

*Mejora vegetal en pimiento:
Una herramienta frente a los patógenos del suelo*



Nuevas resistencias en pimiento para el control de patógenos del suelo

Caridad Ros Ibáñez

Investigadora del Instituto Murciano de Investigación Agrario y Alimentario

Equipo de Protección de Cultivos del IMIDA

[Email: caridad.ros@carm.es](mailto:caridad.ros@carm.es)

Principales problemas del suelo

Phytophthora sp.

- Factor limitante del cultivo de pimiento
- 40% invernaderos del Campo de Cartagena (CC) contaminados
- 1º sp fue *P. capsici* y ahora en *P. parasítica*
- Patógeno en torno al cual se han diseñado las estrategias de desinfección del suelo



Plantas marchitas



Daños en el cuello



Muerte de plantas

Meloidogyne incognita

- Polífago cosmopolita
- Endoparasitos obligados
- Importantes pérdidas económicas (40% hort)
- El 90% de los invernaderos están contaminados

Duración ciclo:
23 días a 24°C
25 días a 21°C



Reproducción partenogenética
500 a 1500 huevos /masa



Control de los patógenos de suelo

Desinfección del suelo

- Fumigantes químicos en uso: solo tiene permiso de uso a través de usos excepcionales el 1,3 dicloropropeno y la cloropicrina
- La biosolarización:
 - Iniciada en agosto resultados buenos hongo y aleatorios nematodos
 - 1º semana de septiembre muestra deficiencias muy notables
 - La adición de algunas enmiendas mejoran los efectos de la BS en septiembre y octubre (Bagazo de cerveza, Torta de colza)
 - La combinación de la BS + injerto mantiene la población *Meloidogyne avirulenta* al gen Me3

mata el 100%	juveniles	390h a 38°C
		33h a 40°C
		13h a 42°C
	huevos	46h a 40°C
14h a 42°C		



Control de los patógenos de suelo

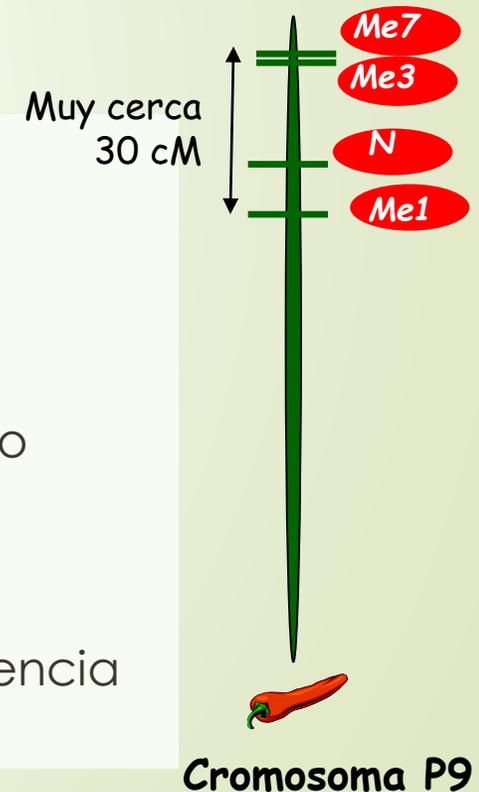
Uso de resistencias

- Al hongo (poligénica recesiva con efecto aditivos) tiene un buen comportamiento y se presenta estable en la reiteración del cultivo
- Al nematodo (monogénica)

Existen 3 genes *Me1*, *Me3* y *N*

- El gen *Me3* es remontada cuando se reitera el cultivo
 - El gen *Me1* no es remontada
 - La base genética donde se introduce un gen influye en la expresión del mismo
- Estrategias de manejo

- La rotación o co-cultivo, piramidalización genes *Me3* y *Me1* preservan la resistencia
- Combinación de la biosolarización + uso de resistencia



Estudio de las posibles resistencias a *Meloidogyne sp.* y *Phytophthora sp.* en el banco de germoplasma de pimiento del IMIDA

Líneas bien adaptadas a:

