efecto más importante fue el patrón en todos los parámetros evaluados ya que en tres de los cuatro se obtuvo un P-valor por debajo de 0,001. Para las interacciones entre el patrón y el tratamiento no se obtuvo significancia alguna.

Tabla 7. ANOVA para parámetros morfométricos medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP con fertilización sin fósforo.

C.M. ¹					
Efecto	g.l. ²	Peso Fresco Hojas	Peso Fresco Tallo	Peso Fresco Raíz	Biomasa Total
Principales					
Patrón (P)	3	1237,7***	2044,47***	504,38*	5867,15***
Tratamiento (T)	1	458,10	588,71*	493,84*	4608,93*
Interacciones					
PxT	3	53,8	147,62	50,18	691,13
Error	46	149,22	126,23	119,92	966,35

¹cuadrado medio, ²grados de libertad; ^{NS}, *, ** y *** indican no significativo para una probabilidad $p > 0.05$ y significativo para $p < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente, de acuerdo al ratio estadístico F.

En las gráficas de medias se puede observar que la variación entre los pesos de las diferentes partes de la planta no sufren una variación notable en función del tratamiento realizado. Para el peso en fresco de las hojas el genotipo de Adige sin injertar fue el que obtuvo unos valores más altos, mientras que, tanto en el peso fresco del tallo y de la raíz, así como en la biomasa total el injerto realizado con Adige/Adige tuvo los valores más altos, sólo superado por el injerto Adige/Piquillo para el peso de las raíces en seco en el tratamiento control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

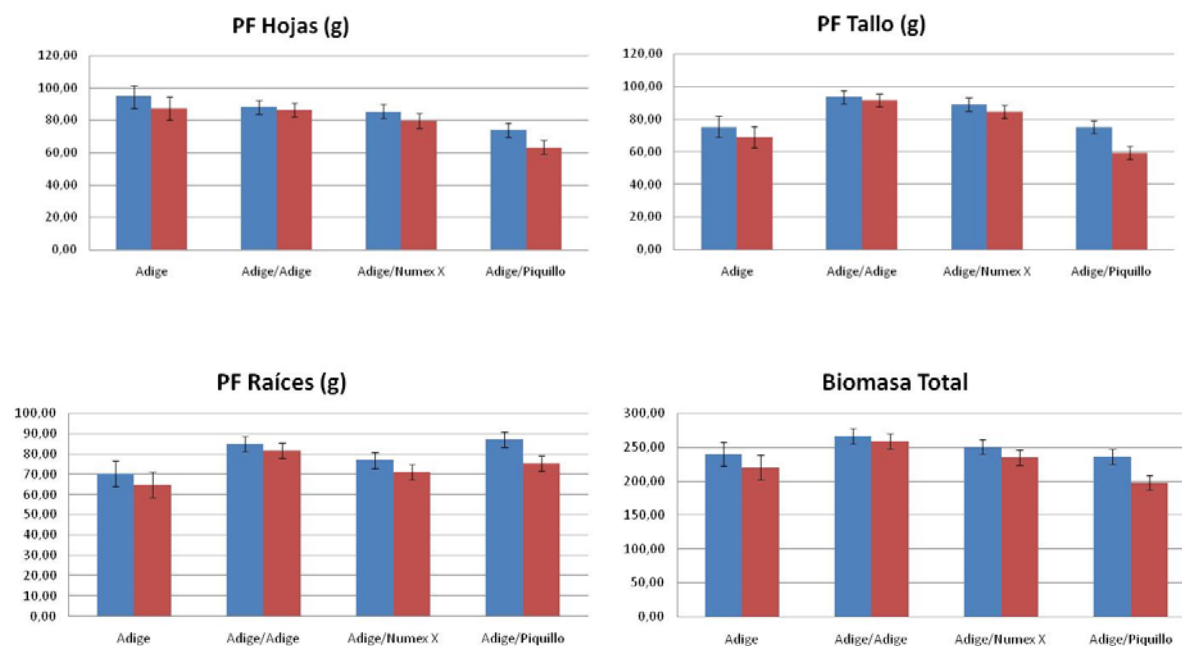


Figura 17. Pesos en fresco de cada una de las partes de la planta y su biomasa total.

Al realizar el análisis de la varianza para los pesos secos vemos que, al igual que pasaba en los pesos frescos, el efecto más importante es el patrón sobre todo para los pesos de hoja y tallo. En este caso el peso de la raíz no fue significativamente diferente entre patrones. Solamente el peso del tallo varió significativamente con el tratamiento realizado, siendo nula la interacción genotipo x ambiente en todos los casos.

Tabla 8. ANOVA para parámetros morfométricos medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP con fertilización sin fósforo.

C.M. ¹					
Efecto	g.l. ²	Peso Seco Hojas	Peso Seco Tallo	Peso Seco Raíz	Biomasa Total S
Principales					
Patrón (P)	3	32,66***	43,61***	9,12	151,72***
Tratamiento (T)	1	6,35	19,77**	1,34	65,96*
Interacciones					
PxT	3	0,57	2,61	7,63	10,03
Error	46	2,86	3,01	3,48	14,36

¹cuadrado medio, ²grados de libertad; NS, *, ** y *** indican no significativo para una probabilidad $p > 0.05$ y significativo para $p < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente, de acuerdo al ratio estadístico F.

Al igual que ocurría con los pesos frescos, la variación sufrida en la media de los diferentes pesos no es muy alta, manteniéndose muy apegada en todos los casos excepto en el peso de la raíz que ya se denotan diferencias más importantes. Como en el caso anterior, el injerto Adige/Adige posee los valores más altos en todas las evaluaciones excluyendo el injerto Adige/Piquillo que, nuevamente, vuelve a ser más alto para el peso de raíz.

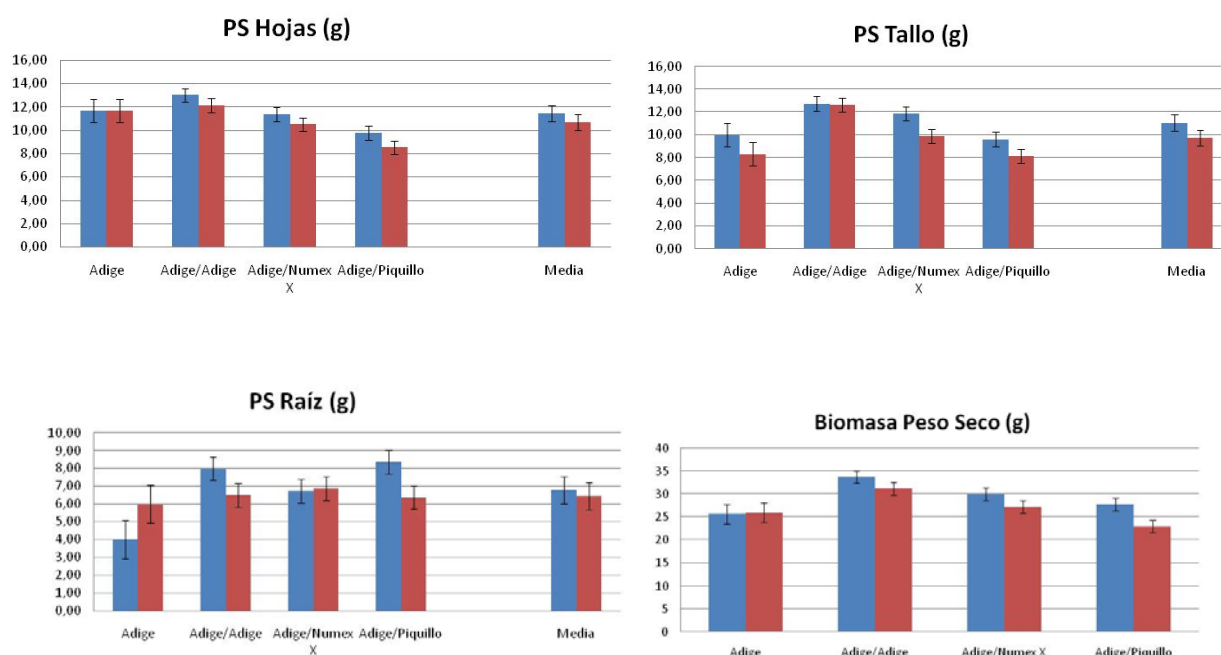


Figura 18. Pesos en seco de las distintas partes de la planta.

La falta de grandes efectos de los tratamientos en los pesos y biomasa puede ser debido a la época del año en que se realizaron los ensayos, a la duración del mismo y a las concentraciones elegidas. El P es más móvil con altas temperaturas que sin duda se dieron en el ciclo de cultivo del ensayo. Eso unido a que las plantas no llegaron a su estado adulto y que tuvieron un periodo muy escaso de ayuno de P hace que el efecto del tratamiento fuera muy suave.

