

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**OPTIMIZACIÓN DE DISTINTOS PORTAINJERTOS EN EL
CULTIVO DEL PISTACHO: UN ENFOQUE
FISIOLÓGICO Y MOLECULAR.**

CRISTINA AZNARTE MELLADO
TESIS DOCTORAL

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Cristina Aznarte Mellado

ISBN: 978-84-9125-454-6

URI: <http://hdl.handle.net/10481/42052>

**Optimización de distintos portainjertos en el
cultivo del pistacho: un enfoque
fisiológico y molecular.**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**OPTIMIZACIÓN DE DISTINTOS PORTAINJERTOS
EN EL CULTIVO DEL PISTACHO: UN ENFOQUE
FISIOLÓGICO Y MOLECULAR.**

Memoria para optar al grado de Doctora
presentada por la licenciada
Dña. Cristina Aznarte Mellado

DIRECTOR:

Dr. Rafael Navajas Pérez

Granada, 2015



La doctoranda Cristina Aznarte Mellado y el director de la tesis Rafael Navajas Pérez, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 10 de Noviembre de 2015.

Director de la Tesis

Doctoranda

Fdo.: Rafael Navajas Pérez

Fdo.: Cristina Aznarte Mellado

Los resultados de esta Memoria han sido en parte publicados en los siguientes artículos, que pueden encontrarse en los anexos de esta Memoria:

- ✦ *Mycorrhizal treatments increase the compatibility between Pistachio (Pistacia vera L.) cultivars and seedling rootstock of Pistacia terebinthus L.*

Cristina Aznarte-Mellado, Pedro J. Sola-Campoy, Francisca Robles, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez.

Scientia Horticulturae, (2014) 176:79-84.

- ✦ *Molecular characterization of the interspecific hybrid Pistacia vigros (P. vera L. x P. atlantica Desf.).*

Cristina Aznarte-Mellado, Pedro J. Sola-Campoy, Francisca Robles, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez.

Scientia Horticulturae, (2014) 179:180-183.

- ✦ *Nutrient uptake efficiency of five varieties of pistachio (Pistacia vera L.).*

Cristina Aznarte-Mellado, Pedro J. Sola-Campoy, Francisca Robles, Julián Guerrero Villaseñor, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez.

Journal of Elementology, doi:10.5601/jelem.2015.20.1.912.

Y han dado lugar a la protección de la variedad vegetal VIGROS:

Variedad vegetal VIGROS.

CPVO (Community Plant Variety Office)

Gazette, (2012) 6:35.

La financiación del presente trabajo ha corrido a cargo del proyecto de investigación del Plan Nacional AGL2009-09094: Desarrollo de Herramientas Moleculares para la Mejora del Cultivo del Pistacho y del Proyecto de Investigación asociado al contrato Ramón y Cajal RYC-2011-08653.

AGRADECIMIENTOS.-

Para realizar un proyecto como este estoy convencida de que es necesario contar con el apoyo de ciertas personas que sin duda han de soportar los vaivenes que surgen a lo largo del trabajo.

En mi caso, nada de esto habría sido posible sin el sostén del grupo de investigación BIO200 de la Universidad de Granada, que me acogió desde un principio como a una más, respondiendo a todas y cada una de mis múltiples dudas y siendo para mí el referente que necesitaba.

Quiero agradecer al Dr. Carmelo Ruiz Rejón, a la Dra. Francisca Robles Rodríguez y al Dr. Roberto de la Herrán Moreno el haberme guiado por este camino con presteza, a Pedro J. Sola Campoy el haberme enseñado todo lo que no sabía sobre un laboratorio de genética y convertirse en un amigo para mí, a la Dra. María Jesús Molina Luzón, a la Dra. Belén Cano Roldán y el Dr. José López Fernández el haber tenido siempre una sonrisa con la que responder a todo lo que les fui solicitando día tras día. En general agradezco a todo el Departamento de Genética de la Universidad de Granada el haberme dado la oportunidad de continuar con una vía abierta por la investigación.

Además, quiero agradecer la participación de Viveros Zuaimé S.L. (Caniles, Granada) y del Centro Agrario El Chaparrillo (Ciudad Real; Junta de Castilla la Mancha) que me proporcionaron el material vegetal analizado en esta tesis y las parcelas experimentales en las que se llevaron a cabo los estudios correspondientes.

Sin duda, el soporte de mi familia ha sido también clave, es por esto que quiero agradecer a mi hermano, José Luis Aznarte Mellado su apoyo, haciéndome partícipe de una realidad siempre mucho más profunda de lo que yo alcanzaba a ver, a mi hermana María Aznarte Mellado por estar siempre dispuesta a ayudar, sea cual sea la tarea que le encomiende, y a mis padres, José Luis Aznarte Cabezudo y Cristina Mellado Ramos que llegaron a sentir cada alegría y cada desesperanza como propias, en un intento por aliviar las mías. Sin ellos no sé si lo habría conseguido.

No puedo cerrar este capítulo de mi vida sin agradecerle a mi director de tesis, el Dr. Rafael Navajas Pérez, el haber cogido mi mano para adentrarme en el mundo de la investigación. A lo largo de todo este tiempo, no sólo me ha aportado los recursos necesarios para seguir esta senda, sino que ha venido conmigo. Gracias.

RESUMEN.-

El pistachero o alfóncigo (*Pistacia vera* L.) es una especie arbórea caduca, dioica y con polinización anemófila perteneciente a la familia *Anacardiaceae*. Es una especie originaria de Asia central y suroccidental y su expansión por todo el mundo a lo largo de la historia ha ido siempre ligada al consumo y uso de su fruto, el pistacho, siendo cultivado ampliamente en su zona de origen, en la zona mediterránea, en California y, llegando más tarde, a Australia.

De entre todas las especies del género *Pistacia*, *P. vera* es la única con importancia económica, ocupando el sexto puesto en la producción mundial de frutos secos, por detrás de la almendra, nuez, anacardo, avellana y castaña. Además, es una fuente excelente de proteína vegetal, ácidos grasos insaturados y fitosteroles, sin olvidar sus niveles considerables en cobre, magnesio, fósforo y calcio así como de vitaminas y ácido fólico.

El cultivo del pistachero se ve muy dificultado por la necesidad de utilizar un patrón o portainjertos donde establecer la variedad de interés, ya que en lugares donde no crece naturalmente, la germinación de *P. vera* no ocurre. Dentro del género *Pistacia* encontramos un importante número de especies que pueden ser usadas como portainjertos, siendo las más empleadas *P. atlantica* Desf., *P. terebinthus* L., así como los híbridos interespecíficos PGII y UCB-1, estos últimos desarrollados en Estados Unidos y muy comercializados en aquella zona.

Sin embargo, no se ha llegado a un consenso universal acerca de qué portainjertos utilizar, posiblemente porque la eficacia de cada uno de ellos varía notablemente en función de la zona de cultivo. El interés del portainjerto depende fundamentalmente de su capacidad de adaptación al medio en el que se desarrolla, es por ello que es muy importante su procedencia. En este contexto, son interesantes los esfuerzos por comprender la eficiencia en la adquisición de nutrientes de los distintos patrones, la posibilidad de modificar esta propiedad usando distintos tratamientos, así como la caracterización y el desarrollo de nuevas variedades cuyas características puedan contribuir a su uso como portainjertos.

En esta Memoria se ha determinado que no existirían diferencias en la eficiencia de adquisición de nutrientes inherentes a las características de las distintas variedades de pistacho y que las diferencias que pueden observarse se deben, sobre todo, al estado fisiológico y fenológico de la planta. No obstante, nuestros datos preliminares indicarían que *Pistacia atlantica* Desf. es un portainjerto más eficiente que *Pistacia terebinthus* L. en cuanto a la absorción de nutrientes se refiere. Por otro lado, se ha demostrado que, al contrario que el tratamiento con fitohormonas, que no afecta a este parámetro, el micorrizado modificaría la capacidad de absorción de nutrientes y que esto beneficiaría el éxito del porcentaje de prendimientos en hasta un 40%.

Finalmente, se ha caracterizado una nueva variedad de *Pistacia*, la variedad VIGROS. Los datos moleculares aquí aportados, sugieren que se trata de un híbrido natural interespecífico de las especies *P. vera* y *P. atlantica*. Estudios preliminares de caracterización como éste, se verán completados con análisis en campo que evalúen la viabilidad de esta nueva variedad a nivel productivo.

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	<i>xi</i>
<i>Resumen</i>	<i>xv</i>
<i>Listado de figuras</i>	<i>xxi</i>
<i>Listado de tablas</i>	<i>xxv</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>xxix</i>
Introducción	1
1.1- El pistachero, <i>Pistacia vera</i> L., y otras especies de <i>Pistacia</i> relacionadas.....	3
1.1.1- Generalidades.....	3
1.1.2.- El cultivo del pistacho.....	4
1.1.3.- Otros factores que intervienen en el cultivo del pistacho: la micorrización y el uso de fitohormonas.....	14
1.1.4.- Problemas fundamentales del cultivo del pistacho.....	16
1.2.- Uso del ADN ribosómico y del ADN cloroplastidial en estudios evolutivos y filogenéticos.....	18
1.2.1.- El ADN ribosómico.....	18
1.2.2.- El ADN cloroplastidial.....	20
1.2.3.- Uso de marcadores moleculares en estudios evolutivos y filogenéticos.....	22
1.3.- Clasificación filogenética del género <i>Pistacia</i>	26
Objetivos	31
Metodología	35
3.1.- Comparación de la eficiencia en la absorción de nutrientes entre <i>Pistacia terebinthus</i> L. Y <i>Pistacia atlantica</i> Desf.	37
3.1.1.- Material vegetal y diseño experimental.....	37
3.1.2.- Análisis estadístico de los resultados.....	37
3. 2.- Evaluación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en cinco variedades de <i>Pistacia vera</i> L.....	38

3.2.1.- Material vegetal y diseño experimental.	38
3.2.2.- Análisis estadístico de los resultados.	38
3. 3.- Evaluación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en <i>Pistacia terebinthus</i> L.	39
3.3.1.- Material vegetal, tratamientos y diseño experimental.....	39
3.3.2.- Injerto, crecimiento y porcentaje de prendimiento.	39
3.3.3.- Absorción de minerales.	40
3.3.4.- Análisis estadístico de los resultados.	40
3.4.- Caracterización genética de la nueva variedad VIGROS.	43
3.4.1.- Aislamiento de ADN.	43
3.4.2.- Aislamiento y caracterización de secuencias de ADN ribosómico y ADN cloroplastidial.	45
3.4.3.- Protocolos de PCR.	46
3.4.4.- Ligación de los productos de PCR	47
3.4.5.- Detección de plásmidos recombinantes	48
3.4.6.- Secuenciación de los clones recombinantes positivos.....	49
3.5.- Análisis filogenéticos de las secuencias de ADN ribosómico y ADN cloroplastidial.	51
3.5.1.-Análisis de la divergencia interespecífica.....	53
Resultados.....	55
 CAPÍTULO 1.- Comparativa de la eficiencia en la absorción de nutrientes de dos variedades al ser usadas como portainjertos: <i>Pistacia atlantica</i> Desf. vs <i>Pistacia terebinthus</i> L.	57
Resumen.....	57
Introducción	59
Resultados y Discusión	60
Conclusiones	67
 CAPÍTULO 2.- Evaluación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en cinco variedades de Pistacho, (<i>Pistacia vera</i> L.)	69
Resumen.....	69
Introducción	71
Resultados y Discusión	72
Conclusiones	79

CAPÍTULO 3.- Modificación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en <i>Pistacia Terebinthus</i> L. mediante el uso de diferentes tratamientos: micorrizas y fitohormonas.	81
Resumen	81
Introducción	83
Resultados	85
Discusión.....	94
Conclusiones.....	99
 CAPÍTULO 4.- Caracterización molecular del híbrido interespecífico <i>Pistacia</i> x VIGROS (<i>P. Vera</i> L. X <i>P. Atlantica</i> Desf.).....	101
Resumen	101
Introducción.....	103
Resultados y Discusión.....	105
Conclusiones	110
 Conclusiones.....	111
 CAPÍTULO 1.- Comparación entre dos portainjertos: <i>Pistacia atlantica</i> Desf. Vs <i>Pistacia terebinthus</i> L.....	113
 CAPÍTULO 2.- Comparación entre variedades de pistacho de la eficiencia en la adquisición de nutrientes.....	115
 CAPÍTULO 3.- Modificación de la eficiencia en la adquisición de nutrientes.	117
 CAPÍTULO 4.- Caracterización genética de híbridos interespecíficos de <i>Pistacia</i>	118
 Bibliografía	119
 Anexos.....	145

LISTADO DE FIGURAS.-

Figura 1.- Diferentes usos del pistacho.....	4
Figura 2.- Principales países productores a nivel mundial en 2013 (FAOSTAT, 2013).....	5
Figura 3.- El injerto en T o en escudo en <i>Pistacia vera</i> L.	7
Figura 4.- Ejemplo de varios de los portainjertos más utilizados: (A) <i>P. vera</i> , (B) <i>P. atlantica</i> , (C) <i>P. terebinthus</i>	8
Figura 5.- Estructura de las regiones utilizadas en el análisis molecular (A) Representación esquemática de la organización de la unidad ribosómica 45S completa de plantas. (B) Región entre los genes cloroplastidiales trnL y trnF. (C) Región entre los genes cloroplastidiales trnC y trnD, incluyendo la secuencia de los genes petN y psbM, y los espaciadores intergénicos correspondientes; (Flechas) posicionamiento de los cebadores específicos utilizados para la amplificación de cada región.....	19
Figura 6.- Árbol filogenético con la actual clasificación de <i>Pistacia</i> . Modificado de Yi et al., 2008.....	28

Figura 7.- Semillas a analizar, sin exocarpo. Recolectadas en un muestreo rutinario. La barra representa 1 cm.43

Figura 8.- Representación de las medias de concentración de los elementos con diferencias significativas según el test de Friedman ($\alpha < 0,05$) con comparación de nuestros resultados con los de la literatura (línea roja).....65

Figura 9.- Representación gráfica de las medias de concentración de C y Ca en cada variedad mostrando posibles diferencias en ‘Mateur’ para ellos.76

Figura 10.- Representación gráfica del estado nutricional de las plantas según los rangos de suficiencia de los macro y micro nutrientes. *Todos los datos han sido tomados de Picchioni et al., 1997 y Harmankaya et al., 2014. Los rangos normales son medidos al principio de Agosto, lo que corresponde con el inicio de la fase III en el desarrollo del fruto o inicio del llena de los frutos en *P. vera* L.78

Figura 11.- Evolución temporal de la concentración de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P y Zn en plantas con fitohormonas, micorrizas y plantas control sin tratamiento durante el experimento. La barra roja indica momento del injerto.91

Figura 12.- Árbol de máxima verosimilitud basado en secuencias de ADN ribosómico. Los números en cada nodo indican los valores de bootstrap..... 107

Figura 13. Alineamiento parcial de la región trnC-D, mostrando la posición de diagnóstico (466) para *P. x VIGROS* y *P. vera* (sombreado)..... 109

* Todas las imágenes utilizadas son propias excepto las abajo indicadas que se encuentran protegidas por licencias Creative Commons:

Figura 3.- www.palmapedia.com.

Figura 4.-

(A) www.flickr.com. Realizada por el usuario: kitchener.lord

(B) www.wikipedia.org. Subida por el usuario: Eitan f.

(C) www.comons.wikimedia.org. Subida por el usuario: Xemenendura

LISTADO DE TABLAS.-

- Tabla 1.** Rangos de suficiencia y valores críticos de concentración para macro y micro nutrientes en *Pistacia vera*. *Valores tomados de Picchioni et al., 1997 y Harmankaya et al., 2014. 13
- Tabla 2.-** Contrastes de igualdad en parcelas y tratamientos utilizando un diseño en bloques completos aleatorizados con un nivel de significación: $\alpha < 0,05$. * Entre paréntesis quedan reflejados los niveles de significación (sig. exacta) para cada uno de los contrastes. ** Las concentraciones de todos los elementos químicos son independientes de la parcela en la que se encuentren las plantas. *** Parcelas con un efecto débil, valor estadístico (F) cercano a 1. **** El contraste en los tratamientos está de acuerdo con el análisis de ANOVA. ***** Un valor bajo para R2 indica que el modelo explica en un bajo porcentaje la variabilidad de los datos. 42
- Tabla 3.-** Lista de especies analizadas y número de accesión de las secuencias.... 52
- Tabla 4.-** Valores medios para la concentración de cada elemento químico en todas las variedades. Las desviaciones típicas aparecen indicadas entre paréntesis para cada valor medio. * *As, Be, Bi, Cd, Co, Mo, Sb* y *Se* mostraron valores de concentración $< 0.5 \text{ Kg/m}^3$ 62

Tabla 5.- Test de Friedman para todos los elementos en cada variedad. Nivel de significación $\alpha < 0,05$. * *Al, S, Cu, Cr, K, Mn, Ni, Pb, Ti* y *Zn* no mostraron diferencias significativas. ^a Elementos cuya concentración es mayor en las variedades injertadas en *P. atlantica* Desf. ^b Elementos cuya concentración es mayor en aquellas variedades cuyo portainjertos era *P. terebinthus* L. ^c Elemento con diferencias significativas que no se pueden asignar a la diferencia de portainjertos utilizado.63

Tabla 6.- Acumulación de elementos químicos por variedad (medias y desviaciones) con los datos del test de Friedman. **C* y *Ca* mostraron diferencias significativas para un nivel de significación de $\alpha < 0.05$ 73

Tabla 7.- Valores medios de la concentración de *C* y *Ca* por variedad, y resultado del test de Wilcoxon con suma de rangos mostrando las diferencias en ‘Mateur’ (negrita). 75

Tabla 8.- Acumulación de elementos químicos en plantas de *Pistacia terebinthus* L. con micorrizas, fitohormonas y en plantas control sin tratamiento. * *As, Be, Bi, Cd, Co, Mo, Sb, Se* mostraron valores de concentración $< 0.5 \text{ Kg/m}^3$ 87

Tabla 9.- ANOVA de un factor y análisis post hoc de la acumulación de elementos químicos en plantas de *Pistacia terebinthus* L. con micorrizas, fitohormonas y en plantas control sin tratamiento. El nivel de significación para ANOVA y Tukey: $\alpha < 0.05$. * *C, Cr, Cu, Li, Na, Ni, Pb* no mostraron diferencias significativas. 88

Tabla 10.- Acumulación de varios elementos en *P. terebinthus* L. antes de los tratamientos (análisis 1), justo después del injerto (análisis 2), y 77 días después del injerto (análisis 3)..... 89

Tabla 11.- Medias de diámetro, perímetro y altura de las plantas. El grupo 1 representa a las plantas micorrizadas, el grupo 2 a las que tienen fitohormonas y el grupo 3 son las plantas control. Niveles de significación para ANOVA y el test de Tukey: $\alpha < 0.05$. * Los valores del diámetro y perímetro no mostraron diferencias significativas..... 92

Tabla 12.- Test Binomial Z para el éxito del injerto en los tres tratamientos. Valor $p < 0.05$. * Todos los tratamientos siguen una distribución binomial ($p = 0.50$). ** Las micorrizas aumentan el éxito del injerto ($p = 0.79$)..... 93

Tabla 13.- Porcentaje de uniones yema-injerto positivas en los tres grupos estudiados..... 94

ABREVIATURAS.-

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Grados centígrados
dNTPs	Desoxi-nucleósidos-trifosfato
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
g	Gramo
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactósido
h	Horas
H₂O_{dd}	Agua ultrapura doble destilada
kb	Kilobases
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani Broth
M	Moles/litro
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
ng	Nanogramos (10 ⁻⁹ gramos)
NJ	Neighbor joining
NOR	Región organizadora del nucleolo (<i>Nucleolar Organizer Region</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
rpm	Revoluciones por minuto

SSC	Citrato sódico salino
Taq	Polimerasa de ADN de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

INTRODUCCIÓN

1.1- El pistachero, *Pistacia vera* L., y otras especies de *Pistacia* relacionadas.

1.1.1- Generalidades.

El género *Pistacia* perteneciente a la familia *Anacardiaceae* se compone de una docena de especies arbóreas caducas, dioicas y con polinización anemófila. Aunque algunas de ellas son utilizadas en la producción de aceites, jabones y cosméticos debido a su alto contenido oleico (Hepper, 1992), la especie más relevante desde el punto de vista comercial es *P. vera* (conocida comúnmente como pistachero o alfóncigo) por la producción de semillas comestibles o pistachos (Whitehouse, 1957). No en vano, esta especie se encuentra sexta en el ranking de la producción mundial de frutos secos, por detrás de la almendra, la nuez, el anacardo, la avellana y la castaña (FAOSTAT, 2013).

El pistacho tiene un alto contenido en arginina, grasas insaturadas y fitoesteroles. Además, contiene niveles apreciables de cobre, magnesio, fósforo y calcio, y muchas vitaminas, como la vitamina E y el ácido fólico (Favier et al., 1995). Se estima que más del 95 % de la producción es dedicada al uso como aperitivo o *snack*, tostado o al natural. Sin embargo, los pistachos se utilizan también para la fabricación de cremas y derivados alimenticios como helados, dulces y yogures (**Figura 1**).



Figura 1.- Diferentes usos del pistacho.

Por último, son tintóreos, pudiendo obtenerse de ellos un colorante verde de uso alimentario. Las hojas son ricas en taninos y de la savia se obtiene la trementina. Además, la madera del pistachero es dura y resistente, y se utiliza en la confección de muebles, utensilios de cocina y en marquetería, siendo además un buen combustible produciendo carbón con alto poder calorífico (Ercisli, 2004; Al-Saghir, 2009).

1.1.2.- El cultivo del pistacho.

El género *Pistacia* es originario de Asia Central y data de hace unos 80 millones de años (Parfitt y Badenes, 1997; Kafkas y Perl-Treves, 2002). Los primeros fósiles se encontraron en la Isla de Madeira y se consideran de la Era Terciaria. Las diferentes especies del mismo se difundieron posteriormente por áreas muy diversas, llegando actualmente desde el norte de África hasta Filipinas y en América del Norte desde Honduras y México a Texas (Al-Saghir, 2010).

Actualmente, la producción mundial de pistacho ha alcanzado las 916.000 toneladas (FAOSTAT, 2013), distribuyéndose en general entre países de Oriente Medio, EEUU y el Mediterráneo. Más concretamente, el mayor productor mundial es Irán, con 478.600 t, seguido de EEUU (196.930 t), Turquía (88.600 t), China (74.000 t), Siria (54.516 t), Grecia (11.000 t), Túnez (1.200 t) e Italia (3.202 t) (FAOSTAT, 2013) (**Figura 2**).

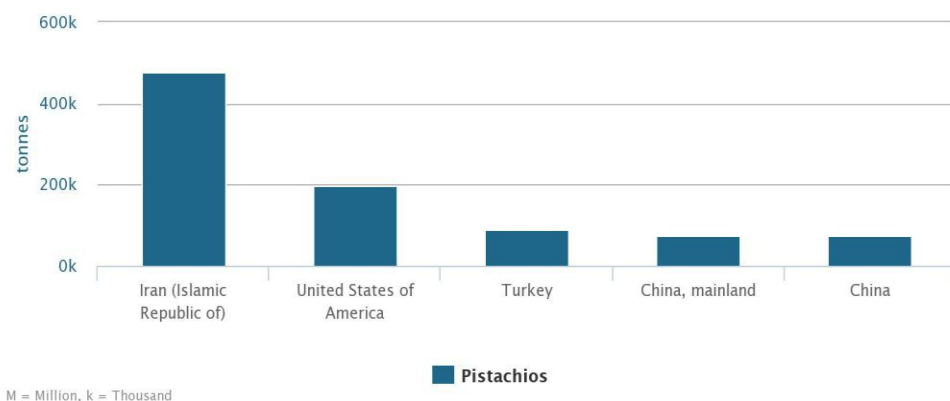


Figura 2.- Principales países productores a nivel mundial en 2013 (FAOSTAT, 2013).

A pesar de que en tiempos de la ocupación árabe en Andalucía el pistacho era un buen cultivo agrícola, durante la reconquista los cristianos fueron eliminando todos los árboles machos por no producir frutos, lo que provocó la desaparición del pistachero de la península. El cultivo se reintroduce, sin embargo, en los años 80, a través de Cataluña con la mediación del Centro Agropecuario *Mas Bové* del IRTA de Reus (Tarragona), desde donde se fue expandiendo progresivamente a otras zonas del país con condiciones favorables para su cultivo. Actualmente, la superficie de cultivo es de unas 5.000 ha, colocando al país en el décimo lugar en el ranking mundial de producción. Éstas, se distribuyen por orden entre Castilla-La

Mancha, con unas 4.000 ha, Cataluña, Andalucía, Extremadura y, por último, Castilla y León, siendo la producción total en el país de unas 500 t, lo que pone de manifiesto la juventud de las plantaciones que, junto con el largo periodo que se requiere para la entrada en producción, se traduce en un rendimiento muy bajo al menos hasta el décimo año (10 a 12 kilogramos de pistachos pelados de media por árbol a partir de los diez años de edad) (Couceiro et al., 2013). Aun así, empieza a implantarse su cultivo, principalmente por los pocos cuidados necesarios en su mantenimiento, ocupando suelos pobres y sustituyendo cultivos menos rentables en la actualidad. En concreto, la provincia de Granada presenta ya unas 150 ha, además de las que se están plantando actualmente. Las zonas de cultivo actualmente son: Guadix, Baza, Caniles, Huéscar, los Montes Orientales, Dúrcal y la Vega de Granada, según la Unión de Pequeños Agricultores y Ganaderos (UPA, 2010).

El hombre ha aprovechado siempre las cualidades del pistacho al menos desde el Neolítico, según las evidencias arqueológicas encontradas. Durante la edad de piedra, cerca del 7000 a. C., se empezaron a domesticar algunas variedades de estas plantas. Desde mediados del siglo XX hasta la actualidad se ha desarrollado un gran número de variedades, entre los que podemos destacar Aegina (Grecia), Ashoury (Siria), Avdat, Avidon (Israel), Batoury (Turkia, Siria), Joley (USA), Larnaka (Chipre), Mateur (Túnez, Marruecos) o Napoletana (Italia) como hembras, y las variedades macho Eginó, Nazaret, Askar (Siria seleccionadas en Israel), C-Especial (Grecia), M-38 (Siria), Mateur M (Túnez, Marruecos), G1 (Centro Agrario el Chaparrillo, Castilla la Mancha) ó 02-18 (Azerbaiján), aunque sin duda, las más utilizadas en la actualidad son Kerman (variedad hembra productora de semillas, preferida en los mercados por el tamaño y la fácil apertura de su fruto) y Peter (variedad macho usada como polinizador más universal), (López et al., 2005).

-El uso del portainjertos en el cultivo del pistacho.

El cultivo del pistachero, como el de tantos otros frutales, requiere de la presencia de un patrón o portainjertos, ya que, en lugares donde no crece naturalmente, su germinación y capacidad de enraizamiento son muy limitadas. Cuando hablamos de injerto, nos referimos a la unión entre dos individuos, portainjerto y variedad, que se desarrollarán como un solo organismo dotando el primero de un sistema radicular más potente al segundo y una parte aérea más desarrollada (**Figura 3**).



Figura 3.- El injerto en T o en escudo en *Pistacia vera* L.

La influencia que ejerce la elección del portainjertos en la productividad final del cultivo ha sido analizada en diferentes publicaciones científicas. Esta influencia se traduce en una mayor tolerancia a situaciones de extrema salinidad (Walker et al., 1987; Behoudian et al., 1986; Picchioni et al., 1990), resistencia a diferentes enfermedades (Ashworth, 1985), vigor y hábitos reproductivos (Crane y Iwakiri, 1987) y eficiencia nutricional (Brown et al., 1994). El portainjerto es, por tanto, el

individuo que aporta el sistema radicular, y la variedad, introducida en forma de yema, formará la parte aérea del árbol cuyos frutos o polen se desarrollarán.

El uso de un patrón homogéneo, además, facilita en gran medida el manejo de las plantaciones. En la actualidad, los portainjertos que dominan el mercado son; *P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus* y los híbridos interespecíficos PGII y UCB-I (revisado por Ferguson et al., 2001) (**Figura 4**). Sin embargo, no existe un consenso universal acerca de qué portainjertos debe ser utilizado, debido a que la eficacia de cada uno de ellos varía notablemente en función de la zona de cultivo y de la variedad elegida.

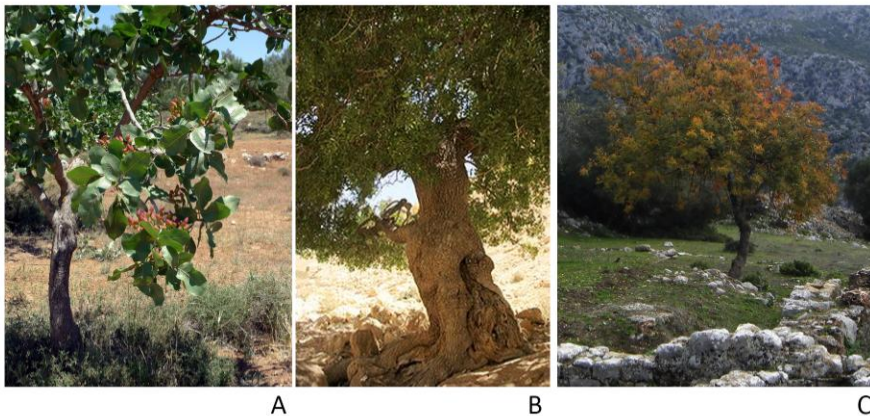


Figura 4.- Ejemplo de varios de los portainjertos más utilizados:
(A) *P. vera*, (B) *P. atlantica*, (C) *P. terebinthus*.

P. vera L. se utiliza frecuentemente en zonas productoras del Oriente Próximo, mayoritariamente en Irán, de donde es originario, lo que mantiene un bajo coste de producción en la región. Se caracteriza por una elevada resistencia al frío, aunque es susceptible a ciertas plagas y enfermedades, especialmente a nematodos y al hongo *Verticillium dahliae*. En España su uso está limitado como

portainjertos debido a los problemas de propagación comentados anteriormente, lo que hace que los agricultores prefieran utilizar *P. terebinthus* L., que además es autóctono del país.

P. atlantica Desf. es utilizado en aquellos países donde es autóctono (Marruecos, Túnez, Argelia, Irak, Irán), pero comenzó a ser sustituido por *P. integerrima* debido a su extrema sensibilidad a la verticilosis causada por diferentes cepas del hongo *Verticillium*.

P. terebinthus L. presenta gran rusticidad y se adapta a suelos pobres, rocosos y calizos, con escasa pluviometría y temperaturas extremas y es el principal portainjerto en Australia, Sicilia (Italia) y algunas zonas de Turquía. En gran parte de España, ésta ha sido la elección de los agricultores, debido a su menor coste, a que es de carácter autóctono y, sobre todo, a los excelentes resultados en cuanto a adaptabilidad y rendimientos productivos, comparándolo con otros patrones como *P. atlantica*, *P. integerrima* y *P. vera*. Sin embargo, éste se define como un patrón poco vigoroso con respecto a los principales portainjertos utilizados (Ferguson et al., 2005; Tarango, 1993).

En cuanto a los híbridos más utilizados como portainjertos cabe destacar UCB1 y PGII. El primero surge de la polinización cerrada entre un árbol femenino de *P. atlantica* Desf. y otro masculino de *P. integerrima* y se considera el pie más vigoroso y productivo de todos los patrones del pistachero, siendo además tolerante a *Verticillium dahliae*. Sin embargo, posee una baja eficiencia nutricional y su precio está aún muy por encima de las posibilidades del agricultor medio. PGII se obtiene a partir de la polinización abierta entre *P. integerrima* x *P. atlantica* y es utilizado casi exclusivamente en California. Su punto fuerte es su vigor, estando

también entre sus características, una producción media baja, sensibilidad moderada a *Verticillium dahliae* y una absorción media alta de algunos nutrientes como cobre, zinc y boro. En Estados Unidos, uno de los países con mayor producción, como portainjertos, junto con *P. integerrima*, se usan fundamentalmente estos híbridos, por su resistencia al hongo edáfico, y por tanto por la posibilidad de ser usados en suelos profundos y en regadío (Morgan *et al.*, 1992; Epstein *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2005).

El interés del portainjerto depende, fundamentalmente, de su capacidad de adaptación al medio en el que se desarrolla, es por ello que su procedencia es muy importante. En este contexto, son interesantes los esfuerzos por caracterizar y desarrollar nuevas variedades cuyas características puedan contribuir a su uso como portainjertos a nivel nacional o local. De esa manera, se debe recalcar que la elección del portainjerto es determinante en el desarrollo futuro del cultivo (Vargas *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 2005) ya que según el patrón utilizado, existen amplias diferencias en cuanto a la producción final, y el vigor y longevidad de los árboles (Tarango, 1993). No sólo se trata de una cuestión determinante, sino que además ninguno de los portainjertos presenta igual rendimiento en las diferentes zonas de cultivo a nivel mundial, proporcionando cada uno de ellos unas características diferentes al árbol según el sitio en el que éste crezca.

- Eficiencia nutricional de distintas especies de *Pistacia*.

A pesar de que los factores que afectan a la nutrición de las plantas son numerosos, los más relevantes pueden dividirse en dos grandes grupos: uno relativo a las características propias del suelo y otro relacionado con los cuidados inherentes al cultivo. En el primer caso destaca la profundidad del suelo, ya que si

es la adecuada, el volumen de agua y nutrientes almacenados también lo serán, y el árbol será capaz de absorber una gran cantidad de los mismos. También cabe referirse a la textura, ya que un suelo apropiado debe retener agua suficiente para asegurar la movilidad iónica y el consecuente intercambio catiónico, y al pH, que si es demasiado bajo (menos de 5,5) puede originar deficiencias de *Ca*, *Mg*, *P* y *Mb* y excesos de *Mn*, *Al* o *Fe*, mientras que uno demasiado alto (más de 8) combinado con altos niveles de cal, puede producir bloqueos con el *Zn*, *Fe*, *Mn* y *Cu*. Hemos de precisar que las plantas de pistacho son muy sensibles a la acumulación excesiva de agua, en el caso de suelos poco permeables, lo que puede traducirse en daños en las raíces e incluso la muerte por asfixia radicular.

Concretamente, en España, las condiciones óptimas para el desarrollo comercial de este cultivo se encuentran en las provincias de Castilla-La Mancha, Andalucía, Extremadura y la Comunidad de Madrid. En estos lugares los suelos suelen tener una textura franco-arcillosa-arenosa con una profundidad de entre 50 cm y 1 m. Su valor de pH está entre 7,5 y 8,5 y en cuanto a la materia orgánica se encuentra en su mayoría por debajo del 1 % (Couceiro et al., 2013). La mayoría de estos suelos son calizos, lo que redundará en una buena formación de los frutos, ya que se trata de una especie calcícola.

Algunas de las posibles deficiencias descritas anteriormente pueden tratarse con enmiendas, como las de *Cu* o *N*, pero existen otras para las que la fertilización no es tan sencilla (caso de *B* y *Zn*, por ejemplo). Una consecuencia directa de ello es el gran interés comercial que tiene la investigación en el desarrollo de portainjertos con alta capacidad en la absorción de estos nutrientes. La capacidad de absorción de determinados nutrientes por parte del portainjerto ha sido estudiada en *Pistacia*. Se piensa que *P. terebintus* L. tendría una mayor eficiencia

nutricional, mientras que UCB-I sería considerado, en términos generales, como el portainjerto de menor capacidad de absorción. Factores como la profundidad y textura del suelo, el marco de plantación, el mantenimiento de los árboles, el portainjerto, cuidados, el pH del suelo y las reservas de nutrientes han sido propuestos como causantes de las diferencias de absorción de nutrientes (Couceiro et al., 2013). Sin embargo, no existe un consenso general y estudios en este sentido son todavía necesarios.

A pesar de ser ésta una especie autóctona de muchos de los países productores y de los pocos cuidados que requiere su cultivo, en el caso de que el nivel de fertilidad de los suelos sea bajo, podría responder de forma positiva a un programa de abonado.

Los nutrientes necesarios para el oportuno desarrollo del árbol son divididos en dos grandes grupos, según la cantidad necesaria para la planta, macronutrientes entre los que se encuentran el *N*, *P*, *S*, *K*, *Ca* y *Mg*, y micronutrientes que incluyen el *Fe*, *Mn*, *B*, *Cu* y *Zn*. En múltiples análisis de los componentes químicos presentes en las plantas de pistacho se han observado diferencias en cuanto a la cantidad media que hay de cada uno de estos elementos en distintas partes de la estructura arbórea.

Esta variabilidad en la composición de las plantas, en cuanto a nutrientes elementales, está siendo estudiada, habiéndose apuntado algunos posibles factores como la evolución de las reservas del pistachero a lo largo de las estaciones, la diferente disponibilidad existente en el suelo donde se desarrollan, la edad de la planta o el tipo de mantenimiento que se realice, permitiendo a las

plantas disponer de todos los recursos necesarios u obligándolas a competir con otras para conseguirlos (Tavallali y Rahemi, 2007; Martínez-Ballesta et al., 2010).

Los valores críticos y rangos de suficiencia de cada uno de los elementos fundamentales para el pistachero están especificados en la **Tabla 1**.