Ciclo de cultivo

Características físico-químicas del suelo

Características climáticas de la zona

1. Conservación y multiplicación de inóculo
2. Ensayos en condiciones controladas
3. Multiplicación de semilla y realización de cruces
4. Evaluación de líneas del banco frente a *M. incognita* en condiciones controladas
5. Evaluación de líneas del banco frente a *M. incognita* en condiciones de campo
6. Evaluación de líneas del banco frente a *Phytophthora* sp.
7. Selección de una línea segregante con resistencia a *Meloidogyne* sp. y *Phytophthora* sp
8. Estudio de la resistencia de Alcos a *M. incognita*
9. Profundización en la resistencia de Alcos
10. Estudio de la resistencia de P13 a *M. incognita*
11. Construcciones de material resistente. Piramidalización de genes
12. Aplicación de la resistencia en estrategias de control del nematodo en condiciones de campo

Conservación y multiplicación de inoculo

Meloidogyne sp del Campo de Cartagena

Mantenimiento de la colección de poblaciones de *Meloidogyne* sp. sobre Marmande

Multiplicación de poblaciones para inoculo para los ensayos:

Aislado MI-CH (virulenta al Me3) → Atlante

Aislado MI-E (avirulenta al Me3) → Lamuyo

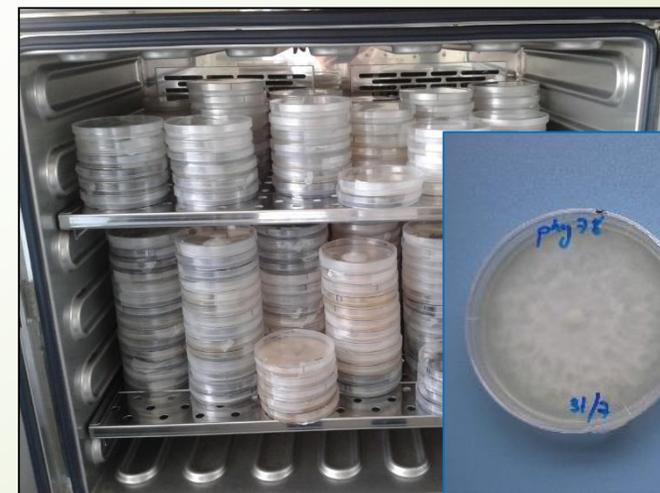


Phytophthora sp del Campo de Cartagena

Mantenimiento de la colección de aislados de *Phytophthora* sp. en micoteca

Multiplicación de aislados para inoculo para los ensayos

Desventaja: pérdida de patogeneicidad



Experimentos en condiciones controladas: testaje de resistencia

Aislados de *Meloidogyne*

M. incognita

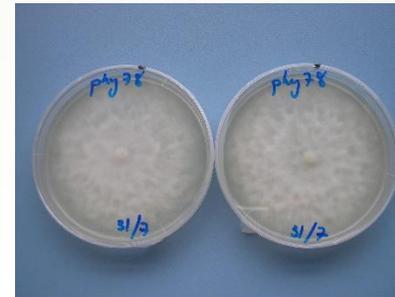
- Mi-CH → virulento a Me3
- Mi-E → avirulento a Me3

Inoculación

- 400 J2/planta
- plantas estado de 4-6 hojas
- macetas con sustrato arenoso

Evaluación

- 8 semanas después = 1 ciclo completo nematodo
- lavado raíces y tinción con eosina
- conteo número total de masas de huevos/planta



Aislados de *Phytophthora*

- *Phytophthora capsici*
- *Phytophthora parasitica*

Inoculación

- 10 ml suspensión/planta
- plantas estado de 4-6 hojas
- macetas con sustrato comercial

Evaluación

- 8 semanas después = tiempo para causar muerte por
- lavado raíces y análisis de tejidos de raíz y cuello dañados

Multiplicación de semilla y realización de cruces

- ❑ En cámara de cultivo: 25°C, 70-90% HR y fotoperiodo de 8 horas luz
- ❑ Plantas madre en macetas de 4 litros
- ❑ Cruces seleccionando flores en el momento anterior a la antesis



Sánchez, F 2015. Tesis doctoral

Evaluación líneas del banco de germoplasma del IMIDA frente a *Meloidogyne incognita*

