



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Departamento de Producción Vegetal

**Influencia del fondo genético en la expresión
de la resistencia a *Meloidogyne incognita* en
pimiento (*Capsicum annum* L.)**

Fulgencio Sánchez Solana

TESIS DOCTORAL

Directores

Dr. Alfredo Lacasa Plasencia

Dra. Caridad Ros Ibáñez

2015

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

Dr. Alfredo Lacasa Plasencia, Profesor de Investigación y Jefe del Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos del IMIDA, y **Dra. Caridad Ros Ibáñez**, Investigadora del Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos del IMIDA, como Directores de la Tesis doctoral titulada “**Influencia del fondo genético en la expresión de la resistencia a *Meloidogyne incognita* en pimiento (*Capsicum annuum* L.)**”

INFORMAN:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por **D. Fulgencio Sánchez Solana**, dentro del programa de doctorado “Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario”, dando nuestra conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

EN CARTAGENA, A 13 DE OCTUBRE DE 2015

EL DIRECTOR DE LA TESIS



Fdo.: Alfredo Lacasa Plasencia

LA CO-DIRECTORA DE LA TESIS



Fdo.: Caridad Ros Ibáñez

COMISIÓN DE DOCTORADO



**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL TUTOR DE LA TESIS**

Dr. D. Pablo Bielza Lino, Catedrático del Área de Producción Vegetal en el Departamento de Producción Vegetal, como Tutor de los estudios de doctorado y de la Tesis doctoral titulada “**Influencia del fondo genético en la expresión de la resistencia a *Meloidogyne incognita* en pimiento (*Capsicum annuum* L.)**”

INFORMA:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por **D. Fulgencio Sánchez Solana**, dentro del programa de doctorado “Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario”, dando mi conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 1 de julio de 2015

EL TUTOR DE LA TESIS Y ESTUDIOS DE DOCTORADO

Fdo.: Pablo Bielza Lino

COMISIÓN DE DOCTORADO

**CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA**

Dr. D. Francisco Artés Hernández, Presidente de la Comisión Académica del Programa
“Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario”

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “**Influencia del fondo genético en la expresión de la resistencia a *Meloidogyne incognita* en pimiento (*Capsicum annuum* L.)**”, ha sido realizada, dentro del mencionado programa de doctorado, por D. Fulgencio Sánchez Solana, bajo la dirección y supervisión del Dr. Alfredo Lacasa Plasencia, y la Dra. Caridad Ros Ibáñez.

En reunión de la Comisión Académica de fecha 10/07/2015, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por la Comisión de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

XCiencias

- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 11 de julio de 2015

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

FRANCISCO DE
ASIS|ARTES|
HERNANDEZ

Firmado digitalmente por FRANCISCO DE ASIS|
ARTES|HERNANDEZ
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=FRANCISCO DE ASIS|ARTES|HERNANDEZ,
serialNumber=52825636H,
givenName=FRANCISCO DE ASIS, sn=ARTES
HERNANDEZ, ou=Ciudadanos, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2015.07.11 00:21:49 +02'00'

Fdo: Francisco Artés Hernández

COMISIÓN DE DOCTORADO

*A Pedro-Matías y Juana, mis padres.
Por su empeño y sacrificio en la formación de sus hijos.*

*A Yoyi, mi mujer.
Porque resulta imposible resumir en pocas palabras
mi agradecimiento por su esencial apoyo y ayuda en esta tesis.
Pero, sobre todo, por estar siempre a mi lado.*

*A Guillermo, mi hijo, y a Martina, mi hija, que viene de camino.
Por la fuerza, ilusión y alegría continua que me generan.*

Agradecimientos

A Alfredo, mi director de tesis. Por su confianza en mí, por su inestimable ayuda y por dedicarme toda la atención que he necesitado. Por todo lo que me ha enseñado sobre agricultura y sobre ciencia, lo cual (me atrevo a decir) se queda pequeño al lado de lo aprendido como persona. Sin duda, una gran suerte ser su discípulo.

A Cari, mi directora de tesis. Por su enorme ayuda desde el primer hasta el último día de la tesis. Por su papel clave al inicio de los trabajos, donde con mucha paciencia y humildad me fue enseñando todo acerca de los nematodos y me instruyó en el “arte” de su manejo. Por sus valiosos consejos, y por escuchar siempre mis propuestas metodológicas, aunque no fueran a tener éxito.

A todos los demás componentes del equipo de Protección de Cultivos, que han estado durante todo o parte del transcurso de la tesis. Todos han participado, en mayor o menor medida, en los trabajos experimentales: Jerónimo, M^a Carmen, M^a del Mar, Ana, Victoriano, Vicente, Carmen M^a, Adriana, Mila, M^a Ángeles Colucho y M^a Ángeles Martínez.

A Joaquín Costa, del equipo de Mejora Genética de Horticultura, por su intuición como mejorador y su asesoramiento en el planteamiento experimental de la tesis. También por lo aprendido sobre mejora genética durante los dos años previos a la tesis, que estuve de becario en su equipo.

Al resto de componentes del equipo de Mejora Genética de Horticultura, los que están y los que ya no están: M^a Sol, Elena, Jose, Paco y Nuria. Además de su participación directa en algunos ensayos, la mayor parte del material vegetal utilizado en esta tesis procede del banco de germoplasma, creado y mantenido por este equipo. También agradezco la cesión de algunas de las fotos. Agradezco, especialmente, a Jose (Josefa Gomariz) gran parte del conocimiento que adquirí durante mi paso como becario por el equipo, parte del cual he aplicado en los experimentos de la tesis.

Al personal de la finca experimental Torreblanca, por su trabajo e interés mostrado para que los ensayos de campo saliesen bien.

Al Dr. Alain Palloix, de la Estación Experimental del INRA en Aviñón, por las estancias realizadas en su centro, muy fructíferas para mí. Por su interés mostrado en mi aprendizaje y por dedicarme gustosamente gran parte de su tiempo. Parte del análisis e interpretación de los resultados de esta tesis fueron con su ayuda.

Al Dr. Rafael Fernández Muñoz, de la Estación Experimental de La Mayora (CSIC-Málaga), por poder contar con su asesoramiento en los análisis genéticos. Los análisis e interpretación de los resultados del Capítulo IV fueron gracias a su ayuda.

Al Dr. Pablo Bielza, por aceptar ser mi tutor de doctorado, ayudándome en todo lo que he necesitado. Y por su ayuda con la estadística.

Al IMIDA en general, por prestar sus servicios e instalaciones para la realización de los trabajos.

A los agricultores que han prestado sus invernaderos, por su interés e implicación en nuestros ensayos.

A la empresa Semilleros El Mirador, por su interés y confianza, y por facilitarnos las labores llevadas a cabo en sus instalaciones.

A los familiares, amigos y compañeros que durante este tiempo me han ayudado y animado con la tesis.

La realización de esta tesis ha sido llevada a cabo gracias a la financiación de una beca predoctoral FPI-INIA, correspondiente a la convocatoria de la Resolución del 4 de febrero de 2010 del Ministerio de Ciencia e Innovación (BOE del 6 de febrero de 2010), y de la Resolución del 21 de junio de 2010 (BOE del 12 de julio de 2010).

Dicha beca fue concedida al proyecto de investigación RTA2009-0058-00 “Injerto en pimiento para el control de patógenos del suelo: comportamiento de la resistencia a *Meloidogyne incognita* e introducción en nuevas obtenciones”, participado con fondos Feder, con el cual se han sufragado gran parte de los trabajos experimentales.

Abreviaturas y acrónimos

Amc: variedad ‘Americano’

Brb: variedad ‘Belrubí’

Ctl: variedad ‘Costal’

DLL: variedad ‘Doux Long des Landes’

Dlr: variedad ‘Dátler’

gen-R: gen mayor de resistencia

IMIDA: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

IN: índice de nodulación

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

MHs: masas de huevos de *Meloidogyne* spp.

M-are: aislado de *Meloidogyne arenaria*

M-jav: aislado de *Meloidogyne javanica*

Mi-avir: aislado de *Meloidogyne incognita*, avirulento a los genes de resistencia *Me*

Mi-virCH: aislado “CH” de *Meloidogyne incognita*, virulento al gen *Me3*

Mi-virB: aislado “B” de *Meloidogyne incognita*, virulento al gen *Me3*

PC: periodo de cosecha

QR: resistencia cuantitativa

RKNs: root-knot nematodes

SCM: variedad ‘Serrano Criollo de Morelos 334’

YW: variedad ‘Yolo Wonder’

Resumen

Meloidogyne incognita es un nematodo que es considerado como uno de los principales patógenos edáficos a escala mundial que afecta, entre otros cultivos, al pimiento (*Capsicum annuum*), provocándole daños en las raíces y ocasionando descensos importantes en las cosechas. Durante los últimos años se ha implementado la obtención y utilización de nuevos materiales vegetales resistentes como alternativa al control químico. En pimiento se conocen tres genes mayores de resistencia frente a *M. incognita*, denominados como *Me1*, *Me3* y *N*. Sin embargo, se ha demostrado que el uso reiterado en el cultivo de variedades portadoras de un mismo gen puede provocar el desarrollo de poblaciones del nematodo virulentas, lo que ha motivado la búsqueda de fuentes de resistencia más estables y el desarrollo de estrategias encaminadas a preservar la eficacia y durabilidad de las resistencias genéticas.

En este trabajo se estudia la resistencia cuantitativa frente a *M. incognita* conferida por el fondo genético del pimiento, explorando sus posibilidades para su uso en la mejora genética de variedades con resistencia durable. Se plantearon los siguientes objetivos: i) identificar resistencia de campo frente a *M. incognita* en variedades locales de pimiento y conocer sus potencialidades para su uso en la mejora genética de porta-injertos; ii) caracterizar la resistencia cuantitativa conferida por el fondo genético del pimiento y su efecto cuando se combina con genes mayores de resistencia a *Meloidogyne* spp.; iii) analizar la genética de la resistencia cuantitativa en la variedad ‘Costal’; iv) evaluar estrategias de uso durable de las resistencias a *M. incognita*.

Se llevaron a cabo ensayos tanto en condiciones artificiales, que permitieron un elevado control de los diversos parámetros ambientales, como en invernaderos con condiciones similares a las de cultivos comerciales, donde las plantas se utilizaron como porta-injertos y se cultivaron en suelos con poblaciones naturales de nematodos, permitiendo obtener un mejor conocimiento sobre utilidad práctica y las prestaciones agronómicas de las alternativas ensayadas.

Se identificó elevado nivel de resistencia frente a *M. incognita* en algunas variedades locales de pimiento, que además mostraron un buen comportamiento agronómico como porta-injertos. Esta resistencia, controlada por el fondo genético, se caracterizó de expresión cuantitativa, resultó eficaz frente a varios aislados de

Meloidogyne spp. de diferente virulencia hacia el gen *Me3* y presentó efectos genéticos aditivos o parcialmente dominantes. Los genotipos portadores de genes mayores de resistencia (*Me1* o *Me3*) presentaron un mayor nivel de resistencia frente a *M. incognita* cuando se combinaron con resistencia cuantitativa. En evaluaciones en invernadero, no se encontró influencia del fondo genético sobre el desarrollo de virulencia hacia *Me3* de la población del nematodo, una vez iniciado el proceso. Sin embargo, no se observó erosión de la resistencia cuantitativa por el patógeno tras tres años consecutivos de cultivo en el mismo suelo. Se determinó que el elevado nivel de resistencia cuantitativa identificado en la variedad ‘Costal’ viene dado, principalmente, por un solo factor genético, independiente de los genes de resistencia a *M. incognita* conocidos en pimiento. Los estudios preliminares sobre estrategias de uso de los genes de resistencia mostraron que el cultivo durante una sola campaña de plantas resistentes a *M. incognita* puede reducir la población del patógeno, mostrando menor incidencia en la siguiente campaña.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten un aprovechamiento más eficiente de la resistencia cuantitativa, enfocado a la mejora genética y al uso de variedades de pimiento con resistencia durable a *M. incognita*.

Abstract

Meloidogyne incognita is considered, worldwide, as one of main soil-borne pathogens of pepper (*Capsicum annuum* L.) crops, causing damage to the roots and significant decreases in yield harvest. In recent years the obtention and use of new resistant plant materials has been implemented, as an alternative to chemical control. In pepper (*C. annuum*), only the dominant *Me1*, *Me3* and *N* resistant genes are effective against *M. incognita*. However, the emergence of virulent populations has been reported when crops of rootstocks carrying the same resistant gen are reiterated for consecutive years. This has motivated the search of durable sources of resistance and developing strategies to preserve the effectiveness and durability of genetic resistance.

In this thesis the quantitative resistance to *M. incognita* conferred by the genetic background of pepper is studied, exploring its possibilities of use in breeding of cultivars with durable resistance. The specific objectives were: i) to identify field resistance to *M. incognita* in local varieties of pepper and know their potential for use in breeding rootstocks; ii) to characterize quantitative resistance conferred by the genetic background of pepper and its effect when combined with major genes of resistance against *Meloidogyne* spp.; iii) to analyze the genetics of quantitative resistance in the variety 'Costal'; iv) to evaluate strategies of use for durable resistance to *M. incognita*.

Some trials were carried out in a culture chamber, which allowed high control of several environmental parameters. Also, trials were carried out in greenhouses with similar conditions to those of commercial crops, where plants were used as rootstock and grown in soils with nematode populations, allowing to obtain a better knowledge of practical utility of the tested alternatives.

High level of resistance to *M. incognita* was identified in some local pepper cultivars, that also showed good agronomic performance as rootstocks. This resistance conferred by the genetic background was characterized of quantitative expression, effective against several isolates of *Meloidogyne* spp. with different virulence towards *Me3* gene, and it presented additive genetic or partially dominant effects. The genotypes carrying major resistance (*Me1* or *Me3* genes) had a higher level of resistance to *M. incognita* when combined with quantitative resistance. In greenhouse evaluations, no influence of the genetic background on the development of virulence towards *Me3* of

nematode population was found, once the process started. However, no erosion of quantitative resistance by the pathogen was observed, after three consecutive years of crop in the same soil. It was determined that the high level of quantitative resistance identified in the variety 'Costal' is given mainly by a single genetic factor, independent of the resistance genes known in pepper against *M. incognita*. Preliminary studies on strategies for using resistance genes showed that during a single growing year of plants resistant to *M. incognita* can reduce the pathogen population in the following year.

The results obtained in this thesis allow a more efficient use of quantitative resistance, focusing on genetic improvement and use of pepper varieties with durable resistance to *M. incognita*.

ÍNDICE

Agradecimientos	xi
Abreviaturas y acrónimos.....	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	- 1 -
1.1. El pimiento	- 3 -
1.1.1. Clasificación botánica.....	- 3 -
1.1.2. Características de la planta	- 4 -
1.1.3. Origen, domesticación y dispersión.....	- 5 -
1.1.4. Usos actuales	- 7 -
1.1.5. Citogenética	- 8 -
1.2. El cultivo del pimiento en invernadero en la Región de Murcia.....	- 10 -
1.2.1. Reseña histórica	- 10 -
1.2.2. Superficie cultivada e importancia en la Región de Murcia.....	- 12 -
1.2.3. Las técnicas culturales	- 13 -
1.2.4. Los problemas fitosanitarios y la gestión integrada de plagas y enfermedades de la parte aérea.....	- 18 -
1.2.5. Las enfermedades del suelo y las estrategias de control.....	- 20 -
1.2.6. Empleo del injerto.....	- 25 -
1.3. <i>Meloidogyne incognita</i>	- 26 -
1.3.1. Características del género	- 26 -
1.3.2. Principales características de la especie	- 28 -
1.3.3. Patogénesis en pimiento	- 32 -

1.3.4. Características de las poblaciones de los invernaderos del Campo de Cartagena	33 -
1.4. Las resistencias genéticas en el pimiento	35 -
1.4.1. Tolerancia a estreses abióticos.....	35 -
1.4.2. Resistencia a patógenos	36 -
1.4.3. La resistencia a <i>Meloidogyne</i> spp.	40 -
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	47 -
2.1. Justificación.....	49 -
2.1.1. La desinfección química y la problemática actual.....	49 -
2.1.2. Las resistencias, sus prestaciones agronómicas y su durabilidad	50 -
2.1.3. La base genética de resistencia a <i>Meloidogyne</i> y la adaptación a las áreas y sistemas de cultivo.....	51 -
2.2. Objetivos	52 -
2.2.1. Objetivo general.....	52 -
2.2.2. Objetivos específicos	52 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	55 -
3.1. Material vegetal.....	57 -
3.1.1. Material del IMIDA	57 -
3.1.2. Variedades comerciales	62 -
3.2. Experimentos en condiciones controladas	63 -
3.2.1. Condiciones de las cámaras y manejo de las plantas.....	63 -
3.2.2. Obtención, multiplicación y conservación del material vegetal.....	64 -
3.2.3. Aislados de <i>Meloidogyne</i>	66 -
3.2.5. Diseños experimentales y planteamiento de los ensayos	67 -
3.2.6. Medida de parámetros.....	69 -
3.3. Experimentos en invernaderos	70 -
3.3.1. Invernaderos utilizados y planteamiento de los ensayos	70 -

3.3.2. Preparación de los semilleros y metodología del injerto	- 73 -
3.3.3. Prácticas culturales	- 74 -
3.3.4. Medida de parámetros.....	- 75 -
3.4. Procesado y análisis de los datos.....	- 77 -
4. CAPÍTULO I	
Evaluación de genotipos de pimiento para su uso en la mejora genética de porta-injertos resistentes a <i>Meloidogyne incognita</i>.....	- 79 -
4.1. Resumen	- 81 -
4.2. Introducción	- 81 -
4.3. Materiales y Métodos	- 83 -
4.4. Resultados	- 86 -
4.5. Discusión.....	- 89 -
4.6. Conclusiones	- 92 -
5. CAPÍTULO II	
Caracterización de la resistencia a <i>Meloidogyne</i> spp. conferida por el fondo genético del pimiento y su efecto cuando se combina con los genes mayores de resistencia	- 93 -
5.1. Resumen	- 95 -
5.2. Introducción	- 95 -
5.3. Materiales y Métodos	- 97 -
5.4. Resultados	- 100 -
5.5. Discusión.....	- 107 -
5.6. Conclusiones	- 111 -
6. CAPÍTULO III	
Influencia de la resistencia cuantitativa conferida por el fondo genético del pimiento sobre los genes de resistencia <i>Me1</i> y <i>Me3</i> en el control de <i>Meloidogyne incognita</i> en condiciones de campo	- 113 -
6.1. Resumen.....	- 115 -

6.2. Introducción	115 -
6.3. Materiales y Métodos	117 -
6.4. Resultados	119 -
6.5. Discusión	126 -
6.6. Conclusiones	129 -
7. CAPÍTULO IV	
Análisis genético de la resistencia a <i>Meloidogyne incognita</i> en la variedad ‘Costal’	131 -
7.1. Resumen	133 -
7.2. Introducción	133 -
7.3. Materiales y Métodos	135 -
7.4. Resultados	138 -
7.5. Discusión	143 -
7.6. Conclusiones	144 -
8. CAPÍTULO V	
Evaluación de la alternancia en el empleo de fuentes de resistencia genética para el control de <i>Meloidogyne incognita</i> en invernaderos de pimiento.....	147 -
8.1. Resumen	149 -
8.2. Introducción	149 -
8.3. Materiales y Métodos	152 -
8.4. Resultados	155 -
8.5. Discusión	158 -
8.6. Conclusiones	162 -
9. CONCLUSIONES GENERALES	165 -
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169 -
Anexos.....	199 -

1. INTRODUCCIÓN

GENERAL

1.1. El pimiento

1.1.1. Clasificación botánica

Con el término pimiento se denomina a varias especies cultivadas del género *Capsicum*, aunque esta tesis se refiere, únicamente, a *Capsicum annuum* que es la especie más conocida, extendida y cultivada de su género. Pertenece a las siguientes categorías taxonómicas superiores:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta (angiospermas)*

Clase: *Magnoliopsida (dicotiledóneas)*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Subfamilia: *Solanoideae*

Tribu: *Capsiceae*

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum annuum*

La familia del pimiento, *Solanaceae*, también alberga otros géneros a los que pertenecen importantes especies cultivadas como la patata (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*) o el tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Dentro del género *Capsicum* se han identificado 32 especies (Moscone *et al.*, 2006) aunque la mayoría de las variedades cultivadas pertenecen a sólo 5 especies: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. y *C. pubescens* Ruiz y Pav. (Pickersgill *et al.*, 1979; Pickersgill, 1991; Perry *et al.*, 2007). Filogenéticamente, *C. annuum*, se encuentra muy próxima a *C. chinense* y *C. frutescens* (Nicolai *et al.*, 2013; González-Pérez *et al.*, 2014) y es con las especies que presenta mayor compatibilidad sexual y similitud morfológica y bioquímica constituyendo entre las tres especies el

denominado “grupo *Capsicum annuum*” (McLeod *et al.*, 1979 y 1983; Pickersgill *et al.*, 1979, Pickersgill, 1991).

1.1.2. Características de la planta

Hábito de crecimiento y estructura de la planta

La diversidad morfológica entre variedades de pimiento es muy alta. Hay publicados descriptores oficiales aceptados internacionalmente que tratan de englobar todos los caracteres morfológicos y sirven de criterio para la clasificación de los recursos genéticos (IBPGR, 1983). A rasgos generales, la planta del pimiento se compone de un tallo principal lignificado, que presenta desde 2 hasta más de 20 entrenudos, que termina en una flor y en cuyo último nudo ramifica en dos o tres tallos secundarios, presentando posteriormente cada tallo secundario el mismo esquema pseudo-dicotómico de crecimiento.