4.1.2. Niveles de adquisición de fósforo.

El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre los niveles de P en los distintos órganos de la planta (Tabla 9). En cuanto al efecto del patrón, sólo fue

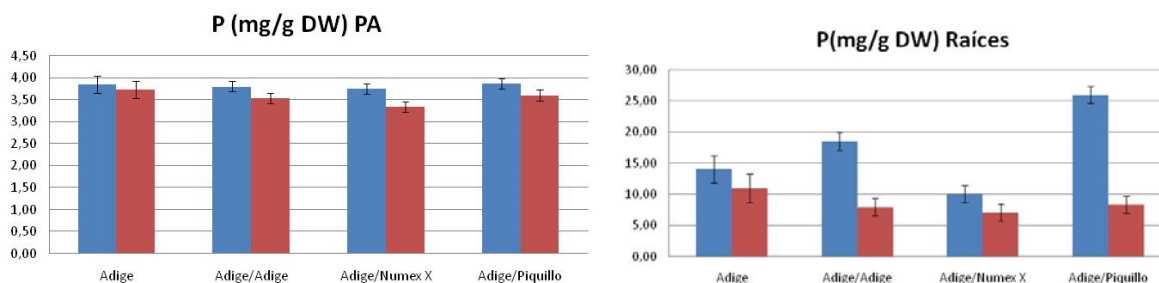
significativo para la concentración de P en las raíces, donde también existió interacción patrón x tratamiento.

Tabla 9. ANOVA para la concentración de P medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP con fertilización baja en P.

C.M. ¹				
Efecto	g.l. ²	[P] Parte Aerea	[P] Raíces	P Total
Principales				
Patrón (P)	3	0,13	198,22***	207,02***
Tratamiento (T)	1	0,81*	823,56***	876,42***
Interacciones				
PxT	3	0,04	165,09***	163,60***
Error	46	0,11	15,48	15,0329

¹cuadrado medio, ²grados de libertad; ^{NS}, *, ** y *** indican no significativo para una probabilidad p>0.05 y significativo para p<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente, de acuerdo al ratio estadístico F.

Las gráficas nos muestran cómo la variación en la concentración de P entre los tratamientos, fue mucho más acusada en las raíces que en la parte aérea (Figura 19). Además, a nivel de raíces se observó una interacción patrón tratamiento, posiblemente debido a la gran diferencia de concentración de P en las raíces de Piquillo entre tratamientos en comparación con los demás. El control de Adige sin injertar fue el que presentó valores de concentración de P en raíces más similares entre los dos tratamientos.



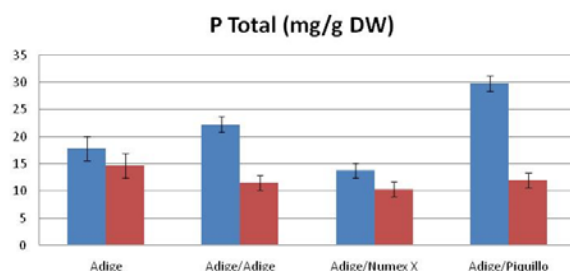


Figura 19. Cantidad de fósforo acumulado en función del peso seco de los diferentes genotipos para parte aérea y raíz.

Al calcular los valores de eficiencia en la adquisición de fósforo y de eficiencia en el uso del fósforo vemos similitudes con resultados obtenidos anteriormente (Figura 20). Como podemos observar en el gráfico, Adige injertado sobre Piquillo posee una eficiencia en la adquisición del fósforo (EAP) por encima del resto, seguida por el injerto Adige/Adige y en tercer lugar Adige/Numex, mientras que las plantas sin injertar tienen unos valores realmente bajos. En el caso de la eficiencia de uso (EUP) vemos que Adige injertado sobre Adige es la accesión cuyos valores superan a los del resto, seguido por Adige/Piquillo y, en tercer lugar, de nuevo, Adige/Numex, siendo otra vez la accesión sin injertar la que posee los valores más bajos.

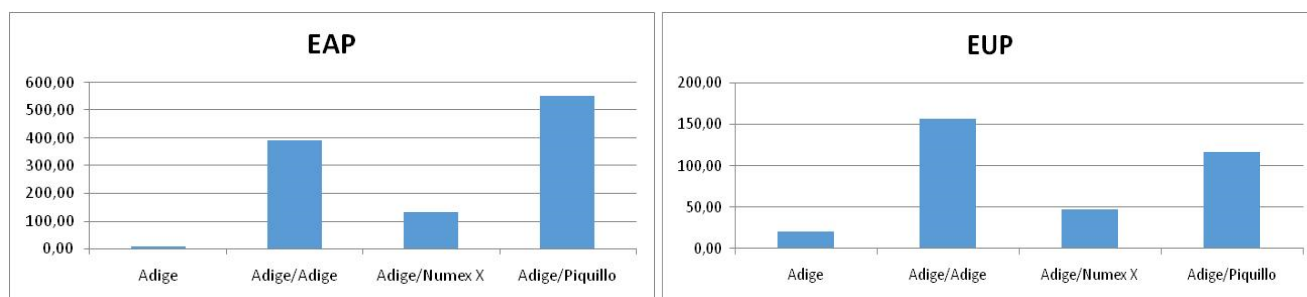


Figura 20. Gráficas de los niveles de eficacia de absorción de fósforo y eficacia de uso de fósforo

Piquillo fue seleccionado para este experimento por mostrar buenos valores de EAP en ensayos anteriores. La eficiencia en la adquisición de fósforo indica la capacidad de adquirir y acumular más fósforo cuando este está presente, sin embargo, plantas con altos EAP no tienen por qué ser las mejores bajo condiciones de bajos insumos. Tal es el caso de Piquillo que mostró resultados modestos en cuanto a cantidad total de P en el tratamiento deNoP, pero la mayor acumulación en el control (Figura 19). Por otro lado,

la EUP se refiere a la capacidad de la planta de generar biomasa por unidad de P. En este sentido se refiere a la capacidad metabólica de la planta. Curiosamente existieron diferencias entre Adige sin injertar y Adige injertado sobre sí mismo, de alguna manera parece que el injerto está mejorando el vigor de la planta (más biomasa) y el uso eficiente de los recursos. Sin embargo, cabe destacar que por problemas en el manejo hubo menos plantas de Adige sin injertar que del resto y que éstas tampoco vegetaron igual, por lo tanto, es aventurado hacer conjeturas a este respecto. Aún así, el hecho de que el EUP de las plantas injertadas sobre Piquillo y sobre Numex X fueran bastante más bajo que el del autoinjerto con Adige parece indicar algún tipo de efecto negativo del uso de los mismos como patrones. Pese a todo, la combinación Adige/Piquillo mostró buenos resultados en cuanto a adquisición y uso de fósforo y aunque los resultados de biomasa no fueron los más espectaculares sería interesante probar esta variedad en ensayos hasta planta adulta pues es promisorio como buen patrón.

4.1.3. Parámetros morfométricos de raíz.

Debidos a fallos experimentales ajenos al equipo de trabajo sólo se pudieron evaluar las 6 plantas por tratamiento de las combinaciones Numex-X/Adige y Adige/Adige, habiendo sólo 2 plantas por tratamiento de la combinación Piquillo/Adige y ninguna del control Adige. Aun así, el escaneo de las raíces recolectadas fue muy tedioso ya que de algunas raíces eran muy densas y al intentar individualizar raíces llegamos a obtener hasta 15 hojas de escaneo. El análisis de la varianza de los datos obtenidos tras el análisis con el programa WinRhizo indicó que sólo existieron diferencias significativas entre los patrones utilizados para la longitud de raíces de diámetro mayor de 1mm. También se observó interacción patrón tratamiento para parámetros como longitud, volumen y longitud de raíces de diámetro menor de 1mm.

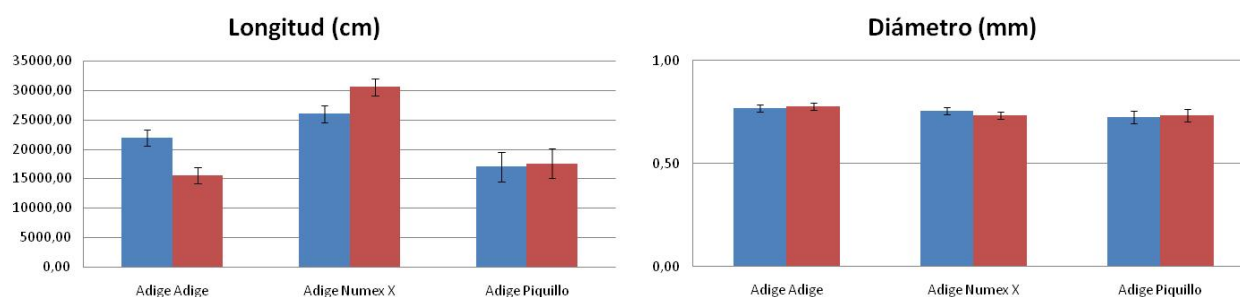
Tabla 10. ANOVA para parámetros morfométricos medidos en 4 accesiones de pimiento sometidas a dos tratamientos: control con fertilización normal y NoP, fertilización sin fósforo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

C.M. ¹						
Efecto	g.l. ²	Longitud (cm)	Diámetro Medio (mm)	Volumen (cm ³)	L _{d<1} (m)	L _{d>1} (m)
Principales						
Patrón (P)	2	3,39·10 ⁸ ns	3,77·10 ⁻³ ns	5437,44 ns	2,55·10 ⁸ ns	6,21·10 ⁶ **
Tratamiento (T)	1	9,1·10 ⁵ ns	1,67·10 ⁻⁷ ns	102,5 ns	8,6·10 ⁴ ns	0,43·10 ⁶ ns
Interacciones						
PxT	2	0,89·10 ⁸ **	0,86·10 ⁻³ ns	1442,85 *	0,65·10 ⁸ **	1,95·10 ⁶ ns
Error	22	0,12·10 ⁸	1,83·10 ⁻³	334,98	0,097·10 ⁸	0,69·10 ⁶

¹cuadrado medio, ²grados de libertad; ns, *, ** y *** indican no significativo para una probabilidad p>0.05 y significativo para p<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente, de acuerdo al ratio estadístico F.