Genotipos	MI-E			MI-CH		
	IA ^a	MHs ^b	% plantas ^b afectadas	IA ^a	MHs ^b	% plantas ^b afectadas
Carolina Cayene (N)	0,2ab	0,2ab	20,0ab	1,2a	26,4b	100,0a
Carolina Wonder (N)	0,0a	0,0a	0,0a	5,1fg	235,8de	100,0a
Charleston Belle (N)	0,0a	0,0a	0,0a	5,0fg	224,8de	100,0a
K-522	1,1bcd	50,4b	40,0bc	4,6efg	191,8de	100,0a
K-801	3,6ef	213,0cd	100,0d	5,2fg	230,0de	100,0a
K.P.	3,9ef	288,6d	100,0d	4,0def	179,2de	100,0a
P13	1,4cd	16,0b	100,0d	2,4bc	64,8bc	100,0a
P26 (Me 7 = Me3)	0,0a	0,0a	0,0a	3,6cde	69,0bc	100,0a
P32	1,2cd	12,8b	100,0d	2,0b	47,2b	100,0a
P33	1,2cd	8,4b	100,0d	ne	ne	100,0a
P36	0,6bc	6,6ab	60,0c	1,0a	10,2a	100,0a
PI-152225	2,8e	102,0c	100,0d	1,2a	38,6b	100,0a
PI-159536	3,9ef	278,8cd	100,0d	4,0def	136,6cd	100,0a
S.G.	0,2ab	0,4ab	20,0ab	3,2cd	62,8bc	100,0a
T.C.	5,1f	250,8cd	100,0d	4,5defg	257,0de	100,0a
Yahualica	1,6d	77,4b	40,0bc	3,5de	197,6de	100,0a
DLL (S)	5,2f	283,0cd	100,0d	5,5g	299,4e	100,0a

Condiciones controladas

- 12 Líneas puras con resistencia no conocida
- Híbrido F1 obtenido por el IMIDA (P26):
Alcos x SCM (Me3 = Me7)
- 3 líneas puras gen N, DLL: Línea pura sin resistencia
- Inoculación con 400J2/pl
- 2 poblaciones de *M. incognita*: Mi-CH , Mi-E
- Hay líneas con buen comportamiento frente a los 2 aislados *M. incognita*
- Podrían ser portadores de genes mayores (Me1, Me3 y/o N) o de resistencia parcial como la que porta Alcos
- Los marcadores moleculares ligados a los genes (Me1, Me3 y/o N) podrían identificar las pls portadoras de genes

Evaluación líneas del banco de germoplasma del IMIDA frente a *Meloidogyne incognita*

Condiciones campo



Genotipos	IA	% plantas	Producción comercial
Abakara	1,9c	86,7ab	7,5a
Alcos	1,8c	100,0b	7,5a
Katmandú	1,5bc	73,3ab	7,2a
P13	0,6a	53,3a	6,5a
P32	0,9ab	73,3ab	5,2ab
P33	1,1bc	86,7ab	4,3b
P36	0,9ab	40,0a	6,8a
Gacela	4,7d	100,0b	7,9a

- 5 Líneas puras con resistencia no conocida
- 2 variedades comerciales (Me1, Syngenta seeds)
- 1 variedad Gacela (Syngenta seeds)
- Población de *M. incognita* en proceso de selección de virulencia al gen Me3
- Bloques al azar 3 rep. De 45 pls/fila
- Suelo biosolarizado en octubre para disminuir fatiga

- Algunas líneas presentan buen comportamiento frente al nematodo en condiciones de campo
- Las plantas injertadas sobre algunas líneas muestran producción comercial similar a las variedades comerciales

Utilización para los programas de mejora de pimiento frente a patógenos de suelo

Evaluación líneas del banco de germoplasma del IMIDA frente a *Phytophthora sp*

ENTRADA	P. capsici		P. parasitica	
	% pls muertas	% pls afectadas	% pls muertas	% pls afectadas
P 42	0	0	100	100
P 43	40	40	100	100
P 44	40	60	100	100
P 45	60	60	100	100
P 46	60	60	100	100
P 47	60	80	80	100
P 48	100	100	20	80
P 49	80	80	20	60
P 50	0	0	100	100
P 51	100	100	100	100
P 52	60	60	0	100
P 53	100	100	100	100
P 54	80	80	40	100
P 57	20	20	80	100
P 58	100	100	80	100
P 59	100	100	20	100
LAMUYO	100	100	100	100
SCM	0	0	40	60
YOLO WONDER	0	0	60	100
DATLER	80	100	100	100
PI201234	0	0	20	60

Condiciones controladas

- 16 Líneas puras con resistencia no conocida
- SCM 334: resistente a *Phytophthora sp*.
- Lamuyo: Línea pura sin resistencia
- 10 ml suspensión de hongo triturado a cada planta
- Dos cepas de *Phytophthora sp*.