El porte de la planta puede ser muy variado (generalmente arbustivo) dependiendo del desarrollo de los brotes secundarios del tallo principal, longitud de los entrenudos o separación de los tallos secundarios. El crecimiento de las plantas puede ser determinado o indeterminado. Así mismo pueden ser perennes o anuales dependiendo de las condiciones climáticas del área donde se desarrollen.

El fruto del pimiento es una baya que, según las variedades, presenta una coloración desde el verde oscuro hasta un blanco marfil, en estado inmaduro, y desde el amarillo pálido hasta el rojo cuando madura, encontrando frutos de color naranja, púrpura o marrón. La forma y el tamaño son también muy variados, desde frutos redondeados que pesan 0.1g, próximos a formas silvestres, hasta frutos rectangulares de tamaño grande (más de 500g de peso). Las semillas se desarrollan dentro de los frutos unidas a la placenta, y cuando están maduras presentan color amarillo y forma arriñonada (Nuez *et al.*, 1996; Djian.Caporalino *et al.*, 2007a).

Sistema reproductivo

La mayoría de las variedades de pimiento son autógamas. Los granos de polen liberados de las anteras son transportados de forma pasiva a través del viento o por gravedad hasta el estigma en el momento de la anthesis de la flor. Sin embargo, el néctar presente en las flores de pimiento atrae a diversos insectos que favorecen la fecundación

cruzada, dándose tasas de alogamia en campo abierto desde un 7% hasta un 90%, lo que ha llevado a algunos autores a considerar al pimiento como alógamo facultativo (Odland y Porter, 1941; Franceschetti, 1971; Tanksley, 1984).

La tasa de multiplicación del pimiento es muy elevada, debido tanto a la gran cantidad de flores y frutos producidos por planta, como a la alta cantidad de semillas presente en cada fruto. Dependiendo de la variedad y condiciones de cultivo una sola planta puede producir desde uno a varios millares de semillas (Djian-Caporalino *et al.*, 2007a).

Requerimientos edafoclimáticos

Aunque el pimiento está bien adaptado a climas cálidos, las temperaturas nocturnas elevadas perjudican el desarrollo de los frutos. La temperatura óptima para la germinación de las semillas se sitúa entre 25 y 30°C. Para un crecimiento y calidad de fruto adecuado la temperatura debe de oscilar entre 21 a 29°C (Nonnecke, 1989). Se acepta un umbral mínimo de 14°C y máximo de 32 °C, a partir de los cuales se retarda o detiene el crecimiento vegetativo, produciéndose la caída de las flores y consecuente ausencia de cuajado de frutos (Knott y Deanon, 1967). Sin embargo, cuando las temperaturas vuelven a situarse en los valores óptimos se recupera la floración y cuajado de frutos (Greenleaf, 1986).

Aunque el pimiento tolera diversos tipos de suelo, en general las mejores condiciones para un óptimo desarrollo de las plantas se corresponden con suelos franco-arenosos, sueltos y bien drenados, con un pH entre 6.5 y 7.5 y baja salinidad. Además, requieren de suelos fértiles necesitando de aporte extra de nitrógeno en determinadas etapas del crecimiento (cuajado, engorde de frutos) (Greenleaf, 1986). Respecto al agua demandan un aporte constante, aunque esta especie es tan sensible a la desecación como al encharcamiento del suelo.

1.1.3. Origen, domesticación y dispersión.

El género *Capsicum* es originario de América, estableciéndose el origen de la especie *C. annuum* en la zona central del continente que abarca desde Colombia hasta el sur de Estados Unidos y las islas del Caribe, ya que es el área de distribución de *C.*

annuum var. *glabriusculum* (Dun.), especie silvestre considerada como el progenitor más probable de las variedades cultivadas correspondientes al taxón *C. annum* var. *annuum* (Bosland y Votava, 2000; Votava *et al.*, 2002, Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009, González-Jaral *et al.*, 2012).

El pimiento ya se conocía y utilizaba por el hombre antes del establecimiento de la agricultura, tal y como atestiguan algunos restos arqueológicos como los encontrados en el valle de Tehuacan (México), fechados en 7000 años a.C. (Pickersgill, 1969). Su domesticación y cultivo tuvo lugar hace aproximadamente 6000 años, con los inicios de la agricultura llevada a cabo por los nativos americanos, según los vestigios encontrados en diferentes yacimientos del área central y sur de América (Perry *et al.*, 2007).

Cuando se produjo el descubrimiento de América, en 1492, el cultivo del pimiento ya estaba extendido por gran parte del nuevo continente y ya se habían originado un inmenso número de variedades, tal y como hicieron constar los botánicos Besler en *Hortus Eystettensis* (1613) y Parkinson en *Theatrum Botanicum* (1640). La introducción del pimiento en Europa fue a través de la Península Ibérica, a donde Cristóbal Colón lo trajo en 1493 (Nuez *et al.*, 1996). Desde aquí se extendió rápidamente a otros lugares de Europa y del área mediterránea. A partir del siglo XVI el pimiento se introdujo en la zona occidental de África llevado desde Europa, y a partir del siglo XVII llega, procedente de América fundamentalmente, a regiones que hoy constituyen importantes centros secundarios de diversificación como India, China, o Indonesia (Andrews, 1984; Somos, 1984; Palloix *et al.*, 2004).

Actualmente, el pimiento se cultiva en los cinco continentes, principalmente en países de clima tropical y subtropical, aunque se puede encontrar en cualquier área que reúna las condiciones ambientales adecuadas, extendiéndose su cultivo hasta los 55° Sur y 52° Norte (Djian-Caporalino *et al.*, 2007a). A escala mundial, el cultivo de pimiento ha experimentado un espectacular crecimiento en las últimas décadas, con un incremento de la producción de un 400% en los últimos 40 años, superando los 34 millones de toneladas en 2013, con una extensión de cultivo estimada en más de 3,9 millones de hectáreas. China es el líder destacado con un 46.6% de la producción total en 2013, seguido muy de lejos por México (6.8%), Turquía (6.3%), Indonesia (5%) e India (4.2%). España, con un 2.9%, ocupa el sexto lugar del mundo, siendo el primer país a escala europea en producción (FAOSTAT, 2013).

1.1.4. Usos actuales

Son múltiples los aprovechamientos que el hombre hace del pimiento, empleándose como planta ornamental, en medicina o como repelente de animales. Pero su uso principal es como alimento a través del consumo de sus frutos, ya sea en fresco, cocinados, como condimento o como especia. La forma de consumo a la cual se destine ha originado el desarrollo de una industria alimentaria especializada en distintos tipos de procesados postcosecha, destacando sobre todo el envasado en conserva y el deshidratado y molienda de frutos (pimentón) que constituye la forma fundamental para su empleo como colorante alimentario y como especia, en cuya forma el pimiento domina el comercio mundial de especias picantes (Nuez *et al.*, 1996; Djian-Caporalino *et al.*, 2007a). Muchas variedades locales (y frecuentemente junto con su particular procesado postcosecha) son ingredientes fundamentales de numerosas recetas y platos tradicionales de la gastronomía de cada región, aportando cada variedad un color y sabor característico. Tanto en Norteamérica como en el centro y norte de Europa su consumo está incrementándose debido, fundamentalmente, a la popularización de la gastronomía mexicana y la dieta mediterránea.

El éxito de la globalización de su consumo se considera que es debido principalmente a tres componentes químicos característicos del pimiento: el alto contenido en vitamina C, los capsicinoides y los carotenoides. El pimiento es una rica fuente de vitaminas de los grupos A, B, C, E y K, destacando sobre todo el alto contenido en vitamina C (ácido ascórbico), compuesto antioxidante de efecto beneficioso para la salud, y presentando concentraciones entre 0.5 y 3g por kg de peso fresco dependiendo de la variedad y condiciones de cultivo, superando así al contenido de frutas como la naranja o el kiwi (Nuez *et al.*, 1996; Djian-Caporalino *et al.*, 2007a). Respecto a su contenido en carotenoides los de mayor interés son la capsantina y la capsorrubina, pigmentos rojos exclusivos del género *Capsicum* (Davies *et al.*, 1970) y que son muy empleados en la industria alimentaria como colorantes naturales, debido sobre todo a su termoestabilidad y origen natural. Suelen extraerse mediante disolventes orgánicos en forma de oleorresinas a partir de frutos deshidratados y molidos. El elevado interés por estos pigmentos ha supuesto la búsqueda y mejora genética de variedades con altas concentraciones de capsantina (Levy *et al.*, 1995; Nuez *et al.*,

1996). Los capsicinoides, responsables de la pungencia o carácter picante del pimiento, son compuestos alcaloides que únicamente están presentes en el género *Capsicum*. Es la principal característica que ha popularizado al pimiento y contribuido a la generalización de su consumo y expansión de su cultivo por todo el mundo. Los capsicinoides se sintetizan y acumulan dentro de vesículas, en la superficie del tejido placentario del fruto, comenzando la biosíntesis entre los 15-25 días después de la antesis (Fujiwake *et al.*, 1980; Stewart *et al.*, 2007). Su función ecológica es evitar el consumo de los frutos por los mamíferos, muy sensibles a estos compuestos, y favorecer el consumo por las aves, a las que no les afecta, favoreciendo así la diseminación de las semillas (Tewksbury y Nabhan, 2001). Su contenido es variable en función de las condiciones ambientales de desarrollo de los frutos y de la variedad, estando ausentes o en niveles inapreciables en las variedades dulces. Además del uso como condimento, los capsicinoides se utilizan en otros campos, destacando sus aplicaciones en medicina y farmacia (Bosland y Votaba, 2000).

1.1.5. Citogenética

Capsicum annuum es una especie diploide con un número básico de cromosomas de 12, al igual que la mayor parte de especies de su género y otras especies de solanáceas de gran interés agronómico (tomate, patata y berenjena). En las décadas de 1970 y 1980, los trabajos de Pochard *et al.* (1977 y 1982) y de Tanksley (1984) fueron pioneros en establecer los primeros grupos de ligamiento para algunos caracteres monogénicos (marcadores fenotípicos) e isoenzimas, mediante técnicas de trisómicos primarios. A partir de la década de 1990, con el desarrollo de los marcadores de ADN se empezaron a construir los primeros mapas de ligamiento genético para pimiento, primero mediante marcadores polimórficos tipo RFLP y posteriormente los basados en la técnica de PCR (RAPD, AFLP, SSR,...) y otros de más reciente aparición como los SNPs. Esto ha permitido disponer de mapas genéticos de ligamiento, tanto intraespecíficos como interespecíficos para cada uno de los 12 cromosomas con un nivel de saturación de marcadores muy elevado (Djian-Caporalino *et al.*, 2007a). Paralelamente se han identificado y mapeado un gran número de loci que controlan diversos caracteres, desarrollándose marcadores moleculares específicos para muchos de estos, que son de gran aplicación en estudios genéticos y de mejora genética de variedades (Wang y Bosland, 2006).

TABLA 1.1. Principales características del genoma del pimiento (*Capsicum annuum*) y de otras dos especies cultivadas de solanáceas (Qin *et al.*, 2014).

Características	Pimiento	Tomate	Patata
Tamaño del genoma (MB)	3349	760	727
Contenido en GC (%)	34.9-35.03	34	34.8
Tasa de repetición (%) (transposones)	80.9	61.3	61.6
Número de genes	35336	33726	38492
Longitud media secuencia génica (pb)	3363	3006	2476
Longitud media secuencia codificante (pb)	1020	1063	928
Promedio de exones/gen	4.27	4.6	3.49
Secuencia localizada en los cromosomas (%)	78.95	-	-
Genes situados en cromosomas (%)	88.29	-	-

La reciente secuenciación del genoma del pimiento, llevada a cabo en dos proyectos distintos (Qin *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014), supone otro punto de inflexión en el conocimiento genético de la especie. Las características principales de su genoma se indican en la tabla 1.1, junto a las del tomate y la patata. Comparando entre las tres destaca el tamaño del genoma del pimiento, cuatro veces mayor que el de la patata y el tomate. Sin embargo, esto es debido a una mayor proporción de ADN repetitivo (sobre todo elementos transponibles), que se asocian a la diferenciación evolutiva entre el género *Capsicum* y el género *Solanum* (Qin *et al.*, 2014). La secuenciación del genoma también ha permitido conocer el número de codones de iniciación de transcripción, estimando así más de 35.000 genes, cifra cercana a la estimada para la patata y el tomate. La integración de estos datos en los mapas genéticos de referencia anteriormente construidos está permitiendo la elaboración de mapas físicos, la secuenciación de numerosos genes, el desarrollo de nuevos marcadores moleculares de genes más precisos o el estudio de nuevos genes (como ejemplos, Devran *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Igualmente la comparación con genomas de otras especies está aportando nuevas claves en torno al proceso de evolución y domesticación de las solanáceas (Xie *et al.*, 2015).

1.2. El cultivo del pimiento en invernadero en la Región de Murcia

1.2.1. Reseña histórica

Según Alemán *et al.* (1982) se tiene conocimiento de que el pimiento se cultiva en la Región de Murcia desde principios del siglo XVI. Al parecer, fueron los monjes del monasterio de los Jerónimos los que lo introdujeron en la Vega del Río Segura hace muchos años, indican los autores al referirse a los documentos escritos encontrados en el monasterio de la pedanía de La Ñora, constituyendo uno de los primeros lugares fuera del Nuevo Mundo donde se comenzó su cultivo.

Se tiene constancia de que en el siglo XIX se inicia la industrialización del pimiento para obtener pimentón (Alemán *et al.*, 1982). Esto supuso el inicio del desarrollo del cultivo del pimiento para tal fin, donde los tipos cultivados predominantes parece correspondían a lo que ahora conocemos como “bola” o “ñora” (fruto de forma subsférica; foto 1). El auge del pimiento para pimentón tuvo su máxima expresión en la década de los años setenta y ochenta del pasado siglo cuando ocupó la mayor superficie (Cánovas, 1996). En aquel momento se localizaba mayoritariamente en las comarcas del Valle del Guadalentín y en el Campo de Cartagena, ya que se había abandonado el cultivo en la Vega del río Segura, la zona tradicional, por causa de las graves epidemias de “tristeza” o “seca” provocadas por *Phytophthora capsici* (Costa *et al.*, 1978). El tipo varietal “bola” seguía siendo el predominante debido a la buena adaptación a las zonas de cultivo, aunque también se comienzan a cultivar otros tipos con buen comportamiento agronómico y calidad para pimentón, fruto de selecciones y nuevas obtenciones varietales (Costa, 1979).

En las nuevas comarcas el cultivo del pimiento para pimentón sufrió nuevas epidemias de virus, como el virus Y de la patata (Potato virus Y, PVY) o el virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus, CMV) a finales de los años ochenta, y del virus del bronceado del tomate (Tomato spotted wilt virus, TSWV) a partir de 1990 (Lacasa y Contreras, 1993). La viabilidad del cultivo se vio comprometida por la persistencia de las epidemias víricas, disminuyendo la superficie de forma brusca en la década de los noventa, hasta el punto de desaparecer de la comarca del Campo de Cartagena y quedar limitado a unos cientos de hectáreas en el Valle del Guadalentín,

que todavía persisten, como testigo del pasado vocacional pimentonero de la Región y como exponente de calidad de un producto muy apreciado en la gastronomía nacional.



Foto 1. Frutos de pimiento de tipo bola.

En la década de los años ochenta del pasado siglo se empezó a desarrollar el cultivo del pimiento en invernadero en zonas cálidas costeras mediterráneas desde el Levante hasta el Sur de la península. En la Región de Murcia, los primeros invernaderos se construyeron en las comarcas costeras del Campo de Cartagena, Mazarrón y Águilas, a principios de los años setenta del pasado siglo, antes de la llegada del agua del trasvase Tajo-Segura, destinándose mayoritariamente al cultivo del pimiento los del Campo de Cartagena (Costa, 1979). Las tentativas de cultivar otras hortalizas en la comarca no fueron exitosas por la dificultad para el manejo de las condiciones ambientales que requieren los otros cultivos y por la especialización de los agricultores de la zona en el cultivo del pimiento, pues el pimiento para pimentón no les era un cultivo ajeno ya que lo estaban haciendo al aire libre para la industria pimentonera.

Comercialmente, las producciones del cultivo en invernadero se orientaron para el consumo en fresco, por lo que preferentemente se eligieron variedades de cultivo de carne gruesa, de frutos grandes, dulces y de sección longitudinal cuadrangular, más largos que anchos (tipo Lamuyo; foto 2) o igual de largos que de anchos (tipo California; foto 3). En menor medida también se utilizaron variedades de tipo “dulce italiano”, con frutos alargados de tamaño mediano o grandes, dulces y de sección longitudinal triangular. A la par del desarrollo del cultivo en invernadero se implantó la utilización de variedades comerciales híbridas F1, de elevada producción y homogeneidad de frutos, y que rápidamente desplazaron a las variedades tradicionalmente cultivadas (Costa, 1979).



Fotos 2 y 3. Frutos de pimiento de tipo Lamuyo (izq.) y California (dcha.)

1.2.2. Superficie cultivada e importancia en la Región de Murcia

Desde hace más de tres décadas, España es el principal productor de pimiento en invernadero de la Unión Europea. En la última campaña se estima que la superficie cultivada fue de unas 13190 ha, localizándose más de 9300 ha en Andalucía (Almería y Granada, principalmente) y más de 1265 ha entre el sur de la provincia de Alicante y el sureste de la de Murcia. En la Región de Murcia el cultivo ocupó 1045 ha de invernaderos en 2013-14 con una producción de 126529 t, que supuso más del 13% de la producción nacional, localizándose mayoritariamente en la comarca del Campo de Cartagena (Estadística Agraria del MARM, 2014).

Las estructuras de producción del pimiento en los invernaderos de la comarca se desarrollaron muy deprisa y en 1984 ya ocupaba 778 ha. La superficie se duplicó en la siguiente década (1549 ha en 1997) y el cultivo se consolidó en el primer lustro del presente siglo (1712 ha en 2000, 1810 ha en 2003, 1559 ha en 2006). Paralelo al aumento de la superficie cultivada se desarrollaron estructuras de comercialización cada vez más sólidas y especializadas, constituyendo un núcleo de comercio con entidad propia orientando las cosechas a la exportación y en menor proporción al mercado nacional (López y Guirao, 1998).

A partir de 2006, la superficie de invernadero destinada al pimiento en el Campo de Cartagena ha ido disminuyendo por: las modificaciones en la forma de desinfectar el suelo (en particular tras la retirada del bromuro de metilo como desinfectante de suelo), las dificultades para disponer de agua de calidad, la competencia en los mercados internacionales, el aumento del costo energético y la apertura de expectativas de alternancia con otros cultivos como el calabacín y en menor medida el melón. El

descenso ha sido progresivo: 1452 ha en 2009, 1222 ha en 2011, 1188 en 2012 y 1015 en 2013 (Estadísticas Agrarias de la Región de Murcia). Los buenos precios de las dos últimas campañas han hecho que la tendencia se invierta por la incidencia de las virosis en los cultivos de cucurbitáceas de la zona, en particular la producida por el Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), que ha limitado la superficie de invernadero y aire libre destinada a calabacín y melón. En la campaña 2014-2015 el pimiento ha ocupado unas 1100 ha.

Desde principios de los años ochenta del pasado siglo el pimiento ha sido el soporte social de municipios del campo de Cartagena como San Pedro del Pinatar, San Javier, Torre-Pacheco, Los Alcázares y Cartagena. Más del 50% de los productores se agrupan en 3 sociedades cooperativas limitadas (SCL) y en dos sociedades agrarias de transformación (SAT). El resto de los productores comercializan la cosecha a través de alhóndigas o de sus propias estructuras comerciales.

El cultivo del pimiento en los invernaderos del Campo de Cartagena forma parte de una horticultura intensiva dinámica, moderna muy tecnificada y competitiva. Una amplia gama de cultivos al aire libre coexisten o se solapan en el tiempo con los de los invernaderos. Todos los invernaderos se cultivan según los principios y normas de producción integrada, habiendo más de 100 ha calificadas en agricultura ecológica.

1.2.3. Las técnicas culturales

En la mayor parte de los invernaderos el pimiento ha sido un monocultivo desde hace mucho tiempo, ya que el ciclo habitual anual mantiene el suelo ocupado entre 8 y 10 meses, dependiendo del tamaño de la explotación y de la orientación comercial. La retirada de los restos del cultivo y la preparación del invernadero para el cultivo siguiente completan la anualidad.

El ciclo habitual del cultivo en los invernaderos del Campo de Cartagena se extiende entre mediados de noviembre y finales de diciembre, y hasta mediados de agosto y finales de septiembre, pudiendo prolongarse la cosecha hasta mediados de octubre. En ocasiones se retrasa la plantación a enero o incluso a febrero, en base a las condiciones climáticas previstas o a las estrategias comerciales. Desde hace unos años la plantación se retrasa a marzo en invernaderos que rotan el cultivo con guisantes o

calabacines. Este último ciclo se solapa en la plantación con el cultivo al aire libre, aunque se adelanta el inicio de la recolección que se prolonga hasta finales de septiembre o principios de octubre.

En los cuarenta años de pervivencia del cultivo las técnicas culturales han ido evolucionando como lo han hecho los avances tecnológicos, reflejados en las características de los invernaderos, en los sistemas de gestión del ambiente, en las características del material vegetal, en la fertilización y en los ajustes del riego, en los conocimientos de los técnicos y en la capacidad innovadora de los productores. Comparando prácticas utilizadas al inicio del cultivo, que fueron recopiladas por Rico (1983), con las actualmente utilizadas se observan grandes variaciones y algunas similitudes, indicadoras de la proyección que se le daba al cultivo como hortaliza de primor.