Para los valores de longitud total observamos que Adige/Adige muestra mayor longitud en el tratamiento control que en el tratamiento con déficit de fósforo mientras que Adige/NumexX mostró valores superiores en el tratamiento NoP que en el control, siendo éste último el que mayores valores obtuvo respecto al resto de accesiones utilizadas en el ensayo. Por lo que a los diámetros se refiere, se mantuvieron, en general, muy constantes no mostrando diferencias notables ni por genotipos ni por tratamientos. Si observamos lo que ocurrió con los datos de volumen vemos que, al igual que pasa con la longitud total, Adige/Adige posee valores superiores en el tratamiento control a diferencia de lo que ocurre con Adige/Numex cuyos valores son superiores en el tratamiento NoP, destacando de igual modo sobre el resto de accesiones con valores superiores en ambos tratamientos.



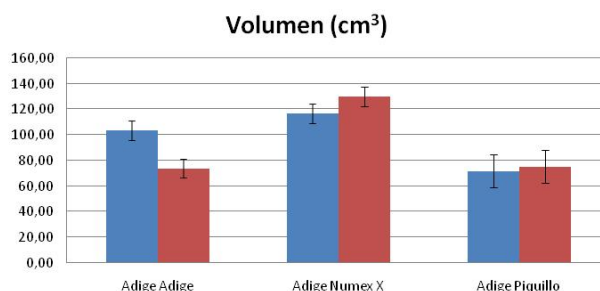


Figura 21. Valores de los parámetros evaluados de longitud total de raíz, diámetro medio y volumen total.

El número de raíces finas es una respuesta ofrecida por la planta cuando se encuentra con un déficit. Las gráficas nos muestran el número total tanto de raíces con un diámetro menor de 1mm como de raíces con un diámetro superior a 1mm que poseían las accesiones. Como se puede ver, Adige/Adige posee un número mayor de ambos tipos para el tratamiento control característica que comparte con la accesión Adige/Piquillo para el número de raíces superior a 1mm. En ambos casos la accesión Adige/Numex es la que posee unos valores mayores respecto al resto de accesiones y, como podemos observar, es en el tratamiento con déficit de fósforo donde los valores aumentan más superando, incluso, los valores obtenidos en el tratamiento con aportes normales de fósforo.

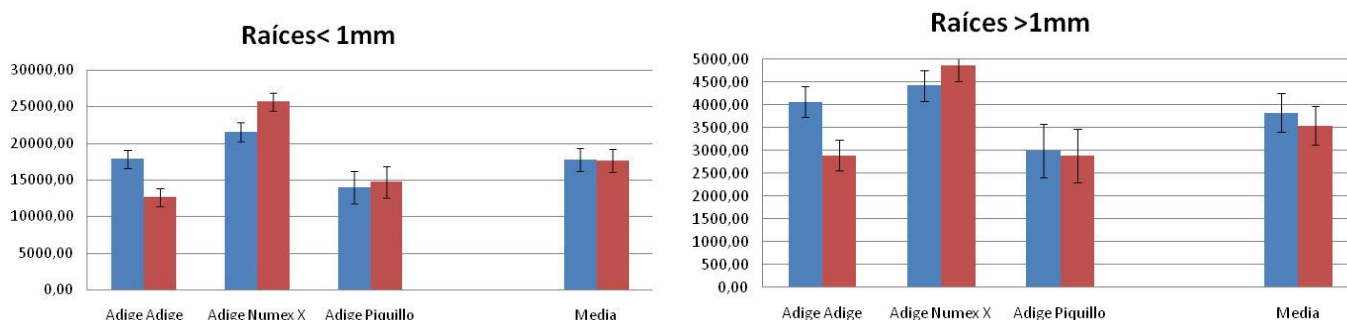


Figura 22. Índice del número de raíces menores de 1mm frente al número de raíces mayores de 1mm.

Aunque la respuesta a la deficiencia en P de nuestro experimento es débil se puede observar claramente diferentes estrategias de cada uno de los genotipos estudiados. Así Adige tendió a reducir su sistema radicular en cuanto a longitud y diámetro. Numex X incrementó la longitud de su sistema radicular, mientras que piquillo, que mostró el sistema radicular más escaso lo mantuvo

igual. Dado que Piquillo es la variedad con mayor EAP cabría esperar que sus raíces tuvieran una mayor capacidad de absorción de P. Por lo que se observa en los resultados esta mayor capacidad de absorber P no viene dada por cambios en su sistema radicular sino más bien por sistemas de absorción del mismo más eficientes (cuando existe el P en el medio). Sin embargo, Numex X sí que reacciona frente a la deficiencia en P con un incremento de su sistema radicular. Todo esto demuestra que existen distintos mecanismos frente a la deficiencia en P.

Por último, en la tabla 12 se muestran los resultados de las posibles correlaciones entre los parámetros de raíz medidos y los niveles de fósforo en las plantas. No se observó ninguna correlación significativa, esto contradice los resultados obtenidos en otros estudios como los de Fita *et al* 2011, Gil 2013 o Araujo *et al* 2005. El hecho de que cada combinación tuviera una respuesta distinta en cuanto a parámetros de raíz frente a la deficiencia de P en nuestro ensayo provoca que no podamos observar una respuesta clara, sin embargo pensamos que si la deficiencia en P hubiera sido más intensa y prolongada en el tiempo y si se hubieran analizado plantas adultas sí que hubiéramos detectado alguna respuesta común a nivel de raíz con diferencias en la intensidad de la respuesta.

Tabla 11. Correlaciones entre la eficiencia de adquisición de P (EAP) y la eficiencia en el uso de P (EUP). Las correlaciones se calcularon sobre los datos medios de cada parámetro y genotipo

	Long.Med.	Diám. Med.	Vol. Med.	Media raíces <1mm	Media raíces >1mm	P (mg/g DW) PA	P (mg/g DW) RAIZ	P (mg/g DW) Total
Long.Med.								
Diám. Med.	-0,15							
Vol. Med.	0,98*	0,03						
Media raíces <1mm	0,99*	-0,17	0,98*					
Media raíces >1mm	0,97*	0,021	0,99*	0,97*				
P (mg/g DW) PA	-0,41	-0,002	-0,36	-0,43	-0,29			
P (mg/g DW) RAIZ	-0,34	-0,3	-0,35	-0,35	-0,25	0,8		
P Total	-0,34	-0,3	-0,35	-0,35	-0,26	0,81	0,99	

4.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

4.2.1. Extracción de RNA

El ARN extraído de las muestras se cuantificó mediante NanoDrop y, se visualizó su integridad en un gel de agarosa. Las extracciones realizadas fueron satisfactorias en cuanto a cantidad y calidad del RNA extraído (Tabla 13). La concentración media obtenida fue de 537,29 ng/ μ l y los valores de los ratios 260/280-260/230 fueron superiores o cercanos a 1,7 y 2 indicando baja contaminación con etanol, fenoles o proteínas. En el gel de agarosa se observaron claramente las dos bandas de RNA ribosomal de 28S y 18S, un peso molecular de unas 300 kp, tal como nos salía en los geles que realizamos (Figura 23). Las bandas superiores corresponden a restos de DNA genómico presente en la muestra y por lo que el siguiente paso natural fue la realización de una limpieza de las muestras.