Algunas líneas presentan buen comportamiento frente a uno de los dos aislados

Utilización para los programa de mejora de pimiento frente a patógenos de suelo



Selección de una línea segregante con resistencia a *Meloidogyne* sp. y *Phytophthora* sp

Línea	Marcador CD	Marcador F4R4	IA MI-CH	Genes de resistencia	Línea	Marcador CD	Marcador F4R4	IA MI-CH	Genes de resistencia
Smith Nº 5 a	R	S	0	Me1	Smith Nº 5c-5	S	S	8	ningún gen
Smith Nº 5 b	R	S	1	Me1	Smith Nº 5c-6	R	S	0	Me1
Smith Nº 5 c	R	S	2	Me1	Smith Nº 5c-7	R	S	0	Me1
Smith Nº 5 d	R	S	1	Me1	Smith Nº 5c-8	R	S	0	Me1
Smith Nº 5 e	S	S	7	ningún gen	Smith Nº 5d-1	R	S	0	Me1
Smith Nº 5 f	S	S	6	ningún gen	Smith Nº 5d-2	R	S	0	Me1
Smith Nº 5 g	S	S	7	ningún gen	Smith Nº 5d-3	R	S	0	Me1
Smith Nº 5 h	R	S	2	Me1	Smith Nº 5d-4	R	S	1	Me1
Smith Nº 5 i	R	S	1	Me1	Smith Nº 5d-5	R	S	0	Me1
Smith Nº 5 j	R	S	1	Me1	Smith Nº 5d-6	R	S	0	Me1
Smith Nº 5a-1	R	S	1	Me1	Smith Nº 5d-7	R	S	0	Me1
Smith Nº 5a-2	R	S	2	Me1	Smith Nº 5d-8	R	S	0	Me1
Smith Nº 5a-3	R	S	0	Me1	Smith Nº 5d-9	R	S	0	Me1
Smith Nº 5a-4	R	S	0	Me1	Smith Nº 5d-10	R	S	1	Me1
Smith Nº 5a-5	S	S	6	ningún gen	Smith Nº 5h-1	R	S	0	Me1
Smith Nº 5a-6	S	S	6	ningún gen	Smith Nº 5h-2	R	S	0	Me1
Smith Nº 5a-7	R	S	1	Me1	Smith Nº 5h-3	R	S	0	Me1
Smith Nº 5b-1	R	S	0	Me1	Smith Nº 5h-4	R	S	1	Me1
Smith Nº 5b-2	R	S	0	Me1	Smith Nº 5h-5	R	S	0	Me1
Smith Nº 5b-3	R	S	0	Me1	Smith Nº 5i-1	R	S	1	Me1
Smith Nº 5b-4	R	S	0	Me1	Smith Nº 5i-2	R	S	0	Me1
Smith Nº 5b-5	R	S	0	Me1	Smith Nº 5i-3	R	S	0	Me1
Smith Nº 5b-6	R	S	1	Me1	Smith Nº 5i-4	R	S	0	Me1
Smith Nº 5b-7	R	S	0	Me1	Smith Nº 5j-1	R	S	0	Me1
Smith Nº 5b-8	R	S	0	Me1	Smith Nº 5j-2	R	S	0	Me1
Smith Nº 5c-1	S	S	8	ningún gen	Smith Nº 5j-3	R	S	0	Me1
Smith Nº 5c-2	S	S	7	ningún gen	Smith Nº 5j-4	R	S	0	Me1
Smith Nº 5c-3	R	S	3	Me1	Smith Nº 5j-5	R	S	0	Me1
Smith Nº 5c-4	S	S	7	ningún gen	Testigo var.Sonar	S	S	7	ningún gen