Nutrientes	Valor crítico	Rango de suficiencia
Nitrógeno	1,8 %	2,2 – 2,5 %
Fósforo	0,14 %	0,14 – 0,17 %
Calcio	1,3 %	1,3 – 4,0 %
Magnesio	0,6 %	0,6 – 1,2 %
Azufre	0,25 %	0,15 – 0,35 %
Potasio	1,6 %	1,6 – 2,0 %
Zinc	7 ppm	10 – 15 ppm
Hierro	105 ppm	60 – 150 ppm
Manganeso	30 ppm	30 – 80 ppm
Boro	90 ppm	150 – 250 ppm
Cobre	4 ppm	6 – 10 ppm

Tabla 1. Rangos de suficiencia y valores críticos de concentración para macro y micro nutrientes en *Pistacia vera*. *Valores tomados de Picchioni et al., 1997 y Harmankaya et al., 2014.

1.1.3.- Otros factores que intervienen en el cultivo del pistacho: la micorrización y el uso de fitohormonas.

En la búsqueda de mejoras que favorezcan el cultivo de *Pistacia*, diferentes especies de micorrizas han sido utilizadas (Ferguson et al., 1998), siendo considerados estos microorganismos como una pieza fundamental en el cultivo sostenible de pistacho. Cuando hablamos de micorrización nos referimos a una relación natural de simbiosis existente entre diferentes tipos de hongos y las plantas, en la que ambos organismos son beneficiados, existiendo una repercusión positiva en la planta en cuanto a la dotación de algunos elementos por parte del hongo y a la formación de una mayor superficie radicular en ella (Dodd y Ruiz-Lozano, 2012).

Las plantas de *Pistacia* micorrizadas sufren un aumento en su vigor debido a un consumo de *C* más eficiente, lo que eleva el área de exploración para la absorción de agua y nutrientes y, por tanto, la cantidad y la calidad de los frutos producidos. Además, las provee de un sistema radicular más grueso, lo que representa un aumento en la absorción de *K*, *Mn*, *P* and *Zn* (Kafkas y Ortas, 2009; Bagheri et al., 2012). Por último, la producción de antibióticos por parte del hongo, redundando en una mayor resistencia a plagas y/o enfermedades.

Diferentes combinaciones de micorriza/pistachero han sido utilizadas en cada uno de los países productores. En el sur de España, la asociación entre *Pistacia lentiscus* en condiciones de secano y *Glomus intraradices*, mejoró la asimilación de algunos elementos minerales, mientras que la de *P. therebintus* con *Glomus mosseae*, mejoró el desarrollo de las plantas (Camprubi et al., 1992; Estaún et al., 1990).

Por otro lado, diferentes fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas son utilizadas como bioestimulantes que modifican la absorción de nutrientes en plantas (Miyashima & Nakajima, 2011). Las giberelinas han sido establecidas como un tratamiento eficaz para incrementar los porcentajes de germinación de semillas (Salisbury y Ross, 1994), estando involucradas en el desarrollo vegetativo, más concretamente en procesos metabólicos como la germinación de semillas, el crecimiento del tallo, la inducción floral, el desarrollo de polen y el crecimiento del fruto (Sponsel y Hedden, 2004).

Sobre las auxinas cabe resaltar que influyen tanto la división como el crecimiento y diferenciación celular, estando involucradas en muchos procesos del desarrollo, en algunos de ellos interactuando con otras fitohormonas (Jordan y Casaretto, 2006). Las auxinas inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias, lo que favorece el aumento en la velocidad de absorción de nutrientes en la planta.

Las citoquininas también se utilizan para favorecer el crecimiento y el desarrollo de las plantas, ya que favorecen la división celular, el retraso de la senescencia, la regulación de la dominancia apical y la transmisión de señales nutricionales (Sakakibara, 2004), induciendo además la formación de raíces en las plantas (Sosa-Rodríguez et al., 2009), lo que favorece el desarrollo de un buen sistema radicular y disminuye el estrés que sufre la planta en el trasplante (Azcón-Bieto y Talón, 2002). Por último, se debe resaltar que se ha encontrado un aumento en el diámetro y longitud del injerto en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) tratadas con citoquininas, mejorando así el prendimiento (Cárdenas-Hernández et al., 2010). La mezcla de fitohormonas formada por auxinas, giberelinas y citoquininas, suele añadirse en muchos cultivos en el momento del trasplantado

para promover no sólo el crecimiento de la raíz, sino también la verticalidad de la misma, aunque en el caso de *Pistacia* no se han encontrado referencias de la monitorización de su uso en la bibliografía.

En este trabajo, especulamos que ambos tratamientos, tanto fitohormonas como micorrizas podrían afectar al desarrollo radicular de las plantas, lo que probablemente se traduciría de forma indirecta en el crecimiento de los nuevos tejidos requeridos tras el injerto y, por lo tanto, en el prendimiento final de la yema.

1.1.4.- Problemas fundamentales del cultivo del pistacho.

Tres son los problemas fundamentales que se encuentran a la hora de establecer una plantación de pistachos. En primer lugar, la elección de un patrón adecuado a las condiciones del entorno de la plantación, ya sea en cuanto a factores edáficos, climáticos o en la relación variedad/portainjerto, puesto que podría determinar el desarrollo futuro del cultivo (Vargas *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 2005). La influencia del patrón utilizado, ya tratada anteriormente en este trabajo, se traduce en diferencias en la producción final, y el vigor y longevidad de los árboles (Tarango, 1993).

En segundo lugar, es indispensable tener en cuenta el porcentaje de prendimiento de las yemas, uno de los factores más relevantes en términos económicos para determinar la viabilidad del cultivo. En el caso del injerto en campo, actualmente en Castilla-La Mancha se requieren tres injertadas como mínimo para obtener un porcentaje de éxito del 60 % (Couceiro *et al.*, 2013). Todos los factores que provocan estrés en la planta afectan negativamente al prendimiento. Entre ellos,

las variaciones de temperatura, el pequeño diámetro del tronco, riego en exceso, el uso de una yema que no está suficientemente madura, una técnica de injerto demasiado profunda y la elección de un momento de ejecución poco apropiado. Existen también diferentes técnicas de injerto, entre las que destaca el injerto de escudo, con la que se podría obtener un porcentaje de prendimiento de hasta el 90 %. La necesidad de abrir nuevas vías de investigación sobre tratamientos que mejoren dicho prendimiento, como la micorrización, ha quedado plasmadas en trabajos anteriores.

A pesar de lo dicho, se han encontrado pocas situaciones de incompatibilidad entre variedades y portainjertos. En España se han encontrado síntomas de incompatibilidad tan solo en dos parejas; una la formada entre *P. atlantica* e Iraq-2 (cultivar femenino) y la otra la que relaciona *P. atlantica* y Peter (cultivar masculino). Dichos síntomas consisten en un engrosamiento de la zona del injerto, que posteriormente puede producir crecimientos reducidos, roturas en el punto de unión y bajos rendimientos en cuanto a producción (Couceiro et al., 2013).

Como última dificultad, es necesario mencionar la capacidad del árbol para absorber nutrientes, factor a tener en cuenta puesto que esto redundaría en la calidad del fruto y en el rendimiento del cultivo. Varios estudios sugieren que la relación entre la variedad y el portainjerto influye en la eficiencia nutricional (Crane y Iwakiri, 1987; Tavallali y Rahemi, 2007; Brown et al., 2008). La velocidad de absorción varía también en relación a varios factores como la edad de la planta, las variaciones estacionales, el injerto, la interacción con micorrizas o la carga frutal del árbol (Tavallali y Rahemi, 2007; Martínez-Ballesta et al., 2010).

1.2.- Uso del ADN ribosómico y del ADN cloroplastidial en estudios evolutivos y filogenéticos.

1.2.1.- El ADN ribosómico.

Los ADNs ribosómicos en eucariotas se encuentran en dos familias multigénicas distintas, excepto en algunos protozoos y hongos. Por un lado encontramos la familia 45S, que codifica para los genes 18S, 5.8S y 26S/28S y que forma en conjunto una única unidad de transcripción de una longitud de entre 7.8 y 18.5 kb (Lapitan, 1992), y por otro lado, la familia 5S que lo hace para el gen 5S. Estas unidades ribosómicas están dispuestas en tándem, repetidas de cientos a miles de veces por genoma que constituirán cada uno de los loci. Como en el caso de la familia 45S, en la que el número de repeticiones oscila entre 570 y 32.000 copias en un genoma nuclear haploide (Rogers y Bendich, 1988).

La **Figura 5A** muestra un esquema de la estructura completa de la unidad de transcripción de la familia 45S. Además de los tres genes mencionados, en la unidad existen dos espaciadores internos que también se transcriben (Internal Transcribed Spacers – ITS): uno que separa los genes 18S y 5.8S, el ITS-1 y otro que separa los genes 5.8S y 26S, el ITS-2. Además, existen otros dos espaciadores, en este caso externos, que separa a cada una de estas unidades de transcripción de la contigua. Estos espaciadores externos o ETS (External Transcribed Spacer) son también transcritos, uno que flanquea el gen 18S en el extremo 5' y al 28S en el 3'.

Además, podemos encontrar una última secuencia entre los dos ETSs, llamada NTS o Non-Transcribed Spacer. Esta secuencia fue llamada así porque al principio se

consideró que no se transcribía, aunque más recientemente se comprobó que sí que lo hacía a bajos niveles en algunas especies (Miller et al., 1983; Reeder, 1990), con lo que se renombró como IGS (Intergenic Spacer). Por otro lado, los genes 5S de la otra familia, se encuentran separados entre sí por secuencias espaciadoras NTSs o IGSs (Lewin, 2007).

El número de cromosomas que contienen regiones organizadoras nucleolares o regiones NORs varía dependiendo de la especie. En ellas será donde se localicen los clusters de genes ribosómicos que codifican para el ARN ribosómico. Estas regiones NOR van a estar implicadas en la formación de los nucléolos, que tiene lugar durante la transcripción de los ARNs ribosómicos, el procesamiento de los precursores de ARN y el ensamblaje de los ribosomas. Cada cluster de genes ribosómicos repetidos da lugar a un nucléolo.

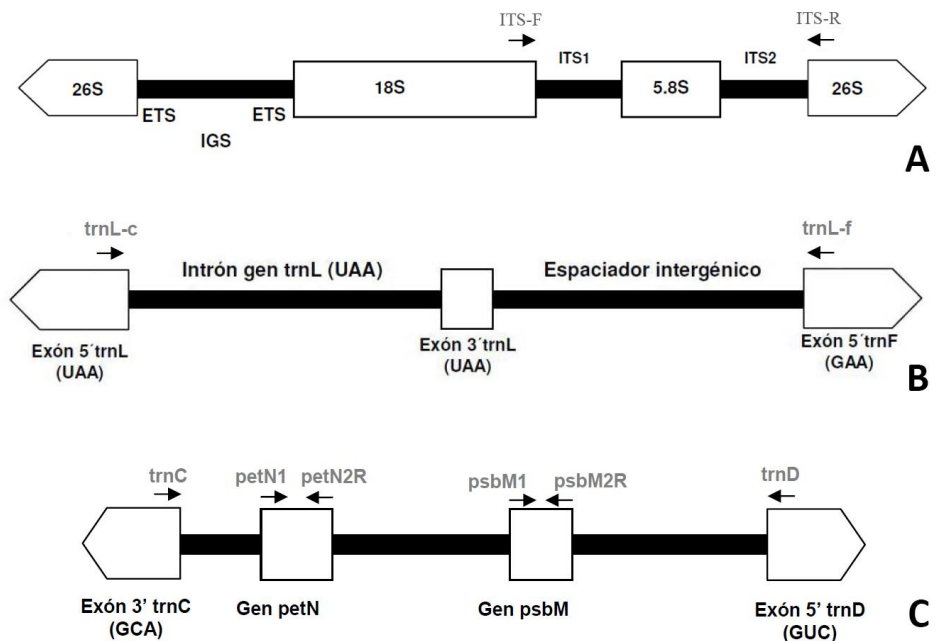


Figura 5.- Estructura de las regiones utilizadas en el análisis molecular (A) Representación esquemática de la organización de la unidad ribosómica 45S

completa de plantas. (B) Región entre los genes cloroplastidiales trnL y trnF. (C) Región entre los genes cloroplastidiales trnC y trnD, incluyendo la secuencia de los genes petN y psbM, y los espaciadores intergénicos correspondientes; (Flechas) posicionamiento de los cebadores específicos utilizados para la amplificación de cada región.

Es sabido que de una manera general, la secuencia de estas familias multiméricas está muy conservada en eucariotas, ya que son fundamentales para el funcionamiento celular (Barciszewska et al., 1985). Esta secuencia además, está caracterizada para un gran número de especies (Opiola et al., 1996; Heslop-Harrison, 2000; Sumida et al., 2004). El hecho de la conservación de estas secuencias es la razón por la que las variaciones que puedan observarse en la longitud o en la secuencia nucleotídica se encontrarán en las secuencias espaciadoras.

1.2.2.- El ADN cloroplastidial.

El ADN cloroplastidial constituye una molécula circular, bicatenaria, cuyo tamaño oscila entre 120 y 217 kb, con la única excepción del alga verde *Floydiella terrestris* que presenta un ADN cloroplastidial de 521.168 pb (Gyulai et al., 2012). Consta de dos repeticiones invertidas que forman dos regiones: una región corta SSC (small single-copy) y una región más larga llamada LSC (large single-copy) (revisado en Ali et al., 2014). Como su propio nombre indica, se encuentra en los cloroplastos, orgánulos celulares encargados de los procesos fotosintéticos que se encuentran en células de plantas, algas verdes y cianobacterias. Los plastidios proceden de la endosimbiosis entre la que posiblemente fuera una cianobacteria fotosintética y un organismo hospedador no fotosintético (Howe et al., 1992).

El ADN cloroplastidial actual presenta alrededor de 100 genes funcionales (Sugiura, 1992; Glöckner et al., 2000), siendo dicho contenido notablemente inferior al que presentan la mayoría de cianobacterias (unos 3200 genes- Nakamura et al., 1998) e inferior también al que se supone necesario para desarrollar el trabajo fotosintético que realizan, por lo que a lo largo de la evolución numerosos genes han debido eliminarse, reduciendo el tamaño del ADN cloroplastidial, bien por pérdida de material o bien por integración de dichos genes dentro del genoma eucariótico (Martin et al., 1998). En la actualidad dicha migración de genes ha sido estudiada y se considera un fenómeno constante y habitual en la historia evolutiva del ADN cloroplastidial (Allen y Raven, 1996; Race et al., 1999).

En cada cloroplasto existe un número variable de moléculas de ADN. Se estima que existen de media unos 50 cloroplastos por célula, dentro de los cuales existen unas 50 copias de ADN cloroplastidial. Este número puede ser aún mayor en algas. En cualquier caso, se trata de un número mucho mayor que el de un marcador nuclear (normalmente $2n$), lo que facilita su extracción y análisis (Ali et al., 2014).

El ADN cloroplastidial de numerosas plantas de diferentes taxones ha sido secuenciado (un alga, *Euglena*- Hallick et al., 1993, un briófito, *Marchantia*- Ohyama et al., 1986, una conífera, el pino negro *Pinus thunbergii* – Wakasugi et al., 1994, una dicotiledónea, el tabaco, *Nicotiana tabacum* – Shinozaki et al., 1986, una monocotiledónea, el arroz, *Oryza sativa* – Hiratsuka et al., 1989, y la dicotiledónea parásita *Epifagus* - Wolfe et al., 1992), revelando un ADN de organización muy sencilla con limitado número de secuencias repetidas y con una estructura y número de genes relativamente constante, destacando significativamente el alto contenido en AT (60-70 %- Kowallik et al., 1995; Reith y

Munholland, 1995). En cuanto a la estructura molecular, los genes se encuentran en loci muy cercanos, separados por pequeñas regiones espaciadoras de ADN no codificante que, por ejemplo, en el caso del arroz, se han determinado en tan solo un 32 % del total (Clegg et al., 1994). Además, otra característica destacable es la gran cantidad de intrones en la estructura de sus genes.

La secuenciación de estos genomas ha permitido también la determinación de una tasa evolutiva relativamente baja en ellos, aunque se debe estudiar por separado cada una de las regiones anteriormente descritas (Clegg et al., 1994). De un lado, las regiones espaciadoras entre los genes cloroplastidiales presentan frecuentemente deleciones y un patrón mutacional complejo, fenómeno atribuido a la recombinación y a la acción depuradora que poseen (intra e intermolecular) y que elimina las secuencias prescindibles del genoma cloroplastidial en regiones con baja presión selectiva como estas. Además, como ya ha sido comentado, encontramos un enriquecimiento en AT en los genes, lo que provoca un sesgo en el uso de codones y tasas evolutivas variables según los grupos considerados. Por último, la secuencia de intrones de genes homólogos tiene un alto grado de polimorfismo contando además con un patrón mutacional relativamente claro (Learn et al., 1992). La estructura secundaria tendrá importancia en el proceso de *splicing* de estos intrones, restringiendo así el efecto de las mutaciones.

1.2.3.- Uso de marcadores moleculares en estudios evolutivos y filogenéticos.

A lo largo de las últimas décadas, en gran parte de los estudios evolutivos ha resultado indispensable el uso de secuencias de nucleótidos como marcadores moleculares. Es por ello que se desarrolló la puesta a punto de la reacción en

cadena de la polimerasa, o PCR, lo que ha supuesto una verdadera revolución en este campo. Revolución que se ha visto materializada, entre otras acciones, en la propuesta del Consortium for the Barcode of Life (www.barcodeoflife.org), que tiene como objetivo la creación de una base de datos que permita clasificar cualquier individuo vegetal o animal utilizando únicamente dichos marcadores moleculares.

Han sido establecidos una serie de criterios para determinar las características fundamentales que deben de cumplir estos marcadores para poder ser utilizados en estudios filogenéticos y evolutivos (Kress et al., 2005):

- Presentar tasas evolutivas acordes con los niveles de variabilidad y divergencia de los taxones comparados.
- Ser de un tamaño adecuado para facilitar la extracción de ADN así como su amplificación.
- Presencia de regiones flanqueantes conservadas que permita el diseño de cebadores específicos.

Estudios filogenéticos de esta índole han sido usados exitosamente para resolver problemas particularmente complicados como estudios con organismos marinos (Shander and Willassen, 2005), aves extintas (Lambert et al., 2005), para elaborar inventarios en ecosistemas complejos (Monaghan et al., 2005; Smith et al., 2005), así como en la resolución de problemas de bioseguridad (Besansky et al., 2003).

Existen una gran cantidad de marcadores moleculares nucleares que vienen siendo utilizados para estudios evolutivos y filogenéticos. Sin embargo, las

secuencias más empleadas han sido los espaciadores ITS1 e ITS2, habiéndose demostrado su gran utilidad en eucariotas fotosintéticos y hongos (Varga et al., 2000; Schroeder et al., 2001). Éstos presentan diferencias interespecíficas que han sido cifradas en hasta un 39% entre especies muy relacionadas filogenéticamente (Baldwin et al., 1995) y se pueden encontrar en ellas un cierto número de mutaciones neutras, que dan lugar a la variación observable. Estas diferencias se atribuyen a una alta tasa de cambio que presentan debido a la baja presión selectiva a la que están sometidas, en comparación con secuencias codificadoras (genes ribosómicos) siendo estas diferencias utilizadas para cuantificar la divergencia entre distintos organismos.

A pesar de esto, hay que tener en cuenta que estas secuencias se transcriben y que van a estar presentes en algunos procesos de la maduración del ARN (Van Nues et al., 1995; Bena et al., 1998), de manera que su tasa evolutiva es moderadamente rápida. Además, evolucionan concertadamente, lo que da lugar a un alto grado de homogeneización intraespecífica y cierto grado de divergencia interespecífica. Por todo esto, se puede concluir que estas secuencias espaciadoras son marcadores válidos para establecer relaciones filogenéticas entre especies muy cercanas (Desfeux y Lejeune, 1996; Kindt et al., 2005; Ronsted et al., 2005).

Las células vegetales, además, presentan dos genomas citoplasmáticos adicionales, el mitocondrial y el cloroplastidial. Ambos, de forma general, tienen herencia uniparental (en angiospermas es normalmente materna), al contrario que el genoma nuclear, de herencia biparental, lo que entre otras cosas, facilita la determinación del parental femenino en híbridos aloploidos (Ackerfield and Wen, 2003).

El genoma cloroplastidial se encuentra muy conservado, ya que carece en términos generales de grandes deleciones, inserciones, transposiciones, inversiones y SNPs, haciéndolo muy útil para estudios filogenéticos. En la bibliografía se encuentran estudios que, usando primers universales, se basan en numerosas regiones como el espaciador de la región atpB-rbcL (Manen et al., 2002), las regiones rps16, matK, ndhF, ycf6-psbM y psbM-trnD (Oxelman et al., 1997, Andersson y Rova, 1999, Downie y Katz-Downie, 1999, Wallander y Albert, 2000; Štorchová y Olson, 2007), el intrón rpL16 intron (Jordan et al., 1996; Baum et al., 1998) o las regiones psbA-trnH y trnH-psbA (Kress et al., 2005; Chase et al., 2005), siendo probablemente la región trnL-F, una de las más usadas (Wallander y Albert, 2000).

Numerosos estudios han demostrado la eficacia del uso combinado de marcadores nucleares y citoplasmáticos en la resolución de problemas taxonómicos a distintos niveles (Mansion y Struwe, 2004; Kyndt et al., 2005) y en la identificación de plantas mediante “códigos de barras moleculares” (Kress et al., 2005). En este sentido, Yi et al (2008) utilizaron marcadores ribosómicos junto con otros marcadores nucleares y cloroplastidiales para desarrollar una clasificación filogenética del género *Pistacia*, en la que nos hemos basado fundamentalmente en el transcurso de este estudio. En este trabajo se han utilizado los marcadores ribosómicos ITS-1 e ITS-2 junto con las regiones de ADN cloroplastidial trnC-D y trnL-F (**Figura 5B y 5C**).

1.3.- Clasificación filogenética del género *Pistacia*.

El género *Pistacia* se compone de 11 especies arbóreas caducas, dioicas y con polinización anemófila. Siete de ellas se encuentran desde el Mediterráneo a Asia Central (*P. atlantica*, *P. integerrima*, *P. khinjuk*, *P. lentiscus*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* y *P. vera*), dos en Asia del Este (*P. chinensis* y *P. weinmannifolia*) y otras dos se distribuyen desde el Suroeste de Estados Unidos a Centroamérica (*P. mexicana* y *P. texana*). *Pistacia chinensis* se encuentra en partes más tropicales de Asia y llega hasta Myanmar y Filipinas (Zohary, 1952). Existe una gran diversidad de variedades y subespecies, debido a la facilidad de hibridación interespecífica del género, y a la amplia distribución del mismo, lo que hace que su clasificación taxonómica no sea sencilla (Ozden-Tokatli et al., 2010).

Diversos autores han abordado el problema de su clasificación. Los primeros estudios se llevaron a cabo teniendo en cuenta caracteres morfológicos. Según éstos, el género podría dividirse en cuatro secciones distintas: ***Lentiscella* Zoh.**, que incluiría a *P. mexicana* HBK y *P. texana* Swingle; ***Eu Lentiscus* Zoh.**, que incluiría a *P. lentiscus* L., *P. saportae* Burnat., y *P. weinmannifolia* Poisson; ***Butmela* Zoh.**, grupo monotípico que incluiría a *P. atlantica* Desf.; y ***Eu Terebinthus***, que incluiría a *P. chinensis* Bge., *P. khinjuk* Stocks, *P. palaestina* Bois., *P. terebinthus*, y *P. vera* L. Sin embargo, esta ordenación se basa en características de la hoja (tamaño, forma, número de foliolos y presencia/ausencia del foliolo terminal, pubescencia y alas en el raquis), en la morfología de la planta, la estructura floral, el tipo de frutos y el patrón de distribución (Zohary, 1952; Al-Saghir, 1996), características que algunos autores sostienen serían demasiado ambiguas para soportar consistentemente la filogenia del grupo (Parfitt y Badenes, 1997).

En este contexto, otros estudios realizados utilizando una combinación de marcadores cloroplastidiales (*ndhF*, *trnL-F* and *trnC-trnD*), nucleares (ITSs) y mitocondriales (*NIA-i3*) (Parfitt y Badenes, 1997; Yi et al., 2008) sugieren una revisión de la clasificación del género *Pistacia*. Esta nueva ordenación propone la subdivisión del género en dos grupos monofiléticos: 1) *Lentiscus*: incluyendo a las especies *P. lentiscus*, *P. weinmannifolia*, *P. mexicana* y *P. texana*. *Estas tres últimas especies están muy próximas, lo que indicaría que las especies del Nuevo Mundo habrían derivado de un ancestral común asiático, posiblemente P. weinmannifolia*, y 2) *Terebinthus*, con las restantes seis especies: *P. chinensis*, *P. integerrima*, *P. terebinthus*, *P. atlantica*, *P. khinjuk* y *P. vera*. Dentro del superclado *Terebinthus*, encontramos cuatro subclados; uno que incluye a las especies *P. terebinthus* y *P. palaestina*, otro en el que se encuentran las especies *P. chinensis* y *P. integerrima*, otro correspondiente a *P. atlantica*, y finalmente otro que incluye secuencias de *P. vera* y *P. khinjuk* (**Figura 6**). La inclusión de *P. texana* y *P. mexicana* en el grupo *Lentiscus* y de *P. atlantica* en *Terebinthus* implicaría la desaparición de las secciones *Lentiscella* y *Butmela*. En cualquier caso, todos los datos obtenidos demuestran que el género *Pistacia* es monofilético, siendo *P. vera* la especie más antigua (entre 1.1 y 3.7 millones de años) y *P. terebinthus* la más actual (Parfitt y Badenes, 1997).

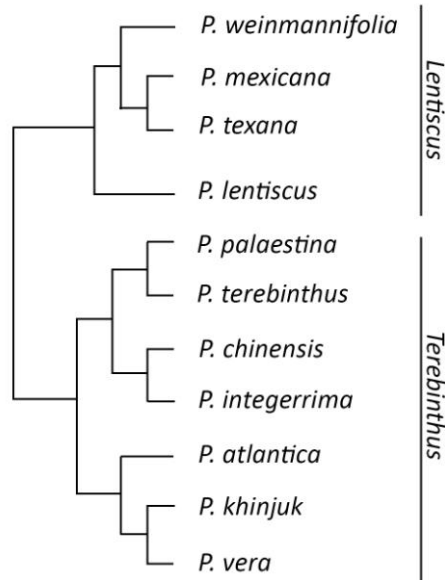


Figura 6.- Árbol filogenético con la actual clasificación de *Pistacia*. Modificado de Yi et al., 2008.

Se observa un alto grado de identidad entre las secuencias de *P. atlantica*, *P. khinjuk* y *P. vera*, por un lado, y las de *P. mexicana* y *P. texana*, por otro. Esto podría deberse a los frecuentes fenómenos de hibridación que se producen en este grupo de plantas (Parfitt, 2003). Yi et al. (2008) demostraron que el uso combinado de los marcadores moleculares anteriormente citados puede aplicarse a la resolución de la procedencia híbridos interespecíficos. Así, estos autores demostraron que *P. x saportae* es una variedad híbrida procedente de un parental femenino perteneciente a *P. lentiscus* y de un parental masculino perteneciente a *P. terebinthus* (Parfitt y Badenes, 1997).

Por último, es interesante hacer unas consideraciones relacionadas con el número cromosómico básico de este grupo de plantas. Gran parte de los estudios citogenéticos llevados a cabo hasta la fecha demuestran que el número cromosómico en *P. vera* y *P. terebinthus* es $2n=30$ (Ayaz y Namli, 2009; Ila et al., 2003), igual que para *P. khinjuk* (Ozbek y Ayfer, 1957), *P. lentiscus* (Natarajan, 1978), *P. integerrima* (Sandhu y Mann, 1988) y *P. eurycarpa* (Ila et al., 2003). Sin embargo, más tarde Ghaffari y Harandi (2002) propusieron un número cromosómico de $2n=24$ para *P. lentiscus* y *P. khinjuk*.

En cuanto a *P. atlantica* existen diferentes referencias al número de cromosomas, entre las que se encuentran la de Zohary (1952) con $2n=28$ y la de Ila et al. (2003) que la haría coincidir con la mayor parte de las especies de *Pistacia* en $2n=30$. Por último, el único estudio para *P. chinensis* le asigna un número cromosómico de $2n=28$ (Huang et al., 1989).

Todos estos datos sugieren la presencia de tres números cromosómicos básicos en este grupo, $n=12$, $n=14$ y $n=15$ (Ghaffari et al., 2005). Estas discrepancias podrían justificarse por el reducido tamaño de los cromosomas de *Pistacia* y por el hecho de que en el meristemo apical de cada raíz hay muy pocas divisiones celulares visibles. Al-Saghir (2010) considerando los datos moleculares, morfológicos y citogenéticos propuso que las especies de *Pistacia* tienen un número cromosómico de $n=15$. Estas últimas investigaciones apoyarían el carácter monofilético del grupo.

OBJETIVOS

El alfóncigo o pistachero (*Pistacia vera* L.) es una especie de gran importancia a nivel comercial que se sitúa en el sexto puesto del ranking mundial de producción de frutos secos. No obstante, su cultivo en zonas donde se encuentra naturalizado no está exento de problemas. En dichas zonas, requiere de la presencia de un patrón o portainjertos. Se estima que gran parte del éxito de una explotación radica en la elección de un buen tándem variedad-portainjertos, de la capacidad por parte del mismo para absorber nutrientes y del porcentaje de prendimientos de yemas obtenidos por injertada. En este contexto, y con el objeto de aportar nuevos datos sobre el portainjertos que puedan mejorar la eficiencia del cultivo, en el presente trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

PRIMERO.- Determinar comparativamente la capacidad de absorción de elementos químicos de cinco variedades de *P. vera* L. ('M38', 'G1', 'Mateur Macho', 'Batoury' y 'Joley') injertadas sobre *P. atlantica* Desf. y analizar el patrón de acumulación de dichos elementos en distintos momentos del ciclo vital de la planta, teniendo en cuenta que la eficiencia en la captación de nutrientes por parte de la planta es crucial para el desarrollo de la misma y la calidad final de los frutos.

SEGUNDO.- Contrastar dichos datos con los obtenidos de plantas de *P. terebinthus* L. injertadas con la variedad 'Peter' y comparar la eficiencia en la adquisición de nutrientes de *P. terebinthus* L. con respecto a *P. atlantica* Desf.

TERCERO.- Analizar la influencia en la absorción de nutrientes, crecimiento y porcentaje de prendimientos del tratamiento con fitohormonas y de la micorrización, usando plantas de *P. terebinthus* L. injertadas con distintas

variedades de pistacho, y sabiendo que el correcto manejo de las plantaciones puede alterar la eficiencia en la captación de nutrientes de las plantas.

CUARTO.- Determinar la procedencia de un grupo de semillas encontradas en un muestreo rutinario en campo, que por su vigor inicial y tasa de germinación podrían pertenecer a una variedad potencialmente utilizable como portainjertos, haciendo uso de marcadores moleculares nucleares y cloroplastidiales puestos a punto anteriormente en distintas especies de *Pistacia*. Demostrar la utilidad de estos marcadores en la caracterización de híbridos interespecíficos de *Pistacia*.

METODOLOGÍA

3.1.- Comparación de la eficiencia en la absorción de nutrientes entre *Pistacia terebinthus* L. y *Pistacia atlantica* Desf.

3.1.1.- Material vegetal y diseño experimental.

Para llevar a cabo este estudio se compararon los valores tomados el 13 de Noviembre de 2012 en 25 ejemplares elegidos al azar de un semillero de *P. terebinthus* L. procedentes de la parcela de *Viveros Zuaimé* SL., y en un grupo de plantas que pertenecen a una colección de variedades mantenida en una parcela experimental del Centro Agrario el Chaparrillo, Castilla-La Mancha (España). Este último grupo está compuesto por plantas injertadas en *P. atlantica* Desf. (variedades hembra 'Batoury' y 'Joley'; variedades macho 'Mateur', 'M38' y 'G1'). Este tipo de parcelas presenta normalmente un número bajo de individuos. Por este motivo, se tomaron un total de 4 muestras por variedad, lo que hace un total de 20 plantas elegidas al azar.

3.1.2.- Análisis estadístico de los resultados.

Tras el análisis de normalidad y homocedasticidad de las muestras, gracias a las pruebas de Saphiro-Wilk y de Levene respectivamente ($\alpha > 0.05$), en este análisis se opta por el test no paramétrico de Friedman (Friedman, 1937). Posteriormente, para comprobar las diferencias entre los distintos grupos de datos, se aplica como análisis *post hoc* el Test de Wilcoxon con suma de rangos y con una corrección de Bonferroni ($p < 0,025$). La existencia de valores atípicos se descartó mediante el uso de la prueba de Grubbs.

3. 2.- Evaluación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en cinco variedades de *Pistacia vera* L.

3.2.1.- Material vegetal y diseño experimental.

En este caso, se utilizó un grupo de plantas pertenecientes a una colección de variedades mantenida en una parcela experimental del Centro Agrario el Chaparrillo, Castilla-La Mancha (España). Como ya ha sido comentado anteriormente, se trata de plantas adultas injertadas en *P. atlantica* Desf. (variedades hembra 'Batoury' y 'Joley'; variedades macho 'Mateur', 'M38' y 'G1'). Un total de 4 muestras por variedad fueron tomadas, lo que hace un total de 20 plantas elegidas al azar. El muestreo fue realizado el 13 de Noviembre de 2012, coincidiendo con la fecha del muestreo de las plantas de *P. terebinthus* L. mencionado en el apartado anterior.

3.2.2.- Análisis estadístico de los resultados.

Al igual que en el apartado anterior, para el análisis estadístico de los datos se ha utilizado un test no paramétrico de Friedman ($\alpha > 0.05$) con una comprobación previa de la normalidad y homocedasticidad de los datos gracias a las pruebas de Saphiro-Wilk y de Levene respectivamente ($\alpha > 0.05$), utilizando el paquete de software SPSS (SPSS 10 para Windows, 2007).

3. 3.- Evaluación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en *Pistacia terebinthus* L.

3.3.1.- Material vegetal, tratamientos y diseño experimental.

Fueron usadas un total de 12.950 plántulas de un año de edad, homogéneas en vigor y talla, procedentes de un semillero de *P. terebinthus* L. situado en *Viveros Zuime SL*, Caniles, Granada. Dichas plántulas fueron colocadas en una parcela con un patrón 2x1 y fueron injertadas con plantas de *P. vera* L.

Se realizaron tres grandes grupos de ~4.000 individuos, siempre utilizando un diseño de bloques aleatorios, siendo estos, a su vez, divididos en tres subgrupos, cada uno con uno de los siguientes tratamientos: (i) control: plantas que no recibieron ningún tratamiento, (ii) fitohormonas: plantas tratadas con una mezcla de auxinas, giberelinas y citoquininas en el momento del trasplante para favorecer el crecimiento radicular vertical (Stimulate, Stoller, USA), y (iii) micorrizas: plantas inoculadas con una mezcla del hongo nativo *Glomus spp.* por inmersión de las raíces en una solución justo antes de la plantación (GLOMYGEL, Mycovitro SL, Spain). En todos los casos, las plantas fueron provistas de irrigación comercial y la disolución estándar de nutrientes.

3.3.2.- Injerto, crecimiento y porcentaje de prendimiento.

El 28 de Agosto de 2012, una vez que las plantas habían alcanzado su tamaño óptimo, se llevó a cabo el injerto en escudo o en T, utilizando yemas de las variedades *Kerman* y *Peter* de pistacho (*P. vera* L.). El injerto fue realizado siempre por el mismo equipo humano para minimizar interferencias no deseadas. La altura de la planta, su diámetro y su perímetro se midieron a 5 cm del injerto el 17 de

Septiembre de 2012. Estos mismos parámetros se midieron 7 semanas después del injerto en 307 plantas control, 290 micorrizadas y 319 con fitohormonas. El recuento de injertos positivos fue realizado visualmente en la temporada siguiente (10/06/2013) en todas las plantas experimentales.

3.3.3.- Absorción de minerales.

Determinamos la capacidad de absorción de minerales del portainjertos evaluando la concentración de treinta elementos químicos en las hojas del mismo. Para ello, se muestrearon 25 plantas al azar para cada uno de los tratamientos, al inicio del experimento, el 12 de Junio de 2012, justo antes del injerto el 27 de Agosto de 2012 y más tarde, el 13 de Noviembre de 2012. Se tomaron 100 gr de tejido foliar de cada una de las plantas, se dejó secar a 60°C durante 24h y después fue finalmente pulverizado. El análisis del C y N totales se llevó a cabo utilizando el Flash EA 1112 Series-LECO TRUSPEC. El resto de los elementos se analizaron por digestión con HNO₃/H₂O₂ en el UltraClave Microwave Milestone y ICP-OES utilizando un ICAP 6500 DUO. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Ionómica del CEBAS-CSIC (Murcia, España).

3.3.4.- Análisis estadístico de los resultados.