Poco parece haber variado la preparación del terreno para la plantación, aunque son sustanciales algunos cambios. En algunos invernaderos se retiran los restos del cultivo precedente junto a los hilos y perchas del entutorado. En la mayoría de invernaderos se trituran y entierran los restos del cultivo precedente, después de haber retirado los materiales del entutorado. Una labor somera con la fresadora sirve para triturar las plantas. Luego se da un pase de subsolador y más tarde otro de fresadora. Si se ha de realizar aporte de estiércol, se extiende nada más triturar las plantas para enterrarlo junto a los restos de plantas.

Cuando se desinfecta el suelo mediante biosolarización, inmediatamente después de haber enterrado las plantas y la enmienda (estiércol fresco u otra enmienda especial para tal fin), se riega (por aspersion o con las mangueras de riego por goteo, colocándolas en dos posturas en sendos días consecutivos) y se cubre el suelo con plástico de polietileno de 160 ó 200 galgas, manteniendo el sellado un mínimo de seis semanas o hasta el momento de preparar el invernadero para la plantación.

Si la desinfección se realiza con fumigantes químicos, se prepara el terreno, incluido el enterrado de la enmienda orgánica. Luego se extienden las mangueras de riego en las líneas donde irán las plantas del siguiente cultivo y se coloca el plástico de polietileno (de 140, 160 ó 200 galgas) o plástico especial para desinfección, menos permeable que el polietileno a los gases fumigantes. Se humedece el suelo regando 3-4 horas en dos días consecutivos o alternos, 7-8 días más tarde se incorpora el

desinfectante en el agua de riego. Se mantiene el plástico de 15 a 21 días, según el fumigante, para la disipación de los productos. Luego se levanta y se espera de 10 a 15 días más antes de plantar. La mayor parte de los agricultores no realizan labores posteriores a la desinfección “en línea”, que predomina en la zona sobre la desinfección a toda superficie.



Foto 4. Momento del trasplante en un invernadero.

Es habitual realizar la plantación en líneas simples al marco de 1 m de separación entre líneas y 0.40 m entre plantas de la misma línea (foto 4). Las líneas se suelen orientar de Norte a Sur, no dejando pasillos en los bordes (invernaderos tipo “parral” o “capilla”; foto 5) o dejando un pasillo de 0.80 m. En los invernaderos con estructuras modernas (tipo “multitúnel; foto 6) son habituales los pasillos laterales y centrales. Se suele plantar en seco y regar a continuación o bien regando en el momento de plantar. Después del riego de “postura” y “enjuague”, con la planta ya arraigada, se hace un pequeño surco a unos 10 cm de las plantas donde se coloca la manguera de riego para evitar la asfixia del cuello a la que es sensible el pimiento (Tello *et al.*, 1987).



Fotos 5 y 6. Invernaderos tipo “capilla” (izq.) y tipo “multitúnel” (dcha.).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Arquillos metálicos puestos en los extremos de las líneas sirven para sujetar los hilos laterales del entutorado que permitirán mantener erguidas las plantas (foto 7). Cuando no se dejan pasillos en los bordes del invernadero, los hilos se sujetan a los alambres de la estructura lateral. Los dos hilos más bajos se ponen cuando las plantas han formado la cruz y se forman las primeras flores, poniéndolos por debajo de la cruz y atándolos cada 4 plantas con un hilo vertical sujeto al alambre de la estructura del invernadero, que está colocada por encima de la fila de plantas. Estos hilos tocan el tallo de las plantas y facilitan el desplazamiento de los enemigos naturales, en particular de los ácaros fitoseidos que se liberan en sobres colocados en las hojas bajas o directamente sobre los hilos. A medida que las plantas van creciendo se van poniendo hilos laterales a diferentes alturas y se van uniendo con hilos atados a los verticales o con perchas de 20 cm sujetas al hilo vertical. De esta forma las plantas quedan recogidas en una anchura de 20 a 30 cm, facilitando la aireación, el cuajado, las aplicaciones fitosanitarias y la recolección.



Foto 7. Sistema de entutorado del pimiento en invernadero.

Todos los invernaderos disponen de sistemas de riego por goteo. Son frecuentes las mangueras de 12 ó 16 mm de diámetro, con goteadores a 0.40 m y descargas de 2 a 4 litros/hora. En algunos invernaderos se coloca una banda de plástico de acolchado negro sobre la línea de goteadores, que ayuda a reducir humedad en el ambiente y al manejo de aguas de baja calidad, retirándolo cuando la planta ha alcanzado el tamaño suficiente como para sombrear la zona húmeda (Martínez, 2005). La dotación de agua se realiza en base a necesidades de la planta y la frecuencia de riego con arreglo al estado fenológico y a las condiciones ambientales o climáticas.

El sistema de riego es utilizado para fertilización. La mayor parte de los invernaderos disponen de tanques con disoluciones de macro y microelementos en el cabezal, conectados a la red de riego y regulados por autómatas unidos a programas informáticos, más o menos complejos. Los abonados de fondo (enmiendas orgánicas, correctores minerales y abonos minerales), si se realizan, se complementan con la fertirrigación. Las cantidades a aportar se determinan en base a las extracciones de las cosechas (Rincón *et al.*, 2005a y 2005b) de acuerdo a las producciones esperadas. Los equilibrios en los aportes de macronutrientes varían según el estado fenológico y las condiciones ambientales (temperaturas, radiación, riego, características fisico-químicas del suelo, etc.). El abonado se realiza siguiendo las recomendaciones de las normas de producción integrada, las cuales tienen en cuenta la sensibilidad de la comarca para la contaminación de las aguas subterráneas y marinas por nitratos.

La recolección se realiza manualmente, cortando el pedúnculo, sin dañar el pericarpo para evitar podredumbres en post-recolección. El calendario de cosecha depende de las fechas de plantación, de la variedad, de las condiciones en las que se desarrolla el cultivo y de la coloración del fruto. Los frutos se recolectan cuando han alcanzado el grado adecuado de consistencia en el caso de los verdes y el porcentaje de superficie mínimo de coloración en el caso de los rojos o amarillos. Es frecuente recoger los frutos con coloración verde la primera cosecha, en el caso de plantas sobrecargadas o inviernos y primaveras frías, con el objeto de favorecer el desarrollo de las plantas. Las exigencias comerciales suelen marcar la pauta de las recolecciones cuando la cosecha se destina a la exportación. Las producciones medias de la comarca varían con los ciclos de cultivo, el tipo de variedad y la coloración del fruto en la recolección. Para las plantaciones más tempranas, que suelen ser de variedades tipo Lamuyo, la cosecha media de frutos rojos varía entre 10 y 12 kg/m²; para las tempranas y tardías de variedades tipo California de frutos en verde entre 12 y 14 kg/m² y entre 10 y 12 kg/m² para cosechas de frutos rojos; para las más tardías, generalmente de tipo Lamuyo, entre 8 y 10 kg/m².

1.2.4. Los problemas fitosanitarios y la gestión integrada de plagas y enfermedades de la parte aérea

Se ha indicado en párrafos anteriores que, desde principios del presente siglo, el cultivo del pimiento en los invernaderos del Campo de Cartagena se realiza en base a criterios de producción integrada, lo que constituyó un hito nacional.

Al parecer las graves epidemias del virus del bronceado del tomate (introducido en 1989), transmitido y dispersado por *Frankliniella occidentalis* (trips introducido en 1987) y la inconsistencia de los medios químicos para paliar los daños de la virosis indujeron a poner a punto la lucha biológica contra el vector que se mostraba como un factor limitante del cultivo. La lucha biológica contra el trips resultó eficaz y estable, requiriendo de la utilización de medios para el control del resto de plagas y enfermedades que fueran compatibles con los enemigos naturales del trips (insectos como *Orius laevigatus* y *O. albidipennis*, y ácaros fitoseidos como *Neoseiulus cucumeris* (Sánchez *et al.*, 1997) o *Amblyseius swirskii*).

La introducción de biotipos de *Bemisia tabaci* en la comarca en 1989 marcó otro punto en la problemática fitosanitaria del cultivo del pimiento, al resultar muy difícil el control por medios químicos habida cuenta de su gran capacidad para generar resistencias a la mayor parte de los insecticidas, resultando una plaga principal. La lucha biológica mediante parasitoides autóctonos (*Eretmocerus mundus*) o introducidos (*E. eremicus*) y ácaros fitoseidos importados como *Amblyseius swirskii*, permiten un control eficaz y duradero (Sánchez y Lacasa, 2006).

En la actualidad en todos los invernaderos se gestionan las plagas de forma integrada, utilizando enemigos naturales para el control de las plagas principales: ácaros fitoseidos como *Neoseiulus californicus* o *Phytoseiulus persimilis* o el cecidómido *Feltiella acariphagus* para la araña roja *Tetranychus urticae* y *T. turkestanii*; parasitoides como *Aphidius colemani*, *A. matricariae* o *Aphelinus abdominalis* para los pulgones *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* o *Macrosiphum euphorbiae*; confusión sexual con emisores de feromonas específicas para el control del taladro de los tallos y frutos *Ostrinia nubilalis* o la aplicación de formulados de *Bacillus thuringiensis* para el control de orugas de noctuidos como *Spodoptera exigua* o *Helicoverpa armigera*.

Las plagas que han emergido como consecuencia de la utilización de medios biológicos o biotécnicos para el control de las plagas clave, principales y secundarias,

requieren de atenciones especiales e intervenciones localizadas, ya que no se dispone de medios biológicos o químicos compatibles con los enemigos naturales habitualmente utilizados en los invernaderos. La utilización del depredador *Chriptolaemus montrouzieri* o de los parasitoides *Anagyrus pseudococci* y *Leptomastix algerina* para el control de las cochinillas algodonosa *Pseudococcus affinis* y *Phenacoccus solani* no siempre resulta eficaz dado que las poblaciones de la cochinilla son protegidas por las hormigas. Tampoco la suelta del parasitoide *Trisolcus basalis* resulta satisfactoria para el control de la pudenda *Nezara viridula*, aunque el parasitoide contribuya a reducir las poblaciones, los daños del chinche en los frutos son irreparables.

En las últimas campañas son cada vez más frecuentes los daños y altas poblaciones de cicadélidos del género *Empoasca* (= *Jacobiasca*) cuya saliva llega a provocar amarillos sistémicos en las hojas cuando las poblaciones son densas. La utilización de placas pegajosas de color rojo paliar los daños cuando las poblaciones no son muy densas. Empiezan a aparecer focos de un Mírido, *Creontiades pallidus*, en algunos invernaderos de la comarca, aunque no se considera a nivel de plaga, pero que sí lo es en los invernaderos de Almería.

La adecuada ventilación de los invernaderos, el uso de dobles cubiertas o cámaras, el control de la humedad en el suelo, la vegetación equilibrada y armónica de las plantas, los cuidados en el entutorado y en la recolección, son las medidas más eficaces para el control de *Botrytis* y *Sclerotinia* en los invernaderos, enfermedades para las que no se dispone de medios curativos eficaces para paliar los daños.

Además de las anteriores medidas, indicadas para las podredumbres de los tallos y frutos, todas aquellas que eviten estreses abióticos (asfixia radicular, salinidad en el suelo, radiaciones intensas, déficits hídricos, etc.) o bióticos (daños de nematodos o de hongos en las raíces, fatiga biológica del suelo, etc.) a las plantas permiten minorar la incidencia del oidio, *Leveillula taurica*, que es endémico en varios cultivos de la comarca. Como medida preventiva es usual instalar sublimadores de azufre, que son compatibles con los enemigos naturales de las plagas. En momentos de condiciones óptimas para el desarrollo y multiplicación del hongo, se llegan a hacer tratamientos con productos antioidio que son compatibles con los enemigos naturales.

1.2.5. Las enfermedades del suelo y las estrategias de control.

Oomicetos

Señalan Tello y Lacasa (1997 y 2004) que poco después del establecimiento del cultivo del pimiento en los invernaderos del Campo de Cartagena se advirtieron los primeros síntomas de “tristeza” o “seca” en algunos invernaderos. El agente causal de la enfermedad aparecida en los invernaderos era, en aquellos momentos, *Phytophthora capsici* como indican los mencionados autores y como lo era en otras zonas españolas donde se producía pimiento al aire libre (Tello, 1984; Palazón, 1988; Bartual *et al.*, 1991 y 1993).

Al parecer, la contaminación de los suelos de los invernaderos se produjo con el material vegetal de plantación (plantas “a raíz desnuda”). Los semilleros de las primeras variedades se realizaron en los mismos sitios donde se realizaban los de las variedades de pimiento para pimentón, en la Vega del Río Segura. Las tierras de la Vega ya se encontraban contaminadas del hongo (Tello *et al.*, 1978) y tanto en las plantas de los almácigos como en la tierra adherida a las raíces se transportó inóculo de *Phytophthora* que se estableció en las nuevas tierras de regadío, antes de la llegada del agua del Trasvase Tajo-Segura.

Recientemente se ha constatado que *Phytophthora parasitica* (= *P. nicotianae*) es la especie predominante en la mayor parte de los invernaderos donde se marchitan y secan plantas (Lacasa *et al.*, 2013; Blaya *et al.*, 2014). Se piensa que las dos especies han podido coexistir en la zona desde hace tiempo. El establecimiento de cultivos de cítricos pudo aportar a la comarca *P. parasitica* en los cepellones de plantación provenientes de viveros contaminados y luego dispersarse por los arrastres de lluvias torrenciales que llegan a inundar los invernaderos (A. Lacasa, comunicación personal). Los cambios en los sistemas de producción (dobles cubiertas, cambios de desinfectantes, etc.) y en las condiciones ambientales (mayores temperaturas del suelo en invierno, etc.) parece han favorecido el desarrollo epidémico de *P. parasitica* y con ello la predominancia en los invernaderos. Todavía se pueden encontrar algunos invernaderos donde *P. capsici* es la especie única o predominante.

Los dos oomicetos producen epinastias y marchitamiento en las partes aéreas de la planta que se acentúa con el paso del tiempo hasta que la planta se seca (foto 8). En todo

el proceso las hojas se mantienen unidas a los tallos con su coloración verde. La manifestación de los síntomas es más rápida y violenta en verano cuanto las temperaturas del suelo y del ambiente son altas. Cuando aparecen los primeros síntomas de marchitamiento se pueden observar podredumbres en las raíces y/o en el cuello de color marrón, deprimidas. A medida que avanza el proceso de infección, el volumen de raíces afectadas aumenta igual que las lesiones en el cuello, que terminan de rodear la base del tallo. En ese momento el marchitamiento es ya irreversible y poco después muere la planta desecada (Guerrero, 2013).

La disposición en el invernadero de las plantas afectadas es heterogénea, aunque la enfermedad progresa en las filas y su presencia se acentúa en rodales en los que el suelo es más pesado, con deficiencias en la infiltración del agua. El agua es el principal vehículo de dispersión en el invernadero, por lo que su incidencia aumenta a medida que aumenta la temperatura del suelo y al aumentar las dosis y la frecuencia de riego. El manejo del riego ayuda a paliar la incidencia de la enfermedad, sobre todo en las fases iniciales del cultivo.

La tristeza o seca se considera un factor limitante del cultivo si no se adoptan medidas preventivas de control. Según Lacasa y Guirao (1997), más del 38% de los invernaderos estaban contaminados de *P. capsici* en 1996 y en más del 15% la incidencia de la enfermedad era superior al 20%, pese a desinfectar el suelo todos los años con bromuro de metilo. En la actualidad se estima que la superficie contaminada sería similar y menor la incidencia ya que en aquel momento todavía se regaba “a manta” y la recontaminación del suelo tras la desinfección es mayor que en riego por goteo.



Foto 8. Planta afectada por *Phytophthora* spp.

Otros hongos del suelo

En las plantaciones de pimiento del Campo de Cartagena no se ha detectado *Verticilium dahliae* (Tello y Lacasa, 2004), que es frecuente en zonas de producción del Valle del Ebro (Palazón, 1988) y del País Vasco (Larregla, 2003).

La proliferación del inóculo de varias especies de *Fusarium* a medida que transcurre el ciclo del cultivo se ha asociado a la aparición de fatiga del suelo, por reiteración ininterrumpida del monocultivo (Guerrero *et al.*, 2014a). Incluso cuando los suelos eran desinfectados con bromuro de metilo, las poblaciones de *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *F. equiseti* iban aumentando de forma gradual hasta alcanzar similares niveles al final del cultivo a los medidos antes de la desinfección (Martínez *et al.*, 2009). Muchos aislados de estos *Fusarium* provocan en las plantas de pimiento reducciones en el desarrollo, amarilleos de las hojas y, en general efectos depresivos en la vegetación, sin llegar a originar la muerte de las plantas (Martínez *et al.*, 2010). Se han considerado como patógenos subclínicos pues se aíslan de las raíces de plantas que sufren asfixia y estarían implicados en el deterioro del sistema radicular, pero no se ha conseguido provocar la muerte de plantas al inocularlos en condiciones controladas (Martínez *et al.*, 2011). Según Guerrero *et al.* (2014a) la fatiga resulta específica del pimiento y cualquier rotación cultural permitiría paliar sus efectos.

Nematodos

Llama la atención que en los cultivos de pimiento para pimentón, que precedieron a los cultivos en los invernaderos de la comarca del Campo de Cartagena, no hubiera reseña de daños por nematodos (Alemán *et al.*, 1982). Sin embargo, se ha señalado a *Meloidogyne incognita* como un problema fitosanitario del suelo desde los inicios del cultivo en los invernaderos de esa comarca.

Si Rico (1983) señalaba la presencia de *M. incognita* sin que hubiera un antecedente de identificación de la especie, Cenis y Fuchs (1988) ensayan formas de control de los nematodos en los cultivos de pimiento, aportando datos sobre *Meloidogyne javanica*. Años más tarde numerosos trabajos indican la presencia de *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* en la Región de Murcia asociados al pimiento (Bello *et al.*, 2004, Robertson *et al.*, 2006; Piedra-Buena *et al.*, 2007). *M. incognita* es la especie más abundante y frecuente en los invernaderos ocasionando

daños al pimiento cuando no se toman precauciones o medidas específicas en preplantación (Ros *et al.*, 2004b y 2008; Ros, 2012).

Al restringir el uso del bromuro de metilo, primero (2002), y al suprimirlo definitivamente en 2006 empezaron a aparecer problemas en los cultivos de más larga duración (final en septiembre-octubre). La emergencia de *M. incognita* como un problema fitosanitario del suelo ya se advirtió al realizar los primeros ensayos de alternativas al bromuro de metilo y en los invernaderos con cultivos ecológicos (Bello *et al.*, 2004; Ros, 2012).

Estrategias de control de los patógenos edáficos

Las medidas de control utilizadas son la desinfección del suelo en preplantación, por medios químicos o no (biosolarización), y el empleo variedades resistentes.

Desinfección por medios químicos

Más del 70% de los invernaderos se desinfectan con la mezcla de 1,3-dicloropropeno y cloropicrina, que sustituyó al bromuro de metilo en 2006 y cuya eficacia es similar si las condiciones de aplicación son las adecuadas (Guerrero *et al.*, 2004a; Lacasa *et al.*, 2006). La aplicación se realiza en el agua de riego, a dosis de 500 L/ha al suelo previamente humedecido y cubierto con film de plástico de polietileno (PE). En los últimos años se empiezan a utilizar plásticos virtualmente impermeables o menos permeables que el PE, no para reducir la dosis de fumigante sino para aumentar la eficacia, ya que se empezaron a observar deficiencias en la duración de la desinfección a los 4-5 años de haber dejado de utilizar el bromuro de metilo, en particular, las deficiencias se manifiestan más en el control de *Meloidogyne* que en el de *Phytophthora*.

Los desinfectantes productores de metilisotiocianato (los únicos desinfectantes generales autorizados en la actualidad) son poco utilizados (Ros *et al.*, 2004a), aunque se empiezan a hacer ensayos de demostración combinándolos con otros desinfectantes para aumentar la eficacia y el espectro de acción (A. Lacasa, comunicación personal).

Biosolarización

En más del 20% de los invernaderos, incluidas las aproximadamente 100 ha de cultivo ecológico, se desinfecta el suelo mediante biosolarización (biodesinfección o solarización con enmiendas orgánicas). La eficacia del método para el control de *Phytophthora* es aceptable a partir del segundo año de reiteración en el mismo suelo, si se inicia en agosto (Guerrero *et al.*, 2004c; Guerrero, 2013). En todos los invernaderos se entierran los restos del cultivo precedente y se incorporan al suelo unos 2,5 a 4 Kg/m² de estiércol fresco o semicompostado. Se humedece el suelo mediante riegos por aspersión o por goteo de forma que la humedad alcance una profundidad de unos 30 cm y se cubre con plástico natural transparente de PE, manteniéndolo cubierto durante, al menos, seis semanas (Guerrero *et al.*, 2004b, 2013 y 2014b). Las temperaturas alcanzadas en el suelo a 30 cm de profundidad y el tiempo acumulado de permanencia por encima de 40°C son el indicador de la eficacia de la desinfección para paliar los efectos de *Phytophthora* (Etxeberria *et al.*, 2011; Guerrero *et al.*, 2013).

Sin embargo, la eficacia para el control de *M. incognita* se muestra aleatoria, dependiendo de las condiciones climáticas durante el proceso de biosolarización. En algunos invernaderos se han presentado deficiencias en la eficacia algunos años, incluso iniciando la biosolarización en agosto (Guerrero *et al.*, 2007). Cuando el proceso de desinfección se inicia con posterioridad a la primera semana de septiembre la eficacia es reducida y se producen pérdidas de cosecha (Guerrero *et al.*, 2004b, 2004d y 2013; Núñez-Zofio *et al.*, 2013).