Evaluación en condiciones controladas

- Inoculación población MI-CH (virulenta al gen Me7) índice de agallas de 0 a 10 (Bridge y Page 1980)
- Marcadores moleculares CD (Me1 y Me7) F4R4 (Me7)
- 10 líneas de la autofecundación del F1 del PI201234 x S Proporción 7 R:3 S gen dominante (Me1)
- 27 líneas segregación de las 7 líneas R gen (Me1) 1/3 en homocigosis y 2/3 en heterocigosis



Utilización para la creación de patrones híbridos para su uso en el cultivo de pimiento

Estudio de la resistencia en Alcos

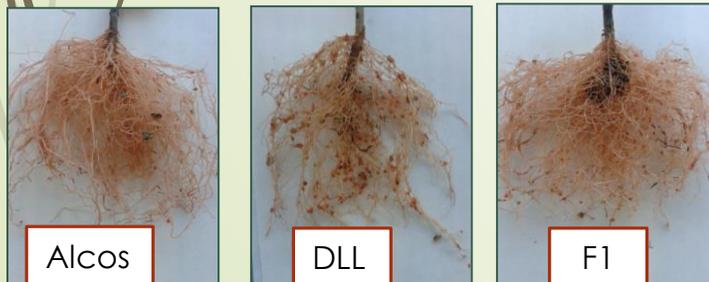
Conocer el modo de herencia, (oligogénico o poligénico) y el alelismo a los genes conocidos

Modo herencia resistencia Alcos

Alcos x DLL
6 generaciones básicas
(Alc, DLL, F1, F2, BC1R, BC1S)

Aislado Mi-CH
El más discriminante

400J2/planta



Test alelismo

Material vegetal

Alcos x HDA149 (Me3)
4 generaciones básicas
(Alc, HDA149, F1, F2,) + DLL

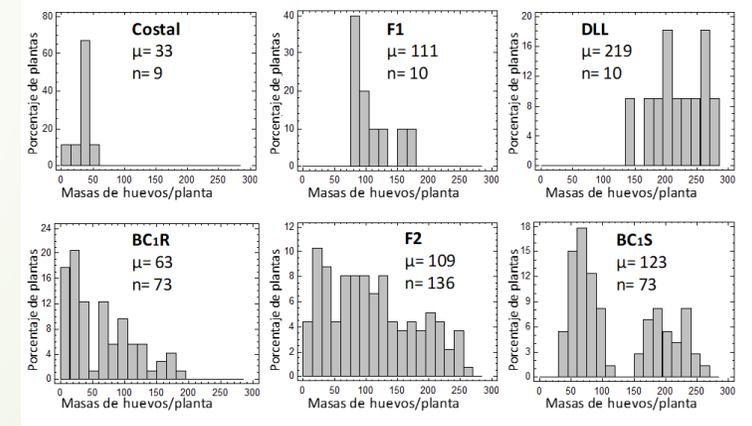
Fenotipado

Aislado Mi-E (avirulento a Me3)
discrimina portadores Me3

400J2/planta

Análisis χ^2 considerando un gen de herencia intermedia

Análisis métodos cuantitativos



La resistencia de 'Alcos' está conferida fundamentalmente por un solo factor genético, diferente a los genes (*Me1*, *Me3* y *N*), lo cual supone el descubrimiento en pimiento de una nueva fuente genética de resistencia a *M. incognita*.

Sánchez, F 2015. Tesis doctoral

Profundización de la resistencia en Alcos

Intentar conocer que gen está implicado en la resistencia y su localización

Material vegetal

- Obtención de las familias

Alcos x DLL



(F1)