Tanto los parámetros de crecimiento de las plantas como la concentración de elementos químicos en las hojas se evaluaron con la utilización de un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) utilizando el paquete de software de SPSS (SPSS 10 para Windows, 2007). Para ello, fue previamente controlado el requisito de normalidad de las muestras analizadas. Posteriormente, se aplicó el test de Tukey's HSD (Honest Significant Difference) como prueba *post hoc* cuando el test

de Levene había certificado la homocedasticidad de la muestra ($\alpha > 0.05$). En el caso de que esto no fuese así, se aplicaron las pruebas de Dunnett T3 y Tamhane. Se ha utilizado un diseño en bloques completos aleatorizados con un nivel de significación de 0,05 para garantizar la independencia entre la concentración de los diferentes elementos químicos y el crecimiento de las plantas en la parcela (**Tabla 2**).

	Contrastes de igualdad en parcelas (sig. exacta)	Contraste de igualdad en tratamientos (sig. exacta)	R ²
<i>Al</i>	1.830 (0.168)	10.749 (0.000)	0.269
<i>S</i>	0.390 (0.679)	9.392 (0.000)	0.221
<i>B</i>	0.962 (0.387)	6.636 (0.002)	0.181
<i>Ca</i>	1.136 (0.327)	12.941 (0.000)	0.291
<i>C</i>	0.429 (0.653)	2.191 (0.120)	0.070
<i>Cu</i>	0.044 (0.957)	0.917 (0.404)	0.027
<i>Cr</i>	0.828 (0.441)	0.708 (0.496)	0.043
<i>Sr</i>	1.004 (0.372)	7.925 (0.001)	0.206
<i>P</i>	0.041 (0.960)	3.066 (0.053)	0.082

	Contrastes de igualdad en parcelas (sig. exacta)	Contraste de igualdad en tratamientos (sig. exacta)	R ²
<i>Fe</i>	0.729 (0.486)	7.840 (0.001)	0.200
<i>Li</i>	0.573 (0.566)	1.120 (0.332)	0.047
<i>Mg</i>	1.345 (0.267)	5.917 (0.004)	0.174
<i>Mn</i>	1.741 (0.183)	12.645 (0.000)	0.269
<i>Ni</i>	1.264 (0.289)	0.365 (0.696)	0.045
<i>N</i>	0.800 (0.453)	7.074 (0.002)	0.185
<i>Pb</i>	0.616 (0.543)	1.217 (0.303)	0.050
<i>K</i>	0.074 (0.929)	9.493 (0.000)	0.217
<i>Na</i>	1.533 (0.223)	2.750 (0.071)	0.109
<i>Tl</i>	0.898 (0.412)	13.953 (0.000)	0.301
<i>Ti</i>	1.461 (0.239)	8.495 (0.001)	0.226
<i>V</i>	1.824 (0.169)	7.505 (0.001)	0.214
<i>Zn</i>	1.686 (0.193)	3.610 (0.032)	0.134

Tabla 2.- Contrastes de igualdad en parcelas y tratamientos utilizando un diseño en bloques completos aleatorizados con un nivel de significación: $\alpha < 0,05$. * Entre paréntesis quedan reflejados los niveles de significación (sig. exacta) para cada uno de los contrastes. ** Las concentraciones de todos los elementos químicos son independientes de la parcela

en la que se encuentren las plantas. *** Parcelas con un efecto débil, valor estadístico (F) cercano a 1. **** El contraste en los tratamientos está de acuerdo con el análisis de ANOVA. ***** Un valor bajo para R^2 indica que el modelo explica en un bajo porcentaje la variabilidad de los datos.

3.4.- Caracterización genética de la nueva variedad VIGROS.

3.4.1.- Aislamiento de ADN.

El material aquí analizado procede de una colección privada de muestreos realizados en campo de especímenes interesantes atendiendo a sus características morfológicas (vigor, masa foliar, características morfológicas específicas, etc.). Concretamente, se trata de un grupo de semillas con características diferentes en cuanto al tamaño y la forma con respecto a las habituales en *P. terebinthus* (**Figura 7**). Fueron recolectadas en la Sierra de Baza, en Granada, durante la clasificación rutinaria de un material de *P. terebinthus* L.



Figura 7.- Semillas a analizar, sin exocarpo. Recolectadas en un muestreo rutinario. La barra representa 1 cm.

Para la caracterización molecular, se germinaron estas semillas en arena fina autoclavada, después de haber sido sumergidas en agua destilada hasta que surgieron las raíces. Posteriormente, se dejaron crecer en semilleros para las plántulas de 6x4.

Una vez germinadas las semillas, varios pies de planta fueron muestreados. De cada pie de planta se recogieron hojas en cantidad suficiente como para llevar a cabo la extracción de ADN y el resto de material foliar fue conservado a -20 °C para posteriores procesados. El ADN se obtuvo con la utilización del *kit* comercial, “Invisorb® Spin Plant Mini Kit” (Invitex). Así, los pasos seguidos fueron los siguientes:

1. Aproximadamente 0.3 g de tejido foliar se pulveriza en morteros de porcelana, en presencia de nitrógeno líquido. El pulverizado se deposita en un tubo eppendorf de 2 ml al que se le añade 0.7 ml de Lysis Buffer P y 0.03 ml de Proteinasa K aportada por el kit, se agita en un *vortex* y se incuba a 65 °C durante un mínimo de 30 min.

2. La parte acuosa del lisado se transfiere a una columna (Prefilter) situada en un tubo de 2 ml, y se centrifuga durante 1 min a 13400 x g (12000 rpm). En este proceso se separa el ADN del resto de componentes celulares.

3. La columna es descartada, y al líquido que ha pasado a través de ésta se le añaden 0.2 ml de Binding Buffer P y se agita en un *vortex*. En este paso 0.005 ml de RNasa (10 mg/ml) pueden ser añadidos para eliminar el ARN del producto final.

4. A continuación se transfiere la suspensión a otra columna (Spin Filter) y, tras 1 min de incubación, se centrifuga a 13400 x g (12000 rpm) durante 1 min. Después, el filtrado se descarta. En este paso el ADN queda en la columna.

5. A la columna se le añaden 0.55 ml de Wash buffer I y se centrifuga durante 1 min a 13400 x g (12000 rpm), el filtrado es descartado y se repite el proceso con Wash Buffer II. Después de eliminar este filtrado se centrifuga durante 2 min a 13400 x g (12000 rpm) para eliminar cualquier resto de alcohol.

6. Finalmente se trasfiere la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añade 0.05 ml de Elution Buffer previamente calentado a 60 °C, se incuba durante 3 min y se centrifuga a 9300 x g (10000 rpm). Se descarta la columna, quedando el ADN listo para ser procesado o almacenado a 4 °C.

La cantidad y calidad del ADN obtenido se determinó mediante Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan, Switzerland) y se confirmó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%, con el uso de marcadores de peso molecular conocido (*Lambda* digerido con *Hind III*- Biotools). El ADN obtenido fue, a grandes rasgos, de alto peso molecular y adecuado para las técnicas de PCR.

3.4.2.- Aislamiento y caracterización de secuencias de ADN ribosómico y ADN cloroplastidial.

Con el objeto de caracterizar molecularmente la nueva variedad, hemos utilizado los marcadores moleculares nucleares ITS1 e ITS2 (espaciadores intergénicos ribosómicos) y el gen ribosómico 5.8S, y los marcadores cloroplastidiales

correspondientes a las regiones trnL-F y trnC-D. A continuación se detalla el procedimiento seguido para su aislamiento y análisis.

3.4.3.- Protocolos de PCR.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ l, conteniendo, 100 ng de muestra, 10mM Tris-ClH, pH=8.3; 5mM KCl; 2mM MgCl; 0.2mM de cada dNTP (Roche); 0.2 μ M de cada uno de los cebadores y 1.25 unidades de Taq polimerasa (Biotools). La posición de los cebadores utilizados, descritos por White et al., 1990 y Yi et al., 2008, se muestra en la **Figura 5A** siendo.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) siguiendo el protocolo de trabajo que se indica a continuación:

- Ciclo I (1x): 95 °C – 5 min
- Ciclo II (30x): 95 °C – 0.40 min
55 °C – 0.40 min
72 °C – 1 min
- Ciclo III (1x): 72 °C – 7 min
- Ciclo IV (1x): 4 °C - ∞

Los resultados de dichas reacciones de amplificación fueron observados en geles horizontales de agarosa al 1.5% en 0,5 X TBE. Se llevó, entonces, a cabo el proceso de aislamiento y purificación de las bandas de ADN deseadas, usando el kit comercial “GTF® PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Amersham-Pharmacia-Biotech) para su posterior ligación y clonación.

3.4.4.- Ligación de los productos de PCR

Los amplificadores obtenidos por PCR y purificados a partir de geles de agarosa fueron ligados al vector pGEM-Teasy por medio del *kit* comercial “pGEM®-Teasy Vector System II” (Promega) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para esta ligación se calculó la cantidad óptima de producto de PCR según la fórmula:

$$[\text{ng vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)} / \text{tamaño vector (kb)}] \times \text{ratio inserto:vector} = \text{ng inserto}$$

1. La reacción de ligación del fragmento de ADN satélite al vector pGEM®-Teasy, se realiza respetando la proporción vector:inserto 1:4, en presencia de 1 unidad de la ligasa T4 (Promega) en tampón de ligación 2x, en un volumen final de 10 µl. Esta mezcla de ligación se incubaba a 4 °C durante 16 h.

2. Bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa JM-109 se transforman según el protocolo descrito por la casa comercial (Promega). De esta manera, el volumen de ligación completo se añade a 50 µl de células competentes. Se somete entonces la mezcla a un choque térmico mediante la incubación en hielo durante 20 min, a 42 °C durante 40-55 s y nuevamente en hielo durante otros 2 min.

3. Las bacterias transformadas se crecen en medio LB líquido, sin ampicilina, durante 1 h a 37 °C.

4. Transcurrido este tiempo, las bacterias se siembran en placas de Petri con medio LB sólido a pH 7.0 (15 g de agar, 10 g peptona, 5 g extracto de levadura y 5 g de ClNa por litro de H₂O). El medio contenía, asimismo, ampicilina (0.05

mg/ml), 40 µl del sustrato cromogénico X-gal (0.02 g/ml dimetil formamida) y 4 µl del inductor IPTG (Roche) (0.2 g/ml H₂O_{dd}). Incubar en una estufa a 37°C durante 16 h.

5. Las colonias son sometidas a dos tipos de selección, una primaria que distingue entre colonias con y sin plásmido gracias a la resistencia que les concede a ella un gen Amp^r portado por el vector. La selección secundaria diferencia entre colonias con inserto y sin inserto, diferenciables por el color que presenta la colonia crecida en el medio, pudiendo ser blancas o azules. El vector pGEM[®]-Teasy porta el gen LacZ que metaboliza los sustratos X-gal e IPTG dando lugar a un precipitado de color azul. Precisamente la ligación de los insertos se produce a este nivel del vector, de tal forma que los plásmidos recombinantes presentan genes LacZ inactivos con la consiguiente ausencia de precipitado azul. De esta manera, alguna de las colonias blancas se inocularon en 15 ml de medio líquido LB (extracto de levadura: cloruro sódico: peptona- 1:1:2) y se dejaron crecer a 37 °C durante toda la noche con agitación.

6. Algunos de estos clones se analizaron inmediatamente. El resto fueron mantenidos a -80 °C en presencia de dimetil sulfóxido al 80% (Sigma).

3.4.5.- Detección de plásmidos recombinantes

La detección de los clones recombinantes se llevó a cabo mediante el protocolo de PCR, usando los cebadores universales del plásmido pGEM-Teasy (SP6 y T7).

Las colonias blancas fueron depositadas en un tubo de 250 μl con 15 μl de agua y calentadas en agua hirviendo durante 10 min para romper las membranas celulares y dejar el ADN accesible para ser sometido a PCR.

De esos 15 μl se usaron 5 μl en la siguiente reacción de PCR para cada colonia:

- ADN de colonia 5 μl
- Tampón 10x 5 μl
- Primer F 1 μl
- Primer R 1 μl
- DNTps (10 pm) 1 μl
- Taq polimerasa (Biotools) 0.2 μl
- H₂O ultrapura hasta 50 μl

El resultado de esta PCR se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con SYBR green, de esta forma conociendo el tamaño del inserto se determina qué colonias tienen potencialmente el inserto deseado, y por tanto no son falsos positivos.

3.4.6.- Secuenciación de los clones recombinantes positivos.

Tras la purificación del ADN plasmídico, con la ayuda del kit comercial “Perfectprep Plasmid Mini” (Eppendorf), se secuenciaron un total de 7 fragmentos pertenecientes al ADN ribosómico clonado de la nueva variedad. Las reacciones de secuenciación se realizaron según el método propuesto por Sanger *et al.* (1977) utilizando el kit comercial “ABI Prism® Big Dye® Terminator Cycle Sequencing” (Applied Biosystems). Las dos cadenas de los insertos ligados en plásmidos

recombinantes fueron secuenciadas utilizando el secuenciador automático multicapilar “ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. Se usaron parejas de cebadores universales cuyas secuencias diana se encuentran presentes en los vectores de clonación empleados, en éste caso *T7-Sp6* para el caso de plásmidos pGEM T-easy (Promega).

Las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de 20 µl con los siguientes compuestos:

- ADN (400-600 ng)
- Tampón 5x 2 µl
- Primer (3.2 pm)
- Reactivo BDT (Big Dye® Terminator, que contiene los dNTPs marcados y la polimerasa de ADN)

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 2700 de Applied Biosystems mediante el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización de 5 minutos a 95 °C seguida de 35 ciclos constituidos por: etapa de desnaturalización (94 °C durante 30 s), etapa de hibridación de los cebadores (55 °C durante 30 s) y etapa de elongación de las cadenas (72 °C durante 1 minutos), con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Una vez completadas las reacciones de secuenciación, éstas se precipitaron tras ser incubadas durante 15 min en una mezcla de acetato sódico 3M y etanol al 95% (62.5 µl de etanol 95%, 3 µl de acetato sódico y 14.5 µl de H₂O_{dd} por muestra) mediante centrifugación en frío (4 °C) durante 20 min a 14,000 rpm. Los

precipitados se lavaron con etanol al 70% y se dejaron secar a 37 °C brevemente. Los productos secuenciados se resuspendieron en 20 µl de formamida.

3.5.- Análisis filogenéticos de las secuencias de ADN ribosómico y ADN cloroplastidial.

Las secuencias fueron ensambladas utilizando el programa Geneious (Biomatters Ltd.). Se cotejaron las secuencias obtenidas con las existentes en la base de datos de ADN de EMBL, EBI y GenBank, mediante el programa interactivo en red BLAST (Altschul *et al.*, 1997) del NCBI.

Estas secuencias, junto con aquéllas obtenidas de la base de datos del GenBank correspondientes al resto de especies de *Pistacia* analizadas (**Tabla 3**), se alinearon con la ayuda del software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) que utiliza el algoritmo Clustal (Higgins *et al.*, 1988) implementado por el programa Geneious. Utilizando el programa satDNA Analyzer (Navajas-Pérez *et al.*, 2007) obtuvimos las secuencias consenso de cada uno de los alineamientos.

La reconstrucción filogenética usando secuencias de ADN ribosómico se llevó a cabo siguiendo el método de Máxima Verosimilitud implementado por el programa MEGA (Kumar *et al.*, 2001), utilizando el modelo de sustitución Kimura 2 Parámetros, una tasa de cambio uniforme y método heurístico de inferencia Nearest-Neighbor-Interchange (NNI), con la realización automática del primer árbol. Alternativamente se usó el método de inferencia Neighbor-joining (Saito y Nei, 1987), basado en matrices de distancias, también usando el programa MEGA (Kumar *et al.*, 2001). Las matrices de distancias utilizadas como base para el

análisis filogenético fueron calculadas siguiendo el modelo propuesto por Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969).

	Ribosómico	trnC-D	trnL-F
<i>P.integerrima</i>	EF193081	EF193145	EF193128
<i>P.khinjuk</i>	EF193104-05	EF193146	EF193129
<i>P.lentiscus</i>	EF193082-83, DQ390467	EF193147, DQ400561	EF193130, DQ390471
<i>P.palaestina</i>	EF193084-85, EF193095-97	EF193148-50	EF193131-33
<i>P.terebinthus</i>	EF193086	EF193153	EF193136
<i>P.vera</i>	AY677201, EF193089-91	EF193156, DQ400564	EF193139, DQ390473
<i>P.mexicana</i>	DQ390468	DQ400562	DQ390472
<i>P.texana</i>	EF193087-88	EF193154-55	EF193137-38
<i>P.chinensis</i>	EF193079-80, DQ390466	EF193143-44, DQ400560	EF193126-27, DQ390470
<i>P.weinmannifolia</i>	EF193092-94	DQ400564	DQ390473
<i>P.atlantica</i>	EF193076-78	EF193140-42	EF193123-25
<i>P.saportae</i>	EF193098-103	EF193151-52	EF193134-35
VIGROS	HE652101-07	HE652108	HE652109-11
<i>Schinus molle</i> (outgroup)	AY641512	DQ400565	AY640463

Tabla 3.- Lista de especies analizadas y número de accesión de las secuencias.

En todos los casos, los huecos (gaps) fueron excluidos del análisis en las comparaciones de cada par de secuencias. Además, como test de la robustez de la topología de los árboles se utilizó el método de remuestreo con reemplazamiento (500 réplicas) o bootstrap (Felsenstein 1985). Para evaluar la congruencia de las distintas secuencias, se usó el llamado test de Farris (independent length difference –ILD- test, Farris et al., 1994).

3.5.1.-Análisis de la divergencia interespecífica.

La divergencia entre secuencias de ADN ribosómico pertenecientes a las distintas especies o variedades se ha calculado de la siguiente manera:

Las diferencias entre dos especies se calcularían según la fórmula:

$$d_A = d_{XY} - (d_X + d_Y / 2)$$

donde d_X y d_Y es la medida de las diferencias de todas las comparaciones de dos en dos secuencias de una especie x e y respectivamente

$$d_X = n_X / n_X - 1 \sum_{ij} x_i x_j \pi$$

$$d_Y = n_Y / n_Y - 1 \sum_{ij} x_i x_j \pi$$

donde n_x y n_y es el número de secuencias de cada especie

d_{XY} es la medida de las diferencias entre las secuencias de la especie x y de la especie y, realizadas de dos en dos

$$d_{XY} = \sum_{ij} x_i x_j \pi$$

El método usado en el análisis de las secuencias de ADN satélite fue Neighbor-joining, NJ (Saito y Nei, 1987), que se basa en distancias evolutivas entre secuencias para medir su divergencia.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1.-

Comparativa de la eficiencia en la absorción de nutrientes de dos variedades al ser usadas como portainjertos: *Pistacia atlantica* Desf. vs *Pistacia terebinthus* L.

RESUMEN

La elección de un portainjertos adecuado para el establecimiento de una plantación de pistacho puede ser decisiva, por las características que éste pueda presentar para adaptarse al terreno en cuestión y la resistencia a distintas enfermedades. Se especula, así mismo, con la posibilidad de que distintos portainjertos presenten una eficiencia distinta para la adquisición de nutrientes del suelo. Para profundizar en este último aspecto, hemos comparado la concentración foliar de 30 elementos químicos en portainjertos de *Pistacia terebinthus* L. y *Pistacia atlantica* Desf. Nuestros resultados indicarían que *Pistacia atlantica* Desf. es un portainjertos más eficiente que *Pistacia terebinthus* L. en cuanto a la absorción de nutrientes se refiere, mostrando mayores concentraciones de *B, Ca, Sr, Fe, Li, Mg, Ti* y *V*. *Pistacia terebinthus* L., por su parte, presentaría mayores valores de *C, N, P* y *Na*. No se detectaron diferencias significativas a nivel intraespecífico. No obstante lo dicho, no se puede descartar la influencia de otros factores como el tipo de suelo en los datos obtenidos y futuras investigaciones centrarán este y otros aspectos relacionados.

Introducción

La influencia que ejerce la elección del portainjertos en la productividad final del cultivo ha sido analizada en diferentes publicaciones científicas. Esta influencia se traduce en una mayor tolerancia a situaciones de extrema salinidad (Walker et al., 1987; Behoudian et al., 1986; Picchioni et al., 1990), resistencia a diferentes enfermedades (Ashworth, 1985), vigor y hábitos reproductivos (Crane y Iwakiri, 1987) y eficiencia nutricional (Brown et al., 1994). Esta última es el objeto de este análisis, habiendo sido un factor ampliamente estudiado en otras especies de plantas (Embleton et al. 1973; Wutscher, 1989), pero no en profundidad en el caso de *Pistacia*.

Debido al bajo coste de la mayoría de los fertilizantes inorgánicos, la elección de un portainjertos más eficaz en la absorción de determinados elementos químicos, sólo está justificada en aquellas situaciones donde se produzcan problemas nutricionales muy graves, como podría ser el caso de la producción de pistacho, que a pesar de ser un cultivo rústico y bastante adaptable, prefiere suelos de textura media (francos o franco-arenosos), calizos, con un pH alcalino entre 6 y 8, y donde la profundidad también es un factor a tener en cuenta (Couceiro et al., 2013).

La elección de un suelo que no reúna las características más demandadas por las plantas de pistacho es algo habitual en los trabajos de campo, lo que puede producir deficiencias nutricionales en las plantas. Éstas, seguramente serán debidas a una pobre absorción de alguno de los elementos básicos para el

desarrollo de los individuos y aquí avanzamos en la hipótesis de que el portainjerto es determinante en este sentido.

Algunas de estas deficiencias pueden tratarse con abonos y/o enmiendas, como las de *Cu* o *N*, pero existen otras para las que la fertilización no es tan sencilla (caso de *B* y *Zn*, por ejemplo). Una consecuencia directa de ello es el gran interés comercial que tiene la investigación en el desarrollo de portainjertos con alta capacidad en la absorción de estos nutrientes.

En estas condiciones se ha realizado una comparativa de la eficiencia nutricional de dos de los portainjertos más utilizados: *Pistacia terebinthus* L. y *P. atlantica* Desf., utilizando como valores de referencia los valores umbrales mostrados en la **Tabla 1**.

Resultados y Discusión

Mediante este estudio se pretende evaluar y comparar la capacidad de absorción de nutrientes por parte de dos portainjertos (*Pistacia terebinthus* L. y *P. atlantica* Desf.), determinando en las hojas de los mismos la concentración de treinta componentes químicos.

De todos los elementos analizados, los valores para *As*, *Be*, *Bi*, *Cd*, *Co*, *Mo*, *Sb* y *Se* se encuentran por debajo del valor crítico de detección del instrumento de medición y no fueron tenidos en cuenta en el resto del análisis (<0.5 Kg/m³). Por otro lado, a la vista de los resultados estadísticos arrojados por el Test de Friedman ($\alpha > 0.05$), en el caso de *Al*, *S*, *Cu*, *Cr*, *K*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *Ti* y *Zn*, no se puede afirmar que haya diferencias significativas entre el uso de un portainjerto u otro (**Tablas 4 y 5**).

	Portainjertos: <i>P. atlantica</i> Desf.					Portainjertos: <i>P. terebinthus</i> L.
	Batoury	Joley	Mateur	M38	G1	<i>P. vera</i> L.
<i>Al</i> (mg/Kg)	54,2925 (13,5302)	84,1575 (20,5190)	87,3050 (11,9457)	94,1550 (36,1621)	82,2475 (24,0331)	66,7364 (29,1519)
<i>B</i> (mg/Kg)	168,9700 (34,4060)	158,8875 (23,3551)	160,9000 (21,0596)	161,0650 (19,5236)	215,5900 (26,3278)	45,0874 (16,8787)
<i>C</i> (g/100 g)	46,0650 (0,2985)	45,1025 (0,7743)	44,0300 (0,3173)	46,5800 (0,7250)	45,4650 (0,2156)	49,6898 (0,8215)
<i>Ca</i> (g/100mL)	1,6625 (0,2074)	1,8625 (0,3040)	2,3750 (0,2903)	1,6050 (0,1869)	1,6700 (0,2119)	1,1236 (0,4489)
<i>Cr</i> (mg/Kg)	0,2575 (0,2532)	0,0575 (0,0675)	0,0575 (0,0665)	0,0875 (0,0629)	0,1000 (0,1254)	0,1720 (0,3248)
<i>Cu</i> (mg/Kg)	46,6775 (25,6889)	44,0925 (28,0447)	78,5800 (42,4545)	56,2850 (39,4555)	66,8100 (61,1024)	114,1906 (65,4326)
<i>Fe</i> (mg/Kg)	43,0975 (5,1625)	71,5150 (8,7151)	62,4850 (7,9991)	65,6175 (19,9563)	58,3925 (12,1794)	68,0036 (21,3028)
<i>K</i> (g/100 g)	0,7650 (0,0733)	1,9775 (0,1727)	1,7300 (0,3008)	1,5300 (0,4292)	1,7400 (0,2486)	0,9541 (0,2350)
<i>Li</i> (mg/Kg)	2,4350 (0,7855)	1,7300 (0,2619)	1,7875 (0,2539)	1,5050 (0,1572)	2,1500 (0,5099)	0,6887 (0,7261)
<i>Mg</i> (g/100 g)	0,4925 (0,1189)	0,5950 (0,1498)	0,5475 (0,0618)	0,3725 (0,0377)	0,5550 (0,0794)	0,1973 (0,0564)
<i>Mn</i> (mg/Kg)	44,0625 (9,2923)	55,1425 (8,3951)	47,8650 (1,9225)	41,9450 (5,2009)	49,1925 (7,2564)	39,8688 (16,0693)
<i>N</i> (g/100 g)	1,4225 (0,1106)	1,6375 (0,2178)	1,3350 (0,1629)	1,3675 (0,1597)	1,4375 (0,1201)	2,1458 (0,2297)
<i>Na</i> (g/100 g)	0,00325 (0,00275)	0,00450 (0,00129)	0,00600 (0,00200)	0,00825 (0,00275)	0,00450 (0,00208)	0,0168 (0,0119)
<i>Ni</i> (mg/Kg)	54,2925 (13,5302)	84,1575 (20,5190)	87,3050 (11,9458)	94,1550 (36,1621)	82,2475 (24,0331)	0,2548 (0,5169)

	Portainjertos: <i>P. atlantica</i> Desf.					Portainjertos: <i>P. terebinthus</i> L.
	Batoury	Joley	Mateur	M38	G1	<i>P. vera</i> L.
<i>P</i> (mg/Kg)	0,0500 (0,000)	0,0600 (0,0115)	0,0550 (0,0129)	0,0550 (0,0100)	0,0575 (0,0050)	42,0395 (18,8072)
<i>S</i> (g/100 mg)	0,1000 (0,0141)	0,1175 (0,0171)	0,1075 (0,0050)	0,0950 (0,0100)	0,1075 (0,0096)	0,1168 (0,0164)
<i>Ti</i> (mg/Kg)	3,2475 (0,6404)	5,0000 (1,2834)	5,2025 (0,7285)	6,0400 (2,3047)	4,8675 (1,6675)	2,5354 (0,9108)
<i>Tl</i> (g/100 mg)	12,7125 (3,2161)	17,0300 (5,1823)	14,7300 (2,4293)	7,4175 (0,6116)	14,6950 (3,5244)	0,9133 (1,4712)
<i>V</i> (mg/Kg)	3,3350 (0,9162)	4,0125 (0,9981)	3,7075 (0,4109)	2,5150 (0,2155)	3,7150 (0,5242)	1,1762 (0,4031)
<i>Zn</i> (mg/Kg)	9,1650 (2,6464)	11,0575 (1,9163)	13,6475 (4,4657)	13,0925 (1,3357)	12,4300 (3,0977)	10,4013 (2,4427)

Tabla 4.- Valores medios para la concentración de cada elemento químico en todas las variedades. Las desviaciones típicas aparecen indicadas entre paréntesis para cada valor medio. * *As, Be, Bi, Cd, Co, Mo, Sb* y *Se* mostraron valores de concentración <0.5 Kg/m³.

	$\chi^2(2)$	Valor p
Al (mg/Kg)	4,143	0,529
B (mg/Kg) ^a	14,429	0,013*
C (g/100 g) ^b	17,000	0,004*
Ca (g/100mL) ^a	13,489	0,019*
Cr (mg/Kg)	3,722	0,590
Cu (mg/Kg)	7,000	0,221
Fe (mg/Kg) ^a	11,143	0,049*
K (g/100 g) ^c	14,714	0,012*
Li (mg/Kg) ^a	14,281	0,014*
Mg (g/100 g) ^a	14,856	0,011*
Mn (mg/Kg)	4,143	0,529
N (g/100 g) ^b	11,286	0,046*
Na (g/100 g) ^b	12,895	0,024*
Ni (mg/Kg)	7,014	0,220
P (mg/Kg) ^b	11,423	0,044*
Pb (mg/Kg)	4,143	0,529
S (g/100 mg)	4,922	0,425
Sr (mg/Kg) ^a	13,857	0,017*
Ti (mg/Kg)	9,714	0,084
Tl (g/100 mg) ^a	14,857	0,011*
V (mg/Kg) ^a	14,857	0,011*
Zn (mg/Kg)	7,374	0,194

Tabla 5.- Test de Friedman para todos los elementos en cada variedad. Nivel de significación $\alpha < 0,05$. * Al, S, Cu, Cr, K, Mn, Ni, Pb, Ti y Zn no mostraron diferencias significativas. ^a Elementos cuya concentración es mayor en las variedades injertadas en *P. atlantica* Desf. ^b Elementos cuya concentración es mayor en aquellas variedades cuyo portainjerto era *P. terebinthus* L. ^c Elemento con diferencias significativas que no se pueden asignar a la diferencia de portainjerto utilizado.

Además, de acuerdo con el Test de Friedman, existen 12 elementos en los que aunque no se aprecian diferencias de absorción entre individuos del mismo portainjerto, existen diferencias significativas entre individuos de distintos portainjertos (ver **Tabla 4 y 5**). Concretamente, *B*, *Ca*, *Sr*, *Fe*, *Li*, *Mg*, *Tl* y *V* están más representados en *P. atlantica* Desf., mientras que *C*, *N*, *P* y *Na* tienen una concentración foliar mayor para *P. terebinthus* L.

Es destacable el caso del *P*, que tiene una gran concentración en las plantas injertadas en *P. terebinthus* L. (42,0395 mg/kg), no sólo muy superior al rango de suficiencia (0,170 mg/kg) sino también mucho mayor a la cantidad encontrada en *P. atlantica* Desf. (0,0555 mg/kg de media).

En el caso del *K* el análisis mostró diferencias significativas pero, a la vista de la **Figura 8**, éstas no pueden ser asignadas a los distintos portainjertos utilizados, puesto que, al contrario de lo que ocurre con todos los demás elementos, en éste el valor de concentración en las plantas injertadas en *P. terebinthus* L. no es el único que gráficamente se distingue de los demás.

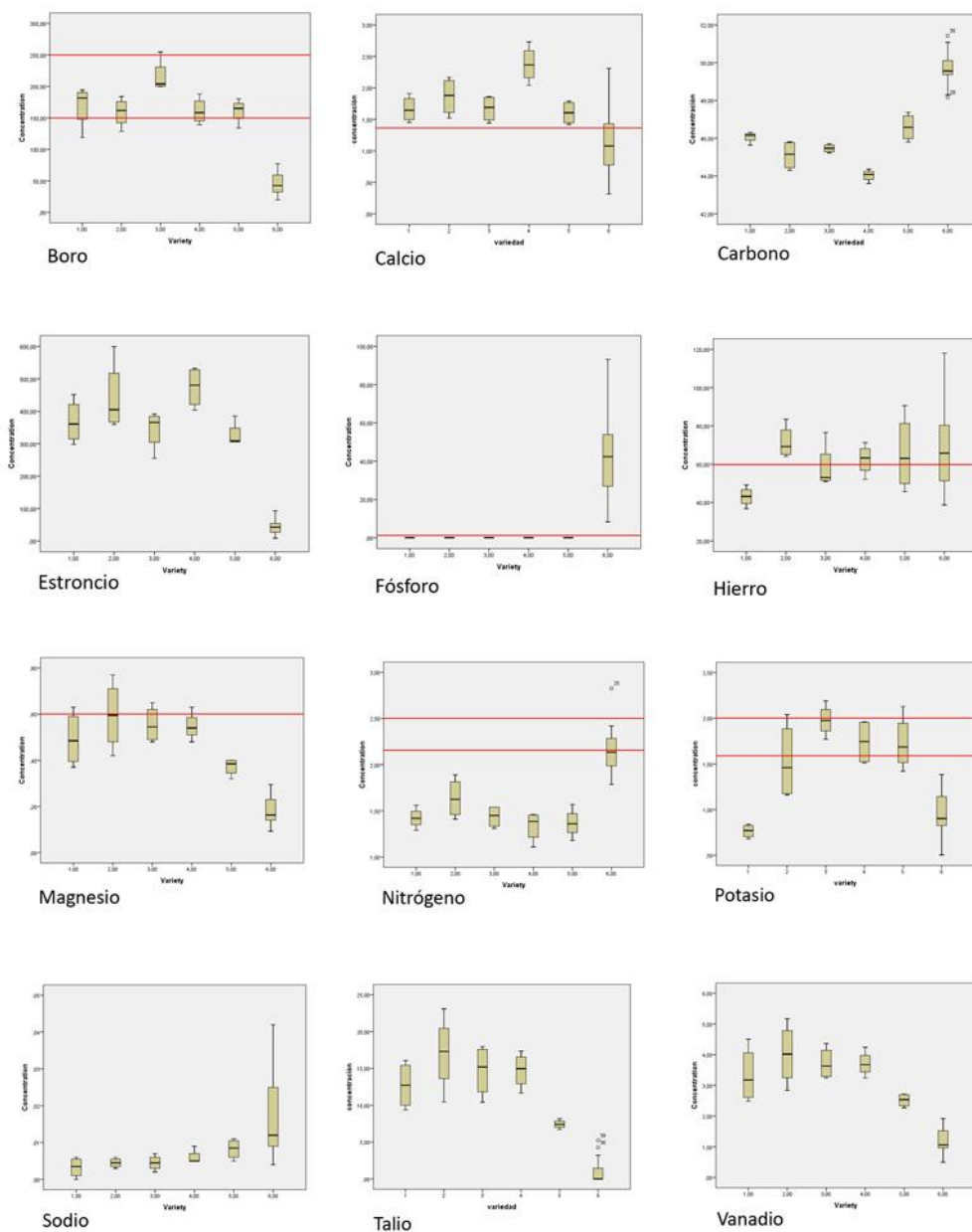


Figura 8.- Representación de las medias de concentración de los elementos con diferencias significativas según el test de Friedman ($\alpha < 0,05$) con comparación de nuestros resultados con los de la literatura (línea roja).

Nuestros datos sugerirían que las diferencias encontradas en la acumulación de nutrientes se deben al patrón utilizado, y que por tanto *P. atlantica* Desf. es un portainjertos más eficiente que *P. terebinthus* L. en cuanto a la absorción de nutrientes se refiere. Entre éstos se encuentran varios macronutrientes (*Ca* y *Mg*), que suministran una mayor proporción de energía al individuo y que están en una mayor cantidad en la planta, y micronutrientes (*B* e *Fe*), generalmente presentes en una dosis mucho menor (**Figura 8**).

Estos valores coinciden con los de Caruso et al. (2005), que realizando una comparación de la absorción de nutrientes entre portainjertos que incluía a *P. terebinthus* L. y *P. atlantica* Desf., obtuvieron como resultado una mayor concentración de *Mg* en este último. Nuestro análisis también está respaldado por los datos de Brown et al. (1994), que señalaron a *P. atlantica* Desf. como el portainjertos más efectivo en cuanto a la absorción de *B*. Estos mismos autores encontraron además mayor concentración de nutrientes *P*, *Cu* y *Zn*, datos no concordantes con nuestros valores. En este sentido, Couceiro et al. (2013) colocan a *P. atlantica* por detrás de *P. terebinthus* en cuanto a la absorción de *Zn* e *Fe*.

Sin embargo, como indican Brown et al. (1994), la influencia del portainjertos es mayor cuando los niveles de nutrientes en hojas son bajos (Brown et al., 1994). Nuestro muestreo tuvo lugar en Noviembre, momento en el que la producción de tejido foliar disminuye, la planta detiene su crecimiento y la senescencia comienza, por lo que la absorción de nutrientes disminuye y con ella, la concentración de elementos que encontramos en la hoja. La inactividad de las plantas en esta época se ilustra en la **Figura 9** del capítulo 2 en el apartado Resultados, que compara nuestros datos con los valores de referencia encontrados en la literatura. La discordancia encontrada, por tanto, puede

deberse al estado fisiológico de las plantas y el momento concreto de su ciclo de vida.

Por último, no se puede obviar que aunque nuestros muestreos fueron realizados en el mismo periodo del año, las muestras procedían de lugares distintos (es decir, suelos con características probablemente distintas) y de pies de planta de distinta edad, por lo que futuras investigaciones serán necesarias para aclarar completamente la influencia del portainjertos en la absorción de nutrientes.

Conclusiones

No se han encontrado diferencias significativas entre las plantas injertadas en *Pistacia terebinthus* L. y *P. atlantica* Desf. para 18 de los 30 elementos analizados. En los 12 elementos restantes, no se apreciaron diferencias de absorción entre individuos con el mismo patrón, pero sí al utilizar diferentes portainjertos, concretamente *B, Ca, Sr, Fe, Li, Mg, Tl* y *V*, mostraron concentraciones mayores en plantas injertadas en *P. atlantica* Desf., mientras que *C, N, P* y *Na* lo hicieron en *P. terebinthus* L.