Uso de resistencias

Actualmente, entre las variedades de pimiento que reúnan las características requeridas para su cultivo comercial en los invernaderos, no se conoce ninguna que presente resistencia a *Phytophthora* spp., y son muy escasas y aún poco probadas las que incorporan resistencia a nematodos. Una técnica empleada en los últimos años ha sido el injerto sobre porta-injertos resistentes. De esta técnica y el manejo de las resistencias a *M. incognita*, así como sus características específicas y prestaciones agronómicas se tratará en apartados posteriores.

1.2.6. Empleo del injerto

En unos pocos invernaderos de producción ecológica se utiliza al injerto de la variedad productiva en porta-injertos portadores de resistencia a *Meloidogyne incognita* y a *Phytophthora*, para paliar los efectos de la tristeza o seca y de los daños de agallas en las raíces producidos por el nematodo.

La resistencia a *Phytophthora capsici* y *P. parasitica* en los invernaderos del Campo de Cartagena se ha mostrado eficaz, aceptable y estable (Ros *et al.*, 2004b y 2007). La mayor parte de los porta-injertos comerciales disponibles en la actualidad se comportan como resistentes al oomiceto y con buen comportamiento agronómico y productivo (Sánchez *et al.*, 2013). Algunos confieren a la variedad algunas cualidades que le permiten soportar mejor los efectos de determinados estreses abióticos (López-Marín *et al.*, 2013). Sin embargo, el injerto no es en la actualidad una alternativa a la desinfección del suelo, ya que se producen fenómenos de fatiga del suelo para los porta-injertos, de forma similar que para las variedades productivas cultivadas sin injertar (Martínez *et al.*, 2009), por lo que es precisa la desinfección, aunque sea parcial para paliar los efectos depresivos de la fatiga.

A diferencia de la estabilidad que la resistencia a *Phytophthora* ha mostrado en los invernaderos del Campo de Cartagena, las resistencias a *M. incognita* se han comportado de forma diferencial según los genes implicados. En general un buen número de los porta-injertos comerciales que han sido evaluados por el Equipo de Protección de Cultivos del IMIDA en los últimos 12 años presentan buen comportamiento frente al nematodo (Ros, 2012; Ros *et al.*, 2005 y 2011a). La resistencia de estos porta-injertos se comporta como estable frente a algunas poblaciones de *M. incognita* de los invernaderos del Campo de Cartagena (Ros *et al.*, 2007), pero se han seleccionado poblaciones virulentas que son capaces de remontar la resistencia, al reiterar el cultivo de esos materiales en algunos invernaderos (Ros *et al.*, 2011b; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). Tal comportamiento hace que no se considere el injerto por sí solo como una alternativa a la desinfección del suelo. Cuando se combina el injerto con la desinfección del suelo (ya sea por medios químicos o mediante biosolarización) se logra mantener avirulentas las poblaciones, obteniéndose buenos

niveles de control de los nematodos y cosechas similares a las de los desinfectantes químicos (Ros *et al.*, 2011a; Guerrero *et al.*, 2012).

El comportamiento de la resistencia a *Meloidogyne incognita* de los porta-injertos comerciales y experimentales portadores del gen *Me3* presenta no solo las deficiencias inherentes a la selección de poblaciones virulentas, sino que una parte de las plantas se infectan con bajos índices de nodulación (forma de evaluar la severidad del daño en las raíces) sin que se lleguen a manifestar síntomas (amarillos, reducción en el desarrollo, etc.) de la enfermedad en la parte aérea de las plantas. Sin embargo, el injerto sobre porta-injertos portadores del gen *Me1* de resistencia a *M. incognita* (al igual que las primeras variedades comerciales de calidad productiva portadoras de este gen) se contempla como una solución al problema, siendo varios los materiales que han mostrado estabilidad en la resistencia y en el comportamiento agronómico al evaluarlos reiteradamente en suelos contaminados. En definitiva, las prestaciones de los porta-injertos y del injerto como técnica cultural se contemplan, en la actualidad, como una solución técnica que permita paliar los efectos de los nematodos, manteniendo niveles adecuados de productividad.

1.3. *Meloidogyne incognita*

1.3.1. Características del género

El género *Meloidogyne* comprende los denominado “nematodos formadores de nódulos o agallas” (en inglés, root-knot nematodes, RKNs), y son endoparásitos sedentarios obligados con una gran importancia económica. Como patógeno de plantas, representa uno de los mayores factores limitantes de la producción de numerosos cultivos. Tienen un amplio rango de hospedadores, que comprende más de 3000 especies vegetales (hortalizas, cereales, frutales, caña de azúcar, café) (Abad *et al.*, 2003), en los que causan daños severos que se traducen en importantes pérdidas económicas (Siddiqi, 2000). Están altamente adaptados al parasitismo de la raíces, produciendo nódulos dentro de los cuales las hembras y su progenie disfrutan de protección y del suministro continuo de nutrientes.

El daño que ocasionan a los vegetales se debe principalmente a la alteración de los tejidos vasculares de la raíz, reduciendo la absorción de nutrientes y agua, por lo que la

planta manifiesta debilitamiento y disminución del rendimiento productivo (Orton Williams, 1972, 1973, 1974 y 1975; Siddiqi, 2000; Abad *et al.*, 2003). Además, los efectos negativos de *Meloidogyne* se agravan en algunas ocasiones por interacciones con otros microorganismos, como hongos (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytium*) y bacterias (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, etc.) (Siddiqi, 2000).

Clasificación taxonómica del género

Según Siddiqi (2000) y Karssen (2002) tiene la siguiente posición sistemática:

Reino: *Animalia*

Phyllum: *Nematoda*

Clase: *Secernentea*

Orden: *Tylenchida*

Suborden: *Tylenchina*

Superfamilia: *Tylenchoidea*

Familia: *Heteroderidae*

Subfamilia: *Meloidogynae*

Género: *Meloidogyne* Göldi, 1982

Principales especies patógenas de cultivos

Hunt y Handoo (2009) enumeran un total de 97 especies identificadas dentro del género *Meloidogyne*. La mayoría se han encontrado parasitando un pequeño rango de hospedantes, como: *M. acronea* en raíces de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), *Sorghum vulgare*, *Pennisetum glaucum* o céspedes en Sudáfrica; *M. citri* parasitando cítricos en China; *M. coffeicola* en raíces de café en Brasil. Otras, como *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* o *M. hapla* son polífagas, encontrándose parasitando raíces de innumerables hortalizas, árboles frutales y cítricos (Siddiqi, 2000). Generalmente, se admite que estas cuatro especies, junto a algunas especies emergentes (*M. enterolobii*, *M. chitwoodi*), son responsables de la gran mayoría de daños en cultivos a escala mundial (Agrios, 2005).

En España se han censado 10 especies: *Meloidogyne arenaria*, *M. artiellia*, *M. hapla*, *M. hispánica*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. lusitanica*, *M. marioni*, *M. baetica*, que fue encontrada parasitando raíces de olivo y descrita taxonómicamente por Castillo *et al.* 2003, y *M. dunensis*, encontrada parasitando *Cakile maritima* (Cruciferae) y citada y descrita por Palomares *et al.* (2007). De éstas, las más frecuentes son *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*. La distribución de estas cuatro especies en España se muestra en la figura 1.1.

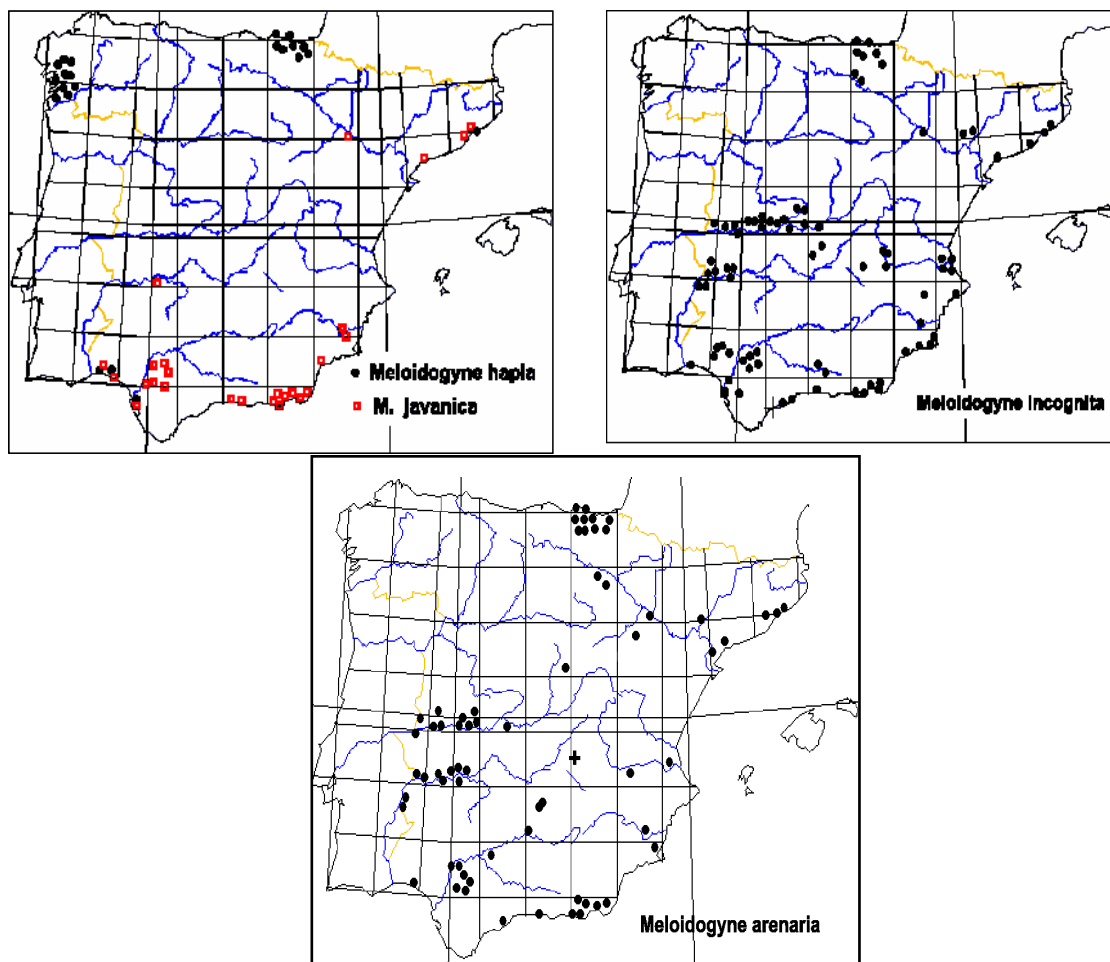


FIGURA 1.1. Distribución de *Meloidogyne incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* y *M. arenaria* en España. Díez-Rojo, 2010.

1.3.2. Principales características de la especie

Morfología

Meloidogyne incognita presenta dimorfismo sexual. Las hembras adultas son endoparásitas con el cuerpo globoso o esférico en forma de pera (Orton Williams,

1973). Los machos son filiformes y con una longitud entre 1108-1953 μm . Los juveniles de primer y segundo estadio (J1 y J2; foto 9) son también filiformes y se caracterizan porque su región caudal se adelgaza hasta un *terminus* subagudo. Los de tercer (J3) y cuarto estadio (J4) tienen forma de saco. Tanto el juvenil (J2) como el adulto presentan un estilete robusto con el cual pican las raíces para alimentarse.



Foto 9. *Meloidogyne incognita*, juvenil de segundo estadio (J2).

Modo de reproducción y ciclo de vida

M. incognita se reproduce exclusivamente de forma asexual mediante partenogénesis mitótica. Dentro del género, *M. javanica* y *M. arenaria* presentan igual modo de reproducción, aunque también hay especies con reproducción sexual y/o partenogénesis meiótica (*M. fallax*, *M. chitwoodi*, *M. hapla*) (Chitwood y Perry, 2009). A pesar de que el modo de reproducción de *M. incognita* no implica recombinación genética, presenta una gran diversidad intraespecífica y elevada capacidad para adaptarse al hospedante. Los estudios genómicos sugieren que en el proceso evolutivo y de especiación pudieron ocurrir eventos de hibridación y poliploidía, que conllevaron a un genoma que presenta copias divergentes para la mayor parte de los genes, lo cual explicaría el extraordinario potencial de esta especie para generar variabilidad aun careciendo de reproducción sexual (Castagnone-Sereno *et al.*, 2013).

El ciclo de vida de *M. incognita* se esquematiza en la figura 1.2. Comienza en el huevo, donde aparece la primera de las cuatro fases juveniles (J1). Dentro del huevo tiene lugar la primera muda, emergiendo como estadio juvenil (J2), el cual posee capacidad migratoria y puede penetrar en los tejidos de la planta (fase infectiva). El estadio J2 tiene energía suficiente para permanecer cierto tiempo (en torno a un mes, aunque depende de las condiciones ambientales) en la búsqueda y penetración de la raíz, estableciendo un sitio de alimentación. Al penetrar en la raíz se mueve intercelularmente, llegando a la altura de la base del cilindro vascular y migrando en sentido ascendente. En la zona de diferenciación de la misma se vuelve sedentario y establece un punto de alimentación permanente. En este punto de alimentación y en respuesta a las secreciones que el nematodo inyecta a las células del hospedante, se producen varias divisiones nucleares sin citoquinesis, dando lugar a células grandes, multinucleadas, llamadas “células gigantes”. Las células del hospedante alrededor del lugar de alimentación se dividen e hinchan, manifestándose externamente como nódulos (agallas). El nematodo ingiere el citoplasma de las células gigantes a través del estilete. Luego pasa por dos fases juveniles (J3 y J4) hasta convertirse en adulto.

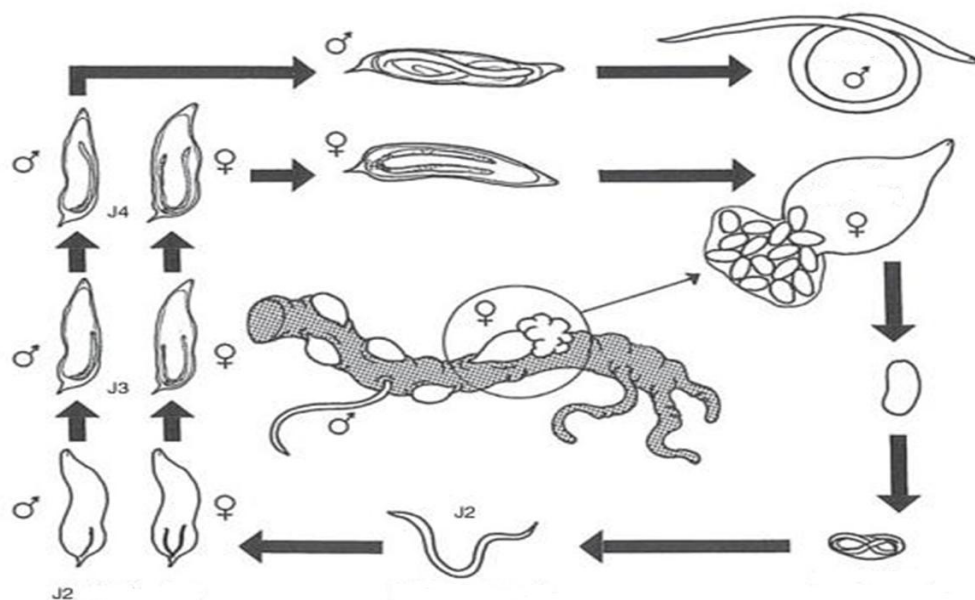


FIGURA 1.2. Diagrama del ciclo de vida de *Meloidogyne incognita*. J2: segundo estadio juvenil; J3: tercer estadio juvenil; J4: cuarto estadio juvenil (Adaptado de Karszen y Moens, 2006).

En el período de alimentación, las hembras se van engrosando hasta tomar forma de pera, y después de 15-30 días comienza la puesta de huevos, que son expulsados a través de la vulva dentro de una masa gelatinosa. Esta masa es secretada por las glándulas rectales y tienen actividad pectolítica, celulolítica y proteolítica sobre las células vegetales, lo que posibilita que se forme un canal desde el extremo posterior de la hembra hasta la superficie de los nódulos radiculares. Al principio, esta masa es de color blanquecino y al alcanzarse el momento de la eclosión se torna de color castaño. Cada masa de huevos contiene generalmente entre 500 y 1000 huevos, que permanecen protegidos dentro de la masa gelatinosa, eclosionando ante condiciones favorables de humedad y el estímulo de los exudados de las plantas hospedantes. Los machos aparecen bajo determinadas condiciones ambientales, pero no son funcionales (Triantaphyllou, 1981). Mantienen su forma vermiforme durante toda la vida y viven de modo libre en el suelo, posiblemente sin alimentarse (Orton Williams, 1973; Siddiqi, 2000).

La duración del ciclo varía según la temperatura. Por ejemplo, la temperatura óptima de desarrollo de *M. incognita* es de 28 °C, en la cual el ciclo se completa en 30 días. Al disminuir la temperatura el ciclo se alarga, de modo que a 20 °C dura 57-60 días (Orton Williams, 1973). Al alejarse del óptimo, la temperatura influye también sobre la movilidad de la fase migratoria (J2), de modo que a 18 °C se ve afectada la capacidad de penetración en la raíz (Prot y Van Gundy, 1981; Roberts *et al.*, 1981; Roberts, 1987; Jefferes y Roberts, 1993). Por otra parte, a altas temperaturas (35.4 °C) la reproducción se inhibe (Ploeg y Maris, 1999). Algunos autores proponen la existencia de “termotipos”, adaptados a diferentes zonas y con distintos requerimientos de temperatura (Dao, 1970), que responderían a la gran valencia ecológica de la especie.

Distribución y hospedantes

M. incognita es la especie de su género de mayor distribución, con un rango de hospedantes extremadamente amplio. Se ha localizado en todas las regiones cálidas y tropicales del mundo, encontrándose en África, Australia, América (Central y del Sur), EEUU, India, Japón, Malasia, y también en suelos de invernaderos del norte de Europa, Canadá y antigua URSS (Orton Williams, 1973, Bello *et al.*, 1994a y 1994b).

Según Eisenback (1997), su amplia distribución se justifica por su adaptación a diferentes temperaturas, con un límite inferior de -1.1 °C como promedio en el mes más frío. No obstante, la mayoría de las poblaciones se encuentran en regiones con temperaturas óptimas para el desarrollo, entre los 24 °C y los 30 °C.

Se han identificado más de 700 especies vegetales que pueden servir de hospedante a *M. incognita* (Goodey *et al.*, 1965), entre las que se incluyen: hortalizas como judías, *Brassica* spp., zanahoria, *Cucurbita* spp., lechuga, okra, guisantes, tomate, pimiento; pastos y leguminosas como pasto Bermuda, trébol, alfalfa; árboles y arbustos como té, *Prunus* spp., *Vitis* spp.; cereales; especies ornamentales; malas hierbas; y otros cultivos de gran importancia como caña de azúcar, patata, algodón y tabaco (Orton Williams, 1973).

1.3.3. Patogénesis en pimiento

En las raíces de las plantas infectadas aparecen nódulos o agallas en los puntos de instalación de los juveniles (foto 10). Es en las raíces secundarias donde primero aparecen los nódulos. Las células picadas se agrandan (células gigantes) y los tejidos proliferan, deformando la raíz. Las agallas se localizan en la zona cortical de la raíz, pero alcanzan al sistema vascular, reduciendo la absorción de nutrientes y el movimiento del agua (Abad *et al.*, 2003), por lo que cuando la infección es muy acentuada, se presenta marchitez en la copa de la planta como síntoma inicial. Luego se manifiesta un debilitamiento general, con reducción en el crecimiento y en el tamaño de la copa. Se generan entrenudos de los tallos más cortos, aparecen amarilleamientos en las hojas apicales (foto 11), que empiezan por la parte basal central de la hoja o del foliolo y avanzan hacia los bordes, terminando por blanquear toda la superficie cuando la infección es intensa y prolongada. La cosecha disminuye en cantidad y calidad, y solo en situaciones extremas las plantas llegan a secarse. Además, los efectos negativos se agravan, en algunas ocasiones, por interacciones de otros patógenos o con factores abióticos como los excesos de agua.



Fotos 10 y 11. Nódulos en raíz (izq.) y amarilleos en hojas (dcha.) ocasionados por *M. incognita* en pimiento.

1.3.4. Características de las poblaciones de los invernaderos del Campo de Cartagena

En términos generales, las poblaciones de *M. incognita* de los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena se comportan como patogénicas y de alto nivel de agresividad, en base a los síntomas que producen. Se han identificado como pertenecientes a la raza 2-pimiento por Robertson *et al.* (2006), sin que se haya detectado algún grado de especialización parasitaria, por lo que mantiene sus capacidades patogénicas frente a un amplio rango de especies vegetales, en particular de hortalizas.

La componente racial, desde el punto de vista patogénico y no de rango de hospedantes en el que se basa la diferenciación racial de Hartman y Sasser (1985), se mantiene homogénea en la mayor parte de la superficie de los invernaderos en los que *M. incognita* es un problema fitosanitario del suelo. Cuando se han realizado ensayos del uso del injerto como alternativa de la desinfección química para el control de los patógenos del suelo, se ha puesto de manifiesto que la patogeneicidad se puede ver modificada. Concretamente se ha constatado el desarrollo de poblaciones virulentas al gen *Me3*, aspecto tratado con más detalle en los apartados 1.2.6 y 1.4.3, y que guarda

similitud con casos ocurridos en otras áreas geográficas para el gen *N* de pimiento (Thies, 2011) o para el gen *Mi* de tomate (Kaloshian *et al.*, 1996).