Fenotipado

Aislado Mi-CH
El más discriminante

400J2/planta



Genotipado

- Obtención del ADN

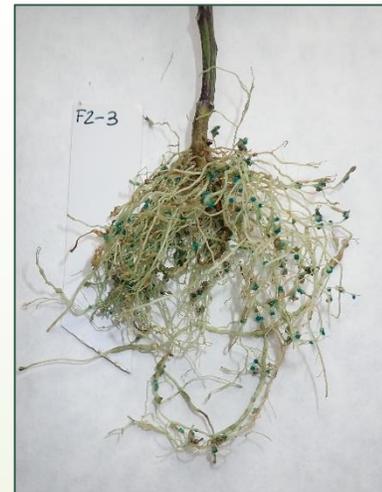
Alcos: 2 pls

DLL: 2 pls

F1: 95 pls



Secuenciación masiva



Estudio de la resistencia en P13

Conocer el modo de herencia, (oligogénico o poligénico) y el alelismo a los genes conocidos

Material vegetal

Modo de herencia resistencia P13

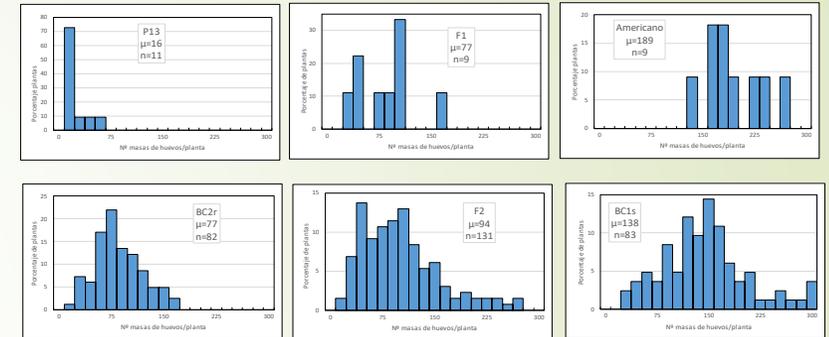
P13 x DLL

6 generaciones básicas
(P13, DLL, F1, F2, BC1R, BC1S)

Fenotipado

Aislado Mi-CH
El más discriminante

400J2/planta



Análisis χ^2 considerando un gen de herencia intermedia



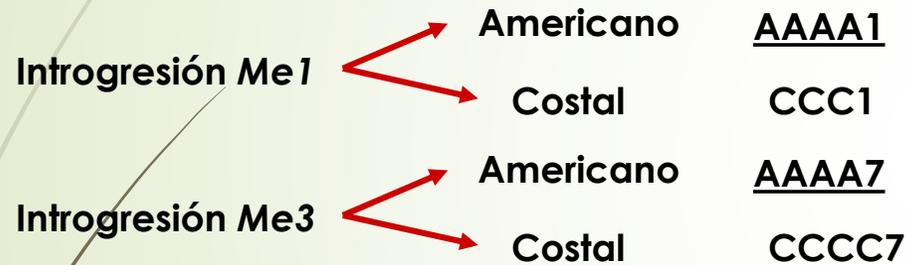
La resistencia de 'P13' está conferida fundamentalmente por varios factores genéticos

Construcción de patrones resistentes a *Meloidogyne sp.*

Piramidalización de genes

1. Profundización estudio del fondo genético

Introgresión de los genes Me1 y Me3 en Americano y Alcos



Líneas isogénicas ≠ genes

Método retrocruzamiento

$\Delta ME \times HDA330$
 \downarrow
 $\Delta \Delta 1$ 50% base genética ΔME

$\Delta ME \times \Delta \Delta 1$
 \downarrow
 $\Delta \Delta \Delta 1$ 50% + 25% = 75% base genética ΔME

$\Delta ME \times \Delta \Delta \Delta 1$
 \downarrow
 $\Delta \Delta \Delta \Delta 1 \rightarrow 50 + 25 + 12.5 = 87.5\%$ base genética.

$\Delta ME \times \Delta \Delta \Delta \Delta 1$
 \downarrow
 $\Delta \Delta \Delta \Delta \Delta 1 \rightarrow 50 + 25 + 12.5 + 6.25 = 93.75$ base.

$\Delta ME \times AAAAA$
 \downarrow
 $AAAAA \Delta 1 \rightarrow 93.75 + 3.125 = 96.87$.
 * autofec.