Nuestros datos sugieren que dichas diferencias se deben al patrón utilizado, y que, por lo tanto, *P. atlantica* Desf. es un portainjertos más eficiente que *P. terebinthus* L. en cuanto a la absorción de nutrientes.

CAPÍTULO 2.-

Evaluación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en cinco variedades de Pistacho, (*Pistacia vera* L.)

RESUMEN

Se han descrito más de 50 variedades de pistacho, *Pistacia vera* L., cultivadas en todo el mundo. La selección de un cultivar apropiado puede afectar a la rentabilidad de los cultivos, y por lo tanto hay que prestarle mucha atención. El tipo y la concentración de los nutrientes absorbidos por la planta afecta a su desarrollo y, con el tiempo, afectará también a la calidad y la cantidad de los frutos.

En este estudio, se ha evaluado la eficiencia en la absorción de nutrientes en cinco variedades de pistacho; tres variedades macho ('M38', 'G1', y 'Mateur'), y dos variedades hembra ('Batoury' y 'Joley'). De acuerdo con nuestros datos, todas estas variedades tienen una capacidad similar en la absorción de *Al, Cr, Cu, K, Li, Mn, Ni, Pb, P, S, Sr, Ti, Tl, Zn, N, B, Fe Mg, Na, y V*. No se detectaron diferencias en relación con el sexo de las plantas. Solo 'Mateur' mostró niveles significativamente altos de *Ca* y bajos de *C*. Según estos datos, los factores fenológicos tendrían más influencia en la absorción de nutrientes que la variedad en sí.

El desarrollo de este capítulo ha dado como resultado el siguiente artículo, que actualmente se encuentra en prensa:

Nutrient uptake efficiency of five varieties of pistachio (Pistacia vera L.).

Cristina Aznarte-Mellado, Pedro J. Sola-Campoy, Francisca Robles, Julián Guerrero Villaseñor, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez.

Journal of Elementology, doi:10.5601/jelem.2015.20.1.912.

Introducción

A pesar de ser nativo de la cuenca mediterránea, *P. vera* L. se cultiva en todo el mundo. Esto sin duda se debe a que posee un fruto comestible muy solicitado en casi todas las culturas. El pistacho es muy apreciado como aperitivo aunque también se utiliza como ingrediente principal de algunas salsas, embutidos, quesos, dulces y pasteles. Seguramente, esta es la razón de que ocupe el quinto puesto en la producción global de frutos secos, siendo Irán y los Estados Unidos los principales productores (Amirteimoori, Chizari 2008). Debido a la domesticación que, a lo largo de su historia, ha llevado a cabo el hombre sobre *P. vera* L., se han desarrollado alrededor de unas 50 variedades de pistacho para el cultivo. Estas cuentan con ciertas diferencias morfológicas y fisiológicas, que siendo muy leves, habitualmente tienen relación con el tamaño de la semilla, el momento de floración y la tasa de producción (Kashaninejad et al. 2005, Razavi et al. 2007a, b, c, Chahed et al. 2008).

La calidad y la cantidad de los frutos, junto con el rendimiento de la cosecha dependen sin duda de la habilidad del árbol para absorber nutrientes. La influencia de la relación entre la variedad y el portainjertos en la capacidad de tomar nutrientes del suelo ha sido ya sugerida (Crane, Iwakiri 1986, Rahemi, Tavallali 2007, Brown et al. 2008). Sin embargo, tratando de arrojar un poco de luz sobre este tema, en este estudio hemos analizado la absorción de 30 elementos químicos en cinco variedades de pistacho de las que hasta la fecha hay escasos datos disponibles. Tres de ellas son variedades macho —‘Mateur’ (cultivado en Marruecos y muy común en Túnez), ‘M38’ (cultivado en Siria), y ‘G1’ (obtenido en

el Centro Agrario el Chaparrillo, Castilla-La Mancha, Spain para ser usado en polinización abierta con ‘Kerman’) — mientras que las otras dos son variedades hembra — ‘Batoury’ (cultivado en Turkia, Siria), y ‘Joley’ (cultivado en EEUU) — (López et al. 2005).

Resultados y Discusión

El análisis de la acumulación de nutrientes en hoja mostró que la absorción de ocho elementos *As*, *Be*, *Bi*, *Cd*, *Co*, *Mo*, *Sb*, y *Se* estaba por debajo del límite de detección del aparato utilizado ($<0.5 \text{ kg m}^{-3}$), y por lo tanto, no se han tenido en cuenta para el resto del estudio. Los valores de concentración media y la desviación estándar (entre paréntesis) de todos los elementos para cada variedad se muestran en la **Tabla 6**.

	Batoury	Joley	Mateur	M38	G1	Test de Friedman (χ^2)
<i>Al</i> (mg kg ⁻¹)	54.29 (13.53)	84.15 (20.51)	87.30 (11.94)	94.15 (36.16)	82.25 (24.03)	4.400 (0.355)
<i>B</i> (mg kg ⁻¹)	168.9 (34.40)	158.8 (23.35)	160.90 (21.06)	161.1 (19.52)	215.6 (26.33)	8.200 (0.085)
<i>C</i> (g 100g ⁻¹)	46.06 (0.29)	45.10 (0.774)	44.03 (0.317)	46.58 (0.725)	45.46 (0.216)	11.80 (0.019*)
<i>Ca</i> (g 100ml ⁻¹)	1.662 (0.207)	1.862 (0.304)	2.375 (0.290)	1.605 (0.187)	1.670 (0.212)	10.88 (0.028*)
<i>Cr</i> (mg kg ⁻¹)	0.257 (0.253)	0.057 (0.067)	0.057 (0.066)	0.087 (0.063)	0.100 (0.125)	4.000 (0.406)
<i>Cu</i> (mg kg ⁻¹)	46.67 (25.68)	44.0 (28.04)	78.58 (42.45)	56.28 (39.45)	66.81 (61.10)	1.400 (0.844)
<i>Fe</i> (mg kg ⁻¹)	43.09 (5.162)	71.51 (8.715)	62.48 (7.99)	65.62 (19.96)	58.39 (12.18)	2.603 (0.626)
<i>K</i> (g 100g ⁻¹)	0.765 (0.073)	1.977 (0.172)	1.730 (0.301)	1.530 (0.43)	1.740 (0.248)	9.400 (0.052)
<i>Li</i> (mg kg ⁻¹)	2.435 (0.785)	1.730 (0.261)	1.787 (0.254)	1.505 (0.157)	2.150 (0.509)	7.949 (0.093)

	Batoury	Joley	Mateur	M38	G1	Test de Friedman (χ^2)
<i>Mg</i> (g 100g ⁻¹)	0.492 (0.118)	0.595 (0.149)	0.547 (0.062)	0.372 (0.038)	0.555 (0.079)	8.759 (0.067)
<i>N</i> (g 100g ⁻¹)	1.422 (0.110)	1.637 (0.217)	1.335 (0.163)	1.367 (0.159)	1.437 (0.120)	3.800 (0.434)
<i>Na</i> (g 100g ⁻¹)	0.003 (0.002)	0.004 (0.001)	0.006 (0.002)	0.008 (0.003)	0.004 (0.002)	5.527 (0.237)
<i>Ni</i> (mg kg ⁻¹)	54.29 (13.53)	84.15 (20.52)	87.30 (11.94)	94.15 (36.16)	82.25 (24.03)	2.987 (0.560)
<i>P</i> (mg kg ⁻¹)	0.050 (0.000)	0.060 (0.011)	0.055 (0.013)	0.055 (0.010)	0.057 (0.005)	2.603 (0.626)
<i>Pb</i> (mg kg ⁻¹)	0.282 (0.169)	0.230 (0.092)	0.342 (0.096)	0.305 (0.145)	0.340 (0.067)	2.600 (0.627)
<i>S</i> (g 100mg ⁻¹)	0.100 (0.014)	0.117 (0.017)	0.107 (0.005)	0.095 (0.010)	0.107 (0.009)	3.884 (0.422)
<i>Sr</i> (mg kg ⁻¹)	367.8 (67.80)	442.1 (109.8)	474.3 (63.28)	326.9 (38.92)	344.6 (61.67)	7.400 (0.116)
<i>Ti</i> (mg kg ⁻¹)	3.247 (0.640)	5.000 (1.283)	5.202 (0.728)	6.040 (2.305)	4.867 (1.667)	6.200 (0.185)
<i>Tl</i> (g 100mg ⁻¹)	12.71 (3.216)	17.03 (5.182)	14.73 (2.429)	7.417 (0.612)	14.69 (3.524)	8.800 (0.066)
<i>V</i> (mg kg ⁻¹)	3.335 (0.916)	4.012 (0.998)	3.707 (2.429)	2.515 (0.215)	3.715 (0.524)	8.800 (0.066)
<i>Zn</i> (mg kg ⁻¹)	9.165 (2.646)	11.05 (1.916)	13.64 (4.466)	13.09 (1.336)	12.43 (3.097)	7.646 (0.150)

Tabla 6.- Acumulación de elementos químicos por variedad (medias y desviaciones) con los datos del test de Friedman. *C y Ca mostraron diferencias significativas para un nivel de significación de $\alpha < 0.05$.

Para 20 elementos químicos del total de 30 analizados, todas las variedades presentaron una eficiencia equivalente en la absorción de nutrientes, con un nivel de significación de 0,05 (ver **Tabla 6**). Sin embargo, la variedad 'Mateur' mostró diferencias significativas en dos casos: tanto para el *Ca* como para el *C*, siendo en el primer caso debido a una acumulación de concentración ($\chi^2= 10.886$, $p=0.028$), y por el contrario, en el segundo, debido a una pérdida en la concentración de *C* ($\chi^2= 11.800$, $p=0.019$) (**Tabla 7** y **Figura 9**).

En las plantas terrestres, el agua y los solutos se captan del suelo a través de las raíces pasando a los vasos de xilema, desde donde se distribuyen por diferentes órganos y son utilizados en una gran variedad de procesos a lo largo de toda la planta. La tasa de absorción puede variar debido a algunos factores como la edad de la planta, las variaciones de las estaciones del año, el injertado, interacciones con micorrizas o diferencias en la carga frutal (Tavallali, Rahemi 2007, Martínez-Ballesta et al. 2010, Aznarte-Mellado et al. 2014).

Concentración en hoja				
	Variedad	Concentración	$\chi^2(2)$	p value
Calcio	Batoury	1.662	10.88	0.028
	Joley	1.862		
	G1	1.670		
	Mateur	2.375		
	M38	1.605		
Carbono	Batoury	46.06	11.80	0.019
	Joley	45.10		
	G1	45.46		
	Mateur	44.03		
	M38	46.58		

Tabla 7.- Valores medios de la concentración de C y Ca por variedad, y resultado del test de Wilcoxon con suma de rangos mostrando las diferencias en 'Mateur' (negrita).

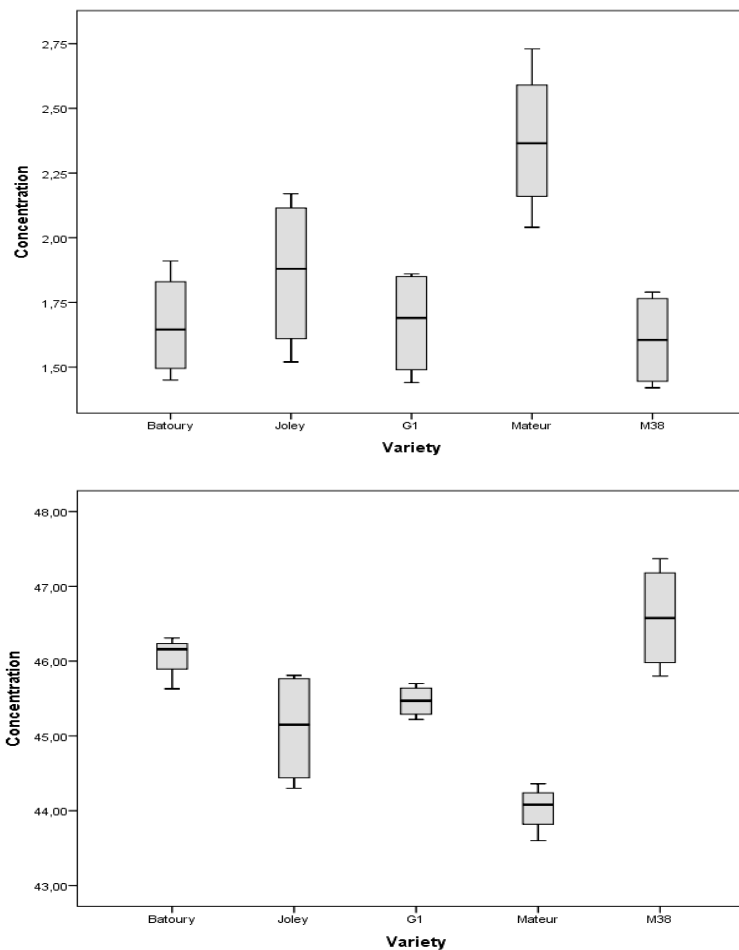


Figura 9.- Representación gráfica de las medias de concentración de C y Ca en cada variedad mostrando posibles diferencias en 'Mateur' para ellos.

Debido a que no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los casos, nuestros datos sugieren que 'Batoury', 'Joley', 'Mateur', 'M38' y 'G1' tienen la misma tasa de absorción en la acumulación de 20 elementos químicos, sin tener en cuenta el género de la variedad. Solo 'Mateur' mostró una mayor tendencia a la acumulación de Ca y una significativamente inferior concentración de C (**Figura 9**). Este resultado podría ser el reflejo de diferencias fenológicas, de hecho, 'Mateur' es la variedad más temprana de todas las utilizadas en este

estudio y, por lo tanto, debería ser la primera que mostrara signos de envejecimiento (Guerrero Villaseñor et al. 2010).

Tanto el *Ca* como el *C* están íntimamente relacionados con la propagación vegetativa. El muestreo de nuestro análisis ha sido realizado al principio del mes de Noviembre, época en la que la producción en la hoja cesa, la planta detiene su crecimiento y comienza la senescencia. Esto explicaría los bajos niveles de *C*, muy fuertemente vinculado a la producción de la hoja (Jonasson et al. 1997), y los altos niveles de *Ca*, que se habría acumulado en los tejidos senescentes (Picchioni et al. 1997).

La inactividad en esta etapa de los árboles de pistacho utilizados se ilustra en la **Figura 10**, que compara nuestros datos con los rangos normales encontrados en la literatura para 11 elementos químicos. Aunque seis de ellos se encontraban dentro del rango de suficiencia (cuatro macronutrientes como el *B*, *Fe*, *Mn* y *Zn*; y dos micronutrientes como *Ca* y *K*), *Mg*, *N*, *P* y *S* muestran una concentración en los mínimos de lo establecido, lo que implica una tendencia a disminuir (**Figura 10**). Tan solo *Cu* estaba por encima del rango normal en las plantas analizadas (**Figura 10**).

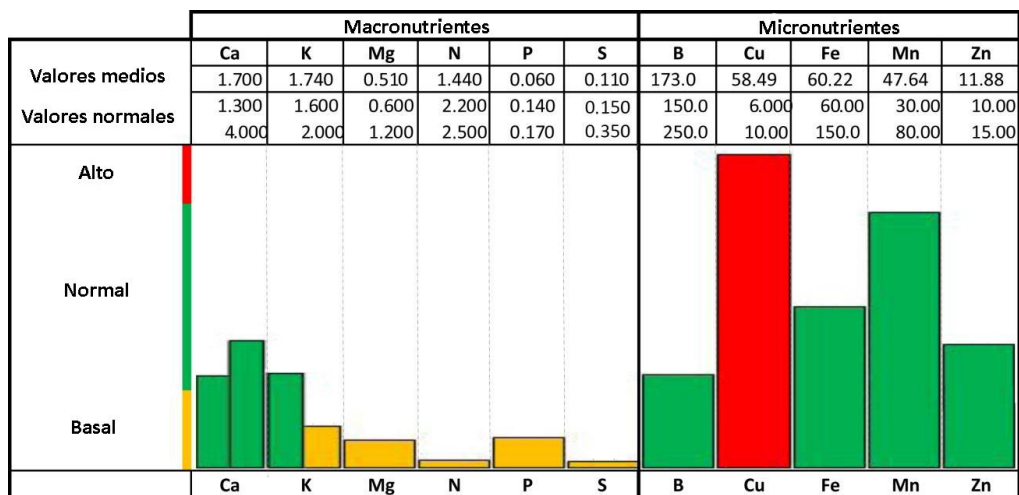


Figura 10.- Representación gráfica del estado nutricional de las plantas según los rangos de suficiencia de los macro y micro nutrientes. *Todos los datos han sido tomados de Picchioni et al., 1997 y Harmankaya et al., 2014. Los rangos normales son medidos al principio de Agosto, lo que corresponde con el inicio de la fase III en el desarrollo del fruto o inicio del llena de los frutos en *P. vera* L.

La novedad de nuestro estudio radica, no sólo en la gran cantidad de elementos analizados, sino también en que las plantas utilizadas pertenecen a una colección de variedades de pistacho. Este tipo de plantas no son utilizadas para explotar su producción, si no que se usan para realizar observaciones experimentales con propósitos no productivos.

Es por esto que sufren procesos de poda frecuentes, lo que impide parcialmente su floración y la posterior fructificación, eliminando aquellas estructuras que potencialmente demandan mayor cantidad de nutrientes.

En este sentido, Vemmos (1999) demostró que mientras que los árboles con fruto muestran una absorción variable de minerales, principalmente *Mg*, *Ca*, *Mn*, *K*, *Zn*,

y *N*, aquellos árboles de pistacho sin frutos mantenían una concentración constante de estos nutrientes. Además, se ha observado una reducción de *P* y *N* en árboles con frutos maduros después de un año de una gran producción (Rosencrance et al. 1996).

Todos estos datos sugieren que el estado fisiológico de la planta y la demanda de nutrientes por parte de diferentes estructuras (como las yemas, flores, frutos u hojas) son factores más influyentes en la distribución de nutrientes a lo largo de la planta que la variedad por sí misma.

Conclusiones

1. Las cinco variedades de pistacho analizadas ('M38', 'G1', 'Mateur' -machos-, 'Batoury', y 'Joley' -hembras) muestran una capacidad de absorción de nutrientes equivalente para 28 de los 30 elementos químicos estudiados, sin tener en cuenta el género de la variedad.
2. 'Mateur' presentó significativamente una acumulación de *Ca* y una pérdida en la concentración de *C*. Estas son consecuencias directas de la senescencia de los tejidos, ya que 'Mateur' es la variedad más temprana de las utilizadas, y estos serían los primeros signos del envejecimiento.
3. Las plantas utilizadas son árboles de pistacho sin un propósito productivo, utilizados para observaciones experimentales, por lo que sufren constantes podas. Esto restringe la floración y la producción de frutos, por lo que se ha eliminado la interferencia producida por estructuras que potencialmente demandarían gran

cantidad de nutrientes. Nuestros datos apoyan la opinión de que los factores fenológicos son más influyentes en la absorción de nutrientes que la propia variedad.

CAPÍTULO 3.-

Modificación de la eficiencia en la absorción de nutrientes en *Pistacia Terebinthus* L. mediante el uso de diferentes tratamientos: micorrizas y fitohormonas.

RESUMEN

Controlar la compatibilidad entre el tándem yema-pie de planta es una cuestión decisiva en el éxito del injerto en pistacho. Las condiciones climáticas y la elección de un patrón apropiado son los dos factores fundamentales para ello. A pesar de los esfuerzos de los productores, las fluctuaciones de estos factores provocan diferencias frecuentes en el rendimiento anual. El objetivo deseable sería minimizar las pérdidas de producción aumentando el porcentaje de injertos positivos, lo que favorecería la introducción de este cultivo en nuevas áreas.

En esta Memoria, se ha analizado la viabilidad de *P. terebinthus* L. usado como portainjertos y tratado, por un lado con micorrizas y, por otro, con fitohormonas. Nuestros resultados, en una parcela experimental de 12.905 plantas, muestran que las plantas micorrizadas dan lugar aproximadamente a un 80% de injertos positivos, mientras que las plantas con fitohormonas y las plantas control obtuvieron un 32.3% y 38.4% de éxito, respectivamente. Este aumento en el prendimiento de los injertos podría ser explicado por la mayor eficiencia en la absorción de nutrientes observada en las plantas micorrizadas.

De hecho, un análisis de la acumulación y asimilación de los elementos químicos en hojas revela que las plantas micorrizadas acumularon *selectivamente Ca, Fe, Mg, N, Al, S, Sr, Ti, V, Mn, y Tl*, mientras que presentaban menores concentraciones de *K* con respecto al resto de las plantas.

Las plantas con un tratamiento de micorrizas eran más pequeñas en altura, pero no mostraron diferencias significativas en cuanto al diámetro y al perímetro del tronco. En este contexto, proponemos el uso de micorrizas para aumentar la compatibilidad entre yema y patrón para *P. vera* L. injertada en *P. terebinthus* L.

El desarrollo de este capítulo ha dado como resultado la publicación del siguiente artículo:

Mycorrhizal treatments increase the compatibility between Pistachio (Pistacia vera L.) cultivars and seedling rootstock of Pistacia terebinthus L.

Cristina Aznarte-Mellado, Pedro J. Sola-Campoy, Francisca Robles, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez.

Scientia Horticulturae, (2014) 176:79-84.

Introducción

El cultivo de *P. vera* L. posee un gran interés comercial debido a poseer un fruto comestible, el pistacho, que se consume fundamentalmente como aperitivo, siendo también el ingrediente principal de algunas bebidas, aceites, salsas, embutidos, quesos y dulces. El pistacho se encuentra quinto en el ranking de la producción mundial de semillas, aunque su comercialización y uso está sufriendo un aumento considerado. A pesar de ser nativo de la cuenca mediterránea, actualmente se cultiva ya en los cinco continentes. Entre los productores principales se encuentran Irán y los Estados Unidos con casi un 70% de la producción total (Faostat, 2013).

A lo largo de la historia, esta especie ha sufrido una fuerte domesticación por parte del hombre, lo que ha permitido el desarrollo de casi 50 variedades de pistacho para el cultivo con sólo algunas diferencias morfológicas y fisiológicas entre ellas, generalmente relacionadas con el tamaño de la semilla, la floración o la tasa de producción (Spina, 1984). Al igual que muchos árboles frutales, esta semilla necesita un portainjertos o patrón para favorecer la propagación vegetativa y evitar problemas de enraizamiento debidos a su ineficacia en el desarrollo radicular. Mientras que la elección del portainjertos no tiene influencia sobre las características de la variedad, se ha observado que sí la tiene en cuanto a la producción, vigor y longevidad de las plantas (Tarango, 1993). Además, el porcentaje de éxito en el injerto se considera un factor clave para la prosperidad de la plantación del pistacho. Es por esto que el uso de un tándem variedad-portainjerto adecuado no es una cuestión baladí y necesita ser estudiado con atención en cualquier área (Ferguson et al., 2005a).

El injerto se realiza durante la época estival. La temperatura, la humedad y el tipo de injerto ejercen de efectos limitantes en el crecimiento del nuevo tejido entre el portainjertos y la yema (Couceiro, 1992; Ferguson et al., 2005b; Guerrero, 2011). Normalmente, durante las primeras etapas, las temperaturas deberían de oscilar entre 15°C y 32°C, y la humedad debería de mantenerse por debajo del 50% (Couceiro, 2013). El injerto más utilizado en la propagación es el injerto en escudo o en T (Guerrero, 2011).

Por otro lado, la elección del portainjertos y las condiciones en las que este se encuentra son los factores con más influencia en el desarrollo del árbol de pistacho. Si existe la posibilidad, son preferibles las plantas de una variedad nativa, ya que tendremos una mayor disponibilidad de muestras, y no será tan necesaria una adaptación al terreno. Es por esto que, las variedades más utilizadas en los Estados Unidos son tanto *P. atlantica* Desf. y *P. integerrima* Stewartson (Guerrero et al., 2005), como algunos híbridos interespecíficos de *P. atlantica* x *P. integerrima* (UCB1 y PGII) (Ferguson et al., 2005a). *P. atlantica* Desf. también es mayoritario en Marruecos, Túnez, Argelia o Irak (Guerrero, 2011), mientras que *P. vera* L. es mucho más utilizado en Irán, Turquía, Siria y Túnez, junto con *P. khinjuk* Stocks, una especie muy cercana (Sheibani, 1996). En España, Italia y Australia, el principal portainjertos es *P. terebinthus* L (Hobman & Bass, 1986; Caruso et al., 1990).

España, el lugar en el que se ha llevado a cabo este estudio, posee potencialmente las condiciones climáticas apropiadas para el cultivo del pistacho, aunque actualmente sólo se están cultivando unas 5000 Ha, lo que todavía representa un pequeño porcentaje de la producción mundial (Couceiro et al., 2013). En este momento, en Castilla-La Mancha, la media de injertos positivos es de hasta un

60% después de tres injertadas, utilizando el mismo tándem variedad/portainjerto (Couceiro et al., 2013). Este factor pone en peligro el establecimiento de nuevas plantaciones, y es esta la razón por la que proponemos el desarrollo de técnicas que aumenten el éxito del injerto, y la reducción del coste de los viveros, lo que a largo plazo facilitará la implantación del cultivo del pistacho en España.

Nuestra hipótesis propone que cualquier técnica capaz de modificar la eficiencia de absorción del portainjertos, puede aumentar su compatibilidad con la yema. En este contexto, investigamos la influencia de los tratamientos con micorrizas y fitohormonas en la toma de nutrientes y su efecto en el éxito del injerto.

Las micorrizas, además de proveer de ciertos elementos a la planta, contribuyen a formar una mayor superficie radicular (Dodd & Ruiz-Lozano, 2012). Las fitohormonas actúan como un bioestimulante que modifica igualmente la absorción de nutrientes (Miyashima & Nakajima, 2011). Según esto, tanto una como otra, podría afectar indirectamente al crecimiento de los nuevos tejidos necesarios tras el injerto. Para investigar estos aspectos, se estableció una parcela experimental con plantas de *P. terebinthus* L. que serán utilizadas como portainjertos. Un tercio de estas plantas fueron tratadas con micorrizas, otro tercio con fitohormonas y el resto fueron utilizados como grupo control.

Resultados

*Análisis de la acumulación y asimilación de diferentes elementos químicos en *P. terebinthus* L. bajo tratamientos con micorrizas y fitohormonas*

Setenta y siete días después del injerto se muestrearon al azar 25 plantas de cada una de las tres parcelas tratadas con micorrizas, con fitohormonas y del grupo

control, respectivamente. Se encontró que las plantas micorrizadas tienen una concentración mayor de *B, Zn, Al, Ca, Fe, Mg, Mn, N, S, Sr, Ti, Tl* y *V* con respecto a las demás (**Tabla 8**). Sin embargo, fueron estas plantas las que revelaron una absorción de *K* más baja.

La toma de minerales fue similar en el caso de fitohormonas y control en todos los casos, excepto en el caso del *B, Zn* y *P*; analizando más de cerca estos datos observamos que en comparación con el grupo control, tanto fitohormonas como micorrizas aumentan la concentración de *B* en hoja.

Por otro lado, en cuanto a la concentración de *Zn* es máxima para micorrizas y mínima para fitohormonas, estando las plantas control entre ambas, que no mostraron diferencias significativas con ninguna de las anteriores y dejando patente por tanto, que las diferencias se encuentran únicamente entre las plantas micorrizadas y las que tienen un tratamiento de fitohormonas (ver **Tabla 9**).

Sin embargo, el caso del *P* presenta la situación inversa. En ella, aquellas plantas con fitohormonas tienen una mayor concentración y las micorrizadas las que tienen valores más bajos. El grupo control exhibe también en este caso un valor intermedio. Tanto ANOVA como el test de Bonferroni no muestran para el *P* diferencias significativas, aunque el análisis *post hoc* de Tukey (HSD) demuestra que la diferencia existente entre ambos extremos (micorrizas y fitohormonas) son significantes entre ellas, aunque no con la media del grupo control (**Tabla 9**).

Por último, la absorción de *C, Cr, Cu, Li, Na, Ni* y *Pb* fue equivalente en todos los tratamientos, mientras que la de *As, Be, Bi, Cd, Co, Mo, Sb* y *Se* estuvo por debajo del límite de detección del aparato ($<0.5 \text{ Kg/m}^3$) (**Tabla 8**).

	Micorrizas	Fitohormonas	Control
Al (mg/Kg)	99.02	66.27	66.74
B (mg/Kg)	68.19	55.83	45.10
C (g/100 g)	49.43	49.08	49.69
Ca (g/100mL)	1.83	1.25	1.12
Cr (mg/Kg)	0.39	0.36	0.33
Cu (mg/Kg)	95.91	108.84	114.19
Fe (mg/Kg)	86.98	65.51	68.00
K (g/100 g)	0.71	0.94	0.95
Li (mg/Kg)	0.83	0.72	0.96
Mg (g/100 g)	0.26	0.21	0.18
Mn (mg/Kg)	67.12	40.45	39.87
N (g/100 g)	2.39	2.14	2.15
Na (g/100 g)	0.025	0.024	0.017
Ni (mg/Kg)	0.32	0.74	0.55
P (mg/Kg)	0.23	0.29	0.21
Pb (mg/Kg)	0.49	0.32	0.32
S (g/100 mg)	0.13	0.12	0.12
Sr (mg/Kg)	66.05	47.76	42.04
Ti (mg/Kg)	3.40	2.43	2.54
Tl (g/100 mg)	7.45	4.35	2.28
V (mg/Kg)	1.79	1.36	1.18
Zn (mg/Kg)	11.87	9.87	10.40

Tabla 8.- Acumulación de elementos químicos en plantas de *Pistacia terebinthus* L. con micorrizas, fitohormonas y en plantas control sin tratamiento. * As, Be, Bi, Cd, Co, Mo, Sb, Se mostraron valores de concentración $<0.5 \text{ Kg/m}^3$.

	ANOVA		HSD Tukey		
	Estadístico F	P value	Micorrizas-Control	Micorrizas-Fitohormonas	Control-Fitohormonas
<i>Al</i> (mg/Kg)	10.606	0.000	0.000	0.000	0.998
<i>B</i> (mg/Kg)	3.161	0.048	0.001	0.138	0.221
<i>C</i> (g/100 g)	2.194	0.119	0.644	0.456	0.099
<i>Ca</i> (g/100mL)	12.961	0.000	0.000	0.001	0.694
<i>Cr</i> (mg/Kg)	0.714	0.493	0.463	0.780	0.986
<i>Cu</i> (mg/Kg)	0.945	0.393	0.379	0.619	0.921
<i>Fe</i> (mg/Kg)	7.963	0.001	0.005	0.002	0.907
<i>K</i> (g/100 g)	9.761	0.000	0.001	0.001	0.968
<i>Li</i> (mg/Kg)	1.160	0.319	0.691	0.760	0.287
<i>Mg</i> (g/100 g)	5.880	0.004	0.003	0.092	0.441
<i>Mn</i> (mg/Kg)	12.500	0.000	0.000	0.000	0.995
<i>N</i> (g/100 g)	7.081	0.002	0.006	0.004	0.993
<i>Na</i> (g/100 g)	2.667	0.076	0.092	0.962	0.165
<i>Ni</i> (mg/Kg)	0.342	0.711	0.794	0.724	0.991
<i>P</i> (mg/Kg)	3.136	0.050	0.736	0.210	0.044
<i>Pb</i> (mg/Kg)	1.216	0.302	0.368	0.379	1.000
<i>S</i> (g/100 mg)	9.591	0.000	0.001	0.001	0.989
<i>Sr</i> (mg/Kg)	7.963	0.001	0.001	0.014	0.641
<i>Ti</i> (mg/Kg)	8.488	0.000	0.004	0.001	0.907
<i>Tl</i> (g/100 mg)	14.024	0.000	0.000	0.003	0.189
<i>V</i> (mg/Kg)	7.373	0.001	0.001	0.030	0.515
<i>Zn</i> (mg/Kg)	3.601	0.032	0.143	0.031	0.770

Tabla 9.- ANOVA de un factor y análisis *post hoc* de la acumulación de elementos químicos en plantas de *Pistacia terebinthus* L. con micorrizas, fitohormonas y en plantas control sin tratamiento. El nivel de significación para ANOVA y Tukey: $\alpha < 0.05$. * *C*, *Cr*, *Cu*, *Li*, *Na*, *Ni*, *Pb* no mostraron diferencias significativas.

Estudio de la tendencia en la acumulación de algunos elementos en P. terebinthus L. durante los tratamientos

En este análisis, comparamos tres medidas de concentración obtenidas en tres momentos diferentes a lo largo del experimento (**Tabla 10**).

	Análisis 1	Análisis 2			Análisis 3		
		Micorrizas	Fitohormonas	Control	Micorrizas	Fitohormonas	Control
Al (mg/Kg)	--	75.63	96.62	116.11	99.02	66.27	66.74
B (mg/Kg)	30.00	39.37	44.15	53.91	68.19	55.83	45.10
C (g/100 g)	--	--	--	--	49.43	49.08	49.69
Ca (g/100mL)	1.34	1.00	1.27	1.09	1.83	1.25	1.12
Cr (mg/Kg)	--	0.27	0.33	0.51	0.39	0.36	0.33
Cu (mg/Kg)	2.00	5.42	7.98	11.52	95.91	108.84	114.19
Fe (mg/Kg)	15.00	56.67	91.99	74.11	86.98	65.51	68.00
K (g/100 g)	1.21	0.90	0.95	1.08	0.71	0.94	0.95
Li (mg/Kg)	--	<0.5	<0.5	<0.5	0.83	0.72	0.96
Mg (g/100 g)	0.26	0.19	0.25	0.24	0.26	0.21	0.18
Mn (mg/Kg)	71.00	56.41	58.08	67.60	67.12	40.45	39.87
N (g/100 g)	--	--	--	--	2.39	2.14	2.15
Na (g/100 g)	--	0.01	0.01	0.03	0.025	0.024	0.017
Ni (mg/Kg)	--	0.21	0.36	0.51	0.32	0.74	0.55
P (mg/Kg)	0.31	0.26	0.42	0.69	0.23	0.29	0.21
Pb (mg/Kg)	--	0.48	0.50	0.50	0.49	0.32	0.32
S (g/100 mg)	--	0.12	0.13	0.14	0.13	0.12	0.12
Sr (mg/Kg)	--	40.28	58.98	33.41	66.05	47.76	42.04
Ti (mg/Kg)	--	2.82	3.19	4.06	3.40	2.43	2.54
Tl (g/100 mg)	--	<0.05	3.39	0.96	7.45	4.35	2.28
V (mg/Kg)	--	1.37	1.95	1.83	1.79	1.36	1.18
Zn (mg/Kg)	15.00	10.73	17.00	7.91	11.87	9.87	10.40

Tabla 10.- Acumulación de varios elementos en *P. terebinthus* L. antes de los tratamientos (análisis 1), justo después del injerto (análisis 2), y 77 días después del injerto (análisis 3).

Tal y como se ha descrito anteriormente, *Ca*, *Fe*, *Mg* y *Mn* se encuentran en una mayor concentración en las plantas micorrizadas, mientras que el *K* se encuentra significativamente en menor proporción. Durante el crecimiento de las plantas, la tendencia de la concentración de *Ca*, *Mg* y *Mn* a disminuir a lo largo del tiempo se observó en los tres grupos. Además, se puede observar un repunte en la concentración en las plantas micorrizadas que coincide con el momento del injerto. En cuanto al *Fe*, se hizo patente una tendencia a aumentar hasta el injerto, momento en el que se produce una caída de concentración en las plantas con fitohormonas y de control. Todas las plantas mostraron la misma tendencia a asimilar el *K*, y su concentración disminuyó con el tiempo (ver **Figura 11** y **Tabla 10**).

Nuestros datos sugieren que hay una tendencia a acumular *B* durante el desarrollo de la planta cuando se utilizan micorrizas y fitohormonas. Sin embargo, las plantas control muestran una ligera bajada de concentración después del injerto. Aunque en la última muestra, los valores de *Zn* y *P* fueron similares en todas las plantas (**Tabla 10**), estos elementos tuvieron un patrón diferente de acumulación en los tres grupos estudiados. Por un lado, en las plantas micorrizadas y control hubo una disminución en la concentración de *Zn* y una recuperación después del injerto, mientras que la dinámica de las plantas con fitohormonas fue la opuesta (véase la **Figura 11** y la **Tabla 10**).