Tabla 12. Concentración de RNA por muestra extraída (ng/ μ l) y valores de limpieza de muestra (260/280-260/230)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sample ID	ng/ul	260/280	260/230	Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
AA15	656,22	2,08	2,01	N20	0,34	-0,73	0,44
AA16	196,93	1,85	0,89	N20 (2)	626,54	2,13	1,95
AA16 (2)	362,03	2,09	1,79	N4	546,45	2,06	1,56
AA19	372,57	2,1	1,7	N5	507,33	2,05	2,1
AA2	61,88	1,75	0,45	NP13	349,38	1,95	0,79
AA2	38,25	1,63	0,35	NP13 (2)	736,17	2,12	1,59
AA2 (3)	127,69	2,05	2,04	NP14	470,01	2,17	1,53
AA3	538,04	1,78	0,88	NP16	403,97	1,99	1,01
AA3 (2)	307,48	2,09	1,89	NP16 (2)	507,07	2,16	1,69
AA4	491,92	2,05	1,68	NP17	446,29	2,1	1,61
AA5	522,78	2,16	2,03	NP20	485,45	2,05	1,39
AA6	372,90	2,12	1,38	NP20 (2)	176,3	2,09	1,79
AA6 (2)	429,78	2,11	1,58	NP3	392,98	2,08	1,55
AAP1	1252,73	2,12	2,3	NP7	368,42	2,11	1,59
AAP20	259,66	1,87	0,75	NP9	463,12	2,09	1,35
AAP20 (2)	476,31	2,08	1,82	NP9 (2)	494,24	2,1	1,94
AAP3	979,85	2,09	1,57	P1	734,70	2,12	1,67
AAP4	359,91	2,1	1,54	P10	491,91	1,89	0,85
AAP6	588,54	2,07	1,4	P10 (2)	303,65	2,05	1,25
AAP6 (2)	447,73	2,09	1,78	P10 (3)	232,73	2,03	1,46
AAP7	544,98	2,1	1,98	P11	33,67	1,81	0,46
AAP9	155,78	1,89	0,7	P11 (2)	504,83	2,14	2,22
AAP9 (2)	500,23	2,16	2,01	P12	531,45	2,14	1,99
AC11	546,52	2,18	1,93	P2	469,84	2,11	1,95
AC12	443,79	2,09	1,27	P5	1591,02	2,09	1,9
AC13	293,17	2,12	2,16	P8	61,58	1,78	0,39
AP11	428,22	2,09	1,31	P8 (2)	846,55	2,09	2,19
AP11	304,6	2,1	1,82	P9	278,34	2,11	1,79
AP12	163,82	1,89	0,7	PP10	701,26	2,12	2,05
AP12 (2)	320,15	2,12	1,88	PP11	593,16	2,12	1,68
AP13	459,09	2,11	1,65	pp12	138,76	2,12	1,21
N11	42,39	1,87	0,4	PP12 (2)	119,09	1,78	0,65
N11 (2)	173,92	2,06	1,95	PP2	84,62	1,74	0,4
N12	441,64	1,99	1,07	PP2 (2)	682,63	2,1	2
N12 (2)	366,31	2,08	1,76	PP4	477,96	1,95	0,86
N13	32,18	1,86	0,4	PP4 (2)	72,19	1,78	0,87
N13 (2)	326,12	2,09	1,89	PP4 (3)	371,75	2,06	1,73
N15	292,33	1,95	0,83	PP7	424,69	2,1	1,57
N15 (2)	60,22	1,54	0,33	PP8	402,9	1,99	0,88
N15 (3)	192,72	2,05	1,32	PP8 (2)	262,9	2,1	1,79
N17	272,83	2,1	1,48	PP9	277,43	2,11	1,07
N17 (2)	312,9	2,1	1,84	PP9 (2)	281,63	2,07	1,2
				PP9 (3)	586,23	2,11	1,9

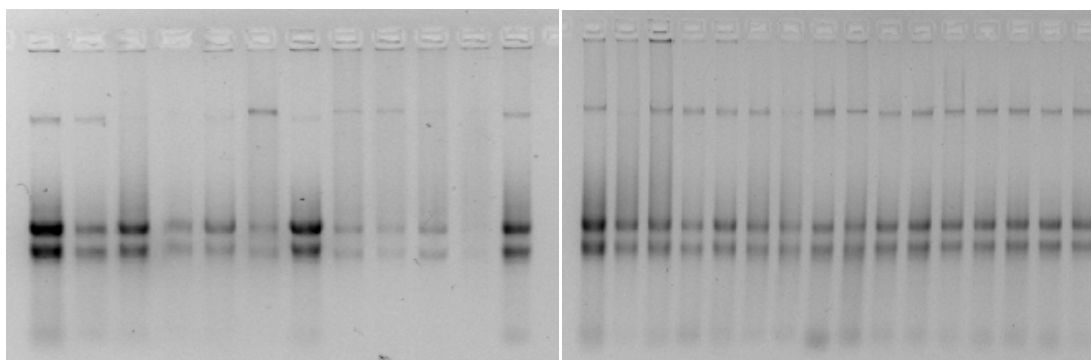


Figura 23. Geles de agarosa 1X dónde se muestra la existencia de RNA. En la parte superior aparecen unas bandas simples que corresponden a DNA genómico.

Para eliminar el ADN genómico, inicialmente realizamos un procedimiento basado en el protocolo de ROCHE® pero las muestras no salieron tan limpias como deberíamos tenerlas por lo que finalmente nos decantamos por una limpieza mediante un kit de Danagenecon el que obtuvimos unos buenos valores de concentración y limpieza tal y como se muestra en la Tabla 14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Concentración de RNA por muestra extraída (ng/μl) y valores de limpieza de muestra (260/280-260/230)

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
AA02	22,85	0,571	0,231	2,47	0,04
AA03	219,74	5,493	2,555	2,15	0,4
AA04	326,42	8,161	3,801	2,15	0,54
AA05	459,01	11,475	5,433	2,11	1,39
AA06	587,85	14,696	7,081	2,08	1,59
AA15	559,91	13,998	6,546	2,14	1,79
AA16	479,35	11,984	5,621	2,13	1,18
AA19	1155,99	28,9	13,544	2,13	1,64
AAP01	776,72	19,418	9,005	2,16	2,38
AAP03	1043,30	26,083	12,151	2,15	2,06
AAP04	484,69	12,117	5,66	2,14	2,16
AAP06	717,66	17,941	8,111	2,21	2,26
AAP07	572,73	14,318	6,623	2,16	2,22
AAP09	554,57	13,864	6,495	2,13	2,24
AAP20	664,00	16,6	7,869	2,11	1,83
AC11	737,04	18,426	8,683	2,12	1,93
AC12	565,43	14,136	6,791	2,08	1,96
AC13	553,72	13,843	6,785	2,04	1,92
AP11	626,12	15,653	7,563	2,07	1,87
AP12	314,88	7,872	3,763	2,09	1,55
AP13	610,72	15,268	7,379	2,07	1,89
N04	705,49	17,637	8,222	2,15	0,78
N05	450,53	11,263	5,311	2,12	2,19
N11	154,88	3,872	1,802	2,15	0,94
N12	362,42	9,061	4,277	2,12	2,2
N13	335,31	8,383	3,967	2,11	2,17
N15	262,20	6,555	3,108	2,11	1,9
N17	381,88	9,547	4,383	2,18	0,63
N20	575,38	14,384	6,775	2,12	1,78
NP03	334,24	8,356	3,915	2,13	2,07
NP07	529,37	13,234	6,21	2,13	1,03
NP09	459,08	11,477	5,377	2,13	2,14
NP13	718,41	17,96	8,47	2,12	1,63
NP14	467,88	11,697	5,521	2,12	2,16
NP16	586,74	14,669	6,871	2,13	2,19
NP17	463,90	11,597	5,458	2,13	1,91
NP20	517,24	12,931	5,857	2,21	2
P01	850,89	21,272	9,994	2,13	1,87
P02	414,99	10,375	4,91	2,11	1,91
P05	508,13	12,703	5,754	2,21	0,89
P08	826,31	20,658	9,477	2,18	1,55
P09	823,52	20,588	9,515	2,16	1,65
P10	275,42	6,886	3,249	2,12	1,43
P11	426,91	10,673	4,983	2,14	1,7
P12	1005,42	25,136	11,704	2,15	1,82
PP02	643,85	16,096	7,545	2,13	1,52
PP04	513,32	12,833	6,024	2,13	1,58
PP07	239,91	5,998	2,827	2,12	1,39
PP08	317,39	7,935	3,731	2,13	1,61
PP09	712,28	17,807	8,082	2,2	1,27
PP10	627,44	15,686	7,039	2,23	1,64
PP11	703,41	17,585	7,785	2,26	1,4
PP12	143,38	3,585	1,722	2,08	1,41

Tal como se hizo con la extracción de RNA, una vez limpias y cuantificadas las muestras se pasó a comprobar mediante un gel de agarosa al 1% que realmente se había eliminado el DNA genómico presente en la muestra. Como se muestra en la Figura 24, todas las muestras aparecieron limpias de DNA, la banda de DNA genómico no está presente en ninguno de los pocillos dónde se colocaron las diferentes muestras.