Homocigótico susceptible
 Homocigótico resistente Me1
 Heterocigótico para Me1

2. Estabilización de la resistencia en el tiempo

Introgresión de Me1 en SCM 334

Método de retrocruzamiento

HDA330 x SCM



F1 (17)

Objetivo: portainjerto con 96,8 % de SCM334 y homo Me1

Determinar las resistentes

Inoculación 600J2 Mi-avirE

17777xSCM

17777

F2

Seleccionar Me1/Me1 (marcadores moleculares)

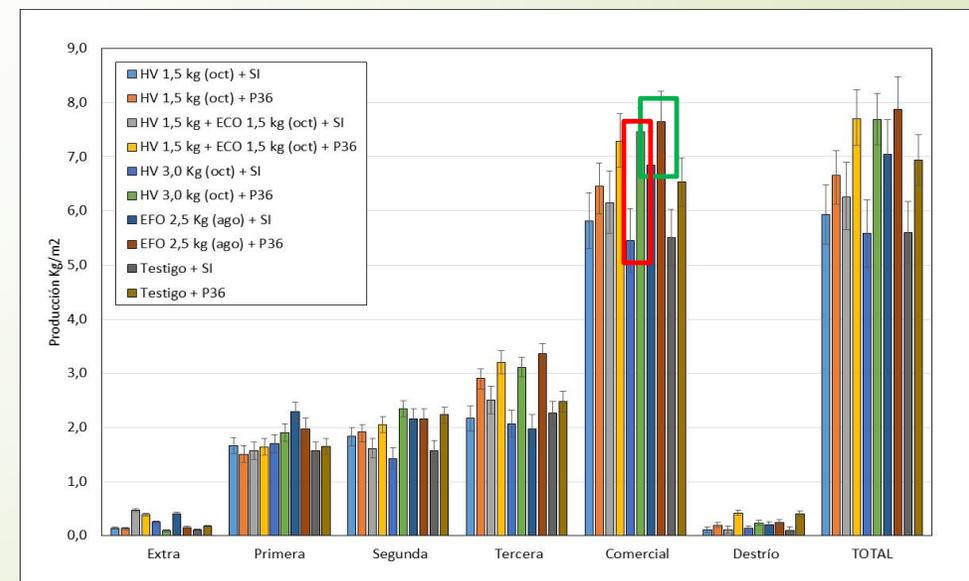
Tenemos plantas con 93.7% del genoma de SCM

Estrategias de control de patógenos de suelo

Combinación de la biosolarización y el uso de resistencias a *M. incognita*

Tratamientos	2019-2020		2020-2021	
	IA	% afectadas	IA	% afectadas
HV 1,5 kg (oct) + SI	0,9bc	53,3bc	3,7c	93,3c
HV 1,5 kg (oct) + P36	0,1a	6,7ab	0,1a	6,7a
HV1,5 kg (oct) + ECO 1,5 kg + SI	1,1cd	46,7abc	2,7c	80,0bc
HV 1,5 kg (oct) + ECO 1,5 kg + P36	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
HV 3,0 kg (oct) + SI	1,6d	80,0c	2,4bc	86,7bc
HV 3,0 kg (oct) + P36	0,2ab	20,0ab	0,2a	20,0a
EFO 2,5 kg (ago) + SI	0,3abc	26,7ab	1,1b	60,0b
EFO 2,5 kg (ago) + P36	0,0a	0,0a	0,2a	6,7a
Testigo + SI	0,8bc	46,7bc	3,0c	100,0c
Testigo + P36	0,1a	13,3ab	0,0a	0,0a

- Injerto de Maestral sobre P13
- variedad Maestral (Semillas Fitó)
- Población de *M. incognita* en proceso de selección de virulencia al gen Me3
- Bloques al azar 3 rep. De 45 pls/fila
- Suelo biosolarizado en agosto y octubre



FEDER 1420-31



Agradecimientos



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

Proyecto PO 07-0048

Proyecto FEDER 1420-02

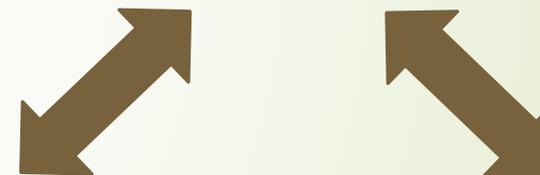
Proyecto FEDER 1420-31



Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

Proyecto RTA2009-0058-00-00

Proyecto RTA2014-00070-00-00





Muchas
gracias por su
atención