La dinámica de las poblaciones del nematodo y por tanto la evolución epidémica de la enfermedad están relacionadas con las características del suelo, con las condiciones ambientales (temperatura, movimiento del agua y grado de humectación del suelo, etc.) y del cultivo, en particular de la variedad cultivada. En los invernaderos del Campo de Cartagena, para el ciclo de cultivo del pimiento más frecuente (ver apartado sobre técnicas culturales), la temperatura del suelo en el momento de la plantación no suele superar 14-15°C, por lo que el nematodo tiene limitaciones térmicas para evolucionar, para moverse y para infectar el pimiento. A medida que va aumentando la temperatura en el suelo se va acortando el ciclo evolutivo del nematodo y aumenta el potencial multiplicador, de forma que a partir de mediados de abril las limitaciones se reducen por alcanzarse 20°C en el suelo (temperatura óptima para el desarrollo de *M. incognita*). Este parece un momento epidemiológicamente crítico (A. Lacasa, comunicación personal) pues a partir de estas fechas se pueden producir solapes generacionales y producirse explosiones demográficas, que pueden resultar incontrolables si la población de partida (al inicio del cultivo) era elevada.

Las modificaciones en la tecnología del cultivo en los invernaderos, como los tipos de plástico de las cubiertas, la disposición de dobles cubiertas y complemento de fibras textiles para la mejora de la temperatura, influyen en la temperatura del suelo y en la evolución de las poblaciones de los nematodos y otros patógenos del suelo, asistiéndose en la actualidad a cambios en los modelos epidemiológicos con importantes repercusiones para las enfermedades producidas por los nematodos.

En todos los invernaderos del Campo de Cartagena el riego se realiza por goteadores, lo que supone una restricción en el movimiento horizontal del agua y en superficie (si el riego se realiza de forma adecuada y el suelo no se encuentra apelmazado). El sistema, en si, supone una limitación al desplazamiento de los juveniles en el suelo, en comparación al riego a toda superficie o por surcos. Esta limitación supone una forma de control de la enfermedad, al menos, en las fases iniciales del cultivo, ya que las frecuencias de riego son largas (una o dos veces por semana) y los caudales son reducidos (las exigencias son también bajas). Sin embargo, a partir de mediados de mayo las exigencias propias del cultivo y la deficiente calidad del agua de

riego hacen que los riegos sean más frecuentes (una vez al día) y con mayores dotaciones. Esto supone que los bulbos se solapen, que la superficie permanezca más tiempo húmeda, por lo que la dispersión de las poblaciones no se ve limitada, dentro de una misma fila de plantas. En consecuencia la epidemia se ve favorecida y la incidencia de la enfermedad aumentada.

La mayor parte de los suelos de los invernaderos hemos dicho que son franco-arcillosos, a veces pesados por bajo contenido en materia orgánica, y con reducida capacidad de infiltración y reducida capacidad de drenaje al asentarse en costra petrocálcica. Esto supone que la humedad en superficie sea elevada cuando los riegos son frecuentes (se llegan a producir efectos de asfixia radicular y del cuello de las plantas, Tello *et al.*, 1987). De esta manera la dispersión del nematodo se ve facilitada y la incidencia del patógeno llega a ser elevada al final del verano.

1.4. Las resistencias genéticas en el pimiento

1.4.1. Tolerancia a estreses abióticos

Entre los principales factores abióticos que afectan negativamente al cultivo del pimiento figuran la escasez y exceso de agua, alta salinidad de suelo y agua, deficiencia y exceso de intensidad luminosa o valores extremos de temperatura. Bajo tales condiciones las plantas pueden presentar deficiencia en el desarrollo, en la producción y en la calidad de los frutos, apareciendo en muchas ocasiones fisiopatías como asfixia de raíz y cuello, pudrición apical, manchado-decoloración o malformación de frutos (Nuez *et al.*, 1996; Djian-Caporalino *et al.*, 2007a). Debido a la diversidad genética del pimiento y la amplitud de su área de cultivo, se pueden encontrar variedades adaptadas a condiciones ambientales más extremas. Sin embargo, la tolerancia a tales condiciones está relacionada con caracteres fenotípicos complejos como fertilidad, sistema radicular, cuajado de frutos, crecimiento vegetativo, etc., que suelen estar controlados por sistemas poligénicos y de expresión cuantitativa. Además, muchas fisiopatías suelen ser por interacción de varios factores, como por ejemplo la pudrición apical de frutos causada por estrés hídrico y de nutrición mineral, de manera que el estudio genético de la tolerancia a estreses abióticos es muy complejo y hace difícil su aplicación en la

mejora de variedades de pimiento (Nuez *et al.*, 1996; Bosland y Botava, 2000; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014).

1.4.2. Resistencia a patógenos

Virus

Se conocen más de 20 virosis pertenecientes a 15 grupos de virus que afectan al pimiento. Los principales géneros de virus, y las fuentes de resistencia conocidas se indican a continuación:

Tobamovirus

La transmisión es de forma mecánica, en las manipulaciones agrícolas, o mediante semilla. Los síntomas más frecuentes son mosaico fuerte o medio, necrosis de partes vegetativas, esterilidad y malformación y decoloración de frutos. Las principales especies que afectan a pimiento son el TMV (Tobacco mosaic virus), el ToMV (Tomato mosaic virus) y el PMMV (Pepper mild-mosaic virus). La resistencia es monogénica y dominante y se caracteriza por una respuesta de hipersensibilidad. Está controlada por el locus *L*, del cual se conocen cuatro alelos con resistencia específica a diversos patotipos. *L1*, procedente de *C. annuum*, confiere resistencia a las cepas más comunes de TMV y ToMV (patotipo 0). *L2*, procedente de *C. frutescens* es eficaz contra cepas virulentas al anterior alelo. *L3*, procedente de *C. chinense* otorga resistencia a TMV, ToMV, PMMV (patotipos 1, y 1.2) y a otros Tobamovirus. *L4*, procedente de *C. chacoense* otorga resistencia a todos los patotipos anteriores más el patotipo 1.2.3 de PMMV (Tm3) que es virulento a *L3* (Boukema, 1980 y 1984; Kovacs *et al.*, 2004; Ozkaynak *et al.*, 2014).

Cucumovirus

CMV (Cucumber mosaic virus) es la especie de mayor importancia. Los síntomas más característicos son mosaico puntiforme en hojas, hojas filiformes, necrosis en hoja de roble, malformación de frutos con decoloraciones anulares. El modo de transmisión es por áfidos (pulgones) en la forma no persistente (Chaim *et al.*, 2001). Se conocen diversas fuentes de resistencia parcial y de campo, de herencia poligénica y expresión cuantitativa, identificadas en *C. annuum* y especies relacionadas (Caranta *et al.*, 1997a y 2002; Grube *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2013).

Potyvirus

Las principales especies de este género son PVMV (Pepper veinal mottle virus) presente en África subsahariana, CVMV (Chili veinal mottle virus) prevalente en Asia, TEV (Tobacco etch virus) y PepMoV (Pepper mottle virus) presentes principalmente en América; PSMV (Pepper severe mosaic virus) y PYMV (Pepper yellow mosaic virus) presentes en el Centro y Sur de América; y PVY (Potato virus Y) que es el más ubicuo del género, presente en Europa y del que se conocen varios patotipos (Djian-Caporalino *et al.*, 2007a). La transmisión es por áfidos, y *Myzus persicae* se considera el vector más importante (Janzac *et al.*, 2008 y 2009). Los síntomas son muy diversos, pudiendo presentar desde moteado en mosaico de hojas y frutos hasta colapso y necrosis del tallo. Se han encontrado numerosas variedades con diferente nivel de resistencia (Djian-Caporalino *et al.*, 2007a), que consiste en una respuesta de hipersensibilidad, y se han identificado diversos genes mayores dominantes o recesivos (Kyle y Palloix, 1997) y QTLs (Caranta *et al.*, 1996 y 1997b). El alelo dominante del gen *Pvr4*, portado por la variedad Criollo de Morelos 334, está considerado uno de los de espectro más amplio, confiriendo resistencia frente a PVY (patotipos 0, 1 y 1-2), PepMoV y PSMV (Dogimont *et al.*, 1996, Janzac *et al.*, 2009).

Tospovirus

Son transmitidos por trips. La especie más importante y extendida es el TSWV (Tomato spotted wilt virus) cuyo vector es el trip *Frankliniella occidentalis*. Los síntomas más comunes son mosaico en hojas, necrosis de hojas y tallo, y decoloración y manchado anular del fruto. La resistencia que se conoce procede de *C. chinense* y viene dada por un gen dominante, el *Tsw* que confiere una reacción de hipersensibilidad, (Moury *et al.*, 1997 y 2000; Suzuki, 2003), pero que no es efectivo a otros tospovirus y es termosensible, inactivándose a altas temperaturas (Moury *et al.*, 1998). Además han surgido formas virulentas que prevalecen en campo (Margaria *et al.*, 2004).

Hongos de evolución aérea

Leveillula taurica

Causante de la oidiopsis del pimiento que afecta a las hojas, reduciendo su funcionalidad y llegando a causar la defoliación de la planta. Tiene elevada incidencia en climas mediterráneos y cultivos protegidos en Europa. La resistencia es de herencia poligénica habiéndose identificado hasta 7 QTLs (Lefebvre *et al.*, 2003). Se conoce un QTL mayor procedente de *Capsicum annuum* que confiere un elevado nivel de resistencia (Eggink *et al.*, 2013).

Botrytis cinerea

Hongo necrotrofo que se alimenta de tejidos sobre los que previamente induce la muerte mediante la producción de toxinas. Tiene alta incidencia en cultivos protegidos cuando la humedad relativa es elevada. No se conocen fuentes de resistencia, aunque sí se han observado diferencias de susceptibilidad entre variedades (A. Lacasa, comunicación personal).

Traquemicosis u hongos vasculares

Son hongos del suelo que infectan la planta colonizando y obstruyendo los vasos leñosos, provocando la marchitez de la planta, la defoliación prematura y la muerte. En nuestro país *Verticillium dahliae* es el responsables de las alteraciones vasculares en zonas templadas (Palazón, 1988; Larregla, 2003). Se dispone de poca información respecto a fuentes de resistencia a este hongo, aunque se ha comprobado que es de tipo poligénico (Palloix *et al.*, 1990).

Oomicetos

Varias especies del género *Phytophthora* son patógenas del pimiento afectando a diversas partes de la planta, aunque debido a su presencia en el suelo y el agua, son la raíz y tallo a las partes que principalmente ataca, necrosando los tejidos y causando el marchitamiento y muerte de las plantas, (enfermedad conocida como "seca" o "tristeza" del pimiento) (Palazón y Palazón, 1989; Larregla, 2003). A escala mundial está considerado como uno de los principales problemas patogénicos del pimiento, ya que aparece prácticamente en todas las zonas de cultivo, siendo muy difícil su erradicación.

P. capsici es la especie más patógena a pimiento, aunque en determinadas zonas, otras especies como *P. nicotianae* pueden ser de mayor importancia (Guerrero, 2013). Debido a su importancia las fuentes de resistencia en pimiento han sido muy estudiadas. Se han identificado variedades, como ‘Criollo de Morelos 334’ o ‘Perennial’, con elevado nivel de resistencia, y se ha determinado que la resistencia es de efectos cuantitativos, no específica de raza, estable y durable. El modo de herencia es poligénico, habiendo implicados entre 7 y 9 QTLs repartidos por varios cromosomas, presentando además interacciones génicas (Lefebvre y Palloix, 1996; Thabuis *et al.*, 2003; Bonnet *et al.*, 2007; Truong *et al.*, 2012). Entre estos se ha identificado un QTL de efectos mayores en el cromosoma P5 (Mallard *et al.*, 2013).

Bacterias

Suponen un problema importante en zonas intertropicales, donde se dan condiciones climáticas húmedas y cálidas. Las especies más importantes por la dimensión de sus daños son:

Xanthomonas campestris

Causante de necrosis y podredumbres en hojas, frutos y tallo. Se identificaron varios genes mayores de resistencia (*Bs1*, *Bs2*, *Bs3*) específicos de raza (Cook y Guevara, 1984; Kim y Hartmann, 1985), aunque posteriormente se describieron algunos casos de virulencia (Minsavage *et al.*, 1990; Kousik y Ritchie, 1998). Posteriormente se han identificado fuentes de resistencia que presentan más estabilidad frente a diferentes razas (Poulos *et al.*, 1991; Szarka *et al.*, 2002).

Ralstonia solanacearum

Es un patógeno del suelo, no presente en los cultivos españoles, que infecta la raíz y se propaga por el tallo causando marchitez. Se han identificado algunas fuentes de resistencia parcial en variedades locales de colecciones de germoplasma (Kim y Kim, 2004; Lafortune *et al.*, 2005), que dependiendo del aislado y material vegetal presentan un modo de herencia oligo o poligénico, de naturaleza cuantitativa y con notables efectos aditivos (Tran y Kim, 2010).

1.4.3. La resistencia a *Meloidogyne* spp.

Origen y genes implicados

En la actualidad se han identificado hasta 9 genes de resistencia a especies del género *Meloidogyne*, todos caracterizados como simples, dominantes y de tipo cualitativo (tabla 1.2).

TABLA 1.2. Características de los genes de resistencia frente a *Meloidogyne* spp. en pimiento.

Gen	Resistencia conferida	Origen	Crom.	Referencias
<i>N</i>	<i>M. incognita</i> <i>M. arenaria</i> <i>M. javanica</i> <i>M. hapla</i>	<i>C. frutescens</i> : ‘Santanka XS’; ‘405B Mexico’	P9	Hare 1966; Fery <i>et al.</i> , 1998; Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 1999; Fazari <i>et al.</i> , 2012
<i>Me1</i>	<i>M. incognita</i> <i>M. arenaria</i> <i>M. javanica</i>	‘PI201234’-Centroamérica	P9	Hendy <i>et al.</i> , 1985; Castagnone-Sereno <i>et al.</i> , 1996; Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 1999, 2001 y 2007b; Fazari <i>et al.</i> , 2012
<i>Me2</i>	<i>M. javanica</i> <i>M. hispanica</i>	‘PI201234’-Centroamérica		
<i>Me3</i>	<i>M. incognita</i> <i>M. arenaria</i> <i>M. javanica</i> .	‘PI322719’- India ‘CM334’- México	P9	
<i>Me4</i>	<i>M. arenaria</i> ¹	‘PI322719’- India	P9	
<i>Me5</i>	<i>M. javanica</i> ²	‘Yolo Wonder’-EEUU		
<i>Me6</i>	<i>M. javanica</i> ³ <i>M. arenaria</i> ³	‘Yolo Wonder’-EEUU		Wang y Bosland, 2006
<i>Mech1</i>	<i>M. chitwoodi</i>	‘CM334’-México	P9	Berthou <i>et al.</i> , 2003; Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 2004;
<i>Mech2</i>	<i>M. chitwoodi</i>	‘PI201234’-Centroamérica	P9	Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 2007b

¹Aislado “Ain Taoujdate”

²Aislado “Abou Dhabi”

³Determinados aislados de poblaciones francesas

El gen *N* fue el primero que se identificó (Hare, 1957) en dos líneas de *C. frutescens* denominadas ‘Santanka XS’ y ‘405B Mexico’ y después transferido a líneas susceptibles de *C. annuum* obteniendo la variedad ‘Mississippi Nemaheart’ (Hare, 1966).

Posteriormente, a partir de la anterior variedad, el gen *N* se introgresó en dos variedades de interés comercial que lo presentan en homocigosis, obteniendo ‘Carolina Wonder’ (con ‘Yolo Wonder B’ como parental recurrente) y ‘Charleston Belle’ (con ‘Keystone Resistant Giant’ como parental recurrente) (Fery *et al.*, 1998). Paralelamente se documentaron líneas de *C. annuum*, ‘Carolina Hot’, y de *C. chinense*, ‘PA-353’, ‘PA-398’ y ‘PA-426’, resistentes a *Meloidogyne* spp. (Martin y Crawford, 1950 y 1958; Fery y Thies, 1997). Sin embargo, diversos estudios genéticos llegan a la conclusión de que la resistencia en estas líneas es conferida principalmente por un gen dominante, alélico al gen *N* presente en ‘Mississippi Nemaheart’ (Fery y Dukes, 1996; Fery y Thies, 1998 y 2000).

Respecto a los genes de resistencia *Me*, los primeros fueron identificados por el equipo del Dr. Pochard del INRA de Montfavet (Francia) en 1985, todos en *C. annuum*. *Me1* y *Me2* se identificaron en la línea ‘PI 201234’ (=‘PM217’) originaria de América Central, *Me3* y *Me4* en la línea ‘PI322719’ (=‘PM687’) originaria de la India y *Me5* en ‘Yolo Wonder’ (variedad obtenida en Estados Unidos). En el mismo estudio se caracterizó la resistencia de cada gen, resultando que *Me1* y *Me3* conferían un amplio espectro de resistencia, siendo los únicos eficaces frente a *M. incognita*. Igualmente ya se indicó que estos dos genes no eran alélicos, aunque estaban ligados junto a *Me4* en un mismo cromosoma (Hendy *et al.*, 1985). Posteriormente se identificó otro gen en la línea Criollo de Morelos 334 (‘CM334’), al que se le denominó como *Me7* (Pegard *et al.*, 2005; Djian-Caporalino *et al.*, 2007b) y responsable de la resistencia conocida con anterioridad frente a varias especies de nematodos (Nuez *et al.*, 1996; Djian-Caporalino *et al.*, 1999). Sin embargo, estudios de alelismo llevados a cabo recientemente demostraron que *Me7* es alélico a *Me3* (Fazari *et al.*, 2012). *Me6* se identificó en ‘Yolo Wonder’ aunque su resistencia parece limitada a determinados aislados o poblaciones de *Meloidogyne*, según comentario personal de C. Djian-Caporalino a D. Wang y P. Bosland (2006). Por último se describieron dos genes simples confiriendo resistencia frente a *M. chitwoodi*, *Mech1* identificado en ‘CM334’ y *Mech2* identificado en ‘PM217’ (=‘PI 201234’) (Berthou *et al.*, 2003; Djian-Caporalino *et al.*, 2004).

Los estudios de localización en el mapa genético del pimiento de estos genes han permitido determinar que *Me1*, *Me3*, *Me4*, *Mech1*, *Mech2* y *N* están ligados en una región de 31.2 cM del cromosoma P9 (figura 1.3) y concretamente *Me1*, *Me3* y *N*, que

son los únicos eficaces frente a *M. incognita*, se sitúan dentro de un intervalo de 9 cM (Castagnone-Sereno *et al.*, 2001; Djian-Caporalino *et al.*, 2007b; Fazari *et al.*, 2012). También se ha visto que esta región cromosómica del pimiento alberga factores de resistencia a otros patógenos (*Phytophthora*, *Xanthomonas*) y guarda sintenia con una región del cromosoma T12 del tomate y con una región del cromosoma XII de la patata que albergan factores de resistencia a nematodos (Djian-Caporalino *et al.*, 2007b) sugiriendo ser un región homóloga entre solanáceas que contienen un clúster de resistencias a patógenos.

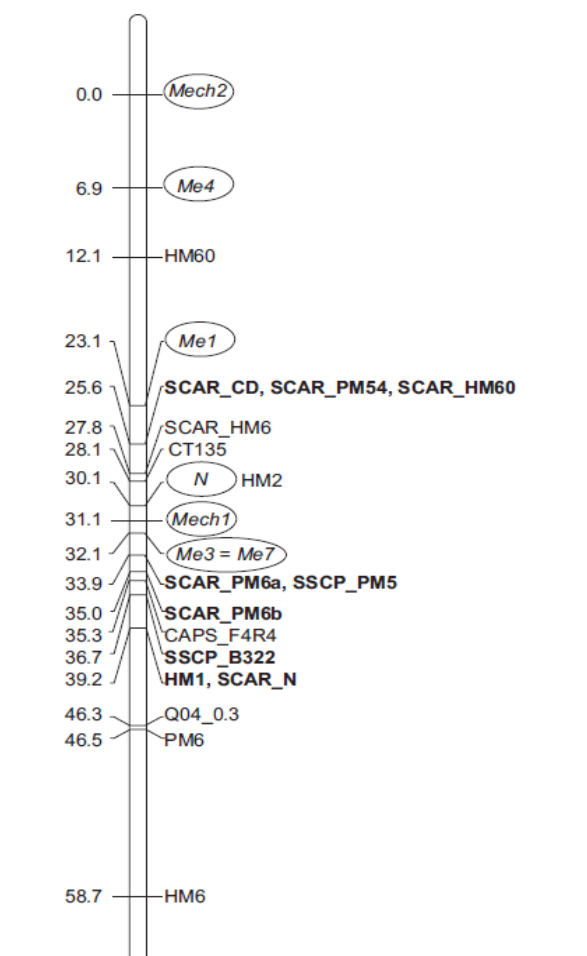


FIGURA 1.3. Posición de algunos de los genes de resistencia a *Meloidogyne* spp. mapeados en el cromosoma P9 (Fazari *et al.*, 2012).

Genes de resistencia a *M. incognita*. Durabilidad y prestaciones

Dentro de los genes identificados hasta ahora confirmando resistencia a *Meloidogyne* spp. únicamente tres genes, *N*, *Me1* y *Me3*, otorgan resistencia a *M.*

incognita. Debido a su importancia estos tres genes han sido muy estudiados y caracterizados.