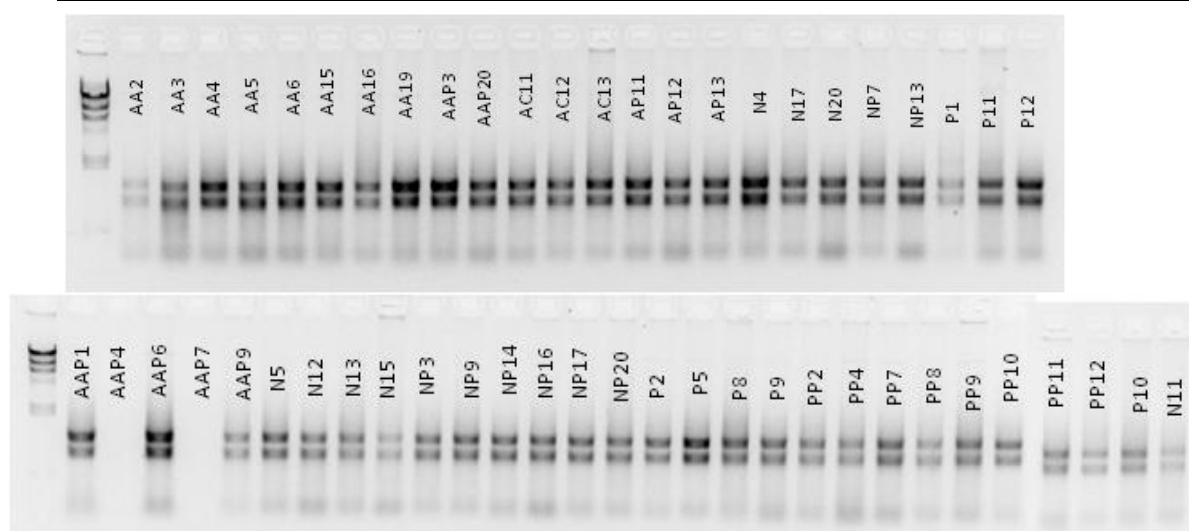


Figura 24. Geles de agarosa 1X. Se muestra el RNA purificado y sin bandas de DNA genómico.

4.2.2. SÍNTESIS cDNA Y AMPLIFICACIÓN DNA DE DOBLE CADENA

Para obtener una cadena simple de DNA (cDNA) a partir de una cadena de RNA es necesario realizar una polimerización con retrotranscriptasa. Dado que en la PCR cuantitativa a tiempo real necesitamos tener una curva patrón y controles negativos estos también se incluyeron en la placa de síntesis de cDNA (figura 25).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Sample ID	AA03	AA04	AA05	AA06	AA15	AA16	AA19	AAP01	AAP03
	RNA	4,55	3,06	2,18	1,70	1,79	2,09	0,87	1,29	0,96
	Oligo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	H2O	5,45	6,94	7,82	8,30	8,21	7,91	9,13	8,71	9,04
B	Sample ID	AAP04	AAP06	AAP07	AAP09	AAP20	AC11	AC12	AC13	AP11
	RNA	2,06	1,39	1,75	1,80	1,51	1,36	1,77	1,81	1,60
	Oligo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	H2O	7,94	8,61	8,25	8,20	8,49	8,64	8,23	8,19	8,40
C	Sample ID	AP12	AP13	N04	N05	N11	N12	N13	N15	N17
	RNA	3,18	1,64	1,42	2,22	6,46	2,76	2,98	3,81	2,62
	Oligo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	H2O	6,82	8,36	8,58	7,78	3,54	7,24	7,02	6,19	7,38
D	Sample ID	N20	NP03	NP07	NP09	NP13	NP14	NP16	NP17	NP20
	RNA	1,74	2,99	1,89	2,18	1,39	2,14	1,70	2,16	1,93
	Oligo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	H2O	8,26	7,01	8,11	7,82	8,61	7,86	8,30	7,84	8,07
E	Sample ID	P01	P01 NO RT	P01cal	P02	P05	P08	P09	P10	P11
	RNA	1,18	1,18	3,53	2,41	1,97	1,21	1,21	3,63	2,34
	Oligo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	H2O	8,82	8,82	6,47	7,59	8,03	8,79	8,79	6,37	7,66
F	Sample ID	P12	PP02	PP04	PP07	PP08	PP09	PP10	PP11	PP12
	RNA	0,99	1,55	1,95	4,17	3,15	1,40	1,59	1,42	6,97
	Oligo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	H2O	9,01	8,45	8,05	5,83	6,85	8,60	8,41	8,58	3,03
G	Sample ID	NO RNA								
	RNA	0,00								
	Oligo	1,00								
	H2O	10,00								

Figura 25. Mezcla de las diferentes muestras de RNA distribuidas en la placa de PCR de 96 pocillos.

4.2.3. Puesta a punto de cebadores y reacción en cadena de la polimerasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal y como se explicó en materiales y métodos, se buscaron genes ortólogos a una lista de genes que responden a la deficiencia de P en otras hortalizas. A partir de la detección de genes candidatos y sus ortólogos en pimiento, se procedió con el diseño de los primers que amplificarían nuestras cadenas de cDNA que sintetizamos previamente (Figura 26). Como se puede observar en la imagen, seleccionamos al menos dos genes ortólogos por cada gen candidato de Arabidopsis, dependiendo de la disponibilidad pues en algún caso sólo se pudo seleccionar uno o dos.

También se muestran las secuencias de amplificación Forward y Reverse para la síntesis de la doble cadena en ambos sentidos, así como su temperatura de funcionamiento y el tamaño del amplicón de cDNA.

Código Arabidopsis	Código capiscum	Nombre	%ID	Al	Strand	Primer Forward	Primer Reverse	tmF	tmR	Tamaño amplicón cdna
AT2G16430	CA01g19520	CaPAP1	75,74	356/470	-	TATGCAATGGTGGAGTGACC	CAGCCTTTCCACATGATCT	59,37	60,07	150
	CA04g21260	CaPAP2	71,72	312/435	+	AAATGGGAAATGCAGTCCAG	TGCAGAATACCTTGGCTGTG	59,93	59,86	121
AT2G02990	CA11g04200	CaRNC1	58,74	131/223	-	TGATCAAGATTATTGGTACAATG	CGCCTCGTGCACAATAAGA	58,02	59,86	115
	CA11g04150	CaRNC2	42,53	94/221	-	TCTGTGCCTCCAGAGTTTT	GAACATGAATGCCAAAGTCG	59,84	59,13	123
AT1G08650	CA05g04290	CaPEP1	67,35	99/147	+	TGAAGCGAAGGATCTGTTGA	GCCATTGATCTTGTTCCTCCTC	59,52	60,08	117
	CA06g10360	CaPEP2	64,58	93/144	-	GGAGGTGTTAGCTGGGAGAA	TCTGAGCACAGCCTCAAAGA	59,28	59,86	136
	CA06g25820	CaPEP3	54,3	139/256	-	ACGGAGTCTGATGCTCTTGC	GAGGATGTTATCGGGCTTGA	60,56	60,04	105
AT5G39090	CA07g13040	CaA5A	31,7	149/470	-	AGCCCCATTACTCGTTTT	TTTCTCCTTGCCATTGCTCT	59,84	59,96	112
	CA10g03640	CaQ3O	33,33	88/264	+	TTTTGTTGGGGTAAACCAG	TGCATTATTGAGCTTTTCG	59,7	59,95	142
AT3G11670	CA10g17170	CaDGDG1	65,65	514/784	+	AAGGCAGAGACCATGCAGAT	GGTGATCCGCACAGACTACA	59,83	59,71	132
	CA08g06590	CaDGDG2	53,68	248/462	-	TCACACTGGAGCAGGAAAA	AATATCGCCCAAAGCAAGAA	59,41	59,68	135
	CA10g06400	CaDGDG3	51,74	238/460	-	GTGGGTGGAAGAGAGGACTG	TCAAGGACTGCAACATCTGC	59,68	59,99	147
AT4G33030	CA08g02360	CaUDP	77,96	375/481	+	TGTTGGACATCCACTTACGG	ATTGGTTGAAAACCCGGAAT	59,41	60,41	137
AT2G26660	CA09g17720	CaXPML1	68,03	200/294	-	ACGGGTGCTGAAGTTGAGTT	TCGCCTTTGCCACTCTATCT	59,77	59,98	130
	CA02g00990	CaXPML2	41,26	118/286	+	TCCATACATGGGGAGATGGT	ATCGGCTGATGAAGAGCAAC	60,01	60,37	143
	CA02g28040	CaXPML3	42,05	74/176	-	ATGCTCTGGAGGCTGACATT	TCCATCTTTGCCACTCTTTTC	59,83	53,3	102
AT4G27960	CA03g19120	UBI-3				AGGTGGCTTTCAGGACAAAA	GGGTCCGTGAGAAGAGAACA	59,71	60,24	142

Figura 26. Genes candidatos, código utilizado en el ensayo, temperaturas de activación y secuencias de los primers.