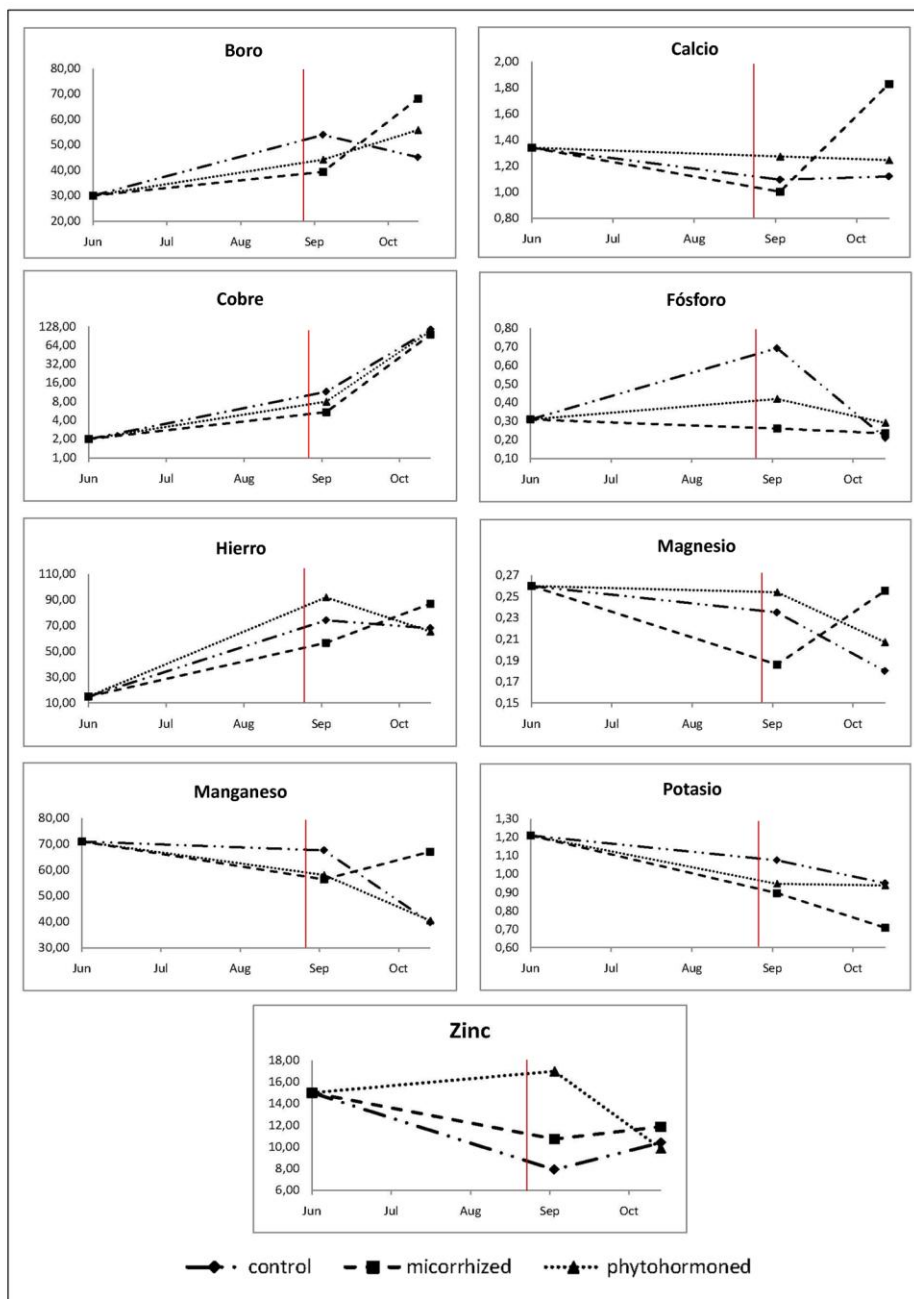


Figura 11.- Evolución temporal de la concentración de *B*, *Ca*, *Cu*, *Fe*, *K*, *Mg*, *Mn*, *P* y *Zn* en plantas con fitohormonas, micorrizas y plantas control sin tratamiento durante el experimento. La barra roja indica momento del injerto.

Por otro lado, el *P* tendió a acumularse en las plantas con fitohormonas y en las del grupo control hasta el injerto, a partir del cual se produjo un ligero descenso. Las plantas con micorrizas mostraron una disminución constante en la concentración de *P*. Por último, todas las plantas analizadas aquí mostraron una tendencia a la acumulación de *Cu* (**Figura 11** y **Tabla 10**).

Patrón de crecimiento y estudio de la compatibilidad variedad/portainjerto después de los tratamientos en P. terebinthus L.

De los tres grupos analizados, las plantas micorrizadas mostraron el valor medio más alto para el diámetro y el perímetro del tronco, y el valor medio más bajo para su altura (ver **Tabla 11**). Los valores del diámetro y el perímetro no exhibieron diferencias significativas al aplicarles el test de ANOVA, pero el test HSD de Tukey demostró que la altura media de las plantas micorrizadas fue significativamente más baja que los otros dos valores (véase **Tabla 11**).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	ANOVA		HSD de Tukey		
				Estadístico F	P value	1 - 3	1 - 2	3 - 2
Diámetro (mm)	10.5	10.2	10.1	0.698	0.498	0.910	0.477	0.732
Perímetro (cm)	3.31	3.21	3.18	0.720	0.487	0.913	0.468	0.717
Altura (cm)	115.53	124.97	123.35	24.208	0.000*	0.000	0.000	0.335

Tabla 11.- Medias de diámetro, perímetro y altura de las plantas. El grupo 1 representa a las plantas micorrizadas, el grupo 2 a las que tienen fitohormonas y el grupo 3 son las plantas control. Niveles de significación para ANOVA y el test de Tukey: $\alpha < 0.05$. * Los valores del diámetro y perímetro no mostraron diferencias significativas.

Además, en la utilización del test Binomial Z para la evaluación del éxito del injerto en cada uno de los tratamientos ($\alpha < 0,05$), nuestros datos en los tres tratamientos difirieron significativamente de la distribución binomial ($p = 0,05$) tomada como referencia. Es llamativo el éxito en las plantas micorrizadas (**Tabla 12**).

		Test binomial Z			
Categoría		N	Proporción observada	Prop. de prueba	Sig. exacta (bilateral)
Control	Grupo 1	SI	1799	,38	,50 ,000
	Grupo 2	NO	2881	,62	
	Total		4680	1,00	
Micorrizas	Grupo 1	SI	3405	,79	,50 ,000
	Grupo 2	NO	885	,21	
	Total		4290	1,00	
Fitohormonas	Grupo 1	SI	1271	,32	,50 ,000
	Grupo 2	NO	2669	,68	
	Total		3940	1,00	

Tabla 12.- Test Binomial Z para el éxito del injerto en los tres tratamientos. Valor $p < 0.05$. *Todos los tratamientos siguen una distribución binomial ($p = 0.50$). ** Las micorrizas aumentan el éxito del injerto ($p = 0.79$).

Dichas plantas con tratamiento de micorrizas aumentaron significativamente el porcentaje de éxito en la unión entre la variedad y el portainjerto en comparación con el grupo control y las plantas con fitohormonas (**Tabla 13**). 41 semanas después del injerto, el 79,4% de las plantas micorrizadas exhibieron yemas activas

con signos de crecimiento tisular entre ellas y el patrón, mientras que los valores para fitohormonas y control son respectivamente 32,3% y 38,4% (**Tabla 13**).

Tratamiento	Plantas analizadas	Porcentaje de injertos exitosos (%)
Control	4675	38.4 %
Micorrizas	4290	79.4 %
Fitohormonas	3940	32.3 %

Tabla 13.- Porcentaje de uniones yema-injerto positivas en los tres grupos estudiados.

Discusión

Para la oportuna propagación vegetativa de las plantas de pistacho es necesario un portainjertos o patrón debido a patentes dificultades para enraizar en la naturaleza. El porcentaje de éxito en el prendimiento es una cuestión determinante en la viabilidad de esta cosecha.

La elección de un portainjertos suele hacerse en función de la compatibilidad del tándem variedad/portainjerto, que depende básicamente de la región geográfica en la que se encuentre y de la eficiencia en la absorción de nutrientes (Ferguson et al., 2005a). En general, el uso de los elementos químicos por parte de la planta está muy relacionado con la eficiencia del genotipo de la raíz, variando según la elección del portainjertos (Hokmabadi et al., 2005). Nuestra hipótesis establece que modificando la capacidad de absorción del patrón, podría modificarse el balance final de la toma de nutrientes.

Para analizar esta cuestión, hemos analizado comparativamente la influencia de micorrizas y fitohormonas en la absorción de nutrientes del portainjerto *P.*

terebinthus L. en España, y por último, su posible influencia sobre el éxito del injerto de las yemas de *P. vera* L. En España, *P. terebinthus* L. es el patrón más utilizado ya que es nativo, resistente al frío, muy tolerante a la salinidad y de una especial eficiencia nutricional (Ferguson et al., 2005b).

Las especies del género *Pistacia* son muy conocidas por establecer fácilmente relaciones simbióticas con las micorrizas (Ferguson et al., 1998), no en vano, estas proveen a la planta de un sistema radicular más desarrollado y representan un aporte extra de *P* y *N*. En estas especies, las plantas micorrizadas muestran una mayor capacidad de absorción de nutrientes en diferentes regímenes de riego y condiciones de estrés salino. En todos los casos *K*, *Mn*, *P* y *Zn* fueron significativamente más acumulados en aquellas plantas asociadas con micorrizas (Kafkas & Ortas, 2009; Bagheri et al., 2012). Bagheri et al. (2012) encontraron también que tanto *Cu* como *Fe* mantienen sus niveles en las plantas micorrizadas.

Nuestro conjunto de datos confirma una acumulación significativa de *Zn*, *Mn*, *P* y *N* en las plantas micorrizadas con respecto a las plantas control y a las tratadas con fitohormonas, lo que apoya las observaciones previas. Este es un hecho importante, debido a que la disponibilidad de *P* y *N* es probablemente el aspecto más limitante en *Pistacia*, y afecta a un gran número de parámetros fundamentales para las plantas, como la eficiencia en el uso del agua, la calidad de las semillas y la resistencia a enfermedades. También el *Zn* es importante para reducir el porcentaje de frutos vacíos y el *Mn* es crucial para la fotosíntesis (Couceiro et al., 2013).

A pesar de esto, nuestros datos muestran que el *K* contaba con una concentración menor en las plantas inoculadas con micorrizas. Esta discrepancia con los datos de

Kafkas & Ortas (2009) y Bagheri et al. (2012) puede ser debida a un consumo mínimo de *K* que tendría lugar durante el crecimiento vegetativo, en el que las muestras se encontraban en aquel momento (Rosecrance et al., 1996).

Mientras que confirman las observaciones en cuanto al *Cu*, nuestros datos sugieren que el *Fe* se acumula preferentemente en las plantas micorrizadas (ver **Tabla 8**).

En el presente estudio también hemos analizado la absorción de otros elementos, mostrando que *Al, Ca, Mg, S, Sr, Ti, Tl* y *V* se habían acumulado especialmente en las plantas micorrizadas.

En el lado opuesto *C, Cr, Li, Na, Ni* y *Pb* no mostraron variaciones significativas en las medias de las plantas analizadas (**Tabla 9**). En todos los casos, las medias de los ejemplares tratados con fitohormonas fueron estadísticamente equivalentes a las de las plantas control, por lo que la mezcla utilizada parece no tener influencia en la acumulación final de los elementos (**Tabla 9** y **Figura 10**).

En otro orden de cosas, hemos realizado también un estudio de las tendencias de acumulación de algunos elementos en los tres grupos de plantas considerados en diferentes momentos antes y después el injerto.

La concentración de *Mg, Mn, Ca, B, K* y *Fe* baja durante el desarrollo de la planta (**Figura 10**). Hemos probado aquí que el tratamiento con micorrizas puede evitar esta pérdida natural de *Ca, Fe, Mg* y *Mn*, pérdida que sí fue detectada en plantas control y en aquellas con fitohormonas.

Junto con el *N*, el *Ca* es probablemente el elemento más consumido durante el desarrollo del pistacho. De hecho, el *Ca* sufrió una gran bajada de concentración durante el período vegetativo y alrededor del 70-80 % de este *Ca* termina por acumularse en la semilla (**Figura 10**).

Tanto el *Fe* como el *Mg* o el *Mn* son elementos esenciales para la fotosíntesis (Couceiro et al., 2013). Así, la influencia de las micorrizas en el desarrollo de la planta podría ser considerable.

Las fitohormonas mostraron también un pico de acumulación de *B* después del injerto, y como las micorrizas podría evitar la pérdida que se observa en las plantas control. Además, las fitohormonas podrían prevenir la pérdida de *Zn* observada en los otros dos grupos de plantas. Se cree que una administración de estas en la primera fase del proceso de crecimiento puede estimular una acumulación diferencial o alteraciones en el transporte de algunos elementos (Zhou et al., 2007; Schwarz et al., 2010).

Tomando como referencia las plantas control, la concentración de *B* y *Fe* invertirían sus tendencias a acumularse después del injerto, bajando. Estos datos sugieren que el injerto podría alterar la absorción de nutrientes en las plantas de pistacho, como había sido sugerido con anterioridad en otras plantaciones (Jensen et al., 2003; Martínez-Ballesta et al., 2010). Sin embargo, la influencia de otros factores no puede ser descartada, y futuras investigaciones serán necesarias para aclarar este aspecto.

Una mejor absorción de nutrientes podría tener sus resultados en un patrón más vigoroso. Estudios previos de correlación entre el injerto y la morfología del

portainjerto han demostrado la importancia del vigor del patrón en el desarrollo de la yema (Beede et al., 2005; Ferguson et al., 2005b; Holtz et al., 2005). El diámetro es un factor clave y se relaciona directamente con el número de injertos positivos. Los injertos entre *P. terebinthus* L./*P. vera* L., por ejemplo, son altamente dependientes del diámetro (con coeficientes de determinación $R_2 > 0,75$) al contrario que otros patrones como *P. atlantica* Desf. ($R_2 = 0,35$). Sin embargo, la altura prácticamente no afecta a la eficiencia del injerto (Guerrero, 2011).

En nuestros análisis, los valores medios de diámetro y perímetro no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, por lo que ninguno de estos dos factores afectaría al injerto. A pesar de esto, se ha sugerido que un diámetro entre 12 y 15 mm favorecería los injertos > 50 % en *P. terebinthus* L. y aumentando este factor se podrían mejorar los resultados presentes (Guerrero, 2011). Por otro lado, las plantas micorrizadas fueron significativamente más bajas que las demás (**Tabla 11**), aunque esto no parece afectar, al menos negativamente, a la eficiencia del injerto. Este hecho podría ser un efecto indirecto de la asignación de nutrientes después del injerto.

Por último, se ha comprobado visualmente el éxito de los injertos en todas las plantas. Sorprendentemente, el 79,4 % de los individuos micorrizados dieron lugar a un injerto positivo, mientras que sólo tuvieron éxito el 32,3 % y el 38,4 % en plantas con fitohormonas y control respectivamente (**Tabla 13**). Esto apoyaría los estudios de Estaun et al. (1990) quienes propusieron que la inoculación con micorrizas podría beneficiar al cultivo en España. La media de injertos positivos en Castilla-La Mancha utilizando las mismas especies es del 60 %, después de tres injertadas (Couceiro et al., 2013). A pesar de que nuestros datos se basan solo en un intento, sugieren que las plantas micorrizadas podrían aumentar la eficiencia

del injerto en al menos un 40 % con respecto a las plantas control. Además, el tratamiento con fitohormonas no afecta positivamente a dicha eficiencia.

Conclusiones

El pistacho necesita de la presencia de un patrón o portainjerto adecuado para su cultivo. La compatibilidad entre la variedad y este es esencial para el éxito de la crianza. El efecto de los tratamientos con micorrizas y fitohormonas en la absorción de nutrientes y, por lo tanto, en el injerto han sido analizados en este trabajo utilizando *P. terebinthus* L. como patrón y *P. vera* L. como variedad injertada. Aproximadamente el 80 % de las plantas micorrizadas dieron lugar a injertos positivos, mientras que sólo el 32,3 % y el 38,4 % en plantas con fitohormonas y control, respectivamente, lo hicieron.

Setenta y siete días después del tratamiento, las plantas micorrizadas mostraron un aumento de *Ca, Fe, Mg, N, Al, S, Sr, Ti, V, Mn, Tl* y, una bajada de *K* con respecto a aquellas tratadas con fitohormonas y las plantas control. El tratamiento con micorrizas además obstaculiza la pérdida de *B, Ca, Fe, Mg* y *Mn*, e influenciaría el porcentaje de injertos positivos. Excepto en el caso del *B*, los valores medios de todos los elementos químicos fueron estadísticamente similares entre el grupo control y el que sufría un tratamiento con fitohormonas, por lo que la mezcla analizada aquí no afecta ni a la acumulación final de elementos ni al éxito del injerto.

Por otro lado, aunque el perímetro y el diámetro del tronco fue similar en todos los casos, las plantas micorrizadas tenían una estatura significativamente menor.

Por lo tanto, proponemos la utilización de plantas de *P. terebinthus* L. micorrizadas como portainjertos, lo que podría aumentar la eficiencia del injerto en al menos un 40 % con respecto a las plantas control.

CAPÍTULO 4.-

Caracterización molecular del híbrido interespecífico *Pistacia x* VIGROS (*P. vera* L. x *P. atlantica* Desf.).

RESUMEN

Como ya ha quedado patente en apartados anteriores de esta Memoria, para favorecer la propagación vegetativa de *P. vera* L., cuyo fruto comestible y explotado comercialmente es el pistacho, es imprescindible el uso de un portainjerto. La compatibilidad entre la yema y el pie de planta es el factor más importante a considerar antes de establecer cualquier nuevo cultivo. Se están haciendo grandes esfuerzos para caracterizar nuevos portainjertos, probar combinaciones alternativas de yema-pie de planta, y para entender los mecanismos que controlan el prendimiento de los injertos, de manera que se mejore la eficiencia de este cultivo.

En este contexto, se ha caracterizado una nueva variedad de *Pistacia*, VIGROS, utilizando marcadores nucleares y cloroplastidiales. Los marcadores nucleares (ITS1, 5.8S, ITS2 ribosómicos) determinaron que VIGROS es un híbrido interespecífico entre *P. vera* L. y *P. atlantica* Desf. Los marcadores cloroplastidiales (regiones trnC-D y trnL-F) demostraron que VIGROS tiene un haplotipo que coincide en un 100% con el de *P. vera*, al que consideramos entonces el parental femenino, mientras que *P. atlantica* sería el parental masculino. Debido a que

cuenta con un fenotipo muy vigoroso, VIGROS es un portainjerto prometedor. Además, este artículo demuestra la validez de este set de marcadores moleculares para caracterizar híbridos interespecíficos de *Pistacia*.

El desarrollo de este capítulo ha dado como resultado la publicación del siguiente artículo:

Molecular characterization of the interspecific hybrid Pistacia VIGROS (P. vera L. x P. atlantica Desf.).

Cristina Aznarte-Mellado, Pedro J. Sola-Campoy, Francisca Robles, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez.

Scientia Horticulturae, (2014) 179:180-183.

Introducción

Como muchos otros árboles frutales, *P. vera* L. presenta ciertas dificultades de enraizamiento en lugares donde no es autóctona, necesitando el uso de un portainjertos o patrón para facilitar su desarrollo vegetativo. El factor más relevante que determina la viabilidad de este cultivo es la elección de un tándem variedad/patrón apropiado, por lo que debe ser considerado previamente y con detenimiento para cada caso (Ferguson et al., 2005). *P. atlantica* Desf., *P. integerrima* Stewartson, *P. vera* L. y *P. terebinthus* L. son algunos de los portainjertos más utilizados en todo el mundo. Además, UCB1 y PGII (dos híbridos interespecíficos de *P. atlantica* x *P. integerrima*) son también utilizados (Couceiro et al., 2013; Ferguson et al., 2005). La aparición de híbridos dentro del género *Pistacia* es muy frecuente y está bien documentada (Zohary, 1952), no existiendo evidencias de incompatibilidad entre sus especies (Parfitt, 2003). Estos híbridos, presentan, a veces, rasgos mejorados de sus progenitores, lo que podría convertirlos en portainjertos más apropiados.

Entre las características que influyen de forma crucial en el éxito del injerto y por tanto del cultivo, destacan el vigor de la planta, el perímetro del tronco y su diámetro, así como otros factores más relacionados con las condiciones particulares de la zona de cultivo, como la resistencia al frío y a las enfermedades (Guerrero, 2011).

Analizado con más detalle, UCB1 proviene de la polinización cerrada entre un espécimen femenino seleccionado de *P. atlantica* y un macho de *P. integerrima*, y fue obtenido en la Universidad de Berkeley (California, EEUU) en 1960 (Ferguson, 2008). PGII (Pioner Gold II) proviene de los mismos progenitores, pero en este

caso es el resultado de la polinización abierta entre una población de hembras de *P. atlantica* y una de árboles macho de *P. integerrima*. El vigor de ambas variedades se considera superior al de *P. atlantica*, y generalmente, igual o mayor que el de *P. integerrima*. Además, UCB1 es altamente resistente a la infección con *Verticillium dahliae* K. (Ferguson et al., 2005).

En el Centro Agrario el Chaparrillo (CAC), en Castilla-La Mancha, se han desarrollado otros híbridos interespecíficos mediante polinización cerrada de *P. terebinthus* con *P. integerrima*, *P. vera* y *P. atlantica*. Todos los cruces tienen fenotipos vigorosos, proporcionan altas *ratios* en el éxito del injerto y son resistentes al frío, excepto *P. terebinthus* x *P. integerrima* (Couceiro et al., 2013). También, han sido producidos por polinización abierta híbridos de *P. vera* x *P. atlantica*, con semillas más grandes y un buen vigor, y *P. vera* x *P. terebinthus*, con un periodo inicial muy vigoroso (Couceiro et al., 2013).

A pesar de que las condiciones climáticas en España son favorables para el cultivo del pistacho, nuestro país está aún muy por detrás de la mayor parte de los principales productores, con tan sólo 5.000 Ha cultivadas (Couceiro et al., 2013). En este sentido, cualquier esfuerzo en la caracterización y evaluación de nuevos portainjertos beneficiará significativamente a los productores, para los que la baja tasa de éxito en el injerto es la preocupación principal.

Esta tasa se sitúa en un 60 % de media en Castilla-La Mancha con *P. terebinthus* como portainjertos, después de tres injertadas (Couceiro et al., 2013).

En este contexto, mediante el uso de marcadores nucleares y cloroplastidiales hemos caracterizado VIGROS, una nueva variedad de *Pistacia* que, debido a un fenotipo muy vigoroso tiene potencial para ser utilizado como patrón en nuestro país.

Resultados y Discusión

Análisis filogenéticos utilizando secuencias de ADN ribosómico

Se alinearon un total de 34 secuencias ribosómicas pertenecientes a 12 especies del género *Pistacia*, junto a seis secuencias de VIGROS y una secuencia de *Schinus molle* L., utilizado como *outgroup* (**Tabla 3**). La matriz de distancias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 tuvo una longitud de 682 pb debido a la inclusión de *gaps*, con un rango entre los 646 y los 659 pb de *P. x saportae* y *P. weinmannifolia* Poisson, respectivamente. La divergencia principal entre todas las secuencias fue 0,042 (0,039 si se excluía el *outgroup*).

Un análisis de máxima verosimilitud mostró árboles con una topología que no sólo apoya la monofilia del grupo, sino que además agrupa secuencias según su afiliación taxonómica (**Figura 6**). De hecho, podemos clasificar las secuencias en dos grandes clados: Lentiscus y Terebinthus, como se ha señalado en otros estudios (Yi et al., 2008).

Por un lado, en el grupo Lentiscus, las secuencias están divididas en tres subclados; *P. mexicana*/*P. texana*, *P. lentiscus* y *P. weinmannifolia*.

Por otro lado, en el grupo Terebinthus se encuentran cuatro subclados; *P. terebinthus*/*P. palaestina*, *P. chinensis*/*P. integerrima*, *P. atlantica* y *P. vera*/*P. khinjuk* (**Figura 6**).

Es remarcable el hecho de que cuatro secuencias de VIGROS (1, 2, 4 y 8) se agrupen con las secuencias del subclado al que pertenecen *P. vera*/*P. khinjuk* y que las otras tres secuencias (3, 5 y 7) lo hagan con las secuencias del subclado de *P. atlantica* (**Figura 12**). VIGROS-2, 4 y 8 mostraron un 100 % de identidad con las secuencias 1-3 de *P. vera*, mientras que VIGROS-3, 5 y 7 mostraron un 99,1 % de identidad con las secuencias 1-3 de *P. atlantica* (**Figura 12**).

Los híbridos pueden mantener copias de ambos alelos parentales en sus genomas, lo cual puede ser detectado mediante la clonación y secuenciación. Asumiendo esto, Yi et al. (2008) determinaron la naturaleza híbrida de *P. x saportae* (*P. lentiscus* x *P. terebinthus*), aislando diferentes variantes de secuencias ribosómicas. Como se muestra en la **Figura 12**, algunas secuencias de *P. x saportae* mostraban identidad con *P. lentiscus* (98,3 % de identidad), mientras que otras se agruparon en el subclado perteneciente a *P. terebinthus*/*P. palaestina* (con un 99,7 % de identidad). Esto confirmó las observaciones previas de Werner et al. (2001) utilizando RAPDs.

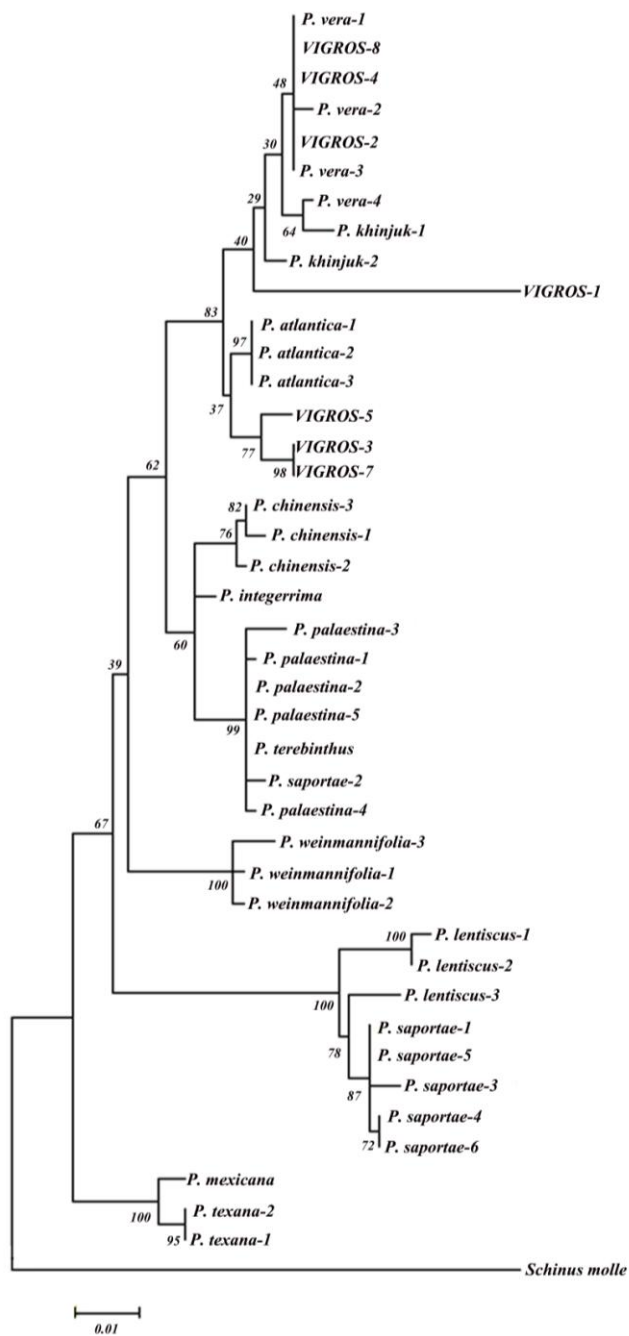


Figura 12.- Árbol de máxima verosimilitud basado en secuencias de ADN ribosómico. Los números en cada nodo indican los valores de bootstrap.

Por este motivo, VIGROS puede ser considerado como un cruce interespecífico entre *P. vera* x *P. atlantica*. Las características morfológicas de las semillas obtenidas en el CAC (España), procedentes del híbrido de polinización abierta *P. vera* x *P. atlantica* apoyarían esta opinión (Couceiro et al., 2013). Además, tratamos de determinar el género de las especies involucradas en el cruce del que procede VIGROS. Esta información sobre el híbrido del CAC no ha sido encontrada.

Determinación del parental femenino utilizando secuencias de ADN cloroplastidial

Se utilizaron secuencias cloroplastidiales para determinar el género de los progenitores de VIGROS. Para ello, se secuenciaron las regiones trnC-D y trnL-F de VIGROS y se compararon con las secuencias de otras 12 especies del género *Pistacia* y del *outgroup* (*S. molle*) (**Tabla 3**).

VIGROS mostró un haplotipo 100 % coincidente con el de *P. vera*. Además, un sitio diagnóstico (la posición 466 de la región trnC-D) diferenciaba a *P. vera* y VIGROS del resto de las especies (**Figura 13**). Esto, junto con los datos comentados anteriormente, apoya la idea de que *P. vera* es el parental femenino, mientras que *P. atlantica* es el masculino. VIGROS ha sido protegido por la CPVO (Community Plant Variety Office) bajo el número de referencia 2012/1925 (CPVO Gazette, 2012). Desafortunadamente, con los datos de que disponemos, no es posible determinar si el cruce se produjo naturalmente o el híbrido se ha naturalizado de una plantación ya establecida.

```

Pistacia x vigros          TTCCAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia vera-1          TTCCAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia vera-2          TTCCAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 494
Pistacia khinjuk         TTCCAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 486
Pistacia atlantica-1    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia atlantica-2    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia atlantica-3    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia chinensis-1    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia chinensis-2    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 487
Pistacia chinensis-3    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia integerrima    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia palaestina-1   TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia palaestina-2   TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia palaestina-3   TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia terebinthus    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia saportae-1     TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia saportae-2     TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia lentiscus-1    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia lentiscus-2    TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia weinmannifolia TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia mexicana       TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 494
Pistacia texana-1       TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 500
Pistacia texana-2       TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 499
Schinus molle           TTCCAAGAAAAGTGTGACTGCGTATTTGTTAATGTTCCCGATTCTA 497
*****

```

Figura 13. Alineamiento parcial de la región trnC-D, mostrando la posición de diagnóstico (466) para *P. x VIGROS* y *P. vera* (sombreado).

Estudios preliminares de campo han demostrado que VIGROS es una variedad enormemente vigorosa con una significativamente alta tasa de germinación y crecimiento rápido, y su potencial para ser utilizado como portainjertos está actualmente siendo evaluado (Viveros Zuaimé, *comunicación personal*).

El pistacho necesita un patrón o portainjertos para mejorar su propagación vegetativa, ya que como otros muchos árboles frutales, es un cultivo con un lento desarrollo radicular. Además, el porcentaje de éxito en el injerto es seguramente el factor más decisivo en la viabilidad de una plantación (Ferguson et al., 2005). Por lo tanto, aumentando el número de patrones disponibles con la caracterización y ensayo de campo de nuevas variedades, crecería también enormemente el beneficio de los productores.

Por último, los resultados aquí presentados demuestran que el uso combinado de marcadores ribosómicos y cloroplastidiales constituye una herramienta muy útil en la caracterización de híbridos en este grupo de especies.

Conclusiones

Utilizando diferentes marcadores moleculares hemos caracterizado VIGROS, una nueva variedad de *Pistacia*. Las secuencias de ADN ribosómico (ITS1, 5.8S, ITS2) demostraron que esta variedad fue obtenida mediante un cruce interespecífico entre *P. vera* y *P. atlantica*.

Los marcadores cloroplastidiales (regiones trnC-D y trnL-F) muestran que el haplotipo de VIGROS es idéntico al de *P. vera*, compartiendo también una posición de diagnóstico que los diferencia del resto de especies de *Pistacia*. Esto sugiere que *P. vera* es el parental femenino, mientras que *P. atlantica* es el masculino.

Dado que conocemos los parentales, esta variedad podría ser reproducida y propagada mediante polinización cerrada, que debido a que posee un fenotipo muy vigoroso, está siendo probada como portainjertos para el cultivo del pistacho.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1.- Comparación entre dos portainjertos: *Pistacia atlantica* Desf. vs *Pistacia terebinthus* L.

PRIMERA.- En este bloque hemos analizado comparativamente la eficiencia en la adquisición de nutrientes de dos de los portainjertos más usados, *Pistacia terebinthus* L. y *Pistacia atlantica* Desf. Para ello analizamos la concentración en hoja de 30 elementos químicos diferentes. Para 18 de los elementos no se observaron diferencias significativas, tanto a nivel intraespecífico como interespecífico.

Para los 12 elementos restantes, no se apreciaron diferencias de absorción entre individuos del mismo portainjertos, pero sí se detectaron diferencias significativas entre individuos de distintos portainjertos. Concretamente, *Pistacia atlantica* Desf. mostró concentraciones mayores de *B, Ca, Sr, Fe, Li, Mg, Tl* y *V*, mientras que *C, N, P* y *Na* presentaron una concentración foliar mayor en *Pistacia terebinthus* L.

SEGUNDA.- Nuestros datos sugerirían que las diferencias encontradas en la acumulación de nutrientes se deben al patrón utilizado, y que por tanto *Pistacia atlantica* Desf. es un portainjertos más eficiente que *Pistacia terebinthus* L. en cuanto a la absorción de nutrientes se refiere. Entre éstos se encuentran varios macronutrientes (*Ca* y *Mg*), que suministran una mayor proporción de energía al individuo y que están en una mayor cantidad en la planta, y micronutrientes (*B* e *Fe*), generalmente presentes en una dosis mucho menor.

TERCERA.- No obstante lo dicho, no se puede obviar que aunque nuestros muestreos fueron realizados en el mismo periodo del año, las muestras procedían de lugares distintos (es decir, suelos con características probablemente distintas) y de pies de planta de distinta edad, por lo que futuras investigaciones serán necesarias para aclarar completamente la influencia del portainjertos en la absorción de nutrientes.

CAPÍTULO 2.- Comparación entre variedades de pistacho de la eficiencia en la adquisición de nutrientes.

CUARTA.- En este bloque hemos analizado comparativamente la eficiencia en la adquisición de nutrientes de cinco variedades de pistacho (las variedades macho 'M38', 'G1' y 'Mateur macho', y las variedades hembra 'Batoury' y 'Joley') injertadas sobre *Pistacia atlantica* Desf. Para ello analizamos la concentración en hoja de 30 elementos químicos diferentes. Todas las variedades mostraron niveles de absorción equivalentes para 20 de esos elementos (*Al, B, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, N, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, Ti, Tl, V y Zn*).

QUINTA.- Sólo variedad 'Mateur macho' mostró valores estadísticamente significativos de acumulación de *Ca* y disminución de *C*. En plantas, se asocia una alta concentración de *Ca* con la presencia de tejidos senescentes y una alta tasa de *C* con la producción de tejido foliar. Nuestros datos, por tanto, confirmarían que 'Mateur macho' es la más temprana de todas las comparadas en este estudio, siendo la primera en mostrar síntomas de senescencia. Así, las diferencias en absorción de nutrientes observadas serían debidas al estado fisiológico de las plantas más que a la variedad en sí.

SEXTA.- Las plantas usadas para este análisis proceden de una colección de variedades de pistacho que se usa con propósitos no productivos, por las plantas son objeto de frecuentes podas. Este hecho impediría en gran medida la floración y fructificación, lo que nos ha permitido analizar la eficiencia en la absorción de nutrientes por parte de las plantas eliminando la interferencia de estructuras que

requieren de gran cantidad de nutrientes. La ausencia de diferencias entre variedades en estas condiciones, sugiere nuevamente que el estado fenológico de la planta es más relevante en cuanto a la adquisición de nutrientes que la variedad a la que pertenezca la misma.

CAPÍTULO 3.- Modificación de la eficiencia en la adquisición de nutrientes.

SÉPTIMA.- El cultivo del pistacho requiere de la presencia de un patrón en el que se injertan las yemas de las distintas variedades. En este contexto, y usando *Pistacia terebinthus* L. como patrón, en este bloque hemos analizado la influencia en la captación de nutrientes del micorrizado y el tratamiento con fitohormonas de plantas de pistacho y su influencia en el porcentaje de éxito del prendimiento de los injertos. Las plantas micorrizadas mostraron un incremento estadísticamente significativo en *Ca, Fe, Mg, N, Al, S, Sr, Ti, V, Mn, Tl*, así como una disminución estadísticamente significativa de *K*, setenta y siete días después del tratamiento con respecto a las plantas fitohormonadas y las plantas control.

OCTAVA.- El perímetro y el diámetro de las plantas micorrizadas, fitohormonadas y control se mantuvo similar durante el experimento. Sin embargo, las plantas micorrizadas mostraron significativamente una talla menor que el resto de plantas.

NOVENA.- Aproximadamente un 80% de las plantas micorrizadas dieron lugar a prendimientos positivos, mientras que sólo el 32,3% and 38,4% de las plantas tratadas con fitohormonas y plantas controles, respectivamente, dieron lugar al mismo resultado. Por lo tanto, el uso de portainjertos de *Pistacia terebinthus* L. micorrizados podría aumentar la eficiencia del prendimiento hasta en un 40%.

CAPÍTULO 4.- Caracterización genética de híbridos interespecíficos de *Pistacia*.

DÉCIMA.- En este bloque hemos determinado genéticamente la procedencia de unas semillas de *Pistacia*. Para ello, hemos utilizado marcadores moleculares nucleares correspondientes a las secuencias de ADN ribosómico ITS1, 5.8S e ITS2, así como marcadores cloroplastidiales correspondientes a las regiones trnL-F y trnC-D. Los datos aquí obtenidos demostrarían que las semillas estudiadas se corresponderían con un híbrido interespecífico entre las especies *P. vera* L. y *P. atlantica* Desf.