El gen *N* se ha mostrado efectivo contra las principales especies, que incluyen *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* (Hare, 1957 y 1966; Fery *et al.*, 1998; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Thies y Fery, 2000), resultando efectivo en condiciones de campo (Thies *et al.*, 2003). Sin embargo, su eficacia disminuye a temperaturas del suelo superiores a 28-30°C (Thies y Fery, 2000). También se han documentado poblaciones virulentas de *M. incognita* en condiciones de campo (Thies, 2011), y además en inoculaciones de plantas portadoras del gen *N* con poblaciones de *M. incognita* de los invernaderos de la Región de Murcia se obtuvieron altos valores de infección (C. Ros, comunicación personal; datos no publicados).

El gen *Me1* se ha mostrado eficaz frente a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Hendy *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Castagnone-Sereno *et al.*, 2001), siendo además estable a temperaturas elevadas (Djian-Caporalino *et al.*, 1999). Además ha mostrado una alta estabilidad y durabilidad, no habiéndose documentado la aparición de poblaciones virulentas del nematodo, ni en condiciones de laboratorio (Castagnone-Sereno, 1996; Djian-Caporalino, 2011) ni tampoco en condiciones de campo (Ros, 2012; Djian-Caporalino *et al.*, 2014; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). La alta estabilidad del gen se ha relacionado con el tipo de mecanismo de defensa que la confiere, que permite la entrada y colonización de la raíz por parte del nematodo, que posteriormente (7-10 días después) desencadena una serie de reacciones que bloquean el suministro de nutrientes al nematodo e impide su desarrollo (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998; Pegard, 2005). Este mecanismo implicaría complejas reacciones en la planta que evitarían la selección de poblaciones virulentas y/o dificultarían la adquisición de virulencia debido al requerimiento de varias mutaciones simultáneas en el genoma del patógeno.

El gen *Me3* también se ha mostrado eficaz frente a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, y estable a temperaturas elevadas (Hendy *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Castagnone-Sereno, 2001). Sin embargo, bajo condiciones controladas se han obtenido aislados virulentos de *M. incognita* para este gen, a partir de aislados avirulentos (Castagnone-Sereno, 1996), y también en campo se ha demostrado el desarrollo de poblaciones virulentas a partir del segundo año, reiterando el cultivo de

plantas portadoras de *Me3* (Ros, 2012; Ros-ibáñez *et al.*, 2014). La adquisición de virulencia se ha relacionado con el mecanismo de defensa de la planta consistente en una rápida respuesta (reacción de hipersensibilidad) que desencadena la necrosis de las células adyacentes al lugar donde el nematodo pica para penetrar en la raíz (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998; Pegard *et al.*, 2005). Este mecanismo implicaría una elevada presión de selección de los individuos hacia aquellos fenotipos capaces de superar la barrera de defensa de la planta. Además, se ha hallado una zona del genoma de *M. incognita* que posee alta plasticidad y codifica una familia de proteínas relacionadas con la capacidad de adquisición de virulencia hacia el gen *Mi* del tomate, el cual confiere un mecanismo de resistencia similar al de *Me3* de pimiento (Abad *et al.*, 2003; Castagnone-Sereno *et al.*, 2009). No obstante, se ha encontrado que la ganancia de virulencia tiene un coste en la reproducción del nematodo, constatándose una mayor reproducción sobre plantas susceptibles de pimiento de aislados de *M. incognita* avirulentos en relación a los virulentos a *Me3* (Djian-Caporalino *et al.*, 2011).

Otras fuentes de resistencia

Además de los genes de resistencia citados anteriormente, se han encontrado algunas líneas de pimiento con resistencia a *Meloidogyne* spp., pero que posteriormente no se han llegado a caracterizar genéticamente o bien, cuando se han caracterizado no se ha determinado claramente si se trataría de nuevos factores de resistencia.

Di Vito *et al.*, (1991) encontraron resistencia a varias especies de *Meloidogyne* (incluyendo *M. incognita*) en varias líneas de *Capsicum* spp. Concretamente llegó a identificar un gen recesivo en *C. annuum* y al menos un gen dominante en líneas de *C. frutescens*, *C. chacoense* y *C. chinense* confirmando resistencia a *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* (Di Vito *et al.*, 1993 y 1999). Sin embargo, no hay constancia de que posteriormente se haya profundizado más en la determinación de estos genes.

Respecto a resistencias de tipo cuantitativo son muy poco conocidas en pimiento, aunque en varios estudios se reflejan observaciones de diferente nivel de resistencia entre líneas de pimiento. En este sentido Fery y Dukes (1996) compararon la resistencia de ‘Mississippi Nemaheart’ (portador del gen *N*) con ‘Carolina Hot’ y observaron mayor nivel de resistencia en esta última línea. El análisis genético determinó que ese mayor nivel de resistencia era debido a un gen recesivo portado por ‘Carolina Hot’ adicional al

N. Sin embargo, otro estudio posterior contradice tal hipótesis concluyendo que ambas variedades portan sólo el gen *N* que tendría efectos aditivos (Souza-Sobrinho *et al.*, 2002), aunque la metodología empleada en la evaluación de la resistencia podría no ser adecuada para una correcta interpretación de los resultados. Djian-Caporalino *et al.* (1999) testaron varias líneas de pimiento frente a dos aislados de *M. incognita* y encontraron menor nivel de infección en las líneas ‘Yolo Wonder’ ‘H3’ y ‘SC81’ que en la línea ‘DLL’ sugiriendo la presencia de genes menores en aquellas líneas como causa de su resistencia parcial.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

2.1.1. La desinfección química y la problemática actual

Se tiene constancia que desde el inicio del cultivo del pimiento en invernaderos del Campo de Cartagena los nematodos constituyeron un problema que requirió de la desinfección del suelo en preplantación. Al parecer, entre 1973 y 1982 para las desinfecciones se utilizaron productos como 1,3-dicloropropano + 1,3-dicloropropeno, metam sodio, nabam y la combinación de varios, resultando ser los nematodos un problema principal.

La dispersión de *Phytophthora capsici* en los invernaderos a medida que aumentó la superficie cultivada de pimiento, resultó un factor limitante del cultivo e hizo que los nematodos no fueran el único objetivo de la desinfección. Por ello, en 1983 ya se realizaron desinfecciones con bromuro de metilo, alternándolas con metam sodio en rotaciones de dos años. A partir de 1988 todos los invernaderos se desinfectaron con bromuro todos los años, por su amplio espectro biocida y por su eficacia, y los nematodos dejaron de ser un problema (Lacasa y Guirao, 1997).

En 1997 se inició la búsqueda de alternativas al bromuro de metilo por los efectos nocivos que provoca sobre la capa de ozono, reduciéndose progresivamente la dosis de aplicación y la superficie desinfectada con el gas entre 1998 y 2005, según los acuerdos del Protocolo de Montreal de 1997 suscrito por España. En 2005 y 2006 se dispuso de un uso crítico del bromuro de metilo, autorizado por el MBTOC para una parte de la superficie, mientras se adaptaban los sistemas de cultivo a nuevas formas de desinfección, sustitutas del bromuro de metilo.

Desde 2006 a la actualidad la mayor parte de los invernaderos se vienen desinfectado todos los años con la mezcla de 1,3-dicloropropeno + cloropicrina, disponiendo de una autorización de uso excepcional de ambas sustancias por periodos anuales de 120 días desde 2010. Los dos compuestos se encuentran en fase de revisión desde 2014, de acuerdo a las disposiciones de la Directiva Europea 91/414/EEC (Reglamento 1107/2009 on Plant Protection Products). Esta disposición ha motivado limitaciones en el uso de los fitosanitarios, en particular de los desinfectantes del suelo (Colla *et al.*, 2012).

Los otros desinfectantes químicos, en la actualidad autorizados (generadores de metil-isotiocianato), se considera tienen actividad general y eficacia parcial, por lo que su uso es reducido, al necesitar de medidas complementarias durante el ciclo de cultivo para mantener niveles adecuados de control de los patógenos en un cultivo como el del pimiento en invernadero que es de larga duración (8-9 meses en el Campo de Cartagena) (Ros *et al.*, 2004a). Las medidas complementarias adoptadas suelen consistir en la aplicación de compuestos químicos, con actividad específica sobre los patógenos principales, durante el desarrollo del cultivo.

La biosolarización utilizando varias enmiendas orgánicas se ha mostrado eficaz para el control de *Phytophthora* si se inicia la solarización en agosto (Guerrero *et al.*, 2004b), pero la eficacia para *Meloidogyne* resulta aleatoria al depender de las condiciones climáticas del periodo de desinfección de cada año (Guerrero *et al.*, 2012, 2013 y 2014b; Núñez-Zofio *et al.*, 2013). Pese a las deficiencias, esta forma de desinfección se aplica en más del 20% de los invernaderos de pimiento con cultivo convencional y en todos los calificados en agricultura ecológica

Desde 2003 en que las dosis de aplicación del bromuro fueron reducidas y la superficie desinfectada con el gas también fue reducida, las deficiencias en el control de *Meloidogyne* se hicieron patentes en algunos invernaderos pasando a ser un problema relevante. Las limitaciones en las prestaciones de la desinfección con 1.3-dicloropropeno + cloropicrina para el control del nematodo se han ido poniendo de manifiesto en invernaderos con largo ciclo de cultivo, según se ha reiterado la desinfección, y *Meloidogyne* se presenta como un problema emergente cada vez en mayor superficie.

En 2012, una prospección realizada en los invernaderos del Campo de Cartagena puso de manifiesto que *Meloidogyne* es un problema principal o clave en más del 50% de los invernaderos evaluados (C. Ros *et al.*, datos no publicados).

2.1.2. Las resistencias, sus prestaciones agronómicas y su durabilidad

El uso de resistencias vegetales está considerado como uno de los mejores métodos de control de patógenos debido a su eficacia, no implicar riesgos para la salud y el medio ambiente y ser un método sostenible económicamente.

El uso de resistencias genéticas se puede ver limitado debido a varios factores como la ausencia específica de fuentes de resistencia o la dificultad de su introgresión en variedades de interés. Sin embargo, en la mayoría de casos en los que se dispone de resistencias adecuadas el principal factor limitante lo constituye la aparición de formas virulentas de los patógenos que ponen en riesgo la durabilidad de las resistencias entendiendo ésta como la presencia de su efectividad prolongada en el tiempo y estable en una amplia área de cultivo bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Johnson, 1981). Se ha visto que la durabilidad de las resistencias está estrechamente ligada a su naturaleza genética habiéndose constatado que, generalmente, aquellas conferidas por genes mayores de resistencia cualitativa (resistencias oligogénicas frecuentemente asociadas a una repuesta de hipersensibilidad) son más efímeras y remontables por razas específicas del patógeno que las conferidas por varios genes de efectos cuantitativos (QTLs) (Van der Planck, 1968; Lindhout, 2002; Ayliffe *et al.*, 2008; Kou y Wang, 2010).

Actualmente los muchos estudios sobre resistencias genéticas van dirigidos a estrategias para mantener su durabilidad. En este sentido, en distintos patosistemas se ha demostrado que la introgresión de genes mayores de resistencia en fondos genéticos con factores cuantitativos de resistencia incrementa la eficacia de las resistencias (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010). También se ha observado que determinadas estrategias agronómicas de uso de las resistencias, como la alternancia, la piramidalización o el co-cultivo de genes diferentes de resistencia pueden favorecer su durabilidad (Fabre *et al.*, 2012; Mundt, 2014).

2.1.3. La base genética de resistencia a *Meloidogyne* y la adaptación a las áreas y sistemas de cultivo

Como se ha indicado anteriormente, se tiene constancia de la fragilidad de las resistencias a *M. incognita* conferidas por los genes *N* y *Me3*; el primero por su pérdida de eficacia a temperaturas elevadas y ambos por la aparición de poblaciones virulentas del nematodo (Castagnone-Sereno, 1996; Thies y Fery, 2000; Thies, 2011). El desarrollo de virulencias hacia el gen *Me3* también se ha constatado en los invernaderos de pimiento de la Región de Murcia, mientras que el gen *Me1* se ha mostrado como la única fuente de resistencia durable (Ros, 2012; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). No obstante, en

ensayos llevados a cabo en el sureste de Francia se ha demostrado un descenso en la resistencia al reiterar el cultivo de un genotipo portador de *Me1* con fondo genético susceptible, que evidencia el riesgo de rotura de resistencia por el nematodo (Djian-Caporalino *et al.*, 2014). Este efecto también ha sido estudiado en condiciones controladas por Barbary *et al.*, (2014) quienes demostraron que la introgresión de los genes *Me1* y *Me3* en el fondo genético de ‘Yolo Wonder’ (resistente parcial) mitiga la aparición de individuos de *M. incognita* virulentos.

Sin embargo, aún es escaso el conocimiento de la influencia del fondo genético sobre los genes de resistencia frente a poblaciones diversas de *Meloidogyne* spp., incluyendo poblaciones virulentas, tanto en condiciones controladas como de campo. Además, el hecho de que las fuentes de resistencia conocidas procedan de regiones con clima distinto (Centroamérica, México e India) las predispone de una base genética poco adaptada a las condiciones de cultivo de la Región de Murcia, siendo preferible introgresar dichas resistencias en materiales autóctonos bien adaptados a los factores edafoclimáticos y su posterior evaluación como porta-injertos. Algunas de estas cuestiones se plantearon como fruto de los resultados de la tesis doctoral de C. Ros (2012) que revelaron diferencias en el nivel de resistencia entre variedades porta-injertos portadoras de un mismo gen y mostraron una buena adaptación y comportamiento agronómico de algunas variedades porta-injertos desarrolladas por el IMIDA.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

En base al conocimiento actual sobre las prestaciones agronómicas de la resistencia a nematodos, el objetivo de esta tesis es conocer el efecto del fondo genético sobre las resistencias a *Meloidogyne incognita* en pimiento.

2.2.2. Objetivos específicos

Debido a la práctica ausencia de variedades de pimiento de interés comercial con resistencias a los principales patógenos del suelo (*Meloidogyne* spp. y *Phytophthora* spp.), actualmente el injerto constituye la única forma que permite el empleo de

resistencias en el control de estos patógenos en los cultivos de la Región de Murcia. En este sentido los estudios llevados a cabo en esta tesis se han orientado hacia su aplicación en la mejora genética de portainjertos resistentes a *Meloidogyne incognita* que estén bien adaptados a las condiciones de cultivo de la Región de Murcia. Por tanto se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la resistencia de campo frente a *M. incognita* y el comportamiento agronómico como porta-injertos de variedades locales de pimiento.
- Conocer la influencia del fondo genético del pimiento controlando la resistencia cuantitativa cuando se combina con genes mayores de resistencia a *Meloidogyne*, y estimar su efecto reduciendo la reproducción de aislados de distinta virulencia a los genes *Me*.
- Estudiar el efecto del fondo genético en la estabilidad de los genes mayores de resistencia a *M. incognita*, en genotipos cultivados como porta-injertos en invernadero.
- Como consecuencia de la observación en la variedad ‘Costal’ de resistencia parcial y estable frente a *M. incognita* se propone caracterizar genéticamente esta nueva fuente de resistencia.
- Llevar a cabo estudios preliminares sobre estrategias de uso durable de las resistencias a *M. incognita* en cultivos de pimiento en invernadero.

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1. Material vegetal

3.1.1. Material del IMIDA

Líneas puras

Con el fin de estudiar la influencia del fondo genético sobre los genes mayores de resistencia, se eligieron: i) variedades portadoras de genes de resistencia conocidos; ii) variedades de diferente fondo genético, no portadoras de genes mayores de resistencia. Éstas últimas se han cultivado tradicionalmente en la Región de Murcia, se adaptan bien a las condiciones del cultivo al aire libre, aunque no se tenían antecedentes de su comportamiento frente a *Meloidogyne incognita*. Tampoco se tenía constancia de que en los años en que se cultivaron hubiera problemas de nematodos, por lo que cabía la posibilidad de presencia en estas variedades de algún grado de resistencia de campo controlada por el fondo genético. Para la elección de las entradas se contó con el asesoramiento del investigador Joaquín Costa, del equipo de Mejora Genética de Horticultura del IMIDA, con amplia experiencia y conocimiento en el campo de la mejora genética del pimiento. De esta forma se optó por incluir tres entradas portadoras de los genes *Me1* o *Me3*: ‘HDA330’, ‘HDA149’ y ‘Serrano Criollo de Morelos’; mas cinco entradas no portadoras de genes mayores de resistencia a *M. incognita*: ‘Americano’, ‘Belrubí’, ‘Costal’, ‘Dátler’ y ‘Yolo Wonder’. Actualmente todas las entradas se conservan en el banco de germoplasma del IMIDA (BAGERIM). Su origen y características se indican a continuación:

- **Americano.** Línea pura obtenida por el IMIDA a partir de la variedad tradicional protegida ‘Ñora’ (Catálogo común de variedades de especies de plantas hortícolas, 2013), de tipo bola (foto 12) y cultivada históricamente en la Región de Murcia, principalmente para su uso en la elaboración de pimentón. Presenta buena adaptación a los suelos y condiciones de cultivo de la Región de Murcia.
- **Belrubí.** Variedad obtenida por el IMIDA y registrada por la Oficina Española de Variedades Vegetales (Catálogo común de variedades de especies de plantas hortícolas, 2013). El fruto es alargado, rojo muy oscuro (foto 13). Cultivada ampliamente en la Región de Murcia durante las últimas décadas para la

obtención de pimentón, destacando su elevada rentabilidad en el aprovechamiento de su oleorresina (J. Costa, comunicación personal; Navarro y Costa, año desconocido), por lo que se trata de un material muy bien adaptado a las condiciones de su zona de cultivo.

- **Costal.** Línea pura procedente de una variedad tradicional tipo Ocal (foto 14) tradicionalmente cultivada en la Región de Murcia. Fue seleccionada por el IMIDA por su buen comportamiento agronómico, su alta calidad y rendimiento para la elaboración de pimentón. Está bien adaptada a las condiciones de cultivo de la Región de Murcia, destacando una elevada vigorosidad de crecimiento. En trabajos previos mostró resistencia parcial a *Meloidogyne incognita* (C. Ros, comunicación personal). Fruto de los trabajos desarrollados en el marco de esta tesis se solicitó su registro a la Oficina Española de Variedades Vegetales como nueva variedad para su uso como porta-injerto, habiendo sido recientemente aceptada bajo el nombre de ‘Alcos’ (BOE de 9 de julio de 2015; ver anexo 1).
- **Dátler.** Variedad obtenida por el IMIDA y registrada por la Oficina Española de Variedades Vegetales (Catálogo común de variedades de especies de plantas hortícolas, 2013). Originariamente procede de un cruzamiento entre la variedad tradicional mallorquina ‘Tap de Cortí’ y la variedad oriunda de Hungría ‘Kalocsai’ (J. Costa, comunicación personal). El fruto es de sección triangular y erecto (foto 15). Se ha cultivado ampliamente en la Región de Murcia para la elaboración de pimentón. Presenta buena adaptación a los suelos y condiciones de cultivo de la Región de Murcia.
- **Yolo Wonder.** Variedad línea pura desarrollada en la Universidad de California, (EE.UU.). De frutos cuadrados de tamaño medio (tipo California) (foto 16). Es portadora del gen *Me5* de resistencia a *M. javanica* (Hendy *et al.*, 1985). Su inclusión en los estudios se debe a que es una variedad de amplia distribución, bien caracterizada y muy referenciada en la bibliografía científica (por ejemplo en: Di Vito *et al.*, 1992; Thies y Fery, 2000; Barbary *et al.*, 2014). Además se ha mostrado como parcialmente resistente a determinadas poblaciones de *Meloidogyne* spp. (Djian-Caporalino *et al.* 1999).

- **HDA330.** Línea doble haploide obtenida mediante cultivo de anteras de plantas F1 procedentes del cruce entre ‘Yolo Wonder’ y ‘PM217’ (=‘PI201234’, USDA) (Dumas de Vaultx *et al.*, 1981). Porta el gen *Me1* que confiere resistencia completa a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Hendy *et al.*, 1985). Entrada cedida al BAGERIM por el Dr. Alain Palloix del INRA de Aviñón (Francia). (Foto 18).
- **HDA149.** Línea doble haploide obtenida mediante cultivo de anteras de plantas F1 procedentes del cruce entre ‘Yolo Wonder’ y ‘PM687’ (=‘PI322719’, USDA) (Dumas de Vaultx *et al.*, 1981). Porta el gen *Me3* que confiere resistencia completa a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Hendy *et al.*, 1985). Entrada cedida al BAGERIM por el Dr. Alain Palloix del INRA de Aviñón (Francia). (Foto 19).
- **SCM 334.** Acrónimo de la línea pura ‘Serrano Criollo de Morelos 334’, procedente de una variedad de pimiento tipo serrano originaria del estado de Morelos (México). Porta el gen *Me3* que confiere resistencia completa a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*. Anteriormente se consideraba que la resistencia estaba conferida por el gen *Me7*, diferente al portado por ‘HDA149’ (Djian-Caporalino *et al.* 2007b), pero recientemente se ha demostrado que *Me3* y *Me7* son alélicos y confieren similar espectro de resistencia (Fazari *et al.*, 2012). (Foto 20).
- La variedad francesa **Doux Long des Landes** (DLL) es muy susceptible a *Meloidogyne* spp. (Hendy, *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999) y se ha utilizado en este trabajo como control susceptible en los ensayos desarrollados en condiciones controladas. La entrada fue cedida por el Dr. Alain Palloix. (Foto 17).