Se realizaron pruebas para poner a punto el protocolo de actuación para la PCR, probando los reactivos y las temperaturas para optimizar los resultados obtenidos y conseguir una buena amplificación de la cadena e DNA (Anejo)

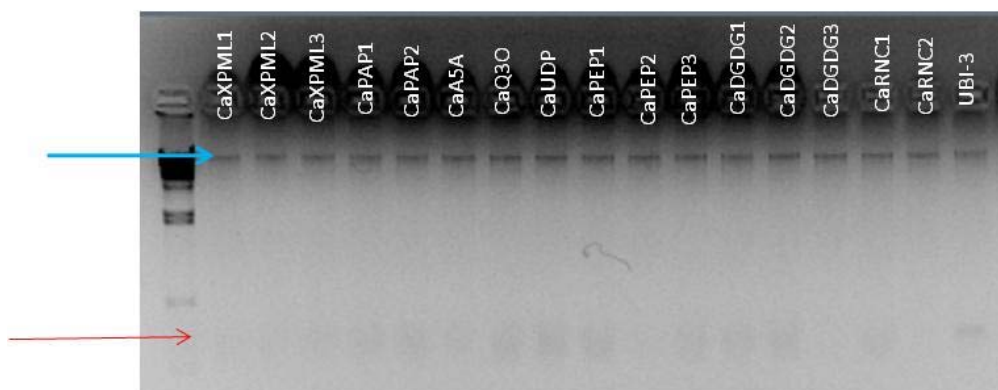


Figura 27. Gel de agarosa 1X después de PCR. La flecha azul indica una banda de DNA genómico y la flecha roja las bandas de RNA degradado.

A causa de los resultados obtenidos en esta primera muestra se decidió modificar, a la baja, las temperaturas de la reacción de alineamiento quedándose esta vez en 53°C, manteniendo el resto de temperaturas en las mismas condiciones que en la primera prueba. Se cambió la solución TAE por las sospechas de que pudiese estar contaminado con DNA y por ello se mostrasen las bandas de DNA genómico en el gel de agarosa.

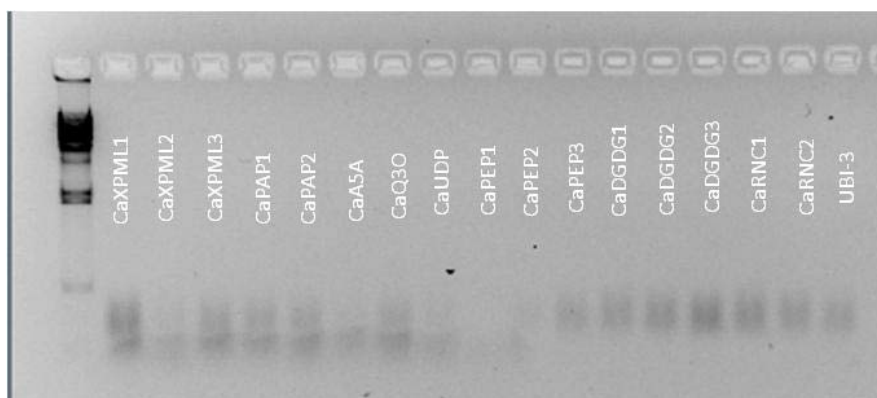


Figura 28. Gel de agarosa 1X después de PCR con los cebadores diseñados.

Efectivamente, una vez bajada la temperatura de alineamiento, haciendo la reacción más inespecífica, se mostraron bandas un poco más definidas pero degradadas no obstante. Para asegurarnos de que los resultados eran debidos a las temperaturas, y quizá, a la cantidad de reactivos que se añadían y comprobar que los primers estaban bien diseñados, se realizó una prueba con el cDNA que

sintetizamos y una muestra de gDNA de una colección usando como testeros dos genes: por un lado el gen *housekeeping* de la ubiquitina (UBI-3) que debería expresarse en bajo cualquier condición, y un gen al azar de los que se diseñaron, que entra dentro de las posibilidades de expresión y que está implicado en la síntesis de ribonucleasa (CaRNC2) para confirmar que realmente estaba bien diseñado.

En este caso las temperaturas que se modificaron fueron las de desnaturalización, tanto inicial como la de los ciclos, bajándolas a 94°C y la de mantenimiento final que se aumentó a 12°C para que el cambio no fuera tan brusco. En cuanto a las cantidades de reactivos las que se variaron fueron el cloruro de magnesio (MgCl 50mM) de 0.3µl a 0.6µl, los cebadores (primers) de 0.3µl a 0.5µl, la taq Pol de 0.05µl a 0.1µl y la cantidad de DNA de 0.5µl a 1µl.

Los resultados fueron positivos, las bandas correspondientes al gen *housekeeping* UBI-3 se expresaron con mayor intensidad, como cabría esperar, tanto en las muestras de nuestro cDNA sintetizado como en las muestras del gDNA de la colección. En cuanto al gen de la ribonucleasa, CaRNC2, también se expresó con ambas muestras aunque con menor intensidad, lo cual nos indica que las variables que debíamos tener en cuenta eran la temperatura y la cantidad de reactivo utilizado.

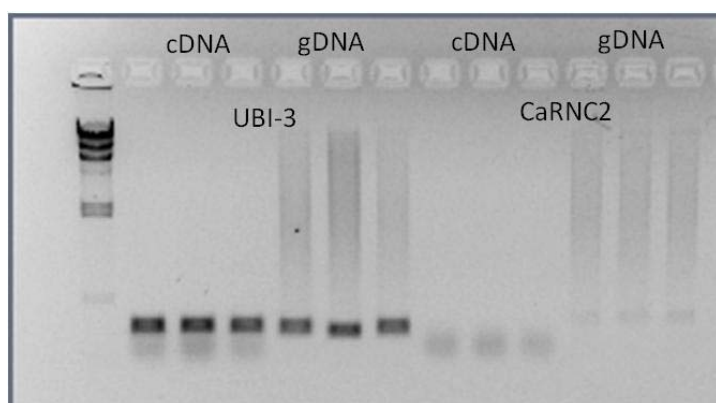


Figura 29. Gel de agarosa 1X para comparar la expresión del gen housekeeping y unos de los primers diseñados.

Con esta prueba se comprobó que la cantidad de reactivos era el correcto pues nos aparecían bandas en todas las muestras pero las temperaturas no eran las correctas ya que aun aparecían las bandas degradadas en las muestras que contenían el gen candidato. Por ello se modificaron las condiciones de la PCR disminuyendo las temperaturas de desnaturalización iniciales y de los ciclos a 92°C junto con la temperatura de alineamiento a 51°C y aumentando la temperatura de mantenimiento final a 12°C.

Tal como se muestra en la Figura, una vez corregidos los parámetros, conseguimos amplificar los cDNAs con todos los primers que se diseñaron aunque sus expresiones fueron variables, algunos de ellos poseen una intensidad de expresión débil como es el caso del gen CaA5A (promueve la formación de antocianos), CaPEP2 (promotor de la kinasa), CaDGDG2 (promotor de la digalactosildiácilglicerol). Los genes que poseen una intensidad de expresión alta, que se corrobora a la hora de realizar la electroforesis con dos geles con distinta concentración de agarosa, son CaPEP1 (uno de los posibles promotores de la kinasa), CaDGDG1 y CaDGDG3 (promotores de la digalactosildiácilglicerol) (Figura 30).

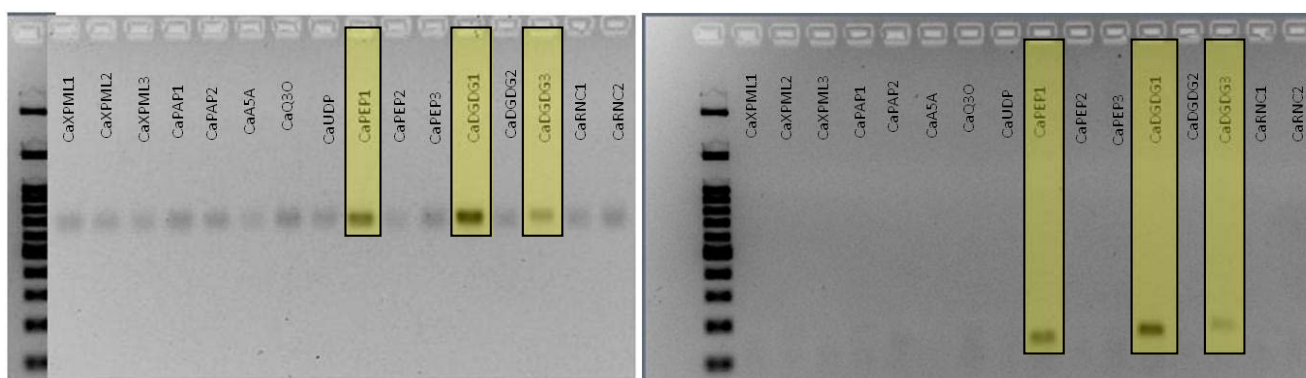


Figura 30. De derecha a izquierda: Gel de agarosa 1X después de PCR para comprobar que amplifican todos los primers; Gel de agarosa 1.85X para separar, si las hubiera, las fases de las bandas de DNA.

4.3.PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).

Para la amplificación y análisis de la expresión de los genes candidatos, de momento no hemos obtenido datos por complicaciones en el procedimiento y por falta de la puesta a punto del protocolo de actuación, aunque actualmente estamos continuando con el proceso y en un futuro no muy lejano podremos facilitar los resultados obtenidos para poder obtener una conclusión final.