UNDÉCIMA.- Los marcadores cloroplastidiales demostraron que este híbrido presenta un haplotipo idéntico al existente en *P. vera* L., con la que además comparte posiciones diagnóstico que las diferencias de otras especies. Esto sugeriría que *P. vera* L. es el parental femenino, mientras que *P. atlantica* Desf. es el parental masculino. Esta variedad fue protegida por la Oficina Europea para la Protección de Variedades Vegetales bajo la denominación de VIGROS.

Y DUODÉCIMA.- Esta combinación de marcadores moleculares ha demostrado ser efectiva para la determinación de la procedencia de los parentales de híbridos interespecíficos de *Pistacia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackerfield, J.R., Wen, J., 2003.** Evolution of *Hedera* (the ivy genus, *Araliaceae*): insights from chloroplast DNA data. *Int. J. Plant Sci.*, 164:593–602.
- Ali, M. A., Gyulai, G., Hidvégi, N., Kerti, B., Al Hemaïd, F. M. A., Pandey, A.K., Lee, J., 2014.** The changing epitome of species identification – DNA barcoding. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21: 204-231.
- Allen, J.F., Raven, J.A., 1996.** Free-radical-induced mutation versus redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J. Mol. Evol.* 42:482-492.
- Alvarez Fernández, I., Wendel, J.F., 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 417-434.
- Al-Saghir, M.G., 2009.** Evolutionary History of the Genus *Pistacia* (Anacardiaceae). *International Journal of Botany*, 5: 255-257.
- Al-Saghir, M. G., 2010.** Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) based on morphological data. *Asian J. Plant Sci.*, 9:28-35.
- Amirteimoori, S., Chizari, A., 2008.** An investigation of comparative advantage of pistachio production and exports in Iran. *JAST*, 10:395-403.
- Andersson, L., Rova, J.H.E., 1999.** The rps16 intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Syst. Evol.*, 214:161–186.
- Ashworth, J. 1985.** Verticillium resistant rootstock research. Annual Report of the Californian Pistachio Industry. Fresno, CA. pp. 54-56.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-2402.

Ayaz, E., Namli, S., 2009. The karyotype analysis of *Pistacia vera* L. from Turkey. *Nat Prod Res*. 23(9): 866 -70.

Azcón-Bieto, J., Talón, M., 2002. Fundamentos de fisiología vegetal. Auxinas, Giberelinas, Citoquininas. McGraw Hill/Interamericana. España.

Bagheri, V., Shamshiri, M.H., Shirani, H., Roosta, H.R., 2012. Nutrient Uptake and Distribution in Mycorrhizal Pistachio Seedlings under Drought Stress. *J. Agr. Sci. Tech.*, 14:1591-1604.

Baldwin, B., Sanderson, M., Porter, M., Wojciechowski, M., Campbell, C.M., Donoghue, M., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82(2): 247-277.

Barciszewska, M., Mashkova, T., Kisselev, L. & Barciszewski, J., 1985. The primary structure of maize and tobacco 5S rRNA. *FEBS Lett.*, 192: 289-293.

Barker, A.V., Pealbeam, D.J., 2007. Handbook of plant nutrition. Florida: Taylor & Francis Group, LLC.

Baum, D.A., Small, R.L., Wendel, J.F., 1998. Biogeography and floral evolution of baobabs (*Adansonia*, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets. *Syst. Biol.*, 47:181–207.

Beede, R.H., Ferguson, L., Wylie, Ch., Fanucchi, C., 2005. Planting and training young trees, in: Ferguson, L. (Eds.), *Pistachio Production Manual*, University of California, pp 57-59.

Behboudian, N. M., Walker, R. R., Torokfalvy, E., 1986. Effects of water stress and salinity on photosynthesis of Pistachio. *Scientia Horticulturae*. 29:251-261.

Bena, G., Prosperi, J.M., Lejeune, B., Olivieri, I., 1998. Evolution of annual species of the genus *Medicago*: A molecular phylogenetic approach. *Mol. Phisiogenet. Evol.* 9: 552-559.

Besansky, N.J., Severson, D.W., Ferdig, M.T., 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends Parasitol.*, 19:545–546.

Brown, P. H., Zang, Q., Ferguson, L., 1994. Influence of rootstock on nutrient acquisition by pistachio. *Journal of Plant Nutrition*. 17(7): 1137-1148.

Camprubi, A., Estaún, V., Calvet, C., 1992. Effect of aromatic plant species on vesicular-arbuscular mycorrhizal establishment in *Pistacia terebinthus*. *Plant and Soil*. 139(2): 299-301.

Cárdenas-Hernández, J., Álvares-Herrera, J., Barragán, E., Rivera, C., 2010. Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas en injertos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agronomía Colombiana*. 28(1):19-27.

Caruso, T., Di Marco, L., Raimondo, A., Tattini, M., 1990. Seasonal variations of macro and micronutrient elements in the reproductive organs of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Programme de recherche Agrimed. Recueil des communications, Nimes (France)*, pp 353-359.

Caruso, T., Barone, E., Marra, E. P., Sottile, F., La Mantia, M., De Pasquale, C., 2005. Effects of rootstock on growth, yield and fruit characteristics in cv. 'Bianca' pistachio (*Pistacia vera* L.) trees. Oliveira M. M. (ed.), Cordeiro V. (ed.). XIII GREMPA Meeting on Almonds and Pistachios. Pp. 117-122.

Chahed, T., Bellila, A., Dhifi, W., Hamrouni, I., M'Hamdi, B., Kchouk, M., Marzouk, B., 2008. Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects. *Grasas y Aceites*, 59(1):51-56.

Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N., Savolainen, V., 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long term goals. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 360 :1889–1895.

Cho, R.J., Fromont-Racine, M., Wodicka, L., Feierbach, B., Stearns, T., Legrain, P., Lockhart, D.J., Davis, R.W., 1998. Parallel analysis of genetic selections using whole genome oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(7):3752-7.

Cho, S., Jin, S.W., Cohen, A., and Ellis, R.E., 2004. A phylogeny of *Caenorhabditis* reveals frequent loss of introns during nematode evolution. *Genome Res.* *14*, 1207–1220.

Clegg, M. T., Gaut, B. S., Learn, G. H., Morton, B. R., 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* *91*: 6795-6801.

Crane, J. C., Iwakiri, B. T., 1987. Pistachio yield and quality as affected by rootstock. *Annual Report of the Californian Pistachio Industry.* Fresno, CA. pp. 86-88.

Couceiro, J.F., 1992. Estudios sobre Adaptación y Comportamiento del Pistachero (*Pistacia vera* L.) e Higuera (*Ficus carica* L.). Período 1988-1991. Conserjería de Agricultura de la Junta de Comunidad de Castilla La Mancha. Investigación Agraria.

Couceiro, J.F., Guerrero, J., Gijón MC., Pérez-López, D., Moriana, A., Rodríguez, M., 2013. El Cultivo del Pistacho. Spain: Ediciones Paraninfo S.A.

Cuñado, N., Garrido-Ramos, M.A., de La Herrán, R., Ruíz-Rejón, C., Ruíz-Rejón, M., Santos, J.L., 2000. Organization of repetitive DNA sequences at pachytene chromosomes of gilthead seabream *Sparus aurata* (Pisces, Perciformes). *Chromosome Res.* *8*: 67–72.

CVPO Gazette. 2012. Official Gazette of the Community Plant Variety Office. 6:53.

Desfeux, C., Lejeune, B., 1996. Systematics of *Euromediterranean Silene* (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequences. C. R. Acad. Sci. Paris. 319: 351-358.

Dodd, I.C., Ruiz-Lozano, J.M., 2012. Microbial enhancement of crop resource use efficiency. Curr Opin Biotechnol. 23:236-242.

Downie, S.R., Katz-Downie, D.S., 1999. Phylogenetic analysis of chloroplast rps16 intron sequences reveals relationships within the woody southern African Apiaceae subfamily Apioideae. Can. J. Bot., 77:1120–1135.

Embleton, T. W., Jones, W. W., Labanauskas, C. H., Bitters, W. P., 1973. Leaf analysis as a diagnostic tool and guide to fertilization, pp. 183-210 and 447-495. IN: W. Reuther (ed.) The Citrus Industry. Volume 3. Division of Agricultural Science, University of California, Berkeley, CA.

Epstein, L., Beede, R., Kaur, S., Ferguson, L., 2004. Rootstock Effects on Pistachio Trees Grown in Verticillium dahliae-Infested Soil. Phytopathology. Vol. 94: 388-395.

Ercisli, S., 2004. A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. Genet. Resour. Crop Evol., 51: 419-435.

Estaun, V., Calvet, C., Camprubi., A., 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Pistacia* sp. symbiosis 9: 309–313.

Favier, J.C., Ireland-Ripert, J., Toque, C., Feinberg, M., 1995. Répertoire général des aliments. Table de composition. 2nd ed. Lavoisier Technique & Documentation, INRA Éditions, Paris, France.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 39:783-791.

Ferguson, L., Beede, R. H., Reyes, H., Metheney, P., 2002. California pistachio rootstocks evaluations. *Acta Hort. (ISHS)* 591:63-66.

Ferguson, L., Beede, R.H., Haviland, D.R., Holtz, B.A., Kallsen, C.E., Sanden, B.L., 2008. Pistachio production manual. 5th Edition, Omnipress, Madison, WI.

Ferguson, L., Kaur, S., Epstein, L., 1998. Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Pistachio Rootstocks in California. *ISHS. Acta Horticulturae*, 470: 211-218.

Ferguson, L., Sanden, B., Grattan, S., Epstein, L., Krueger, B., 2005a. Pistachio rootstocks, in: Ferguson, L. (Eds.), *Pistachio Production*. University of California, pp. 67-73.

Ferguson, L., Sanden, B., Grattan, S., Epstein, L., Krueger, B., 2005b. Rootstocks Production and Budding, in: Ferguson, L. (Eds.), *Pistachio Production*. University of California, pp. 74-79.

Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Chicca, M., Rossi, R., 2003. Chromosomal mapping of 18S, 28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. *Genome*. 46(3): 473-477

Food and agriculture organization of the United Nations database. FAOSTAT website 2013 [cited 2015 February 10]; Available from: URL: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>

Friedman, M., 1937. The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. *J. Am. Statist. Assoc.*, 32(200):675-701.

Garrido, M.A., Jamilena, M., Lozano, R., Ruíz Rejón, C., Ruíz Rejón, M., Parker, J.S., 1994. rDNA site number polymorphism and NOR inactivation in natural populations of *Allium schoenoprasum*. *Genetica*, 94: 67-71.

Ghaffari, S. M., Harandi, O. F., 2002. Chromosome counts and assessment of two heterochromatic chromosomes in some species of *Pistacia* L. from Iran. *Acta Hort.*, 591: 389-393.

Gielly, L., Taberlet, P., 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11(5): 769-777.

Glöckner, G., Rosenthal, A., Valentin, K., 2000. The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J. Mol. Evol.* 51:382-390.

Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Wang, Z.S., Khadha, D.K., Saunders, J.A., Kostukovsky, V., Rowland, L.J., 2004. Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. *Plant Syst Evol.* 246:9–18.

Guerrero J., 2011. Comportamiento varietal del pistachero (*P. Vera* L.) y respuesta agronómica del portainjerto autóctono *P. terebinthus* L. en Castilla-La Mancha. Doctoral Thesis, Universidad Politécnica de Madrid, Spain.

Guerrero, J., Moriana A., Couceiro J.F., 2005. El pistachero: elección de variedad y portainjerto en Castilla La Mancha. *Fruticultura Profesional*. 150: 5-24.

Guerrero Villaseñor, J., Gijón López, M., Pérez López, D., Couceiro López, J., 2010. Edafological requirements and plant material for pistachio cultivation (in Spanish). *Agricultura*, 931:558-562.

Gyulai, G., Szabó, Z., Wichmann, B., Bittsánszky, A., Waters Jr., L., Tóth, Z., Dane, F., 2012. Conservation genetics – Heat Map analysis of nuSSRs of a DNA of archaeological watermelons (Cucurbitaceae, *Citrullus l. lanatus*) compared to current varieties. *Genes Genom. Genom.* 6 (S11): 86–96.

Hallick, R., Hong, L., Drager, R., Favreau, M., Monfor, A., Orsat, B., Spielmann, A., Stutz, E., 1993. Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research*. 21:3537-3544.

Harmankaya, M., Ozcan, M., Juhaimi, F., 2014. Mineral contents and proximate composition of *Pistacia vera* kernels. *Environ Monit Assess*, 186(7):4217-21.

Hepper, F.N., 1992. Pflanzenwelt der Bibel. Eine illustrierte Enzyklopadie. Deutsche Bibelgesellschaft, Stuttgart.

Heslop-Harrison, Y., 2000. Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in perspective. *Annals of Botany*. 85 (Supp A): 5-13

Higgins, D. G., Sharp, P. M., 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. 73: 237-244.

Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C.R., Meng, B.Y., 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217:185-194.

Hobman, F.R., Bass, A.W., 1986. Pistachio growing in Australia. Primary Protection of Pistachios. South Australian Department of Agriculture.

Hokmabadi H., Arzani, K., Grierson, P.F., 2005. Growth, chemical composition, and carbon isotope discrimination of pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstock seedlings in response to salinity. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 135–144.

Holtz, B., Ferguson, L., Parfitt D., Allen, G.E., Radoicich, 2005. Rootstock production and Budding, in: Ferguson, L. (Eds.), *Pistachio Production Manual*. University of California, pp. 74–79.

Howe, C.J., Beanland, T.J., Larkum, A.W.D., Lockhart, P.J., 1992. Plastid origins. *Trends in Ecology and Evolution*. 7:378-383.

Huang, S. F., Zhao, Z. F., Chen, Z. Y., Chen, S. J., Huang, X. X., 1989. Chromosome counts on hundred species and infraspecific taxa. *Acta Bot. Austro. Sin.*, 5: 161-176.

Ila, H. B., Kafkas, S., Topaktas, M., 2003. Chromosome numbers of four *Pistacia* (Anacardiaceae) species. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 78: 35-38.

Jensen, P.J., Rytter, J., Detwiler, E.A., Travis, J.W., McNellis, T.W., 2003. Rootstock effects on gene expression patterns in apple tree scions. *Plant Mol. Biol.* 493:394-511.

Jonasson, S., Medrano, H., Flexas, J., 1997. Variation in leaf longevity of *Pistacia lentiscus* and its relationship to sex and drought stress inferred from leaf δ C13. *Funct. Ecol.* 11:282-289.

Jordan, M., Casaretto, J., 2006. Capítulo XV: Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. In *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Jordan, W.C., Courtney, M.W., Neigel, J.E., 1996. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). *Am. J. Bot.*, 83:430-439.

Jukes, T. H., Cantor, C. R., 1969. Evolution of protein molecules. 21-132 in: Munro, H. D. (ed) *Mammalian protein metabolism*. Academic press, New York.

Kafkas, S., Ortas, I., 2009. Various Mycorrhizal fungi enhance dry weights, P and Zn uptake of four *Pistacia* species. *Journal of Plant Nutrition*. 32:146-159.

Kafkas, S., Perl-Treves, R., 2002. Interspecific relationships in *Pistacia* based on RAPD fingerprinting. *HortScience*. 37(1):168-171.

Kashaninejad, M., Mortazavi, A., Safekordi, A., Tabil, L., 2005. Some physical properties of pistachio (*Pistachio vera* L.) nut and its kernel. *Journal of Food Engineering*, 72(1):30–38.

Kress, J.W., Wurdack, J.K., Zimmer, E.A., Weigt, A.L., Janzen, H.D., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:8369–8374.

Kowallik, K.V., Stoebe, B., Schaffran, I., Kroth-panic,P., Freier,U., 1995. The chloroplast genome of a chlorophyll a+c-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol.Biol.Rep.* 13: 336-342.

Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. B., Nei, M., 2001. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Kyndt, V.T., Bouibede-Hocine, K., Esswein, C., 2005. Counting and Enumeration Complexity with application to multicriteria scheduling, *4'OR*, 3(1):1-21.

Lambert, D.M., Baker, A., Huynen, L., Haddrath, O., Hebert, P.D.N., Millar, C.D., 2005. Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? *J. Hered.* 96: 279–284

Lapitan, N.L.V., 1992. Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome* 35: 171–181.

Lavrov, D.V., Lang, B.F., 2005. Poriferan mtDNA and animal phylogeny based on mitochondrial gene arrangements. *Systematic Biology*. 54:651-659.

Learn, G. H. J., Shore, J. S., Furnier, G.R., Zurawski, G., Clegg, M. T., 1992. Constraints on the evolution of plastid introns: the group II intron in the gene encoding tRNA-Val(UAC). *Molecular Biology and Evolution*. 9: 856–871.

Lewin, B., 2007. *Genes IX*. Oxford University Press Inc., New York.

López, J., Moriana, A., Ubillos, M., Villaseñor, J., 2005. Varieties of pistachio cultivated in Castilla-La Mancha (in Spanish). *Vida rural*, 93:46-50.

Luo, Q.Y., 1996. Study on chemical composition and utilization of tannins in *P. chinensis* leaf. *Chem indust forest product*, 16: 61-63.

Manen, J.F., Boulter, M.C., Naciri-Graven, Y., 2002. The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data. *Plant Syst. Evol.*, 235:79–98.

Mansion, G., Struwe, L., 2004. Generic delimitation and phylogenetic relationships within the subtribe Chironiinae (Chironieae: Gentianaceae), with special reference to *Centaurium*: evidence from nrDNA and cpDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 951–977.

Martin, W., Herrmann, R.G., 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens and why? *Plant Physiology*. 118(1):9-17.

Martínez-Ballesta, M.C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., Carvajal, M., 2010. Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Sci. Hort.* 127:112-118.

Martins, C., Galetti, J.P.M., 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*. 44(5): 903-910.

Mehlenbacher, S.A., 2003. Progress and prospects in nut breeding. *Acta Hort.* 622:57–79.

Miller, J. R., Hayward, D. C., Glover, D. M., 1983. Transcription of the “non-transcribed” spacer of *Drosophila melanogaster* rDNA. *Nucl. Acids Res.* 11:11-19.

Miyashima, S., Nakajima, K., 2011. The root endodermis: A hub of developmental signals and nutrient flow. *Plant Signaling & Behavior* 6:12.

Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R., Vogler, A.P., 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 360:1925–1933.

Morgan, D.P., Epstein, L., Ferguson, L., 1992. Verticillium wilt resistance in pistachio rootstock cultivars. Assays and an assessment of two interspecific hybrids. *Plant Dis.* 76: 310-313.

Nakamura, I., Kameya, N., Kato, Y., Yamanaka, S., Jomori, H., Sato, Y.I., 1998. A proposal for identifying the short ID sequence which addresses the plastid subtype of higher plants. *Breed. Sci.* 47: 385-388.

Natarajan, G., 1978. In IOPB chromosome number reports LXII. *Taxon*, 27: 519-535.

Navajas-Pérez, R., Rubio-Escudero, C., Aznarte, J. L., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M. A., 2007. SatDNA Analyzer: a computing tool for satellite-DNA evolutionary analysis. *Bioinformatics*, 23(6):767-768.

Negi, M.S., Rajagopal, J., Chauhan, N., Cronn, Lakshmikumaran, 2002. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoids*. *Genome* 45: pp. 1181-1188.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S. et al., 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*. 322: 572-574.

Oldenburg, D.J., Bendich, A.J., 2004. Changes in the structure of DNA molecules and the amount of DNA per plastid during chloroplast development in maize. *J. Mol. Biol.* 344(5): 1311-30.

Opiola, T., Szkaradkiewicz, K., Barciszewska, M.Z., 1996. The nucleotide sequence of ribosomal 5S RNA from sorrel. *Biochimie*. 78(2): 108-110.

Oxelman, B., Liden, M., Berglund, D., 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Syst. Evol.*, 206:393–410.

Ozbek, S., Ayfer, M., 1957. *Pistacia turleri* uzerinde sitolojik arastirmalar. Ankara Univeristiesi Ziraat Fakultesi Yilligi, 3: 203-222.

Ozden-Tokatli, Y., Akdemir, H., Tilkat, E., Onay, A., 2010. Current status and conservation of *Pistacia* germplasm. *Biotechnology Advances*. 28:130-141.

Palmer, J.D., 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.* 130:S6-S29.

Parfitt, D.E., 2003. 'Bonsai' ornamental pistachio. *HortScience* 38:1260-1261.

Parfitt, D.E., Badenes, M.L., 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7987-92.

Persson, K., Bothmer, R., 2000. Assessing the allozyme variation in cultivars and Swedish landraces of rye (*Secale cereale* L.). *Hereditas*. 132: 7- 17.

Picchioni, G. A., Miyamoto, S., Storey, J. B., 1990. Salt effects on growth and uptake of pistachio rootstock seedlings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:647-653.

Picchioni, G., Brown, P., Weinbaum, S., Muraoka, T., 1997. Macronutrient Allocation to Leaves and Fruit of Mature, Alternate-bearing Pistachio Trees: Magnitude and Seasonal Patterns at the Whole-canopy Level. *JASHS*, 122(2):267-274.

Race, H.L., Herrmann, R.G., Martin, W., 1999. Why have organelles retained genomes? *Trends Genet.* 15:364-370.

Razavi, S., Emadzadeh, B., Rafe, A., Amini, A., 2007a. The physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety: Part I. Geometrical properties. *Journal of Food Engineering*, 81(1):209–217.

Razavi, S., Rafe, A., Moghaddam, T., Amini, A., 2007b. Physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety. Part II. Gravimetical properties. *Journal of Food Engineering*, 81(1):218–225.

Razavi, S., Amini, A., Rafe, A., Emadzadeh, B., 2007c. The physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety. Part III: Frictional properties. *Journal of Food Engineering*, 81(1):226–235.

Reeder, R.H., 1990. rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.* 6:390-395.

Reith, M.E., Munholland, J., 1995. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 13: 333-335.

Robles, F., de la Herran, R., Ludwig, A., Rejon, C. R., Rejon, M. R., Garrido-Ramos, M. A., 2005. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon. *Genome*. 48, 18–28.

Rogers, S.O., Bendich, A.J., 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S.V.; SCHILPEROORT, R.A.; VERMA, D.P.S. (Ed.) *Plant molecular biology manual*. Dordrecht: Kluwer Academic. 6: 1-10.

Ronsted, N., Law, S., Thornton, H., Fay, M.F., Chase, M.W., 2005. Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 35: 527-509.

Rosecrance, R.C., Weinbaum, S.A., Brown, P.H., 1996. Assessment of nitrogen, phosphorus, and potassium uptake capacity and root growth in mature alternate-bearing pistachio (*Pistacia vera*) trees. *Tree Physiology*, 16:949-956.

Saito, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*. 4: 406-425.

Sakakibara, H., 2004. Cytokinin biosynthesis and metabolism. En: Davies, P.J. (Ed.) *Plant hormones Biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Publishers, 95-114.

Salisbury, F., Ross, C., 1994. Respuestas del crecimiento a la temperatura. *Fisiología vegetal*. Grupo Editoriales Iberoamérica. México. 534-559.

Sandhu, P.S., Mann, S.K., 1988. SOCGI plant chromosome number reports VII. *J. Cytol. Genet.*, 23: 219-228.

Schwarz, D., Roupael, Y., Colla, G., Venema, J.H., 2010. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stress. Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Sci. Hort.* 127:162–171.

Schroeder, J.I., Kwak, J.M., Allen, G.J., 2001. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*. 410 (6826): 327-30.

Shander, C., Willassen, E., 2005. What can biological barcoding do for marine biology. *Mar. Biol. Resour.* 1:79–83.

Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., Small, R.L., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Ame J Bot.* 92:142-166.

Sheibani, A., 1996. Distribution, use and conservation of pistachio in Iran, in: Padulosi, S., Caruso, T., Barone, E. (Eds), Workshop “Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources”, Palermo (Italy), 1995. IPGRI, Rome (Italy), pp 51-56.

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimida, H., Sugiura, M., 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5:2043-2049.

Smith, M.A., Fisher, B.L., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 360:1825–1834.

Sosa-Rodríguez, F., Ortíz, R., Hernández, R., Armas, P., Guillen, D., 2009. Propagación in vitro de *Heliconia standley* Macbride en Cuba. Revista Chapingo. Serie Horticultura 5(2):17-23.

Spina, P., (1984). El Pistacho. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

Sponsel, V. M., Hedden, P., 2004. Gibberellin biosynthesis and inactivation. En: Davies, P.J. (Ed) Plant hormones Biosynthesis, signal transduction, action!. Kluwer Academic Publishers, 63-94.

Štorchová, H., Olson, M.S., 2007. The architecture of the chloroplast psbA-trnH non-coding region in angiosperms. Plant Syst. Evol., 268(1–4):235–256.

Sugiura, M., 1992. The chloroplast genome. Plant Mol. Biol. 19:149-168.

Sumida, G., Remaudière, M., Inbar, J., Menier, 2004. “Un Nouveau Geocica Gallicole sur *atlantica* en Jordanie Hemiptera, Aphididae, Eriosomatinae, Fordini,” Revue Française d’Entomologie, Vol. 26, No. 1, pp. 37-42.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis *Pistacia* using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 28:2731-2739.

Tarango Rivero, S.H., 1993. El cultivo del pistachero. Colección Agropecuaria 1993. Ed. Departamento Editorial de la Universidad de Chihuahua, Mexico.

Tavallali, V., Rahemi, M., 2007. Effects of Rootstock on Nutrient Acquisition by Leaf, Kernel and Quality of Pistachio (*Pistacia vera* L.). American-Eurasian J. Agric. & Environ Sci., 2 (3): 240-246.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 24: 4876-4882.

Van Nues, R.W., Rientjes, J.M.J., Morré, S.A., Mollee, E., Planta, R.J., Venema, J., Raué, H.A., 1995. Evolutionarily conserved structural elements are critical for processing of internal transcribed spacer 2 from *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA. J Mol Biol. 250: 24–36.

Varga, J., Toth, B., Rigó, K., Terén, J., Hoekstra, R.F., Kozakiewicz, Z., 2000. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section Circumdati based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. Fungal Genet Biol. 30 (1): 71-80.

Vargas, F.J., Romero, M.A., Batlle, I., Clavé, J., 1995. Estudio del vigor en familias de pistachero. In: VI Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SECH), Resúmenes. SECH, Barcelona (Spain), pp.198.

Vemmos, S.N., 1999. Mineral Composition of Leaves and Flower Buds in Fruiting and Non-Fruiting Pistachio Trees. Journal of Plant Nutrition, 22(8), 1291-1301.

Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Sugiura, M., 1994.

Loss of all ndlt genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 9794-9798.

Walker, R.R., Torokfalvy, E., Behboudian, N. M., 1987. Uptake and distribution of

chloride, sodium and potassium ions and growth of salt-treated Pistachio plant.

Aust. J. Agric. Res. 38:383-94.

Wallander, E., Albert, V.A., 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based

on rps16 and trnL-F sequence data. Am. J. Bot., 87:1827–1841.

Werner, O., Sánchez-Gómez, P., Guerra, J., Martínez, J.F., 2001. Identification of

Pistacia × saportae Burnat (Anacardiaceae) by RAPD analysis and morphological characters. Sci Hort 91:179-186.

Whitehouse, W.E., 1957. The pistachio nut – a new crop for the western United

States. Econ Bot. 11:281–321.

Wolfe, K.H., Morden, C.W., Palmer, J.D., 1992. Function and evolution of a

minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA. 89:10648-10652.

Wutscher, N. H., 1989. Alteration of fruit tree nutrition through rootstock.

HortScience. 24:578-584.

Xie, L., Yang, Z.Y., Wen, J., Li, D.Z., Yi, T.S., 2014. Biogeographic history of *Pistacia* (Anacardiaceae), emphasizing the evolution of the Madrean-Tethyan and the eastern Asian-Tethyan disjunctions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 77:136-146.

Yi, T., Wen, J., Golan-Glodhirsh, A., Parfitt, D.E., 2008. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* 95(2): 241–251. 2008.

Zhou, Y.H., Huang, L.F., Zhang, Y., Shi, K., Yu, J.Q., Nogues, S., 2007. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H₂O₂ accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto fig leaf gourd. *Ann. Bot.* 100:839-848.

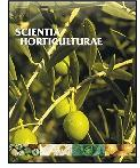
Zohary, M., 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany* 5:187-228.

ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti

Mycorrhizal treatments increase the compatibility between Pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars and seedling rootstock of *Pistacia terebinthus* L.



Cristina Aznarte-Mellado, Pedro J. Sola-Campoy, Francisca Robles, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez*

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2014
Received in revised form 26 June 2014
Accepted 30 June 2014
Available online 19 July 2014

Keywords:

Mycorrhizae
Phytohormones
Grafting
Nutrition
Rootstock
Pistachio

ABSTRACT

The bud–rootstock compatibility is decisive in the success of grafting pistachios. Climate conditions and appropriate rootstock choice are the two key factors influencing grafting success. Despite producers' efforts, fluctuations in these factors result in frequent differences in annual yield. To minimize production losses by increasing the percentage of successful grafting would greatly benefit the introduction of this crop in new areas.

Here, we analyze the viability of *Pistacia terebinthus* L. differentially treated with mycorrhizae or phytohormones and used as rootstock for *Pistacia vera* buds. Our results, on an experimental plot of 12,905 plants, demonstrate that mycorrhiza-treated plants reached ~80% positive grafts, while the phytohormone-treated plants and controls had 32.3% and 38.4% success, respectively. The increase in grafting success could be explained by more efficient nutrient uptake in mycorrhiza-treated plants. An analysis of chemical element accumulation and assimilation in leaves reveals that mycorrhiza-treated plants selectively accumulated Ca, Fe, Mg, N, Al, S, Sr, Ti, V, Mn, and I, but lacked K with respect to the rest of the plants. Mycorrhiza-treated plants were shorter, but no significant differences were found in trunk diameter and circumference. We propose the use of mycorrhizae to increase bud–rootstock compatibility for this tandem of species.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pistacia vera L. is a much appreciated crop due to its edible fruit, the pistachio, which is consumed as finger food, and also used as the main ingredient of some beverages, oils, cold meats, cheeses, and sweets. Pistachio ranks fifth among global nut production, and is undergoing a surge worldwide. Although native to Mediterranean basin, it is currently cultivated on the five continents. The main producers are Iran and the United States, with over 70% of total production (Faostat, 2013). After a long history of domestication, there are over 50 cultivated varieties of pistachio with few morphological and physiological differences between them, related mainly to seed size, flowering time, and production rate (Spina, 1984). Like many other fruit trees, this crop is hard to root and requires a rootstock for vegetative propagation. While the rootstock does not influence the distinctive features of each variety, broad differences in production,

vigor, and longevity have been reported depending on this selection (Tarango Rivero, 1993). Furthermore, the percentage of successful grafts is considered to be the key factor for the prosperity of pistachio breeding. Thus, the use of an appropriate bud–rootstock is a key issue that needs to be carefully considered for any given area (Ferguson et al., 2005a).

Temperature and humidity, and the type of grafting exert limiting effects on the growth of *de novo* tissue between the rootstock and bud (Couceiro, 1992; Ferguson et al., 2005b; Guerrero, 2011). Grafting takes place during the summer season. As a rule, during the first stages, temperatures should range between 15 °C and 32 °C, and humidity should remain below 50% (Couceiro et al., 2013). The most widely spread grafting is T-budding (Guerrero, 2011). Nevertheless, rootstock choice and its general condition are likely to be the most influential factors in pistachio nurturing. Native plants are preferred because of the availability of specimens, and the lack of adaptation issues. Thus, in USA, *Pistacia atlantica* Desf. and *Pistacia integerrima* Stewartson are commonly used (Guerrero et al., 2005), as well as, some interspecific hybrids of *P. atlantica* × *P. integerrima* (UCB1 and PGII) (Ferguson et al., 2005a). *P. atlantica*

* Corresponding author. Tel.: +34 958249709; fax: +34 958244073.
E-mail address: rnavajas@ugr.es (R. Navajas-Pérez).

Desf. is also prevalent in Morocco, Tunisia, Algeria, Iraq, and Iran (Guerrero, 2011), while *P. vera* L. is widely used in Iran, Turkey, Syria, and Tunisia, together with *P. khinjuk* stocks, a closely related species (Sheibani, 1996). *Pistacia terebinthus* L. is the main rootstock in Spain, Italy, and Australia (Hobman and Bass, 1986; Caruso et al., 1990).

Spain, where this research was conducted (Granada), has the potential climatic conditions to produce pistachios but the 5000 ha cultivated still represent a low percentage (Couceiro et al., 2013). The average of grafting success in Castilla La Mancha (Spain), using the same tandem of species studied here, is currently 60% after three rounds of grafting (Couceiro et al., 2013). This factor jeopardizes the establishment of new orchards. Thus, it is important to develop techniques to increase grafting success and thereby reduce the cost of nursery plants that in the long-term may facilitate the adoption of pistachio in Spain.

We hypothesized that any technique capable of promoting the uptake efficiency of a rootstock may increase the compatibility between the bud and the rootstock. In this context, we investigated the influence plant treatment with mycorrhizae and phytohormones on nutrient uptake and grafting success. Mycorrhizae, apart from providing some elements to the plant, encourage the formation of a larger root surface area (Dodd and Ruiz-Lozano, 2011). Phytohormones act as bio-stimulants that influence nutrient uptake (Miyashima and Nakajima, 2011). Thus, either treatment might indirectly affect the growth of *de novo* tissue required after grafting. To analyze these aspects, we laid out an experimental plot of *P. terebinthus* L. plants to be used as rootstocks. A third of the plants were treated with mycorrhizae (hereafter mycorrhizal plants), another third with phytohormones (hereafter phytohormonal plants), while the rest were left untreated as control.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, treatments, and experimental design

The study was conducted in a plot at Viveros Zuaimé SL, Caniles, Granada (Spain) from 06/12/2012 to 06/10/2013. A total of 12,905 one-year-old seedlings from a seedbed of *P. terebinthus* plants, homogenous in vigor and size, were selected and planted in the plot on a 2 × 1 m pattern. All plants were supplied with commercial irrigation during the experiment, and a standard nutrient solution. Three different groups of ~4000 individuals each were settled. A randomized complete-block design was used, and these were equally divided into three subgroups, according to the following treatments: (i) *control*, plants that underwent no further treatments, (ii) *phytohormonal*, plants treated with a mixture of auxins, gibberellins, and cytokinins at the time of transplanting to promote root growth and deep rooting (Stimulate, Stoller, USA); and (iii) *mycorrhizal*, plants inoculated with a mix of native *Glomus* spp. mycorrhizae by immersing the roots in a solution prior to planting (GLOMYGEL®, Mycovitro SL, Spain).

2.1.1. Grafting, plant growth, and percentage of grafting success

When the plants reached an optimal size, on 08/28/2012, T-bud grafting was performed using buds evenly split between *Kerman* and *Peter* varieties of pistachio (*P. vera*). Grafting was executed manually by the same team of technicians to minimize undesired interferences. Plant height and diameter and perimeter of plants at 5 cm of the graft union were measured on 10/17/2012. These parameters were measured in 307 control, 290 mycorrhizal, and 319 phytohormonal plants 7 weeks after the grafting. The percentage of successful grafts was visually checked the following season (06/10/2013) in all the experimental plants.

2.1.2. Mineral uptake by the rootstock

We determined mineral uptake capability by the rootstock, evaluating the concentration of 30 chemical elements in the leaves of the rootstock (Table 1). At random, 25 plants were sampled from the seedbed before the treatments on 06/12/2012 at the beginning of the experiment. Then, 25 plants taken at random from each group were sampled directly after the grafting on 09/27/2012, and on 11/13/2012. For each plant, 100 g of leaves were collected and dried out at 60 °C for 24 h, and then fine powdered. Analysis of total C and N was performed in a Flash EA 1112 Series-LECO TRUSPEC device. The analysis of the rest of elements was made by digestion with HNO₃/H₂O₂ in an UltraClave Microwave Milestone, and ICP-OES using an ICAP 6500 DUO device. These analyses were carried out at the Ionomic Laboratory of CEBAS-CSIC (Murcia, Spain).

2.2. Statistical analyses

Plant growth parameters and mineral concentration in leaves were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) using the SPSS software package (SPSS 20 for Windows, 2007). The assumption of normality, homoscedasticity and the independence of the factors were previously set. To assure normality, a Shapiro–Wilk test was applied and the distribution was typified if it not previously.

Tukey's HSD (honest significant difference) was used as a *post hoc* test when Levene's test showed homoscedasticity ($\alpha > 0.05$); otherwise Dunnett T3 and Tamhane were used, as in the case of Cu, Mn, K, C, and Ti.

A randomized complete-block design with a significance level of 0.05, was used to guarantee the independence between the concentration of chemical elements and the plants growing in the plot (Table S1). For all the elements the result was favorable, supporting the null hypothesis and establishing that concentration did not depend on the plot.

Furthermore, a binomial Z test was used to corroborate the evidence of the grafting results (Table S2). Our data on the three treatments significantly differ from the binomial distribution ($p = 0.50$) taken as reference. It is remarkable the success of mycorrhizal plants (79%; $\alpha < 0.01$).