Foto 12. 'Americano'



Foto 13. 'Belrubí'



Foto 14. 'Costal'



Foto 15. 'Dátler'



Foto 16. 'Yolo Wonder'



Foto 17. 'DLL'



Foto 18. 'HDA330'



Foto 19. 'HDA149'



Foto 20. 'SCM 334'

Híbridos F1

Para estudiar la influencia del fondo genético sobre la resistencia de los genes *Me1* y *Me3* éstos fueron introgresados en distintos fondos genéticos a nivel de F1, mediante cruzamientos intraespecíficos entre cada una de las líneas portadoras de un gen mayor de resistencia ('HDA330', 'HDA149' y 'SCM') y cada una de las líneas no portadoras de genes *Me1* y *Me3* ('Americano', 'Belrubí', 'Costal', 'Datler' y 'Yolo Wonder'). Se construyeron 15 híbridos F1 (tabla 2.1). Para simplificar la nomenclatura de los híbridos los nombres de cada uno fueron codificados en base a su genotipo: la letra mayúscula (primer carácter) hace alusión al parental no portador de genes mayores de resistencia (A=Americano; B=Belrubí;...), el número (segundo carácter) y la letra minúscula (tercer carácter) indican el gen *Me* que porta y el parental donador, respectivamente (1=*Me1*-HDA330; 3h=*Me3*-HDA149; 3s=*Me3*-SCM).

TABLA 2.1. Genotipos híbridos obtenidos y código de nomenclatura.

Características	Genotipo híbrido F1	Código
Híbridos portadores de <i>Me1</i>	Americano x HDA330	A1
	Belrubí x HDA330	B1
	Costal x HDA330	C1
	Dátler x HDA330	D1
	Yolo Wonder x HDA330	Y1
Híbridos portadores de <i>Me3</i> (procedente de HDA149)	Americano x HDA149	A3h
	Belrubí x HDA149	B3h
	Costal x HDA149	C3h
	Dátler x HDA149	D3h
	Yolo Wonder x HDA149	Y3h
Híbridos portadores de <i>Me3</i> (procedente de SCM)	Americano x SCM	A3s
	Belrubí x SCM	B3s
	Costal x SCM	C3s
	Dátler x SCM	D3s
	Yolo Wonder x SCM	Y3s

3.1.2. Variedades comerciales

Porta-injertos

Para evaluar las potencialidades como porta-injertos del material vegetal del IMIDA, tanto agronómicas como para el control de los patógenos del suelo, se utilizaron como referencia en los ensayos en invernadero variedades comerciales de porta-injertos, usadas en la zona y con las que en trabajos anteriores se habían obtenido resultados agronómicos satisfactorios (Ros, 2012). A continuación se indican las características de cada uno:

- ‘Atlante’. Obtenido por Semillas Ramiro Arnedo S.L. (España). Portador del gen *Me3*, aunque ineficaz frente a poblaciones virulentas de *Meloidogyne incognita*. Presenta buen comportamiento agronómico y buena adaptación a las condiciones de la zona de cultivo.
- ‘C19’. Obtenido por Semillas Ramiro Arnedo S.L. (España). Portador del gen *Me3*, mostrando mayor nivel de resistencia que ‘Atlante’ frente a poblaciones virulentas de *Meloidogyne incognita*.
- ‘Creonte’. Obtenido por De Ruiters Seeds (en la actualidad Monsanto S.A., EE.UU.). Portador del gen *Me3*, aunque muestra deficiencias frente a poblaciones virulentas. Presenta excelente comportamiento agronómico y buena adaptación a la zona de cultivo.
- ‘Terrano’. Obtenido por Syngenta Seeds S.A. (Suiza). Portador del gen *Me1*, muestra alta estabilidad frente a poblaciones virulentas y avirulentas del nematodo. Presenta, en general, buen comportamiento agronómico, aunque con variaciones dependiendo de las condiciones de cultivo particulares de cada invernadero.

Variedades tipo California

En los ensayos en invernaderos se utilizaron variedades de tipo California Rojo, de apreciado valor comercial, usadas en el área de cultivo, que se injertaron sobre las variedades utilizadas como porta-injertos. También se utilizaron sin injertar como control susceptible de los ensayos. Se emplearon dos variedades comerciales híbridas F1 en varios invernaderos:

- ‘Gacela’, de Syngenta Seeds S.A. (Suiza), en los invernaderos E y AT
- ‘Coyote’, de Syngenta Seeds S.A. (Suiza), en el invernadero H.
- ‘Traviata’, de Rijk Zwaan S.A. (Holanda), en el invernadero K.

3.2. Experimentos en condiciones controladas

3.2.1. Condiciones de las cámaras y manejo de las plantas

Cámaras de cultivo

La mayoría de los ensayos se realizaron en la misma cámara, aunque en momentos puntuales, debido a razones de espacio, se utilizó otra para multiplicación de las semillas y de las poblaciones de nematodos. Las condiciones en ambas fueron similares y constantes: $24(\pm 3)$ °C, humedad relativa de 40-60 % durante el periodo luminoso y del 80-95% durante el periodo oscuro, y fotoperiodo de 15:9 horas de luz:oscuridad.

Semilleros

Se realizaron en bandejas de plástico especiales para tal fin, con alveolos cuadrangulares de 2 cm de ancho x 6 cm de profundidad (foto 21). El sustrato utilizado fue una mezcla de 3 partes de turba (rubia y negra) y una parte de perlita. Las semillas, una por alveolo, se colocaron enterradas a 1 cm de profundidad aproximadamente y se cubrieron con una capa fina de vermiculita, regando a continuación con agua del grifo y manteniéndolos en la cámara de cultivo. Los riegos posteriores fueron cada 2 ó 3 días abonando semanalmente con una solución nutritiva completa.



Foto 21. Plantas de pimiento en las bandejas de semillero.

Condiciones para el crecimiento de las plantas

Las plantas en el estado de 4-6 hojas (35-40 días desde la siembra) se trasplantaron a macetas. El tipo de maceta y el sustrato fue diferente según la finalidad del uso de la planta. Se regaron tres veces y abonaron una vez por semana. Los problemas debidos a la aparición de algunas plagas como araña roja (*Tetranychus urticae*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y trips (*Frankliniella occidentalis*), fueron controlados preferentemente por medios de lucha biológica (suelta de enemigos naturales, *Amblyseius* spp.), o por control químico.

3.2.2. Obtención, multiplicación y conservación del material vegetal

Condiciones de multiplicación de las semillas del material de base

Para la obtención de semillas de las líneas puras las plantas se cultivaron en macetas de base cuadrangular de 20 cm de lado y 30 cm de alto en un sustrato compuesto por una mezcla de 2 partes de turba y 1 de perlita (foto 22). Se mantuvieron en la cámara evitando así el riesgo de alogamia. Se cultivaron al menos 6 plantas de cada variedad. Para mantener su buen estado vegetativo, durante los tres años correspondientes a la fase experimental, se realizaron podas de formación y también para estimular la producción de flores y frutos. Cuando las plantas presentaron signos de envejecimiento se sustituyeron por otras.



Foto 22. Condiciones de cultivo de las plantas empleadas para realizar cruces y multiplicar semilla.

Condiciones de hibridación

Para la obtención de los híbridos se utilizaron las mismas plantas que para la multiplicación de semilla. En todos los cruces se utilizaron como madre (receptoras del

polen) las variedades no portadoras de genes mayores de resistencia: ‘Americano’, ‘Belrubí’, ‘Costal’, ‘Dátler’ y ‘Yolo Wonder’. Las tres variedades portadoras de los genes de resistencia *Me1* o *Me3*, ‘HDA330’, ‘HDA149’ y ‘SCM’, se utilizaron como padre (donadoras del polen).

Para el proceso de hibridación, primero se recolectó el polen de flores (de planta padre) en momento anterior de la antesis, estado en el cual el polen está maduro pero aún no se ha liberado de las anteras ni se han abierto los pétalos. Con una pinza desinfectada previamente con alcohol se recolectaron las anteras y se depositaron en una placa Petri etiquetada con el nombre de la variedad y planta de procedencia. Posteriormente, en la planta madre se seleccionaron flores en el estado anterior a la antesis. Con las pinzas se castró cada flor, retirando las anteras (foto 23). Después, con ayuda de una lanceta se extrajo el polen de las anteras (recolectadas de la planta padre) y se depositó cuidadosamente sobre el estigma de la flor castrada. A continuación, se colocó una etiqueta en el pedúnculo de cada flor polinizada con un código correspondiente al cruce realizado (fotos 23 y 24). Las flores se cubrieron con un adhesivo inmediatamente después de la fecundación, para evitar posibles contaminaciones posteriores de polen.



Fotos 23 y 24. Detalle de flor castrada para cruce (izq.) y fruto procedente de un cruzamiento (dcha.).

Extracción y conservación de las semillas

Cuando los frutos tornaron a color completamente rojo (fruto maduro) se recolectaron, se extrajo la semilla y ésta se dejó secar a temperatura ambiente durante, al menos, 3 días. Una vez secas se guardaron en duquesitas bien cerradas, clasificadas por genotipo y fecha de obtención y se conservaron en un frigorífico a temperatura de 5°C.

3.2.3. Aislados de *Meloidogyne*

Origen y características

Se utilizó 1 aislado de *Meloidogyne arenaria*, 1 aislado de *M. javanica* y 3 aislados de *M. incognita*, pertenecientes a la colección de nematodos mantenida en el IMIDA. Cada aislado se estableció a partir de una única masa de huevos de poblaciones colectadas en campo que previamente fueron identificadas para especie y raza por el Laboratorio Nacional de Referencia de Nematología (CSIC) mediante el test de hospedantes de Hartman y Sasser (1985) y el análisis de las isoenzimas esterasas y malato deshidrogenasas a través de la electroforesis en geles de poliacrilamida en el sistema PhastSystem by Pharmacia (Esbenshade and Triantaphyllou, 1990). El origen y las características de cada aislado se indican a continuación:

- **M-are**: obtenido en 2001 de tabaco cultivado en Losar de la Vera (Cáceres). Caracterizado como *Meloidogyne arenaria* raza 3, patógena a pimiento (Robertson *et al.*, 2009; López-Pérez *et al.*, 2011).
- **M-jav**: obtenido en 2007 de clavel cultivado en Chipiona (Cádiz). Caracterizado como *Meloidogyne javanica* raza 1, no patógeno a pimiento (Robertson *et al.*, 2009).
- **Mi-avir**: obtenido en 2002 de pimiento (variedad ‘Ribera’, de Monsanto S.A.) cultivado en un invernadero de la finca experimental Torre-Blanca del IMIDA, en Torre-Pacheco (Murcia). Caracterizado como *Meloidogyne incognita* raza 2-pimiento, patógeno y muy agresivo a pimiento, avirulenta a los genes *Me1* y *Me3* (Robertson *et al.*, 2006; Ros, 2012).
- **Mi-virCH**: obtenido en 2005 de pimiento injertado sobre el porta-injerto resistente ‘Atlante’ (Ramiro Arnedo S.L.) cultivado en un invernadero de la finca experimental Torre-Blanca del IMIDA, en Torre-Pacheco (Murcia). Caracterizado como *Meloidogyne incognita* raza 2-pimiento, patógeno y muy agresivo a pimiento, virulento al gen *Me3* (Robertson *et al.*, 2006; Ros, 2012).
- **Mi-virB**: obtenido en 2001 de pimiento injertado sobre el porta-injerto resistente ‘Atlante’ (Ramiro Arnedo S.L.) cultivado en un invernadero de una explotación comercial en San Pedro del Pinatar (Murcia). Caracterizado como *Meloidogyne*

incognita raza 2-pimiento, patógeno y muy agresivo a pimiento, virulento al gen *Me3* (Robertson *et al.*, 2006; Ros, 2012).

Conservación y multiplicación

Todos los aislados se mantienen en el IMIDA utilizando como hospedante plantas de tomate de la variedad susceptible ‘Marmande Claudia’ (Clause-Tezier S.A.), y como sustrato una mezcla turba (rubia y negra) con perlita (2:1, en volumen) desinfectado en autoclave a 120° C y 1 kg/cm² durante una hora. Se utilizan plantas de 5 semanas (4-6 hojas verdaderas) cultivadas en macetas que se inoculan con masas de huevos procedentes de raíces infectadas, renovando plantas y sustrato cada 10-12 semanas. El cultivo se desarrolla en una cámara climatizada a una temperatura de 24(±3)°C, humedad relativa de 50-90 % y fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad.

Para su uso en los experimentos, los aislados M-are y M-jav se multiplicaron sobre plantas de tomate de la variedad ‘Marmande Claudia’, el aislado Mi-avir se multiplicó sobre plantas de pimiento de la variedad susceptible ‘Sónar’, y los aislados Mi-virCH y Mi-virB se multiplicaron sobre plantas de pimiento de la variedad porta-injerto ‘Atlante’ (portadora de *Me3*), utilizando para ello el mismo procedimiento que el descrito para el mantenimiento de los aislados.

3.2.5. Diseños experimentales y planteamiento de los ensayos

Preparación de las plantas

Para evaluar los distintos genotipos frente a los aislados de *Meloidogyne* spp., las plantas se trasplantaron, en el estado de 4-6 hojas verdaderas, a macetas de base redonda y de 200 ml de capacidad (fotos 25 y 26). Se empleó un sustrato previamente esterilizado compuesto por un 50% en volumen de arena de sílice, 25% de tierra de suelo franco-arcilloso y 25% de vermiculita. Este sustrato permite un adecuado crecimiento de las plantas y desarrollo de la raíz, con la ventaja de facilitar la posterior extracción y limpieza del sistema radicular sin apenas dañarlo.



Fotos 25 y 26. Trasplante a macetas de 200 ml conteniendo sustrato de base arenosa.

Preparación y dosis de inóculo

Se utilizó una metodología adaptada de la descrita por Djian-Caporalino *et al.* (1999). Entre tres y cinco días después del trasplante las plantas se inocularon con los aislados de nematodos. Para la preparación del inóculo se extrajeron raíces con masas de huevos a partir de plantas infectadas previamente, y se pusieron sobre tamices en contacto con agua (foto 27) con el fin de favorecer la eclosión de los huevos y coleccionar los juveniles de segundo estadio (J2). Esta operación se inició tres días antes de la inoculación de las plantas con el fin de asegurar la máxima viabilidad de los J2. Éstos se contaron con ayuda de una lupa binocular para ajustar la dosis de inóculo a 400 J2 (± 50) por planta, contenidos en una suspensión acuosa de 5 ml, aplicada en dos agujeros realizados en el sustrato cercanos a la base de la planta (foto 28).



Fotos 27 y 28. Método de extracción de juveniles de *Meloidogyne* spp (izq.) para utilizarlos posteriormente en la inoculación de plantas (dcha.).

Repeticiones y distribución

Se realizaron al menos 12 repeticiones por cada genotipo y aislado, correspondiendo una repetición a una maceta. Para asegurar la independencia de las repeticiones, una maceta de cada genotipo inoculadas con el mismo aislado se dispusieron al azar en una misma bandeja, repitiendo este diseño varias veces.

Condiciones de incubación

Una vez inoculadas las plantas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 8 semanas, que es el tiempo estimado como suficiente para el desarrollo de masas de huevos.

3.2.6. Medida de parámetros

Masas de huevos

A las 8 semanas de la inoculación se arrancaron las plantas inoculadas y se lavaron las raíces cuidadosamente con agua del grifo. Después se sumergieron durante 10 minutos en una solución acuosa de eosina (0.1 g/litro de agua), con la cual se tiñen específicamente las masas de huevos (Roberts *et al.*, 1990) (foto 29). Posteriormente se examinaron con una lupa para contar el número total de masas de huevos (MHs) de cada planta, correspondiente al número total de J2 que fueron capaces de introducirse en la raíz y completar el ciclo. Este dato, MHs, se utilizó como parámetro cuantitativo de resistencia de la planta ó de infectividad del aislado del nematodo.

Daños en raíces

En las plantas que presentaron pocas o ninguna masa de huevos, se anotó la existencia de daños en raíces (nódulos, necrosis) producidos por la penetración de los nematodos en los tejidos, con el objeto de comprobar si el mecanismo de resistencia de la planta además de limitar la reproducción del patógeno limitó también la penetración.



Foto 29. Raíz de pimiento con masas de huevos de *Meloidogyne* spp. específicamente teñidas de rosa.

3.3. Experimentos en invernaderos

3.3.1. Invernaderos utilizados y planteamiento de los ensayos

Ubicación

Para la evaluación del material vegetal en condiciones de campo se utilizaron cuatro invernaderos situados en la comarca del Campo de Cartagena dentro del área donde se concentra la mayor parte del cultivo del pimiento en invernadero de la Región de Murcia (figura 3.1.). Dos invernaderos, denominados H y E, se localizan en la finca experimental Torre-Blanca, propiedad del IMIDA y situada en el nordeste del municipio de Torre-Pacheco (lat. 37°45' N, long. 0°59' O). Los otros dos invernaderos son propiedad de agricultores que hacen cultivo comercial, denominados AT y K, el primero localizado en la zona norte del municipio de Torre-Pacheco (37°49' N; 0°55' O) y el segundo localizado en el noroeste del municipio de San Pedro del Pinatar (37°51' N; 0°49' O).



FIGURA 3.1. Fotografía aérea de la comarca del Campo de Cartagena y localización de los invernaderos utilizados en los ensayos.

Características de los invernaderos

En la tabla 2.3 se resumen las principales características de cada invernadero, que se explican posteriormente con más detalle.

TABLA 2.3. Invernaderos utilizados en el estudio y principales características.

Invernadero	Tipo	Patógenos
H	Experimental	<i>Meloidogyne incognita</i> . Población avirulenta
E	Experimental	<i>Meloidogyne incognita</i> . Población en desarrollo de virulencia a <i>Me3</i>
AT	Comercial	<i>Meloidogyne incognita</i> . Población avirulenta <i>Phytophthora parasitica</i>
K	Comercial	<i>Meloidogyne incognita</i> . Población virulenta a <i>Me3</i> <i>Phytophthora parasitica</i>

- **Invernadero H.** De 330m² (30 x11m), tipo capilla, orientación Este-Oeste, se construyó en 1974, dispone de riego por goteo (manguera de 16 mm de diámetro y emisores de 3 L/h a 0.40 m de separación), con ventilación lateral, con cubierta de plástico tricapa de 0.08 mm. El suelo es franco-arcilloso, se ha cultivado de pimiento todos los años desde 1997 y se encuentra naturalmente infestado por *M. incognita* Raza 2 (Robertson *et al.*, 2006), caracterizada la población como patógena y avirulenta.
- **Invernadero E.** Se construyó en 1986 sobre suelo de otro invernadero construido en 1974 y cultivado de diferentes hortalizas y flores. Desde 1992 se cultivó interrumidamente de pimiento. Es de tipo capilla con estructuras metálicas y superficie de 950 m² (53x18 metros). Riego por goteo (manguera de 16 mm de diámetro y emisores de 3 L/h a 0.40 m de separación), con ventilación lateral y con cubierta de plástico tricapa de 0.08 mm. El suelo es franco-arcilloso, pH 7.8 y 2% de materia orgánica. La orientación es Este-Oeste. El suelo está naturalmente infestado por *M. incognita* Raza 2 (Robertson *et al.*, 2006) caracterizada la población como patógena y avirulenta. Sin embargo, en la campaña 2010-11, previa al inicio de los ensayos de este trabajo se detectó cierto grado de infección en plantas portadoras del gen *Me3*,

interpretando un incipiente desarrollo de virulencia hacia este gen de la población del nematodo.

- **Invernadero AT.** Perteneciente a la empresa agrícola Agroquímicos Los Triviños. Es de tipo capilla, de 6600m², orientación Este-Oeste, dispone de riego por goteo (manguera de 16 mm de diámetro y emisores de 3 L/h a 0.40 m de separación), con ventilación lateral y cenital, con cubierta de plástico tricapa de 0.08 mm y doble cubierta de plástico. Se ha cultivado de pimiento ininterrumpidamente desde 1999. Está infestado naturalmente por *Phytophthora parasitica* y *M. incognita* cuya población se caracteriza como patógena y avirulenta (C. Ros *et al.*, datos no publicados).
- **Invernadero K.** Pertenece a un socio de Hortamira Sociedad Cooperativa Limitada (El Mirador, San Javier). Se construyó en 1982 y se ha cultivado ininterrumpidamente de pimiento, desinfectando el suelo desde 1986 a 2006 con bromuro de metilo y luego con la mezcla de 1,3-dicloropropeno y cloropicrina. Es de tipo capilla de estructuras metálicas de 2 m de altura en los laterales y 3.8 m en la cumbre, con aperturas laterales de ventilación de 1.2 m de anchura y una cenital de 1m. Con cubierta de plástico tricapa de 0.08 mm y con doble cubierta interior de plástico de polietileno de 0.03 mm, ligeramente perforado y puesto con inclinación hacia los laterales, vertiendo el agua de condensación al interior del invernadero. Es de forma rectangular con orientación NE-SO, y superficie de 3400 m² (170 x 20m). Dispone de sistema de riego por goteo (manguera de 12 mm de diámetro y emisores de 3 L/h a 0.40m de separación). El suelo es franco-arcilloso, con menos del 2% de materia orgánica, pesado, con problemas de asfixia debido al encharcamiento que en algunas ocasiones han sufrido por escorrentías de agua de lluvia. Está infestado naturalmente por *Phytophthora parasitica* y *Meloidogyne incognita* caracterizada como raza 2 y virulenta a *Me3* (Robertson *et al.*, 2006; Ros, 2012).

Diseño de los ensayos

En todos los invernaderos el diseño experimental fue de bloques al azar con al menos tres repeticiones por cada genotipo, consistiendo cada repetición de una parcela

(fila, foto 30) donde se cultivaron entre 10 y 53 plantas (en función de las dimensiones del invernadero).



Foto 30. Disposición en filas de las plantas.