5. CONCLUSIONES

Debido a las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las plantas no se obtuvieron diferencias notables entre los tratamientos, no obstante, fue posible describir una respuesta diferencial entre los diferentes patrones testados.

A la vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que ninguno de los patrones testados llegó a superar a la propia variedad en lo que a la generación de biomasa se refiere.

Por otra parte, los resultados logrados concuerdan con otros anteriores destacando la variedad Piquillo por su alta eficiencia en la adquisición de fósforo, cualidad que parece más favorecida por mecanismos de facilitación química de la entrada de fósforo en la planta que por los cambios morfológicos sufridos en la arquitectura radicular. Quizá se debería realizar la comparativa en plantas adultas dónde la interacción de la producción de fruto promovería un aumento en los índices de absorción de fósforo ya que en plantas jóvenes la tasa de absorción de éste mineral puede no ser tan importante.

En lo referente al análisis de la expresión genética de los genes candidatos que se propusieron no se pudo concluir, no obstante se dispone del material y protocolos necesarios para poder continuar con el análisis por lo que se podrán obtener resultados sólidos próximamente.

Podemos asegurar entonces que el estudio de éstos genes junto con otros datos provenientes de un mRNAseq que se está realizando en el laboratorio nos ofrecerán información más precisa sobre la respuesta ofrecida por las plantas frente a una deficiencia de fósforo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Andrews J. 1995.** Peppers: The domesticated *Capsicums*. Univeristy of Texas Press. Austin, TX.
- Alcaraz Ariza FJ, 2012.** Salinidad y vegetación. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Bates TR, Lynch JP (2001).** Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant Soil* 236:243–250
- Bhatt, R.M., Rao, N.K.S., & Harish, D.M. (2013).** Significance of Grafting in Improving Tolerance to Abiotic Stresses in Vegetable Crops Under Climate Change Scenario. In *Climate-Resilient Horticulture: Adaptation and Mitigation Strategies* (pp. 159-175). Springer India.Boyer JS. Plant productivity and environment. *Science* 218, 443–448.
- Bonser AM, Lynch J, Snapp S (1996).** Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*.281-288.
- Bouain N, Shahzad Z, Rouached A, et al (2014).** Phosphate and zinc transport and signalling in plants: toward a better understanding of their homeostasis inteaction.
- Blum A, Mayer S, Galon G. (1989).**Agronomic and physiological assessments of genotypic variation for drought resistance in *sorghum*.*Aust. J. Agric.* 40, 49–61.
- Castañón-Nájera G, Latournerie-Moreno L, Lesher-Gordillo JM, Cruz-Lázaro E, Mendoza-Elos M. 2010.** Identificación de variables para caracterizar morfológicamente colectas de chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México.*uciencia*; 26(3): 225-234.
- Caterina MJ, Leffer A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-ZeitzKR, Koltzenburg M, Basbaum AIA, Julius D. (2000).** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313.

- Collins CN, Tardieu F, Tuberosa R. (2008).** Quantitative Trait Loci and Crop Performance under Abiotic Stress: Where Do We Stand? *Plant Physiol.* Vol. 147: 469-486.
- Cordell D, Drangert J, White S (2009)**The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environ Change Human Policy Dimens* 19:292–305. doi: [10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009](https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009)
- DeWitt D, Bosland PW. 1996.** Peppers of the world: An identification guide. TSP Berkeley, California.
- Drew MC, He C-J, Morgan PW (1989).**Decreased Ethylene Biosynthesis, and Induction of Aerenchyma, by Nitrogen- or Phosphate-Starvation in Adventitious Roots of *Zea mays* L. 266-271.
- Eshbaugh WH. 1968.**A nomenclatural note on the genus *Capsicum*. *Taxon*; 17: 51-52.
- Fang ZY, Shao C, Meng YJ, Wu P, Chen M (2009)** Phosphate signaling in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *PlantSci* 176: 170–180.
doi:[10.1016/j.plantsci.2008.09.007](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.007)ER
- Fita A, Nuez F, Picó B. 2011.**Diversity in root architecture and response to P deficiency in seedlings of *Cucumis melo*L.*Euphytica*, 181: 323 - 339
- Flórez JS. 1986.**Agrucultura ecológica. Mundiprensa, Madrid. 401pp. Food and Agricultural Organizations of the United Nations (FAO). 2012. FAOSTAT agricultural data 2012. [http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org). Fecha de consulta: 12 de Junio de 2012.
- Garcés-Claver A, Fellman SM, Gil-Ortega R, Jahn M, Arnedo-Andrés MS. 2007.** Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *Theor. Appl. Genet.*; 115: 907-916.
- Greenleaf H. 1986.** Pepper breeding. Edited by Mark J. Basset. Vegetable crops department. University of Florida.Gainsville, Florida. AVI Publishing Company, INC., Westport, Coneticut.

- García-Bañuelos, M. L., Sánchez, E., Gardea-Béjar, A. A., Muñoz-Marquez, E., Soto-Parra, J. M., & Ojeda-Barrios, D. L. (2017).** Nitrogen use efficiency and yield in response graft bell pepper cultivars. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 29(6).
- Hammond JP, Broadley MR, White PJ (2004)** Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann Bot* 94:323–332. doi:[10.1093/aob/mch156](https://doi.org/10.1093/aob/mch156)
- HammondJP, BroadleyMR, WhitePJ, KingGJ, BowenHC, HaydenR, Meacham MC, MeadA, OverST, SpraclenWP, GreenwoodDJ(2009).** ShootyielldrivesphosphorususeefficiencyinBTWJsicaoleraceaandcorrelate swithrootarchitecturetraits. *JExpBot* 60:1953-1968. doi:10.1093/jxblerp083
- IBPGR. (1983).** Genetic resources of *Capsicum*: a global plan of action. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Ito K, Tanakamaru K, Morita S, Abe J, Inanaga S. (2006).** Lateral root development, including responses to soil drying, of maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticumaestivum*) seminal roots. *PhysiologiaPlantarum*, 127(2):260–7.
- Ince AG, Karaca M, Onus AN. 2009.** Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. *Plant.Mol. Biol. Rep.* 28: 285-291.
- Jones Jr, J. B. (2012).** Plant nutrition and soil fertility manual. CRC press.
- Junta de Extremadura (1992).** Diagnóstico nutricional. Ediciones Mundi-Prensa, pp 210.
- Lahbib K, Bnejdi F, El Gazzah M. 2012.** Selection of pepper parent from a collection of *Capsicumannuum* landraces based on genetic diversity. *J. Plan. Breed. CropSci.* 5(5): 68-72.
- Llácer G, Díez MJ, Carrillo JM, Badenes ML. 2006.** Mejora genética de la calidad en plantas. Editorial UPV. 2006-2021.
- Long-Solís, Janet. 1998.** *Capsicum* y cultura: la historia del chili. Fondo de Cultura Económica, CornellUniversity. 203pp.

-
- Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L (2003).** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6:280–287. doi:[10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)ER
- Lynch JP (2007).** Roots of the second green revolution. *Aust J Bot* 55:493–512. doi:[10.1071/BT06118](https://doi.org/10.1071/BT06118)ER
- Lynch JP, Brown KM (2001).** Topsoil foraging—an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant Soil* 237:225–237
- Maroto J.V. (1992).** Horticultura herbácea especial. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. 372-389.
- Martinez J, Esteve MA. (2005).** estimación de la contaminación agrícola del mar Menor mediante un modelo dinámico. *Mediterránea*, 18:8-35.
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V. (2008).** Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 595–624.
- McLeod MJ, Guttman SI, Eshbaugh WH. (1982).** Early Evolution of Chili Peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36 (4): 361-368.
- MohdNor, N. H., Fujinuma, R., Menzies, N. W., Harper, S., & McGrath, D. (2014).** Selection for root morphological traits improves the growth of grafted bell pepper. In *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): 1127* (pp. 211-216).
- Namesny, A. 2006.** Pimientos. 2ª Edición. Compendios de horticultura 16. Ediciones de horticultura, S.L. Reus. España. 254pp.
- Niu YF, Chai RS, Jin GL, Wang H, Tang CX, Zhang YS (2012).** Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of Botany*, 195:306-320
- Nuez F, Ortega RG, Costa J. (2003).** El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundiprensa, Madrid. 607.
- Paran I, Aftergoot E, Shifriss C. 1997.** Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99: 167-173.
- Paran I, Ben-Chaim A, Kang BC, Jahn M. (2007).** *Capsicum*ms.