3. Results

3.1. Analysis of accumulation and assimilation of different chemical elements in *P. terebinthus* treated with mycorrhizae and phytohormones

At 77 days after the grafting, 25 random mycorrhizal, phytohormonal and control plants were sampled. Mycorrhizal plants were found to have increased B, Zn, Al, Ca, Fe, Mg, Mn, N, S, Sr, Ti, Tl, and V uptake with respect to the others (Table 1). However, K uptake showed the lowest values in mycorrhizal plants. Mineral uptake between control and phytohormonal plants was similar in all cases except for B, Zn, and P; in comparison with controls, while phytohormonal and mycorrhizal plants showed increased B uptake. Mycorrhizal and phytohormonal plants showed the highest and lowest Zn mean values, respectively, while controls had intermediate mean value. Control values lacked significance with respect to either of the two other values. Finally, mycorrhizal and phytohormonal plants showed the lowest and highest P mean values, respectively. Controls showed an intermediate mean value. The three mean values lacked significance after the ANOVA and Bonferroni tests. Instead Tukey's HSD test demonstrated that the values of mycorrhizal and phytohormonal plants significantly differed, but lacked significance with respect to control (Table 1).

Table 1
Accumulation of chemical elements in mycorrhizal, phytohormonal, and control *Pistacia terebinthus* plants 77 days after the grafting.

Element	Analysis 3			ANOVA		Tukey's HSD		
	Mycorrhize	Phytohormone	Control	Statistical F	Signification value	Mycorrhize–Control	Mycorrhize–Phytohormone	Control–Phytohormone
Al (mg/kg)	99.02	66.27	66.74	10.606	0.000	0.000	0.000	0.998
B (mg/kg)	68.19	55.83	45.10	3.161	0.048	0.001	0.138	0.221
C ^a (g/100 g)	49.43	49.08	49.69	2.194	0.119	0.644	0.456	0.099
Ca (g/100 mL)	1.83	1.25	1.12	12.961	0.000	0.000	0.001	0.694
Cr (mg/kg)	0.39	0.36	0.33	0.714	0.493	0.463	0.780	0.986
Cu ^a (mg/kg)	95.91	108.84	114.19	0.945	0.393	0.379	0.619	0.921
Fe (mg/kg)	86.98	65.51	68.00	7.963	0.001	0.005	0.002	0.907
K (g/100 g)	0.71	0.94	0.95	9.761	0.000	0.001	0.001	0.968
Li ^a (mg/kg)	0.83	0.72	0.96	1.160	0.319	0.691	0.760	0.287
Mg (g/100 g)	0.26	0.21	0.18	5.880	0.004	0.003	0.092	0.441
Mn (mg/kg)	67.12	40.45	39.87	12.500	0.000	0.000	0.000	0.995
N (g/100 g)	2.39	2.14	2.15	7.081	0.002	0.006	0.004	0.993
Na ^a (g/100 g)	0.025	0.024	0.017	2.667	0.076	0.092	0.962	0.165
Ni ^b (mg/kg)	0.32	0.74	0.55	0.342	0.711	0.794	0.724	0.991
P (mg/kg)	0.23	0.29	0.21	3.136	0.050	0.736	0.210	0.044
Pb ^a (mg/kg)	0.49	0.32	0.32	1.216	0.302	0.368	0.379	1.000
S (g/100 mg)	0.13	0.12	0.12	9.591	0.000	0.001	0.001	0.989
Sr (mg/kg)	66.05	47.76	42.04	7.963	0.001	0.001	0.014	0.641
Ti (mg/kg)	3.40	2.43	2.54	8.488	0.000	0.004	0.001	0.907
Tl (g/100 mg)	7.45	4.35	2.28	14.024	0.000	0.000	0.003	0.189
V (mg/kg)	1.79	1.36	1.18	7.373	0.001	0.001	0.030	0.515
Zn (mg/kg)	11.87	9.87	10.40	3.601	0.032	0.143	0.031	0.770

ANOVA and Tukey's significance value: $\alpha < 0.05$.

^a C, Cr, Cu, Li, Na, Ni, and Pb showed no significant variations.

Table 2
Accumulation of some elements in *P. terebinthus* before the treatments, directly after the grafting, and 77 days after the grafting.

Element	Analysis 1	Analysis 2			Analysis 3		
		Mycorrhize	Phytohormone	Control	Mycorrhize	Phytohormone	Control
Al (mg/kg)		75.63	96.62	116.11	99.02	66.27	66.74
B (mg/kg)	30.00	39.37	44.15	53.91	68.19	55.83	45.10
C (g/100 g)					49.43	49.08	49.69
Ca (g/100 mL)	1.34	1.00	1.27	1.09	1.83	1.25	1.12
Cr (mg/kg)		0.27	0.33	0.51	0.39	0.36	0.33
Cu (mg/kg)	2.00	5.42	7.98	11.52	95.91	108.84	114.19
Fe (mg/kg)	15.00	56.67	91.99	74.11	86.98	65.51	68.00
K (g/100 g)	1.21	0.90	0.95	1.08	0.71	0.94	0.95
Li (mg/kg)		<0.5	<0.5	<0.5	0.83	0.72	0.96
Mg (g/100 g)	0.26	0.19	0.25	0.24	0.26	0.21	0.18
Mn (mg/kg)	71.00	56.41	58.08	67.60	67.12	40.45	39.87
N (g/100 g)					2.39	2.14	2.15
Na (g/100 g)		0.01	0.01	0.03	0.025	0.024	0.017
Ni (mg/kg)		0.21	0.36	0.51	0.32	0.74	0.55
P (mg/kg)	0.31	0.26	0.42	0.69	0.23	0.29	0.21
Pb (mg/kg)		0.48	0.50	0.50	0.49	0.32	0.32
S (g/100 mg)		0.12	0.13	0.14	0.13	0.12	0.12
Sr (mg/kg)		40.28	58.98	33.41	66.05	47.76	42.04
Ti (mg/kg)		2.82	3.19	4.06	3.40	2.43	2.54
Tl (g/100 mg)		<0.05	3.39	0.96	7.45	4.35	2.28
V (mg/kg)		1.37	1.95	1.83	1.79	1.36	1.18
Zn (mg/kg)	15.00	10.73	17.00	7.91	11.87	9.87	10.40

Table 3
Means of diameter, circumference, and height of plants. ANOVA and Tukey's significance value: $\alpha < 0.05$.

Analysis	Mycorrhize	Phytohormone	Control	ANOVA		Tukey's HSD		
				Statistical F	Signification value	Mycorrhize–control	Mycorrhize–phytohormone	Control–phytohormone
Diameter (mm)	10.5	10.2	10.1	0.698	0.498 ^a	0.910	0.477	0.732
Perimeter (cm)	3.31	3.21	3.18	0.720	0.487 ^a	0.913	0.468	0.717
Height (cm)	115.53	124.97	123.35	24.208	0.000	0.000	0.000	0.335

^a Diameter and circumference showed no significant variations.

Table 4
Percentage of positive bud–rootstock unions in the three groups of plants studied.

Treatment	Plants analyzed	Percentage of positive matches (%)
Control	4675	38.4
Mycorrhizal	4290	79.4
Phytohormonal	3940	32.3

In all the treatments, C, Cr, Cu, Li, Na, Ni, and Pb uptake was similar while As, Be, Bi, Cd, Co, Mo, Sb, and Se uptake fell below the detection range ($<0.5 \text{ kg/m}^3$; Table 1).

3.2. Trends in accumulation of some elements in *P. terebinthus* during the treatments

For this analysis, we compared the three measures gathered at different times during the experiment. As described above, Ca, Fe, Mg, and Mn were significantly accumulated in mycorrhizal plants, whereas K was significantly underrepresented. As the plants grew, a tendency of Ca, Mg, and Mn to slightly decrease over time was observable in all three groups. However, mycorrhizal plants showed an upturn in coincidence with the grafting. The Fe concentration generally tended to increase up to the grafting time, after which values dropped in mycorrhizal and phytohormonal plants and in control. All plants exhibited the same trend for K assimilation, its concentration decreasing with time (see Fig. 1 and Table 2).

Our data suggest that B tended to accumulate over plant development in mycorrhizal and phytohormonal plants. Nevertheless, control plants showed a slight drop after grafting. Although at the last sampling, Zn and P values proved similar in all plants (Table 2), these elements had a different accumulation pattern in the three groups studied. On one hand, in mycorrhizal and control plants Zn concentration decreased, but increased after grafting, while the dynamic in phytohormonal plants was the opposite (see Fig. 1 and Table 2). On the other hand, P tended to accumulate in phytohormonal and control plants until grafting, from which point there was a slight drop. Mycorrhizal plants exhibited a steady decline in P concentration. Finally, all plants analyzed here showed a tendency to accumulate Cu (Fig. 1 and Table 2).

3.3. *P. terebinthus* growing pattern and percentage of bud–rootstock compatibility after the treatments

Mycorrhizal plants showed the highest mean value of diameter and circumference of trunk, and the lowest height mean value (see Table 3). Diameter and circumference values were not significant according to the ANOVA. However, Tukey's test demonstrated that mycorrhizal-plants mean height values were significantly lower than the other two mean values (see Table 3).

Mycorrhizal plants increased the percentage of positive bud–rootstock union in comparison with phytohormonal and control plants (Table 4). Whereas 41 weeks after the grafting, 79.4% of mycorrhizal plants showed active buds with signs of tissue growth between them and the rootstock, their respective values for phytohormonal and control plants was only 32.3% and 38.4% (Table 4).

4. Discussion

Pistachio is a hard-to-root tree, and requires a rootstock for vegetative propagation. The percentage of successful grafting is decisive for the viability of this crop. The choice of the rootstock is made on the basis of bud–rootstock compatibility, which depends basically on the geographical region and the nutrient uptake efficiency (Ferguson et al., 2005a). As a whole, the fate of chemical elements relies largely on the efficiency of root genotypes, and

varies depending on the choice of rootstock (Hokmabadi et al., 2005). Here, we hypothesize that changing the uptake efficiency of the rootstock might influence the final nutrient–uptake balance. For this, we have comparatively analyzed the influence of mycorrhizae and phytohormones in the nutrient uptake of the rootstock *P. terebinthus* L. in Spain, and ultimately its possible influence on *P. vera* L. bud-grafting success. *P. terebinthus* L. is a widely used rootstock in Spain, as it is native, cold resistant, highly tolerant to salinity, and of remarkable nutritional efficiency (Ferguson et al., 2005b).

It is well known that *Pistacia* species can easily establish symbiotic relations with mycorrhizae (Ferguson et al., 1998). In general, mycorrhizae provide the plant with a thicker root system, and represent an extra source of P and N. In *Pistacia*, mycorrhizal plants showed better nutrient uptake efficiency under different water regimes and salt-stress conditions. In all cases K, Mn, P and Zn are found to be significantly accumulated in plants associated with mycorrhizae (Kafkas and Ortas, 2009; Bagheri et al., 2012). Bagheri et al. (2012) also found that Cu and Fe maintain their levels in mycorrhizal plants.

Our dataset confirm a significant accumulation of Zn, Mn, P, and N in mycorrhizal plants with respect to control and phytohormonal ones, in support of previous observations. This is remarkable, because the availability of P and N is probably the most limiting aspect in *Pistacia*, and affects a number of vital parameters such as water-usage efficiency, seed quality, and disease resistance. Also, Zn is important to reduce the percentage of empty fruits, and Mn is crucial for photosynthesis (Couceiro et al., 2013). Nevertheless, we found K to be underrepresented in plants inoculated with mycorrhizae. This discrepancy with data from Kafkas and Ortas (2009) and Bagheri et al., 2012 may be due to the low consumption of K during the vegetative growth, in which the samples were taken (Rosecrance et al., 1996). While confirming the observations in Cu, our data would suggest that Fe is preferentially accumulated in mycorrhizal plants (see Table 1).

In the present study, we also analyzed the uptake of other elements, showing that Al, Ca, Mg, S, Sr, Ti, Tl, and V were preferentially accumulated in mycorrhizal plants. On the contrary, C, Cr, Li, Na, Ni, and Pb showed no significant variations in the mean values in any plants analyzed (Table 1). In all cases, mean values of phytohormonal plants were statistically similar to those of control plants, so that the mixture tested here seems not to have influenced the final accumulation of elements (Table 1 and Fig. 1).

Additionally, we studied the accumulation trends of some elements in the three groups of plants considered at different moments before and after the grafting. Mg, Mn, Ca, B, K, and Fe concentration decreased during the plant development (Fig. 1). We proved here that mycorrhizal treatment could avoid this natural loss of Ca, Fe, Mg, and Mn detected in phytohormonal and control plants. Together with N, Ca is probably one of the most consumed elements during pistachio development. In fact, there was a marked decrease in the Ca concentration during the vegetative period and around 70–80% of this Ca ultimately accumulates in the seed (Fig. 1). Fe, Mg, and Mn are essential elements for photosynthesis (Couceiro et al., 2013). Thus the influence of mycorrhizae on plant development could be considerable. Phytohormonal plants also showed a rise in B accumulation after grafting and, like mycorrhizae, would avoid the loss observed in control plants. For their part, phytohormones would prevent the loss of Zn registered in mycorrhizal and control plants. It is thought that a growing shoot can stimulate differential accumulations or alterations in the transport of some elements (Zhou et al., 2007; Schwarz et al., 2010). With the control plants taken as reference, the B and Fe concentrations would reverse their trend to accumulate after grafting, and the concentration would decline. Nonetheless, Mg and Mn concentration dramatically plummeted after grafting, following the natural tendency of these elements to decrease. These data suggest

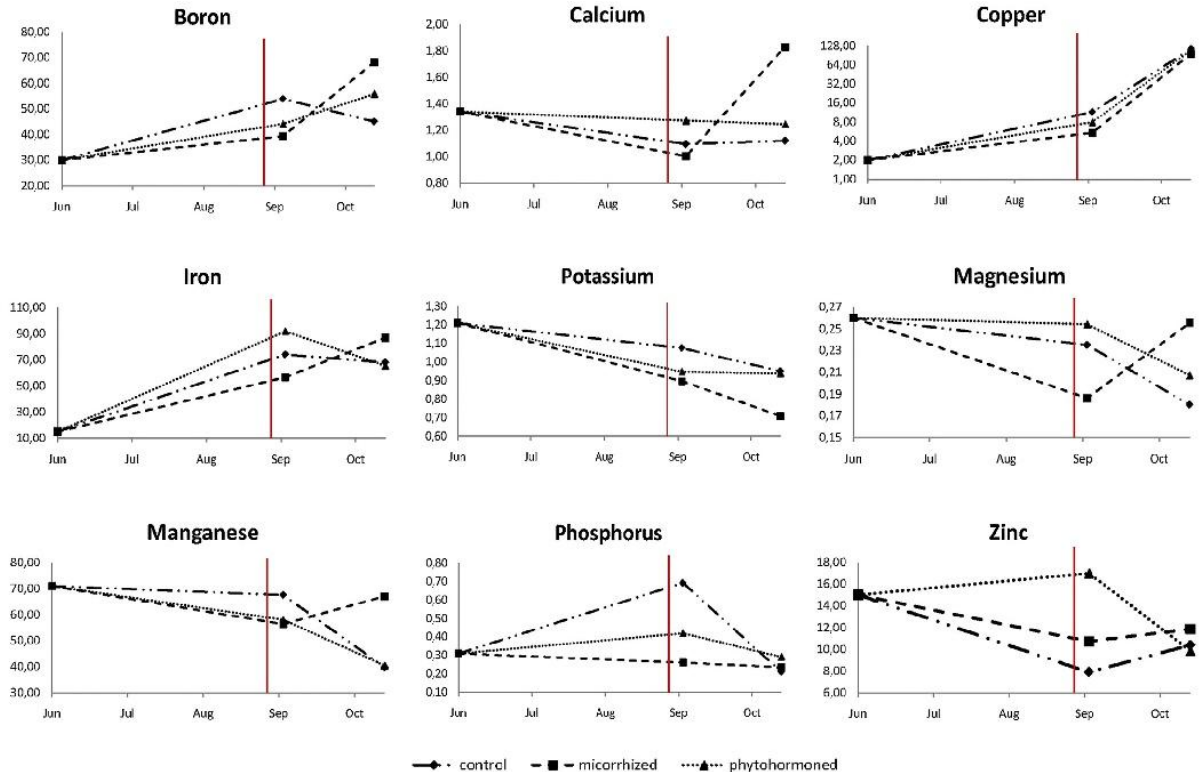


Fig. 1. Seasonal patterns of B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn concentration on phytohormonal, mycorrhizal, and control plants during the experiment. Red bar indicates moment of grafting. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that grafting might alter nutrient uptake in pistachio, as suggested previously in different tree crops (Jensen et al., 2003; Martínez-Ballesta et al., 2010). However, the influence of other factors cannot be ruled out, and further research is needed to clarify this point.

Better nutrient uptake could result in a more vigorous rootstock. Previous studies correlating grafting and rootstock morphology have demonstrated the importance of rootstock vigor in bud development (Beede et al., 2005; Ferguson et al., 2005b; Holtz et al., 2005). Diameter is a key factor and positively correlates with grafting success. *P. terebinthus*–*P. vera* grafts for example are highly dependent on diameter (with coefficients of determination $R^2 > 0.75$), with respect to other rootstocks as *P. atlantica* Desf. ($R^2 = 0.35$). On the contrary, height is unlikely to affect the efficiency of the graft (Guerrero, 2011).

In our analyses, the mean diameter and circumference values did not significantly differ between treatments, so neither of these parameters appears to affect grafting success. However, a diameter among 12–15 mm has been suggested to favor grafts >50% in *P. terebinthus* L., and increasing this might positively affect the results presented here (Guerrero, 2011). On the other hand, mycorrhizal plants were significantly shorter than the others (Table 3). Nevertheless, this seems not to affect, at least negatively, the efficiency of the graft. It might be an indirect effect of nutrient allocation after grafting.

Finally, we visually checked the success of grafting in all plants. Strikingly, 79.4% of mycorrhizal plants gave successful results, versus 32.3% and 38.4% success in phytohormonal and control plants, respectively (Table 4). This would support the contention of Estau et al. (1990) who proposed that mycorrhizal inoculation

could benefit the pistachio crop in Spain. The average of positive grafting in Castilla La Mancha (Spain), using the same species is 60% after three rounds of grafting (Couceiro et al., 2013). Although our study is based exclusively on the first round, the dataset suggests that mycorrhizal plants could boost grafting efficiency at least 40% with respect to control plants. In turn, phytohormone treatment does not positively affect the grafting effectiveness.

5. Conclusions

Pistachio requires a suitable rootstock, for which bud–rootstock compatibility is essential. The effect of mycorrhizae and phytohormones on nutrient uptake and their effect in grafting have been analyzed in this work using *P. terebinthus* as a rootstock for *P. vera* buds. Around 80% of mycorrhizal plants gave rise to a successful graft, while 32.3% and 38.4% of phytohormonal and control plants had success, respectively.

After 77 days of the treatment, mycorrhizal plants increased in Ca, Fe, Mg, N, Al, S, Sr, Ti, V, Mn, and Tl, but dropped in K with respect to phytohormonal and control plants. Mycorrhizal treatment hampered the loss of B, Ca, Fe, Mg, and Mn, and might influence the percentage of successful grafts. Except for B, mean values of elements were statistically similar to those of control in phytohormonal plants, so that the mixture tested here affects neither the final accumulation of elements nor the grafting success.

Although the circumference and the diameter of the trunk were similar in all cases, mycorrhizal plants were significantly shorter.

Therefore, we propose the utilization of mycorrhizal treatment of *P. terebinthus* plants as the rootstock, which could increase the

efficiency of grafting at least 40% with respect to control pistachio plants.

Acknowledgments

This work was supported by the project AGL 2009-09094, PJ S-C is a FPI scholar, and R. N-P a Ramón y Cajal fellow (RYC-2011-08653), all funded by Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. The authors are deeply indebted to Viveros Zuaime and SAT Pistachos de Andalucía (Granada, Spain) for kindly providing the material analyzed in this paper. We also wish to thank Dr. Martínez Fiestas for her assistance in the statistical analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.039>.

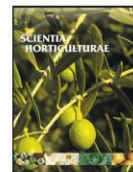
References

- Bagheri, V., Shamshiri, M.H., Shirani, H., Roosta, H.R., 2012. Nutrient uptake and distribution in mycorrhizal pistachio seedlings under drought stress. *J. Agric. Sci. Technol.* 14, 1591–1604.
- Beede, R.H., Ferguson, L., Wylie, Ch., Fanucchi, C., 2005. Planting and training young trees. In: Ferguson, L. (Ed.), *Pistachio Production Manual*. University of California, California (USA), pp. 57–59.
- Caruso, T., Di Marco, L., Raimondo, A., Tattini, M., 1990. Seasonal variations of macro and micronutrient elements in the reproductive organs of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Programme de recherche Agrimed. Recueil des communications*, Nîmes (France), 353–359.
- Couceiro, J.F., 1992. Estudios sobre Adaptación y Comportamiento del Pistachero (*Pistacia vera* L.) e Higuera (*Ficus carica* L.). Período 1988–1991. Conserjería de Agricultura de la Junta de Comunidad de Castilla La Mancha. Investigación Agraria.
- Couceiro, J.F., Guerrero, J., Gijón, M.C., Pérez-López, D., Moriana, A., Rodríguez, M., 2013. *El Cultivo del Pistacho*. Ediciones Paraninfo, Madrid.
- Dodd, I.C., Ruiz-Lozano, J.M., 2011. Microbial enhancement of crop resource use efficiency. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 236–242.
- Estaun, V., Calvet, C., Camprubi, A., 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Pistacia* sp. *Symbiosis* 9, 309–313.
- Faostat, 2013. FAO-2012. FAOSTAT database. <http://www.faostat.fao.org/site/567/default.aspx>
- Ferguson, L., Kaur, S., Epstein, L., 1998. Arbuscular mycorrhizal fungi on pistachio rootstocks in California. *ISHS. Acta Hort.* 470, 211–218.
- Ferguson, L., Sanden, B., Grattan, S., Epstein, L., Krueger, B., 2005a. Pistachio rootstocks. In: Ferguson, L. (Ed.), *Pistachio Production*. University of California, pp. 67–73.
- Ferguson, L., Sanden, B., Grattan, S., Epstein, L., Krueger, B., 2005b. Rootstocks production and budding. In: Ferguson, L. (Ed.), *Pistachio Production*. University of California, pp. 74–79.
- Guerrero, J., Moriana, A., Couceiro, J.F., 2005. El pistachero: elección de variedad y portainjerto en Castilla La Mancha. *Fruticultura Profesional* 150, 5–24.
- Guerrero, J., (Doctoral thesis) 2011. Comportamiento varietal del pistachero (P. Vera L.) y respuesta agronómica del portainjerto autóctono *P. terebinthus* L. en Castilla-La Mancha. Universidad Politécnica de Madrid, Spain.
- Hobman, F.R., Bass, A.W., 1986. Pistachio growing in Australia. In: *Primary Protection of Pistachios*. South Australian Department of Agriculture.
- Holtz, Ferguson, B., Parfitt, L., Allen, D., Radoicich, G.E., 2005. Root-stock production and budding. In: Ferguson, L. (Ed.), *Pistachio Production Manual*. University of California, pp. 74–79.
- Hokmabadi, H., Arzani, K., Grierson, P.F., 2005. Growth, chemical composition, and carbon isotope discrimination of pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstock seedlings in response to salinity. *Aust. J. Agric. Res.* 56, 135–144.
- Jensen, P.J., Rytter, J., Detwiler, E.A., Travis, J.W., McNellis, T.W., 2003. Rootstock effects on gene expression patterns in apple tree scions. *Plant Mol. Biol.* 493, 394–511.
- Kafkas, S., Ortas, I., 2009. Various Mycorrhizal fungi enhance dry weights, P and Zn uptake of four *Pistacia* species. *J. Plant Nutr.* 32, 146–159.
- Martínez-Ballesta, M.C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., Carvajal, M., 2010. Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Sci. Hort.* 127, 112–118.
- Miyashima, S., Nakajima, K., 2011. The root endodermis: a hub of developmental signals and nutrient flow. *Plant Signal. Behav.* 6, 12.
- Rosecrance, R.C., Weinbaum, S.A., Brown, P.H., 1996. Assessment of nitrogen, phosphorus, and potassium uptake capacity and root growth in mature alternate-bearing pistachio (*Pistacia vera*) trees. *Tree Physiol.* 16, 949–956.
- Schwarz, D., Roupael, Y., Colla, G., Venema, J.H., 2010. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stress. Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Sci. Hort.* 127, 162–171.
- Sheibani, A., 1996. Distribution, use and conservation of pistachio in Iran. In: Padulosi, S., Caruso, T., Barone, E. (Eds.), *Workshop Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources*, Palermo, IPGRI, Rome (Italy), pp. 51–56.
- Spina, P., 1984. *El Pistacho*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Tarango Rivero, S.H., 1993. *El cultivo del pistachero*. Colección Agropecuaria 1993. Departamento Editorial de la Universidad de Chihuahua, Mexico.
- Zhou, Y.H., Huang, L.F., Zhang, Y., Shi, K., Yu, J.Q., Noguees, S., 2007. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H₂O₂ accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto fig leaf gourd. *Ann. Bot.* 100, 839–848.



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti

Short communication

Molecular characterization of the interspecific hybrid *Pistacia vigros* (*P. vera* L. × *P. atlantica* Desf.)



Cristina Aznarte-Mellado¹, Pedro J. Sola-Campoy¹, Francisca Robles, Carmelo Ruiz Rejón, Roberto de la Herrán, Rafael Navajas-Pérez*

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2014

Received in revised form

16 September 2014

Accepted 17 September 2014

Keywords:

Hybrid

Pistacia

Rootstock

Pistachio

Molecular markers

ABSTRACT

A new *Pistacia* variety, VIGROS, has been characterized here using nuclear and chloroplastidial DNA sequences, which are suitable tools for genetic improvement and cultivar identification. The nuclear DNA sequences (ribosomal ITS1, 5.8S, ITS2) determined that VIGROS is an interspecific hybrid between *Pistacia vera* L. and *Pistacia atlantica* Desf. The chloroplastidial DNA sequences (trnC-D, trnL-F regions) demonstrated that VIGROS bears a haplotype 100% coincident with that of *P. vera*, which would then be regarded as the female parent, while *P. atlantica* would be the male one. Due to its vigorous phenotype VIGROS has the potential to be used as a rootstock. This characterization may benefit producers and contribute to improved grafting of pistachios. Also, this paper demonstrates the validity of this set of molecular markers to characterize interspecific *Pistacia* hybrids.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Like many other fruit trees, *Pistacia vera* L. is hard to root and thus requires a rootstock for vegetative propagation. The choice of an appropriate tandem bud-rootstock is the most decisive factor in pistachio cultivation, and needs to be carefully considered for any given area (Ferguson et al., 2005). *Pistacia atlantica* Desf., *Pistacia integerrima* Stewartson, *P. vera* L., *Pistacia terebinthus* L. are rootstocks used worldwide. Significantly, UCB-1 and PGII (two interspecific hybrids of *P. atlantica* × *P. integerrima*) are also fairly common (Couceiro et al., 2013; Ferguson et al., 2005). The occurrence of hybrids in the genus *Pistacia* is frequent and well documented (Zohary, 1952), with no evidence of crossing barriers between its species (Parfitt, 2003). These often exhibit improved traits with respect to the parents, making them suitable rootstocks. Vigour, in terms of trunk perimeter and circumference, as well as other factors more connected to particular conditions of the cultivation area, such as cold resistance and diseases tolerance, have been demonstrated to be crucial features affecting the success of the grafts (Guerrero, 2011).

More in detail, UCB-1 comes from the close pollination between a selected female tree of *P. atlantica* and a male tree of *P. integerrima*, performed at the University of Berkeley (California, USA) in 1960 (Ferguson et al., 2008). PGII (Pioneer Gold II) comes from the same parent but resulted from open pollination between a population of female trees of *P. atlantica* and a population of male trees of *P. integerrima*. Both varieties have increased vigour compared to *P. atlantica*, and generally have equal or greater vigour compared to *P. integerrima*. UCB-1 is highly resistant to *Verticillium dahliae* K. infection (Ferguson et al., 2005).

In Castilla-La Mancha (Spain), the Centro Agrario el Chaparrillo (CAC) has developed different interspecific hybrids by crossing *P. terebinthus* with *P. integerrima*, *P. vera*, and *P. atlantica* by close pollination. All of the crosses have vigorous phenotypes, give good rates of grafting success, and are cold resistant except for *P. terebinthus* × *P. integerrima* (Couceiro et al., 2013). Also, hybrids *P. vera* × *P. atlantica*, with large seeds and good vigour, and *P. vera* × *P. terebinthus*, with a good initial vigorous period, have been produced by open pollination (Couceiro et al., 2013).

Despite having favourable climatic conditions to produce pistachios, Spain (where this research is focused) is still behind the main producers, with only around 5000 Ha cultivated (Couceiro et al., 2013). We propose that any effort at characterizing and testing new rootstocks will benefit the producers, whose main concern is the low rate of grafting success, i.e. 60% on average for Castilla la Mancha with *P. terebinthus* as the rootstock

* Corresponding author. Tel.: +34 958249707; fax: +34 958244073.

E-mail address: rnnavajas@ugr.es (R. Navajas-Pérez).

¹ These authors contributed equally to this work.



Fig. 1. VIGROS seeds without exocarp. Bar represents 1 cm.

(Couceiro et al., 2013). In this context, using nuclear and chloroplastidial DNA sequences, we here characterize VIGROS, a naturally occurring variety of *Pistacia* that, due to its vigorous phenotype, has the potential to be used as a rootstock. The aim of this study was to identify the provenience of this variety which might facilitate its establishment.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and genomic DNA isolation

During a routine classification of *P. terebinthus* L. material collected from Sierra de Baza, Granada (Spain) to be used as rootstock, the presence of a group of dissimilar seeds in size and shape, with respect to average *P. terebinthus* seed, was detected (Fig. 1). These were considered a new variety, named VIGROS. To confirm this status, a molecular characterization was carried out. For that purpose, VIGROS seeds were germinated in autoclaved fine sand soaked in distilled water until roots emerged. Then, plants were grown in 6 × 4 seedling pots. Genomic DNA from fresh leaves was isolated using the Invisorb® Spin Plant Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Germany) following the manufacturer instructions. The quality was measured by Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan, Switzerland) and confirmed by running the extracted DNA in a 1% agarose gel.

2.2. Cloning, sequencing, and DNA analyses

Nuclear ribosomal ITS1, 5.8S, and ITS2 sequences, and the plastid trnL-F and trnC-D regions were amplified using the pairs of primers described in Yi et al. (2008). Restriction products were excised from agarose gel and purified using illustra™ GTX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). After purification, they were ligated to pGEM®-Teasy cloning vector (Promega), and transformed into competent cells of *Escherichia coli* JM109. The transformant colonies, screened by blue/white selection, were grown in 1 ml of LB medium at 37 °C overnight.

PCR reactions for sequencing, in an ABI PRISM 3100 – Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), were made under the following conditions: 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 5 min.

Using the software Geneious 6.1.7 (<http://www.geneious.com/>, Biomatters), sequences were trimmed, BLASTed against GenBank, and aligned with positive matches found in other 12 *Pistacia* species

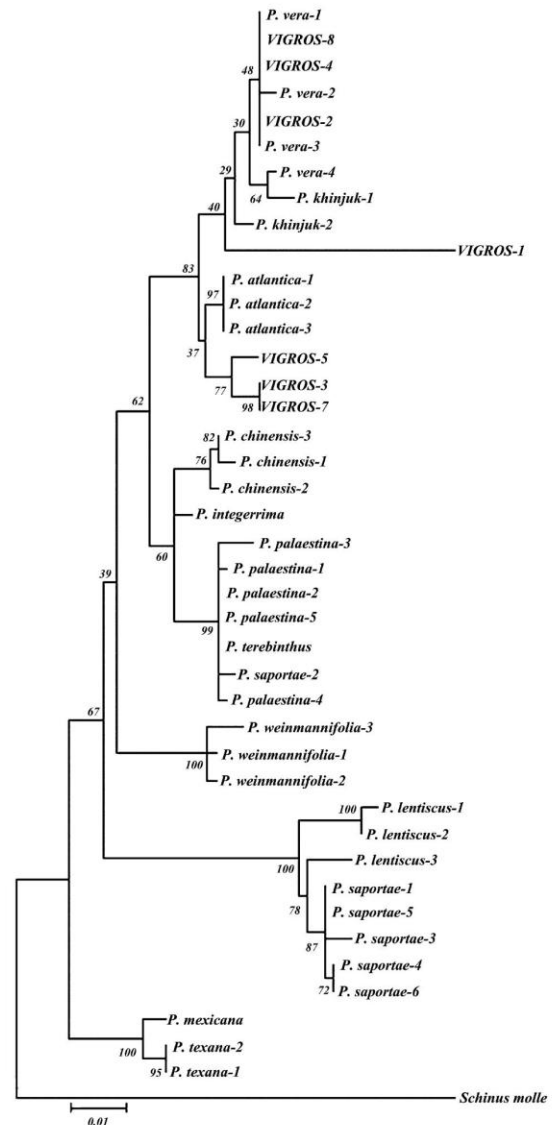


Fig. 2. Maximum likelihood tree based on ribosomal DNA sequences. Numbers at each node indicate bootstrap support.

and the outgroup *Schinus molle* L. New sequences were deposited in GeneBank, and accession numbers assigned (Table 1).

Phylogenetic reconstructions based on ribosomal DNA were conducted using the maximum likelihood method as implemented in MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011). The DNA-substitution model was Kimura 2 parameters; a uniform rate of substitution and the nearest-neighbour-interchange heuristic search strategy were considered. For gaps, a complete deletion option was chosen. Internal branch support was estimated with 500 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985).

Plastid markers were used to assign the female parent. For that task, the haplotypes isolated from our variety were aligned with those in GenBank belonging to the species mentioned above (Table 1). Thus, diagnostic positions were determined by visual inspection of the alignment.

Table 1

List of species analyzed, and accession numbers of the sequences.

	Ribosomal DNA	trnC-D region	trnL-F region
<i>P. integerrima</i>	EF193081	EF193145	EF193128
<i>P. khinjuk</i>	EF193104-05	EF193146	EF193129
<i>P. lentiscus</i>	EF193082-83, DQ390467	EF193147, DQ400561	EF193130, DQ390471
<i>P. palaestina</i>	EF193084-85, EF193095-97	EF193148-50	EF193131-33
<i>P. terebinthus</i>	EF193086	EF193153	EF193136
<i>P. vera</i>	AY677201, EF193089-91	EF193156, DQ400564	EF193139, DQ390473
<i>P. mexicana</i>	DQ390468	DQ400562	DQ390472
<i>P. texana</i>	EF193078-88	EF193154-55	EF193137-38
<i>P. chinensis</i>	EF193079-80, DQ390466	EF193143-44, DQ400560	EF193126-27, DQ390470
<i>P. weinmannifolia</i>	EF193092-94	DQ400564	DQ390473
<i>P. atlantica</i>	EF193076-78	EF193140-42	EF193123-25
<i>P. saportae</i>	EF193098-103	EF193151-52	EF193134-35
VIGROS	HE652101-07	HE652108	HE652109-11
<i>Schinus molle</i> (outgroup)	AY641512	DQ400565	AY640463

3. Results and discussion

3.1. Phylogenetic analyses using ribosomal DNA sequences

A total of 34 ribosomal sequences belonging to 12 *Pistacia* species, plus 7 sequences of VIGROS, and a sequence of *S. molle* L. (outgroup) were aligned (Table 1). The distance matrix of the ITS1, 5.8S, and ITS2 regions had a length of 682 bp due to the inclusion of indels, ranging from 646 and 659 bp of *Pistacia × saportae* and *Pistacia weinmannifolia* Poisson, respectively. The mean divergence among all the sequences was 0.042 (0.039 excluding the outgroup).

Maximum likelihood analyses showed trees with a topology that not only supports the monophyly of the group, but draw sequences together according to their taxonomic affiliation (Fig. 2). In fact, sequences can be classified into two large clades: *Lentiscus* and *Terebinthus*, as pointed out elsewhere (Yi et al., 2008). Within the *Lentiscus* group, sequences are divided into three subclades corresponding to *Pistacia mexicana*/*Pistacia texana*, *Pistacia lentiscus* L., and *P. weinmannifolia*. Within the *Terebinthus* group, four subclades can be found, *P. terebinthus*/*Pistacia palaestina*, *Pistacia chinensis*/*P. integerrima*, *P. atlantica*, and *P. vera*/*Pistacia khinjuk* (Fig. 2).

Notably, 4 VIGROS sequences (1, 2, 4, and 8) grouped together with the sequences of *P. vera*/*P. khinjuk* subclade; the other 3 VIGROS sequences (3, 5 and 7), fell into *P. atlantica* subclade (Fig. 2).

VIGROS-2, 4, and 8 had a 100% identity with sequences 1–3 of *P. vera*. In turn, VIGROS-3, 5, and 7 sequences showed 99.1% identity with *P. atlantica* sequences 1–3 (Fig. 2). Hybrids can maintain copies of both parental alleles in their genomes which can be detected by cloning and sequencing. Under this assumption, Yi et al. (2008) determined the hybrid nature of *Pistacia × saportae* (*P. lentiscus* × *P. terebinthus*), isolating different variants of ribosomal sequences. As shown in Fig. 2, some *Pistacia × saportae* sequences showed identity with *P. lentiscus* (98.3% identity), while others grouped into the *P. terebinthus*/*P. palaestina* subclade (99.7% identity). This confirmed previous observations using RAPDs by Werner et al. (2001).

On these grounds, VIGROS can be regarded as an interspecific *P. vera* × *P. atlantica* cross. Morphological features of the seeds of the open-pollination hybrid *P. vera* × *P. atlantica* obtained in the CAC (Spain) (Couceiro et al., 2013) would support this contention. Next, we sought to determine the gender of the species involved in the cross that produced VIGROS. We have been unable to find this information for the CAC hybrid.

3.2. Determining the female parent using chloroplastidial DNA sequences

Chloroplastidial DNA sequences were used to determine the gender of the VIGROS parent. For that task, trnC-D and trnL-F regions of VIGROS were sequenced and compared to sequences

<i>Pistacia x vigros</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia vera-1</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia vera-2</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	494
<i>Pistacia khinjuk</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	486
<i>Pistacia atlantica-1</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia atlantica-2</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia atlantica-3</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia chinensis-1</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia chinensis-2</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	487
<i>Pistacia chinensis-3</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia integerrima</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia palaestina-1</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia palaestina-2</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia palaestina-3</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia terebinthus</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia saportae-1</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia saportae-2</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia lentiscus-1</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia lentiscus-2</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia weinmannifolia</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia mexicana</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	494
<i>Pistacia texana-1</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	500
<i>Pistacia texana-2</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	499
<i>Schinus molle</i>	TTCCAAAGAAAAGTGGGACTGCGTATTTTGTGTTAATGTTCCCGATTCTA	497

Fig. 3. Partial alignment of the trnC-D region showing the diagnostic position (466) for *P. x vigros* and *P. vera* (shaded).

of other 12 *Pistacia* species and the outgroup (*S. molle*) (Table 1). VIGROS showed a haplotype 100% coincident with that of *P. vera*. Additionally, a diagnostic site (466 position of trnC-D region) differentiated *P. vera*, *P. khinjuk* and VIGROS from the rest of species (Fig. 3). This, together with the data shown above, supports the contention that *P. vera* is the female parental, while *P. atlantica* is the male one. VIGROS has been protected by the CPVO (Community Plant Variety Office) under the file number 2012/1925 (CVPO Gazette, 2012). Unfortunately, with the data available, it is not possible to determine whether the cross was produced naturally or the hybrid naturalized from an established plantation.

Preliminary field studies have demonstrated that VIGROS is a highly vigorous variety with significantly high rates of germination and rapid growth, and its potential to serve as a rootstock is currently being evaluated (Viveros Zuaime, personal communication). Pistachio requires a rootstock for vegetative propagation because, like many other fruit trees, it is a hard-to-root crop. Furthermore, the percentage of successful grafting is surely the most decisive factor in the viability of pistachio cultivation (Ferguson et al., 2005), and therefore increasing the number of choices by the characterizing and field testing of new potential rootstocks may greatly benefit producers. Also, the results presented here demonstrate that the combined use of ribosomal and chloroplastidial DNA sequences constitutes a useful tool to characterize hybrids in this group of species.

4. Conclusions

By using different molecular markers, we have characterized VIGROS, a new variety of *Pistacia*. Ribosomal DNA sequences (ITS1, 5.8S, ITS2) demonstrated that this variety has arisen from an interspecific cross between *P. vera* and *P. atlantica*. Chloroplastidial DNA sequences (trnC-D, trnL-F regions) show that the VIGROS haplotype is identical to that of *P. vera*, which also shares a diagnostic position that differentiates them from the other *Pistacia* species. This

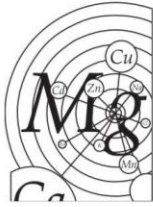
suggests that *P. vera* is the female parent, while *P. atlantica* is the male one. This molecular characterization also allows close pollination to propagate the variety, which, due to its vigorous phenotype, is being tested as a rootstock for pistachio cultivation.

Acknowledgements

This work was supported by the project AGL 2009-09094, P.J.S.-C. is a FPI scholar, and R.N.-P. a Ramón y Cajal fellow (RYC-2011-08653), all funded by Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. The authors are deeply indebted to Viveros Zuaime and SAT Pistachos de Andalucía (Granada, Spain) for kindly providing the material analyzed in this paper.

References

- Couceiro, J.F., Guerrero, J., Gijón, M.C., Pérez-López, D., Moriana, A., Rodríguez, M., 2013. In: Ediciones Paraninfo, S.A., El Cultivo del Pistacho (Eds.), *Clima: requerimientos del cultivo.*, pp. 25–39.
- CVPO Gazette, 2012. *Official Gazette of the Community Plant Variety Office.*, pp. 53.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 39, 783–791.
- Ferguson, L., Beede, R.H., Haviland, D.R., Holtz, B.A., Kallsen, C.E., Sanden, B.L., 2008. *Pistachio Production Manual*, 5th ed. Omnipress, Madison, WI.
- Ferguson, L., Sanden, B., Grattan, S., Epstein, L., Krueger, B., 2005. *Pistachio rootstocks.* In: Ferguson, L. (Ed.), *Pistachio Production*. University of California, pp. 67–73.
- Guerrero, J., (Doctoral thesis) 2011. *Comportamiento varietal del pistachero (P. vera L.) y respuesta agronómica del portainjerto autóctono P. terebinthus L. en Castilla-La Mancha.* Universidad Politécnica de Madrid, Spain.
- Parfitt, D.E., 2003. 'Bonsai' ornamental pistachio. *HortScience* 38, 1260–1261.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Werner, O., Sánchez-Gómez, P., Guerra, J., Martínez, J.F., 2001. Identification of *Pistacia × saportae* Burnat (Anacardiaceae) by RAPD analysis and morphological characters. *Sci. Hort.* 91, 179–186.
- Yi, T., Wen, J., Golan-Glodhirsh, A., Parfitt, D.E., 2008. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *Am. J. Bot.* 95 (2), 241–251.
- Zohary, M., 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine J. Bot.* 5, 187–228.



Aznarte-Mellado C., Sola-Campoy P.J., Robles F., Guerrero Villaseñor J., Ruiz Rejón C., de la Herrán R., Navajas-Pérez R. 2016. *Nutrient uptake efficiency of five pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties*. J. Elem., 21(1): 141-148. DOI: 10.5601/jelem.2015.20.1.912

NUTRIENT UPTAKE EFFICIENCY OF FIVE PISTACHIO (*PISTACIA VERA* L.) VARIETIES*

Cristina Aznarte-Mellado¹, Pedro J. Sola-Campoy¹,
Francisca Robles¹, Julián Guerrero Villaseñor²,
Carmelo Ruiz Rejón¹, Roberto de la Herrán¹,
Rafael Navajas-Pérez¹

¹Departament of Genetica, University of Granada, Spain

²Omnia Pistacho, Ciudad Real, Spain

Abstract

Pistacia vera L., whose edible fruit is the pistachio, is an economically important crop. It is cultivated worldwide and over 50 different varieties have been described attending to morphological and phenological characteristics. The selection of a suitable cultivar may affect the profitability of the orchards, and thus requires careful consideration for any given region. The type and concentration of nutrients taken up by the plant affect its development and eventually the quality and quantity of the fruits. It is a matter of discussion whether all varieties have the same capacity to absorb nutrients. In order to clarify this aspect, in this study the efficiency of nutrient uptake has been assessed for five pistachio varieties: three males (M38, G1, and Mateur), and two females (Batoury, and Joley), by measuring the concentration of 30 chemical elements in leaves by Inductively Coupled Plasma (ICP) and C/N micro-elemental analyses. Data were subjected to a non-parametric Friedman test, using a series of Wilcoxon Rank Sum test with a Bonferroni correction as *post hoc*s. Our findings demonstrate that all these varieties have an equal uptake capacity for Al, Cr, Cu, K, Li, Mn, Ni, Pb, S, Sr, Ti, Tl, Zn, N, B, Fe, Mg, Na, and V. No differences related to the gender of the plants were detected. Only Mateur exhibited significantly higher levels of Ca and lower levels of C. Stock plants from an experimental plot were used as material. These plants are not used for productive purposes, and flowering and fruiting are partially restricted by removing potential nutrient-demanding structures. These findings support the contention that the presence/absence of such organs has more influence on the nutrient uptake than does the variety itself.

Keywords: pistachio, nutrient uptake, nutrition, nutrient content.

Rafael Navajas-Pérez, Ph.D. Ramón y Cajal senior scientist, Department of Genetics, University of Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, Spain, e-mail: rnavajas@ugr.es

* This work was supported by the project AGL 2009-09094, P.J.S.-C. is a FPI scholar, and R.N.-P. a Ramón y Cajal senior scientist (RYC-2011-08653), all funded by Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain.

INTRODUCTION

Although native to the Mediterranean basin, *Pistacia vera* L. is grown worldwide because of its edible fruit, the pistachio. Pistachio is much appreciated as a finger food and is also used as the main ingredient of some sauces, cold cuts and cheeses, sweets, and pastries. With Iran and the USA as the main producers, the crop is the fifth in global nut production (AMIRTEIMOORI, CHIZARI 2008). Human domestication has given rise to over 50 cultivated varieties, with only few morphological and physiological differences between them: seed size, flowering time and production rate (KASHANINEJAD et al. 2005, RAZAVI et al. 2007a, b, c, CHAHED et al. 2008).

The quality and quantity of fruits and the profitability of the crop depend largely on the ability of the tree to take up nutrients. The influence of a variety/rootstock species on the nutrient-uptake capacity has been suggested (CRANE, IWAKIRI 1986, RAHEMI, TAVALLALI 2007, BROWN et al. 1994). To clarify this issue, in the present study we estimated the uptake of 30 different elements by five pistachio cultivars for which scanty data were available. Three of these cultivars were males: Mateur (cultivated in Morocco and very common in Tunisia), M38 (cultivated in Syria), and G1 (obtained at Centro Agrario el Chaparrillo, Castilla-La Mancha, Spain, from open pollination of var. Kerman), while the other two were females: Batoury – cultivated in Turkey and Syria, and Joley – cultivated in the USA (LÓPEZ et al. 2005).

MATERIALS AND METHODS

Plant material and experimental design

The study was conducted in a field of source plants at the Centro Agrario el Chaparrillo, Castilla-La Mancha (Spain), in November 2012. These plants are maintained as a collection of different varieties and do not serve for productive purposes, so that the number of individuals belonging to each variety is usually low. A total of four plants per variety (Batoury, Joley, Mateur, M38, and G1, all grafted onto *P. atlantica* Desf.) were sampled. All plants were grafted in 1993 except for M38 (1994) and G1 (2003). According to the FAO classification, the soil is a luvisol, and the pH is over 8 due to a high content on CaCO_3 . The cation-exchange capacity (CEC) is base saturated, and the organic matter content is low. All plants were maintained with minimal management under a controlled deficit irrigation strategy. Vermicompost was used as fertilizer ($3,000 \text{ kg ha}^{-1}$ every two years). No foliar feeding was applied except for two copper fungicidal treatments.

Mineral uptake by the different varieties

Mineral uptake capability of the selected varieties was determined by evaluating the concentration of 30 chemical elements (Al, As, B, Be, Bi, C, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, N, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn) in fresh leaves randomly taken from the trees sampled. These elements are considered essential for plant nutrition. The samples consisted of 100 g of leaf tissue, dried at 60°C for 24h, and finely powdered. A Flash EA 1112 Series-LECO TRUSPEC device was used to analyze the total C and N, while the other 28 elements were analyzed by HNO₃/H₂O₂ (4:1) digestion in an UltraClave Microwave Milestone, and ICP-OES using an ICAP 6500 DUO device. The limit of detection for Be, Bi, Co, Li, Mo, Sb, Se, Sr, Ti, Tl and V is <0.5 mg kg⁻¹, <0.1 mg kg⁻¹ for As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn and B, <2.0 mg kg⁻¹ for Al, Fe, S and P, and <100.0 mg kg⁻¹ for K, Na, Mg and Ca. The wavelengths and the measurement degree of uncertainty are shown in the Table 1. The analyses were made at the Ionomic Laboratory of CEBAS-CSIC (Murcia, Spain), following the reporting standard UNE-EN ISO 11885.

Statistical analyses

To test mineral concentration differences in leaves, data were subjected to a non-parametric Friedman test (FRIEDMAN 1937) using the SPSS software package (SPSS 20 for Windows, 2007). As *post hoc* analyses, a series of Wilcoxon Rank Sum test with a Bonferroni correction were used ($p < 0.025$). The existence of outliers was ruled out using the Grubbs test.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of nutrient accumulation in leaves showed that the uptake of nine elements As, Be, Bi, Cd, Co, Mo, P, Sb, and Se was below the detection range (<0.5 mg kg⁻¹ for Be, Bi, Co, Mo, Sb and Se, <0.1 mg kg⁻¹ for As and Cd, and <2 mg kg⁻¹ for P) and thus were excluded from further analysis. The concentration mean values and the standard deviation of all elements are shown in Table 1.

All the varieties exhibit the same nutrient-uptake efficiency for 19 of the elements analyzed (see Table 1). However, Mateur showed significant accumulation of Ca ($\chi^2 = 10.886$, $p = 0.028$) and loss of C ($\chi^2 = 11.800$, $p = 0.019$) at a significance level of 0.05 (Table 2).

In terrestrial plants, the water and solutes move from the soil through the roots into the xylem vessels, from where they are delivered to different organs and used in a wide variety of processes throughout the plant. The uptake rate may vary due to a number of factors such as the plant age, the seasonal variations, grafting, mycorrhizae interactions, or differential crop load (TAVALLALI, RAHEMI 2007, MARTÍNEZ-BALLESTA et al. 2010, AZNARTE-MELLADO et al. 2014).

Accumulation of chemical elements by variety (means and deviations) with the Friedman test data

Element	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	$\chi^2(2)$	P value	Wave-length (nm)	Degree of uncertainty (%)
	Batoury		Joley		Mateur		M38		G1					
Al (mg kg ⁻¹)	54.29	13.53	84.15	20.51	87.30	11.94	94.15	36.16	82.25	24.03	4.400	0.355	167.079 396.152	5.38
B (mg kg ⁻¹)	168.9	34.40	158.8	23.35	160.90	21.06	161.1	19.52	215.6	26.33	8.200	0.085	208.959	3.54
C* (g kg ⁻¹)	460.6	0.29	451.0	0.774	440.3	0.317	465.8	0.725	454.6	0.216	11.80	0.019*
Ca* (g kg ⁻¹)	16.62	0.207	18.62	0.304	23.75	0.290	16.05	0.187	16.70	0.212	10.88	0.028*	184.006 315.887	4.34
Cr (mg kg ⁻¹)	0.257	0.253	0.057	0.067	0.057	0.066	0.087	0.063	0.100	0.125	4.000	0.406	205.552	4.3
Cu (mg kg ⁻¹)	46.67	25.68	44.09	28.04	78.58	42.45	56.28	39.45	66.81	61.10	1.400	0.844	324.754 224.700	4.12
Fe (mg kg ⁻¹)	43.09	5.162	71.51	8.715	62.48	7.99	65.62	19.96	58.39	12.18	2.603	0.626	259.940 238.204	3.92
K (g kg ⁻¹)	7.65	0.073	19.77	0.172	17.30	0.301	15.30	0.43	17.40	0.248	9.400	0.052	766.490	4.56
Li (mg kg ⁻¹)	2.435	0.785	1.730	0.261	1.787	0.254	1.505	0.157	2.150	0.509	7.949	0.093	670.784	6.78
Mg (g kg ⁻¹)	4.92	0.118	5.95	0.149	5.47	0.062	3.72	0.038	5.55	0.079	8.759	0.067	202.582 279.079	4.7
Mn (mg kg ⁻¹)	44.06	9.292	55.14	8.395	47.86	1.922	41.94	5.201	49.19	7.256	4.000	0.406	259.373	6.15
N (g kg ⁻¹)	14.22	0.110	16.37	0.217	13.35	0.163	13.67	0.159	14.37	0.120	3.800	0.434
Na (g kg ⁻¹)	0.03	0.002	0.04	0.001	0.06	0.002	0.08	0.003	0.04	0.002	5.527	0.237	589.592	5.23
Ni (mg kg ⁻¹)	54.29	13.53	84.15	20.52	87.30	11.94	94.15	36.16	82.25	24.03	2.987	0.560	231.604	4.83
Pb (mg kg ⁻¹)	0.282	0.169	0.230	0.092	0.342	0.096	0.305	0.145	0.340	0.067	2.600	0.627	220.353	6.14
S (g kg ⁻¹)	1.00	0.014	1.17	0.017	1.07	0.005	0.95	0.010	1.07	0.009	3.884	0.422	180.731 182.034	4.25
Sr (mg kg ⁻¹)	367.8	67.80	442.1	109.8	474.3	63.28	326.9	38.92	344.6	61.67	7.400	0.116	421.552	7.04
Ti (mg kg ⁻¹)	3.247	0.640	5.000	1.283	5.202	0.728	6.040	2.305	4.867	1.667	6.200	0.185	336.121 334.941	8.12
Tl (g kg ⁻¹)	127.1	3.216	170.3	5.182	147.3	2.429	74.17	0.612	146.9	3.524	8.800	0.066	190.856	7.05
V (mg kg ⁻¹)	3.335	0.916	4.012	0.998	3.707	0.411	2.515	0.215	3.715	0.524	8.800	0.066	268.796 292.402	6.78
Zn (mg kg ⁻¹)	9.165	2.646	11.05	1.916	13.64	4.466	13.09	1.336	12.43	3.097	7.646	0.150	206.200	5.02

* C and Ca showed significant variations at a signification value $\alpha < 0.05$. Wavelength and ICP measurement's degrees of uncertainty are shown.

Our data suggest that Batoury, Joley, Mateur, M38 and G1 have an equal uptake (regardless of the variety gender), given that no significant differences were found in the accumulation of 19 elements. Only Mateur showed a biased accumulation of Ca and a significantly low concentration of C. Our data might be the reflection of phenological differences. In fact, Mateur is the earliest variety and thus should be the first to show signs of ageing (GUERRERO VILLASE-

Table 2

Graphic representation of the mean values in C and Ca concentration by variety, and Wilcoxon Rank Sum test analysis showing significant differences for the variety Mateur (bold).

Chemical element	Concentration in leaves				Graphics
	variety	concentration (g kg ⁻¹)	$\chi^2(2)$	<i>p</i> value	
Calcium	Batoury Joley G1 Mateur M38	16.62 18.62 16.70 23.75 16.05	10.88	0.028	
Carbon	Batoury Joley G1 Mateur M38	460.6 451.0 454.6 440.3 465.8	11.80	0.019	

NOR et al. 2010). Both Ca and C are related to vegetative propagation. At the time of our sampling (early November), the leaf production ceases, plants stop growing and senescence begins. That would explain the low levels of C, strongly correlated with leaf production (JONASSON et al. 1997), and high levels of Ca, differentially accumulated in senescent tissues (PICCHIONI et al. 1997).

The inactivity of pistachio trees at this stage is illustrated in Figure 1, which compares our data to the range of 10 chemical elements found in the literature. Although six elements were within the range of sufficiency (four micronutrients, i.e. B, Fe, Mn and Zn; and two macronutrients, i.e. Ca and K), Mg, N, and S showed a basic concentration, implying a decreasing trend (Figure 1). Only Cu was over the normal range in the plants studied probably due to fungicidal treatments (Figure 1).

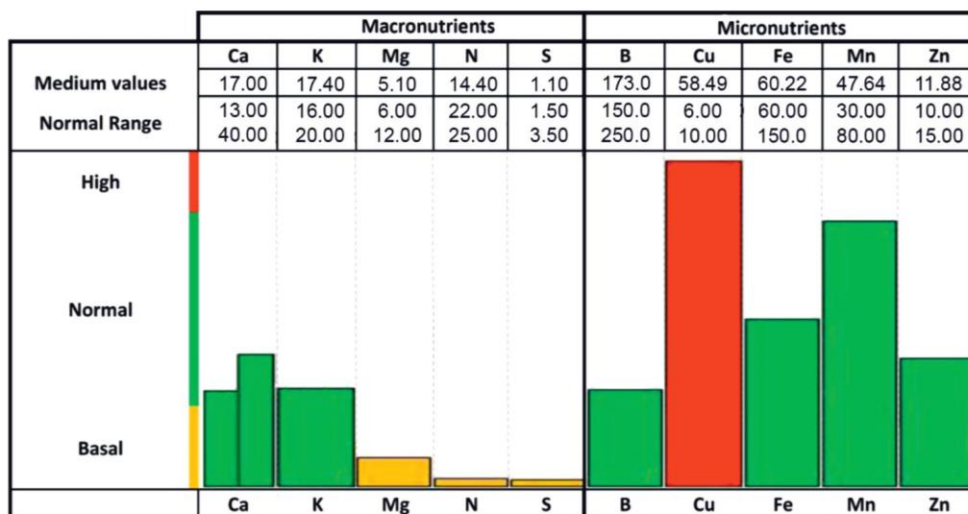


Figure 1. Graphic representation of the relative mean values of concentrations of macro- and micronutrients in leaves of the five pistachio varieties analyzed in this paper. The nutritional state of the plants is estimated according to the sufficiency ranges (sufficiency ranges in mg kg^{-1} for micronutrients and in g kg^{-1} for macronutrients taken from PICCHIONI et al. (1997) and HARMANKAYA et al. (2014) as measured in early August, corresponding to stage III, beginning of fruiting. Our data were collected in November)

There are two innovative aspects of our analysis. Firstly, a higher number of elements was analyzed. Secondly, the plants of pistachio used to obtain material belong to a plant collection. These types of plants do not serve for production purposes but for experimental observations, and consequently are subject to frequent pruning. This would partially restrict flowering and fruiting, by removing potential nutrient-demanding structures. In this sense, VEMMOS (1999) demonstrated that while fruiting trees exhibit a variable uptake of minerals, mainly Mg, Ca, Mn, K, Zn, and N, non-fruiting pistachio trees maintain a constant concentration of those nutrients. Also, a reduction of P and N is observed in mature fruit trees after a heavy fruiting year (ROSENCRANCE et al. 1996).

All these data suggest that the physiological state of the plant and the demand of nutrients from different structures (e.g. buds, flowers, fruits, leaves) are more influential factors in the distribution of nutrients throughout the plant than is the variety itself.

CONCLUSIONS

1. The five pistachio varieties analyzed here (males M38, G1, Mateur, and females Batoury and Joley) exhibited a comparable capacity of nutrient

uptake for 19 out of 30 chemical elements measured, regardless of the variety gender.

2. Mateur showed a significant accumulation of Ca and a significant low concentration of C, direct consequences of tissue senescence. Mateur is the earliest variety and thus, these should be the first signs of ageing.

3. We studied non-producing pistachio trees used for experimental observations, and consequently subject to frequent pruning. This partially restricts flowering and fruiting, by removing potential nutrient-demanding structures. Our data support the contention that the presence of such organs is more influential in nutrient uptake than the variety itself.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are deeply indebted to Centro Agrario el Chaparrillo (Castilla-La Mancha, Spain) for kindly providing the material analyzed in this paper.

REFERENCES

- AMIRTEIMOORI S., CHIZARI A. 2008. *An investigation of comparative advantage of pistachio production and exports in Iran*. JAST, 10: 395-403.
- AZNARTE-MELLADO C., SOLA-CAMPOY P., ROBLES F., RUIZ REJÓN C., DE LA HERRÁN R., NAVAJAS-PÉREZ R. 2014. *Mycorrhizal treatments increase the compatibility between Pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars and seedling rootstock of *Pistacia terebinthus* L.* Sci. Hort., 176: 79-84.
- BROWN P., ZHANG Q., FERGUSON L. 1994. *Influence of rootstock on nutrient acquisition by pistachio*. J. Plant Nutrit., 17(7): 1137-1148.
- CHAHED T., BELLILA A., DHIFI W., HAMROUNI I., M'HAMDI B., KCHOUK M., MARZOUK B. 2008. *Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects*. Grasas y Aceites, 59(1): 51-56.
- CRANE J., IWAKIRI B. 1986. *Pistachio yield and quality as affected by rootstock*. HortSci., 21: 1139-1140.
- FRIEDMAN M. 1937. *The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance*. J. Am. Statist. Assoc., 32(200): 675-701.
- GUERRERO VILLASEÑOR J., GILÓN LÓPEZ M., PÉREZ LÓPEZ D., COUCEIRO LÓPEZ J. 2010. *Edafological requirements and plant material for pistachio cultivation*. Agricultura, 931: 558-562. (in Spanish)
- HARMANKAYA M., OZCAN M., JUHAIMI F. 2014. *Mineral contents and proximate composition of *Pistacia vera* kernels*. Environ Monit Assess, 186(7): 4217-21.
- JONASSON S., MEDRANO H., FLEXAS J. 1997. *Variation in leaf longevity of *Pistacia lentiscus* and its relationship to sex and drought stress inferred from leaf δC^{13}* . Funct. Ecol., 11: 282-289.
- KASHANINEJAD M., MORTAZAVI A., SAFEKORDI A., TABIL L. 2005. *Some physical properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) nut and its kernel*. J. Food Engin., 72(1): 30-38.
- LÓPEZ J., MORIANA A., UBILLOS M., VILLASEÑOR J. 2005. *Varieties of pistachio cultivated in Castilla-La Mancha*. Vida Rural, 93: 46-50. (in Spanish)
- MARTÍNEZ-BALLESTA M., ALCARAZ-LÓPEZ C., MURIES B., MOTA-CADENAS C., CARVAJAL M. 2010. *Physiological aspects of rootstock-scion interactions*. Sci. Hort., 127: 112-118.

-
- PICCHIONI G., BROWN P., WEINBAUM S., MURAOKA T. 1997. *Macronutrient allocation to leaves and fruit of mature, alternate-bearing pistachio trees: Magnitude and seasonal patterns at the whole-canopy level*. JASHS, 122(2): 267-274.
- RAHEMI M., TAVALLALI V. 2007. *Effects of rootstock on Iranian pistachio scion cultivars*. Fruits, 62(05): 317-323.
- RAZAVI S., AMINI A., RAFA A., EMADZADEH B. 2007c. *The physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety*. Part III. *Frictional properties*. J. Food Engin., 81(1): 226-235.
- RAZAVI S., EMADZADEH B., RAFA A., AMINI A. 2007a. *The physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety*. Part I. *Geometrical properties*. J. Food Engin., 81(1): 209-217.
- RAZAVI S., RAFA A., MOGHADDAM T., AMINI A. 2007b. *Physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety*. Part II. *Gravimetric properties*. J. Food Engin., 81(1): 218-225.
- ROSENCRANCE R., WEINBAUM S., BROWN P. 1996. *Assessment of nitrogen, phosphorus, and potassium uptake capacity and root growth in mature alternate-bearing pistachio (Pistacia vera) trees*. Tree Physiol., 16: 949-956.
- TAVALLALI V., RAHEMI M. 2007. *Effects of Rootstock on Nutrient Acquisition by Leaf, Kernel and Quality of Pistachio (Pistacia vera L.)*. Am.-Eur. J. Agric. Environ Sci., 2(3): 240-246.
- VEMMOS S. 1999. *Mineral composition of leaves and flower buds in fruiting and non-fruiting pistachio trees*. J. Plant Nutrit., 22(8): 1291-1301.



CPVO

Community Plant Variety Office

Официален бюлетин на Службата на Общността за сортовете растения
Boletín Oficial de la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales
Úřední věstník Odrůdového úřadu Společenství
EF-Sortmyndighedens Officielle Tidende
Amtsblatt des Gemeinschaftlichen Sortenamtes
Ühenduse Sordiameti ametlik väljaanne
Επίσημη Εφημερίδα του Κοινοτικού Γραφείου Φυτικών Ποικιλιών
Official Gazette of the Community Plant Variety Office
Bulletin officiel de l'Office communautaire des variétés végétales
Bollettino ufficiale dell'Ufficio comunitario delle varietà vegetali
Kopienas Augu šķirņu biroja Oficiālais Vēstnesis
Bendrijos augalų veislių tarnybos oficialusis žurnalas
A Közösségi Növényfajta Hivatal Hivatalos Közlönye
Gazzetta Uffiċjali ta' l-Uffiċċju Komunitarju tal-Varjetajiet ta' Pjanti
Mededelingenblad van het Communautair Bureau voor Plantenrassen
Urzędowa Gazeta Wspólnotowego Urzędu Odmian Roślin
Boletim Oficial do Instituto Comunitário das Variedades Vegetais
Buletinul oficial al Oficiului Comunitar pentru Soiuri de Plante
Úradný vestník Úradu Spoločenstva pre odrody rastlín
Uradno glasilo Urada Skupnosti za rastlinske sorte
Yhteisön kasvilajikeviraston virallinen lehti
Officiell tidskrift för Gemenskapens växtsortsmyndighet

6•2012

15|12|2012

- BG** Служба на Общността за сортовете растения • Официален бюлетин на Службата на Общността за сортовете растения
- ES** Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales • Boletín Oficial de la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales
- CS** Odrůdový úřad Společenství • Úřední věstník Odrůdového úřadu Společenství
- DA** EF-Sortsmyndigheden • EF-Sortsmyndighedens Officielle Tidende
- DE** Gemeinschaftliches Sortenamts • Amtsblatt des Gemeinschaftlichen Sortenamtes
- ET** Ühenduse Sordiamet • Ühenduse Sordiameti ametlik väljaanne
- EL** Κοινοτικό Γραφείο Φυτικών Ποικιλιών • Εμίσσημη Εφημερίδα του Κοινοτικού Γραφείου Φυτικών Ποικιλιών
- EN** Community Plant Variety Office • Official Gazette of the Community Plant Variety Office
- FR** Office communautaire des variétés végétales • Bulletin officiel de l'Office communautaire des variétés végétales
- IT** Ufficio comunitario delle varietà vegetali • Bollettino ufficiale dell'Ufficio comunitario delle varietà vegetali
- LV** Kopienas Augu šķirņu birojs • Kopienas Augu šķirņu biroja Oficiālais Vēstnesis
- LT** Bendrijos augalų veislių tarnyba • Bendrijos augalų veislių tarnybos oficialusis žurnalas
- HU** Közösségi Növényfajta Hivatal • A Közösségi Növényfajta Hivatal Hivatalos Közlönye
- MT** L-Uffiċċju Komunitarju tal-Varjetajiet ta' Pjanti • Gazzetta Uffiċjali ta' l-Uffiċċju Komunitarju tal-Varjetajiet ta' Pjanti
- NL** Communautair Bureau voor plantenrassen • Mededelingenblad van het Communautair Bureau voor Plantenrassen
- PL** Wspólnotowy Urząd Odmian Roślin • Urzędowa Gazeta Wspólnotowego Urzędu Odmian Roślin
- PT** Instituto Comunitário das Variedades Vegetais • Boletim Oficial do Instituto Comunitário das Variedades Vegetais
- RO** Oficiul Comunitar pentru Soiuri de Plante • Buletinul oficial al Oficiului Comunitar pentru Soiuri de Plante
- SK** Úrad Spoločenstva pre odrody rastlín • Úradný vestník Úradu Spoločenstva pre odrody rastlín
- SL** Urad Skupnosti za rastlinske sorte • Uradno glasilo Urada Skupnosti za rastlinske sorte
- FI** Yhteisön kasvilajikevirasto • Yhteisön kasvilajikeviraston virallinen lehti
- SV** Gemenskapens växtsortsmyndighet • Officiell tidskrift för Gemenskapens växtsortsmyndighet

3 boulevard Maréchal Foch
 CS 10121
 FR-49101 ANGERS CEDEX 2
 Tel: +33(0) 241 25 64 00
 Fax: +33(0) 241 25 64 10
 Email: cpvo@cpvo.europa.eu
 Website: www.cpvo.europa.eu

- BG** В този брой е включена цялата информация за периода от 01.09.2012г. до 31.10.2012г.(Страница 2)
- ES** Esta edición contiene informaciones referidas al período del 01.09.2012 al 31.10.2012 inclusive(Página 3)
- CS** Toto vydání obsahuje veškeré informace pro období od 01.09.2012 do 31.10.2012(Strana 4)
- DA** Dette nummer indeholder oplysninger for perioden fra den 01.09.2012 til den 31.10.2012 inklusive(Side 5)
- DE** Die vorliegende Ausgabe enthält alle Informationen für den Zeitraum vom 01.09.2012 bis 31.10.2012(Seite 6)
- ET** Käesolev väljaanne sisaldab täielikku informatsiooni perioodi 01.09.2012 kuni 31.10.2012 kohta(Lehekülj 7)
- EL** Η παρούσα έκδοση περιέχει πληροφορίες για τη χρονική περίοδο από 01.09.2012έως και 31.10.2012(Σελίδα 8)
- EN** This edition contains all information for the period 01.09.2012 to 31.10.2012(Page 9)
- FR** Cette édition contient des informations concernant la période du 01.09.2012 au 31.10.2012 inclus(Page 10)
- IT** Questa edizione contiene informazioni relative al periodo dal/dall'01.09.2012 al 31.10.2012 inclusi(Pagina 11)
- LV** Šajā izdevumā ievietota visa informācija par laika periodu no 01.09.2012 līdz 31.10.2012(Lappuse 12)
- LT** Šiame numeryje pateikta visa laikotarpio 01.09.2012 – 31.10.2012 informacija(Puslapis 13)
- HU** Ez a kiadvány a 01.09.2012 és 31.10.2012 közötti időszakra vonatkozó összes információt tartalmazza(Oldal 14)
- MT** Din l-edizzjoni tiġbor l-informazzjoni kollha għall-perjodu mill-01.09.2012 sat-31.10.2012(Paġna 15)
- NL** Deze editie bevat informatie over de periode van 01.09.2012 tot en met 31.10.2012(Bladzijde 16)
- PL** Niniejsza edycja zawiera wszystkie informacje za okres od 01.09.2012 do 31.10.2012(Strona 17)
- PT** Esta edição contém informações relativas ao período de 01.09.2012 a 31.10.2012, inclusive(Página 18)
- RO** Prezenta ediție cuprinde toate informațiile pentru perioada 01.09.2012 - 31.10.2012(Pagina 19)
- SK** Toto vydanie obsahuje všetky informácie za obdobie od 01.09.2012 do 31.10.2012(Strana 20)
- SL** Ta izdaja vsebuje vse informacije za obdobje od 01.09.2012 do 31.10.2012(Stran 21)
- FI** Tämä painos sisältää tiedot ajalta 01.09.2012 - 31.10.2012(Sivu 22)
- SV** Detta nummer innehåller upplysningar för perioden 01.09.2012 - 31.10.2012(Sida 23)

1	2	3	4	5	6	7
<i>Persea americana</i> Mill.						
2012/1977	00345	07817/07818/02281/ 02282/07819	02085	UZI	pp14	F
2012/1978	00345	07817/02282/02281/ 07818/07819	02085	STEDDOM	pp24	F
2012/1979	00345	07817/02281/02282/ 07819/07818	02085	ZENTMYER	pp4	F
<i>Petunia</i> Juss.						
2012/2082	05505	05505		DUEPOTPOP	duepotpop	C
2012/2083	05505	05505		DUESURMINIBU	duesurminibu	F
2012/2084	05505	05505		DUESURYEL	duesuryel	C
2012/2085	05505	05505		DUESURPUIC	duesurpuic	C
2012/2086	05505	05505		DUEPOTBLAIC	duepotblaic	F
2012/2087	05505	05505		DUEPLURE	dueplure	C
2012/2088	05505	05505		DUEPLUPIN	dueplupin	C
2012/2089	05505	05505		DUEPEPUR	duepepur	C
2012/2090	05505	05505		DUEPEPLA	duepepla	C
2012/2145	01856	01856		FLORTUNIA BLUSTA	q10-73-5	F
2012/2182	00633	07838	00423	BALPELITE	balpelite	F
2012/2183	00633	05623	00423	BALSPUNURST	balspunurst	F
2012/2288	00633	00509	00423	BALPERBLUES	balperblues	F
<i>Phalaenopsis</i> Blume						
2012/2022	06202	06202		MI00298	mi00298	C
2012/2023	06202	06202		MI00256	mi00256	C
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.						
2012/1753	00648/07786	07742/07773/07785/ 07783/07784	05899	POP NUÑA BLANCA	pop nuña blanca [pmb-344 o pha-411- 1-54-54-05, línea f2 :7 pmb0225/pha1037]	C
<i>Philadelphus delavayi</i> L. Henry × <i>Ph. microphyllus</i> A. Gray						
2012/2177	02741	02741	01589	DAINTY LADY	dainty lady	F
<i>Photinia</i> × <i>fraseri</i> Dress × <i>Photinia serratifolia</i> (Desf.) Kalkman						
2012/2367	07435	07435		KOLMAVOCA	701-01	F
<i>Physocarpus opulifolius</i> (L.) Maxim.						
2012/1881	04736	07802	03881	JEFAM	jefam	F
<i>Pistacia atlantica</i> Desf. × <i>P. vera</i> L.						
2012/1925	07810	07811/07812/07813/ 07814/07815		VIGROS	pistacia x bio200	F
<i>Pisum sativum</i> L.						
2012/1724	01870	04461/07778		FRASER	isci 19/6-1	F
2012/2124	00031	00031		ELIXIA	rc 3589	F
<i>Poa pratensis</i> L.						
2012/1921	03304	06759		TOUCHE	psg23180	F
<i>Portulaca oleracea</i> L.						
2011/1612	06640	06640	01903	SUPHA21	supha21	C
2011/1613	06640	06640	01903	SUPHA32	supha32	C
2011/1615	06640	06640	01903	SUPHA50	supha50	C
<i>Prunus armeniaca</i> L.						
2012/2221	04411	04411		RAMBO	s 77-2	F