- Penella, C., Landi, M., Guidi, L., Nebauer, S. G., Pellegrini, E., San Bautista, A., ... & Calatayud, A. (2016).** Salt-tolerant rootstock increases yield of pepper under salinity through maintenance of photosynthetic performance and sinks strength. *Journal of plant physiology*, 193, 1-11.
- Pereira-Días, Leandro; Gil Villar, Daniel; Rodríguez Burruezo, Adrián; López Galarza, Salvador Vicente; San Bautista Primo, Alberto; Castell Zeising, Vicente; Fita, Ana (2016).** *Rootmorphology and phosphorusstarvationadaptation in pepper.* EN *XVIth EUCARPIA Capsicum and EggplantWorkingGroup Meeting.*(436 - 437).Kecskmet, Hungría: DiamondcongressLtd
- Pickersgrill B. 1988.** The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. *Biol. Zent. Bl.* 107: 381-389.
- Price AH, Cairns JE, Horton P, Jones HG, Griffiths H. (2002).** Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *J Exp Bot* 53: 989–1004.
- Pochard E, Palloix A, DaubezeAM. 1992.** Le piment. En: **Gallais A, Bannerot H (Eds).** Amélioration de especès végétales cultivées. Objectifs et critères de selection. INRA. Paris. 420-447pp.
- Ribes-Moya A, Guijarro-Real C., Rodríguez-Burruezo A., Fita A. 2014.** Capsicum root diversity for improved tolerance to abiotic stresses. *Journal of Biotechnology*, 185: 117-117.
- Rodríguez AB, Nuez FV. 2006.** Mejora de la calidad del pimiento. Capítulo 5. Mejora genética de la calidad de las plantas. Sociedad española de ciencias hortícolas. Sociedad española de genética. Universidad Politécnica de Valencia. 361-391pp.
- Samson BK, Hasan H, Wade LJ. (2002).** Penetration of hardpans by rice lines in the rainfed lowlands. *Field Crops Res.* 76, 175–188.

- Shahbaz AM, Oki Y, Adachi T, Murata Y, Rashid Khan MdH (2006).** Phosphorus starvation induced root-mediated pH changes in solubilization and acquisition of sparingly soluble P sources and organic acids exudation by *Brassica* cultivars. 623-633
- Steele KA, Price AH, Shashidhar HE, Witcombe JR. (2006).** Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. *Theor Appl Genet*, 112: 208–221.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. (2002).** Agricultural sustainability and intensive production practices
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003)** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* 157:423–447.
- Vilmorín Díaz F. 1977.** El cultivo del pimiento dulce (tipo Bell). Editorial Diana, México.
- Votava EJ, Baral JB, Bosland PW. 2004.** Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum var. annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Eco. Bot.* 59(1): 8-17.
- Wang H, Yamauchi A. (2006).** Growth and function of roots under abiotic stress in soil. In: Huang, B. (Ed.), *Plant-Environment Interactions* (3rd). CRC Press, New York.
- Hongjian Wang¹, Wei Yuan¹, Meiyin Ruan, Qingjing Ye, Rongqing Wang, Zhimiao Li, Guozhi Zhou, Zhuping Yao, Jing Zhao, Shujun Liu, Yuejian Yang (2011).** Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.)
- Xiong LM, Wang RG, Mao GH, Koczan JM. (2006).** Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* 142, 1065–1074.
- Venema JH, Dijk BE, Bax JM, van Hasselt PR, Elzenga JTM (2008)** Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of a high-altitude accession of

Solanum habrochaites improves suboptimal-temperature tolerance.
Environ Exp Bot 63:359–367

Yetisir H, Çaliskan ME, Soylu S, Sakar M. (2006). Some physiological and growth responses of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai] grafted onto *Lagenaria siceraria* to flooding. Environ. Exp. Bot. 58: 1-8

Zhu JM, Kaepler SM, Lynch JP. 2005b. Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. Theoretical and Applied Genetics 111: 688–695.

ANEXO I

Extracción de RNA de planta (método TRIZOL®)

Para extraer el RNA se utilizaron las raíces de las plantas las cuales se encontraban en un estadio joven y se realizó mediante el método de extracción con TRIZOL®:

- Las muestras, previamente congeladas, se trituraron con un mortero y, posteriormente, se introdujeron en un tubo Eppendorf de 2 ml y se pesaron unos 100 mg de muestra. Se conservaron en nitrógeno líquido.
- Añadir 500 µL de TRIZOL y mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Añadir 100 µL de CLOROFORMO y agitar con brío durante 15 min. Incubar a temperatura ambiente 2-3 minutos
- Centrifugar: 12.000 rpm, 15 min, 4°C
- En otro EPPENDORF añadir 500 µL de ISOPROPANOL por cada mL de TRIZOL (es decir, poner **250 µL de ISOPROPANOL** en el EPPENDORF)
- Sobre ese ISOPROPANOL, añadir el sobrenadante tras la centrifugación e incubar 10 min a 4°C
- Centrifugar: 12.000 rpm, 15 min, 4°C
- Eliminar el ISOPROPANOL
- Lavar con 1 ml de ETANOL 75%
- Resuspender el pellet
- Centrifugar: 7.500 rpm, 5 min, 4°C
- Eliminar el ETANOL secar bien y resuspender en agua pura (en 40 µL o 25 µL en función del tamaño del pellet)
- Congelar las muestras a -80°C

ANEXO II

Limpieza de muestras extraídas. Procedimiento DNase

Procedimiento realizado mediante un kit de limpieza: **DANAGENE DNA**

REMOVAL KIT

Componentes del KIT:

- Tampón de Lisis
- 1. Añadir 400µl de tampón de unión a 100µl de la solución que contiene el RNA más 50µl de etanol al 100%. Se mezcla bien y, si la solución es menor a 100µl se añade agua libre de nucleasas o escalando los reactivos.
- 2. Transferir la muestra a una columna gDNAremoval colocando la spin column en un tubo de recogida.
- 3. Centrifugar 1 minuto a 8000 r.p.m.
- 4. Recoger el sobrenadante, añadir 400µl de etanol al 100% y mezclar bien.
- 5. Coger una columna de unión RNA más su tubo de recolección y añadir la mezcla obtenida en el punto anterior, centrifugar a 9000 r.p.m. durante un minuto. Si hay mucho volumen de muestra pasarla en dos tandas.
- 6. Añadir 700 µl de Tampón de Lavado y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- 7. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad para eliminar todo el etanol.
- 8. Colocar la columna en un micro tubo nuevo de 1.5 ml y eluir el RNA.
- 9. Eluir el RNA en 30-50 µl de Agua libre de Nucleasas, incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

ANEXO III

Procedimiento PCR para obtener cDNA.

Mezclar:

- 1 µL oligodT (50 µM que hemos diluido)

- 3.5 μL de RNA total (entre 1–2 μg RNA total o incluso más, hasta 5 μg).
Nosotros ponemos 1 μg con un volumen variable.

- 6 μL agua

En nuestro caso el volumen de agua es variable en función del volumen de RNA.

Incubar 10 min a 70° C (para eliminar estructuras secundarias)

Pasar inmediatamente a hielo (dar un spin)

Añadir:

- 4 μL de tampón “5X first strand buffer”
- 2 μL de DTT (0.1 M)
- 2 μL dNTPs (10 mM)
- 1 μL “Superscript) (retrotranscriptasa)
- (opcionalmente, añadir HPRI Inhibitor: el inhibidor de RNasa)

Incubar 1 h a 42° C y 10 min a 70° C

Añadir RNasa H (1 μL)

Incubar 20 min a 37° C

Medir el contenido de cADN (de cadena simple) en el nanodrop.

ANEXO IV

Reactivos de la PCR (Polymerase chain reaction) para la amplificación de la cadena de DNA a partir de los PRIMERS diseñados.

El volumen final de la mezcla para la reacción fueron 15 μL cuyo contenido fue:

- 10,5 μL de agua pura (libre de RNasa y DNasa)
- 1.5 μL de solución Buffer 10X
- 0.6 μL de MgCl_2 50mM
- 0.3 μL de una mezcla de los cuatro desoxinucleotidostri-fosfato (dNTPs) 10 mM
- 0.1 μL de Taqpolimerasa, concentración de 5 unidades/ μL
- 0.5 μL de cebador directo 10 μM

- 0.5 µl de cebador reverso 10 Mm
- 1µl de cDNA obtenido a partir del RNA extraído

Condiciones de PCR inicial

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador *EppendorfMastercycler* (Hamburg, Germany) en las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial: 2 minutos a 96°C
- 35 ciclos de:
 - 30 segundos a 96°C para la desnaturalización
 - 30 segundos a 55°C para el alineamiento
 - 1 minuto a 72°C para la elongación
- 1 ciclo de extensión final: 5 minutos a 72°C
- Mantenimiento final a 4°C

Condiciones de PCR finales modificadas

Aunque en el diseño de los primers las temperaturas óptimas oscilaban entre 58-60°C se tuvieron que realizar varias pruebas para ver cuáles eran los óptimos de temperaturas, las condiciones idóneas para la reacción fueron:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C
- 35 ciclos de:
 - 30 segundos a 94°C para la desnaturalización
 - 30 segundos a 53°C para el alineamiento
 - 1 minuto a 72°C para la elongación
- 1 ciclo de extensión final: 5 minutos a 72°C
- Mantenimiento final a 12°C