3.3.2. Preparación de los semilleros y metodología del injerto

Todo el proceso comprendido entre la siembra de cada genotipo hasta el momento del trasplante, incluyendo el injerto, se llevó a cabo en la empresa Semilleros El Mirador S.L. Para cada ensayo en un mismo invernadero la siembra de cada genotipo se hizo a la misma vez, generalmente de forma manual, aunque cuando el número de semillas de un mismo genotipo fue mayor de 300 se recurrió a la siembra mecanizada. Las condiciones de siembra, germinación y crianza de las plantas fueron las propias del semillero utilizadas para plantas comerciales (fotos 31 y 32).



Fotos 31 y 32. Plantas de pimiento en semillero comercial.

El injerto se hizo cuando tanto el porta-injerto como la variedad presentaron entre 4 y 6 hojas, decapitando el porta-injerto por debajo de los cotiledones y la variedad por encima de los cotiledones. El injerto fue en bisel (tipo japonés) uniendo ambas partes con pinza de 2mm de diámetro (fotos 33 y 34). Posteriormente las plantas se mantuvieron en una cámara en oscuridad a 25°C y 100% de humedad relativa durante

dos días, aumentando durante los siguientes días la iluminación y ventilación interna, de forma paulatina. Al cabo de una semana las plantas se trasladaron a un invernadero con calefacción y se cubrieron con malla térmica, que fue retirada progresivamente. Al cabo de 15 ó 20 días desde el injerto las plantas ya se encontraban aclimatadas a las condiciones de invernadero, aptas para el trasplante. Todas las plantas destinadas a un mismo ensayo (mismo invernadero) se sembraron, injertaron y aclimataron a la misma vez.



Fotos 33 y 34. Detalles del proceso de injerto: momento del corte en bisel de la planta patrón (izq.) y plantas recién injertadas con pinza sujetando el punto de unión (dcha.).

3.3.3. Prácticas culturales

Preparación del suelo

Las labores de preplantación se iniciaron tras finalizar el cultivo precedente. Se retiraron las mangueras de riego, los hilos y perchas del entutorado. Los restos del cultivo se enterraron utilizando una fresadora extendiendo a continuación el abonado orgánico de fondo y los correctores, dando un pase o dos de subsolador y enterrando la enmienda orgánica con una labor de fresadora.

Biosolarización

Aunque los suelos no se desinfectaron, con el fin de asegurar una densidad elevada de los nematodos, en aquellos invernaderos en los que se manifestaron evidentes síntomas de fatiga del suelo en el cultivo precedente, se llevó a cabo una biosolarización tardía, en el mes de octubre, la cual tiene un efecto muy bajo sobre las poblaciones de *Meloidogyne*, pero en cambio muestra cierta eficacia para paliar el efecto de la fatiga (Guerrero, 2013). Para la biosolarización se labró el terreno, después se incorporó la enmienda orgánica biofumigante (estiércol fresco de ovino) con una labor de fresadora.

Luego se extendieron los ramales de riego y se sellaron las parcelas con plástico de polietileno de 0.05 mm (200 galgas) de espesor. A continuación se regó el suelo hasta que los bulbos se solaparon, momento en el cual se alcanzó una humedad homogénea, (el número de horas de riego dependen del tipo de suelo, lo más usual es dar 6 horas de riego total repartidas, por igual, en dos días consecutivos con emisores de 3 L/h a 0.4m de distancia y 0.5 m de separación entre ramales), siguiendo el protocolo descrito por Guerrero *et al.* (2004b).

Plantación y fechas de cultivo

La plantación se llevó a cabo entre mediados de diciembre y principios de enero, extendiéndose el periodo de cultivo hasta la primera semana de agosto o hasta finales de septiembre en el caso del invernadero K. Las plantas se dispusieron en filas, con una separación de 0.4 m entre plantas y de 1 m entre filas (2.5 plantas /m²), que corresponde al marco de plantación utilizado tradicionalmente en la comarca. Durante el mes posterior al trasplante se realizaron semanalmente reposiciones de plantas muertas (marras), debido a causas diversas como depredación por herbívoros, rotura mecánica, enfermedades o desecación por mal funcionamiento del gotero.

Manejo de las plantas y de plagas y enfermedades

La conducta de las plantas y las técnicas culturales llevadas a cabo fueron las habituales de la zona, descritas anteriormente en el apartado de Introducción General (apartado 1.2.3.).

3.3.4. Medida de parámetros

Temperatura del suelo y del ambiente

En cada invernadero se midió la temperatura del aire y del suelo (a profundidad de 20 cm). Se realizó de forma continua durante todo el periodo de cultivo a intervalos de 1 hora mediante el uso de datalogger electrónicos.

Cosecha

Los frutos se recolectaron (con color verde o rojo) cuando alcanzaron el grado adecuado de consistencia en el caso de los verdes y el porcentaje de superficie mínimo

de coloración en el caso de los rojos. A veces se recolectó con coloración verde la primera cosecha en el caso de plantas sobrecargadas, con el objeto de favorecer el desarrollo de las plantas. A lo largo del cultivo se realizaron varias recolecciones. En cada una se cosecharon todas las plantas del invernadero, clasificando y pesando los frutos para cada genotipo porta-injertos y repetición (foto 35). Para los cálculos de producción no se tuvo en cuenta la procedente de los frutos clasificados como destrío, considerando sólo la producción comercial (frutos bien formados de 120 gr. de peso mínimo).



Foto 35. Recolecta de frutos.

Resistencia a nematodos

La evaluación de la resistencia de cada genotipo frente a *Meloidogyne incognita* se llevó a cabo al finalizar el cultivo. Se arrancaron entre 5 y 10 plantas de cada repetición (parcela) procurando extraer la mayor parte del sistema radical. Se eliminó la tierra de las raíces y se examinó visualmente la presencia de daños (nódulos) y reproducción (masas de huevos) (foto 36). El nivel de resistencia/susceptibilidad de cada genotipo se estimó mediante dos parámetros:

- Índice de Nodulación: el sistema radical de cada planta se valoró según el nivel de daños causados por *Meloidogyne*, en base a la escala descrita por Bridge y Page (1980) para daños por nematodos en tomate y adaptada para el pimiento, y que se muestra en la figura 3.2 (pág. 78). Esta escala asigna valores comprendidos entre 0, cuando la raíz no presenta ningún nódulo o agalla, hasta 10, cuando toda la raíz se encuentra agallada.

- Porcentaje de plantas afectadas: obtenida en cada repetición mediante la proporción de plantas que presentaron Índices de Nodulación >0



Foto 36. Evaluación en campo de los daños en raíces.

Incidencia de otros patógenos del suelo

En los invernaderos con suelos contaminados por *Phytophthora* spp. se contabilizaron las plantas de cada genotipo y repetición afectadas por este patógeno. Para ello, semanalmente, se inspeccionaron todas las plantas de cada parcela, se anotaron las que presentaron síntomas de tristeza y se llevaron al laboratorio para corroborar la infección del patógeno como causante de la enfermedad.

Incidencia de factores abióticos del suelo

Al examinar las plantas arrancadas para evaluar la incidencia de *M. incognita*, se anotó la presencia en las raíces y en el cuello de alteraciones como: asfixia radicular, hiperlenticelosis, hipertrofia del cuello y lesiones corchosas en las raíces.

3.4. Procesado y análisis de los datos

En cada capítulo se detalla el análisis específico realizado de los datos obtenidos. Generalmente los análisis se plantearon para conocer la influencia de cada factor estudiado (gen de resistencia, fondo genético, aislado o población de *Meloidogyne*,...) sobre los parámetros medidos (índice nodulación, masas de huevos/planta,...). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para uno o dos factores con interacción, dependiendo del ensayo. Previamente, el conjunto de los datos utilizados fue comprobado para las premisas de normalidad de distribución y homocedasticidad de

varianzas mediante las pruebas Shapiro-Wilk y Barlett, respectivamente, realizando una transformación de escala de los datos cuando fue necesario.

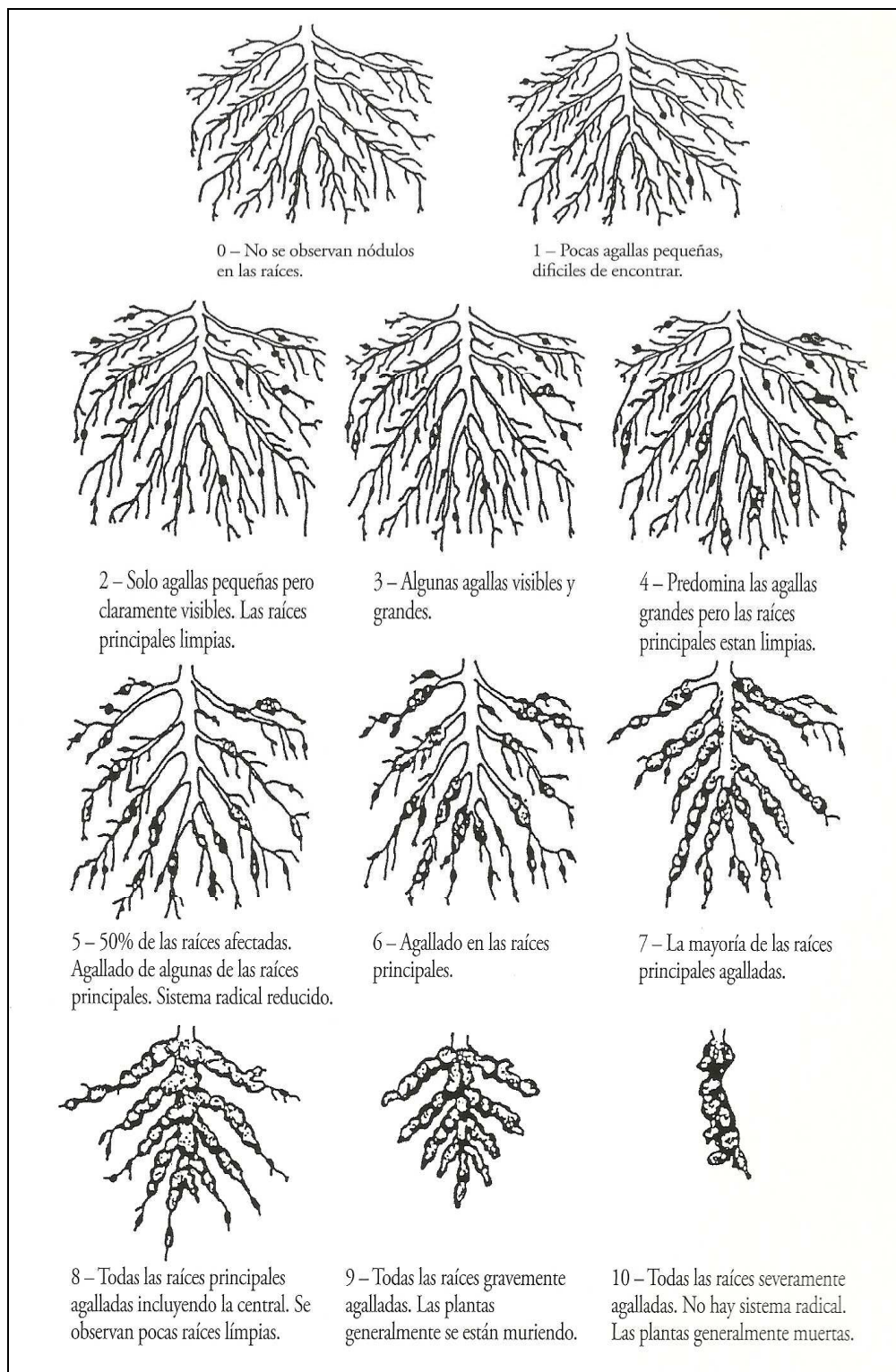


FIGURA 3.2. Diagrama del índice de agallas provocados por *M. incognita*.

Fuente: Bridge y Page (1980).

4. CAPÍTULO I

Evaluación de genotipos de pimiento para su uso en la mejora genética de porta-injertos resistentes a *Meloidogyne incognita*

Publicado en: *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* (2015).

Doi: 10.1017/S1479262115000027 (ver Anexo 2)



4.1. Resumen

Los nematodos pertenecientes al género *Meloidogyne* provocan nodulaciones radiculares y están considerados, a escala mundial, como uno de los principales patógenos de los cultivos de solanáceas, incluido el pimiento (*Capsicum spp.*). La restricción en el uso de los nematicidas habituales ha motivado el desarrollo y empleo de variedades y porta-injertos resistentes. En el pimiento se conocen tres genes, denominados *Me1*, *Me3* y *N* que confieren resistencia frente a las tres especies más frecuentes del género *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*). Su eficacia parece limitada, ya que se han encontrado poblaciones del nematodo que han superado la resistencia, haciendo necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia y el empleo de estrategias de su uso para preservar su eficacia. En este trabajo se evalúa, en dos invernaderos y durante un ciclo de cultivo de 7 meses, la resistencia frente a *M. incognita* y el comportamiento agronómico como porta-injertos de 9 genotipos de pimiento: ‘HDA330’, portador de *Me1*, ‘Serrano Criollo de Morelos’, portador de *Me3*, ‘Yolo Wonder’, resistente parcial, y otros 6 de resistencia desconocida pero procedentes de variedades locales bien adaptados a las condiciones de cultivo. Los resultados mostraron que el gen *Me1* confirió una resistencia más robusta que el gen *Me3*. Se ha encontrado resistencia a *M. incognita* en 4 nuevos genotipos: ‘P13’, ‘CTL’, ‘CT5’ y ‘P14’. En ‘P13’ el nivel de resistencia es similar al de ‘HDA330’. Además, los genotipos resistentes mostraron mejor comportamiento agronómico que los susceptibles, manifestándose sobre todo en el periodo final del cultivo. Algunos de los genotipos aquí evaluados constituyen un potencial recurso para su empleo en la mejora genética de porta-injertos resistentes a nematodos.

4.2. Introducción

Los nematodos pertenecientes al género *Meloidogyne* provocan nodulaciones radiculares y están considerados, a escala mundial, como uno de los principales patógenos que afectan a los cultivos de solanáceas (Khan y Haider, 1991). En los cultivos protegidos de pimiento del sureste de España (principal área de producción de pimiento de Europa) *Meloidogyne incognita* es la especie predominante dentro de su género (Robertson *et al.*, 2006; Talavera *et al.*, 2012; Guerrero *et al.*, 2013) y se estima en un 30% las pérdidas de producción que ocasiona en los cultivos (Talavera *et al.*,

2012). Durante años su control ha sido mediante desinfectantes químicos del suelo. Sin embargo en los últimos años debido a causas medioambientales se ha restringido drásticamente su uso motivando la búsqueda de otras alternativas.

El empleo de resistencias genéticas es una de las mejores formas de control de las enfermedades en general y de los nematodos en particular, por su inocuidad y su sostenibilidad económica (Colla *et al.*, 2012; Djian-Caporalino *et al.*, 2011), lo que ha impulsado, en los últimos tiempos, el desarrollo de programas de mejora genética de variedades. Sin embargo, para el caso de los tipos varietales de pimiento cultivados mayoritariamente en los invernaderos del sureste de España apenas hay disponibles variedades élite que incorporen resistencias a nematodos, por lo que se ha recurrido al uso de porta-injertos resistentes, que resultan eficaces para el control de otro importante patógeno del suelo, *Phytophthora* spp. (Ros *et al.*, 2005 y 2014; Sánchez *et al.*, 2013). Igualmente se han mostrado las ventajas del injerto en pimiento para la tolerancia a estreses abióticos (Schwarz *et al.*, 2010), constatándose que variedades comerciales de pimiento injertadas sobre determinados porta-injertos tienen un mejor comportamiento en comparación a las mismas variedades no injertadas en condiciones de altas temperaturas (López-Marín *et al.*, 2013) y salinidad (Penella *et al.*, 2013).

En el pimiento, la resistencia a nematodos del género *Meloidogyne* está conferida por los genes *Me* y *N*, aunque sólo *Me1*, *Me3* y *N* son eficaces frente a *M. incognita* (Hare 1956; Hendy *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Thies *et al.*, 2003; Fazari *et al.*, 2012). Éstos genes de resistencia (genes-R) fueron identificados en líneas de pimiento distantes geográfica y genéticamente y se encuentran co-localizados en un cluster del cromosoma 9 del pimiento (Fazari *et al.*, 2012). Sin embargo, en el caso de los genes *Me3* y *N* se ha visto comprometida su eficacia por la aparición de poblaciones del nematodo virulentas a estos genes (Castagnone-Sereno *et al.*, 1996; Thies, 2011). Asimismo, en condiciones de cultivo en invernadero se ha documentado la aparición de poblaciones virulentas al reiterar el cultivo de porta-injertos resistentes durante varios años seguidos (Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). Estos antecedentes hacen necesaria la búsqueda y utilización de germoplasma que sean nuevas fuentes de resistencia. De hecho se ha puesto de manifiesto la importancia del fondo genético en la estabilidad de la resistencia conferida por los genes *Me*, demostrando que determinados fondos genéticos donde se integran los genes-R pueden evitar la rotura de las resistencias (Barbary *et al.*, 2014).

Igualmente, otras estrategias de utilización de los genes de resistencia, como la piramidalización de *Me1* y *Me3* en un mismo genotipo o la alternancia temporal de éstos en cultivos sucesivos se han mostrado eficaces para evitar la rotura de las resistencias (Djian-Caporalino *et al.*, 2014).

El objetivo de este trabajo es evaluar, en condiciones de cultivo en invernadero, la resistencia frente a *M. incognita* y el comportamiento agronómico como porta-injertos de 9 genotipos de pimiento, los cuales se emplearán en posteriores trabajos de mejora genética de porta-injertos y de estudio de la influencia del fondo genético en la expresión de la resistencia a *M. incognita*.

4.3. Materiales y Métodos

Material vegetal

Los 9 genotipos objeto de estudio (Tabla 4.1) fueron elegidos atendiendo a diferentes características: ‘HDA330’ y ‘SCM’ por ser portadores de un gen-R; ‘YW’ por su resistencia parcial a nematodos y ser un genotipo ampliamente referenciado en diversos trabajos; los genotipos ‘AMC’, ‘BRB’ y ‘CTL’ por ser variedades tradicionalmente cultivadas en la zona de estudio y por tanto bien adaptadas a las condiciones de cultivo; y ‘CT-5’, ‘P13’ y ‘P14’ por su vigor y buen comportamiento agronómico, evaluados en trabajos realizados previamente. Todos los genotipos se cultivaron como porta-injertos, injertando sobre estos la variedad ‘Coyote’ que es del tipo varietal predominante en los cultivos de invernadero del SE de España (tipo California). El injerto se realizó por decapitación (tipo japonés). Se utilizó el porta-injertos comercial ‘Atlante’ como referente resistente y ‘Coyote’ no injertado como control susceptible.

TABLA 4.1. Origen y características de los genotipos de pimiento (*Capsicum annuum*) empleados en el estudio.

Entrada	Origen	Resistencia frente a <i>Meloidogyne incognita</i>
HDA330	Línea doble haploide desarrollada en el INRA de Aviñón (Dumas de Vaulx <i>et al.</i> , 1981) y proporcionada por el Dr. Alain Palloix	Resistente. Línea portadora del gen <i>Me1</i> (Hendy <i>et al.</i> , 1985)
SCM ¹	Línea pura procedente de la variedad mexicana Serrano Criollo de Morelos	Resistente. Línea portadora del gen <i>Me3</i> (Fazari <i>et al.</i> , 2012)
YW	Yolo Wonder. Línea pura obtenida en la Universidad de California (EE.UU.)	Resistente parcial (Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 1999 y 2001; Barbary <i>et al.</i> , 2014)
AMC ¹	Línea pura procedente de Americano (variedad tradicional de Murcia)	Desconocida
BRB ¹	Línea pura procedente de Belrubí (variedad tradicional de Murcia)	Desconocida
CTL ¹	Línea pura procedente de Costal (variedad tradicional de Murcia)	Desconocida
CT5 ¹	Línea de mejora de porta-injertos resistentes a <i>Phytophthora</i> spp. Desarrollada por el IMIDA	Desconocida
P13 ¹	Línea pura de la colección de pimientos del IMIDA	Desconocida
P14 ¹	Línea pura de la colección de pimientos del IMIDA	Desconocida
Atlante	Porta-injertos comercial, híbrido F1, obtenido por Semillas Ramiro Arnedo (España)	Resistente. Portador del gen <i>Me3</i> (Ros <i>et al.</i> , 2014)
Coyote	Variedad comercial, híbrido F1, de tipo California obtenida por Syngenta Seeds (EE.UU.)	Susceptible

¹ Entradas procedentes del banco de germoplasma del IMIDA

Invernaderos experimentales

La evaluación se llevó a cabo en los invernaderos H (Inv-H) y E (Inv-E), situados en el Campo de Cartagena (Murcia) dentro de la finca experimental ‘Torreblanca’ perteneciente al IMIDA (lat. 37°45’ N, long. 0°59’ O). En ambos invernaderos el suelo es franco-arcilloso y se encuentra naturalmente infestado por *M. incognita* Raza 2 (Robertson *et al.*, 2006). La población de *M. incognita* de Inv-H se considera avirulenta a los genes-R, mientras que la población de *M. incognita* de Inv-E es virulenta al gen *Me3*, ya que en este invernadero durante los tres años precedentes al ensayo se

cultivaron porta-injertos resistentes, encontrándose elevados daños de infestación en aquellos portadores del gen *Me3*.

Diseño experimental y evaluación

Todos los genotipos se cultivaron en ambos invernaderos, excepto P14 que sólo se cultivó en Inv-H. Se estableció un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por genotipo en cada invernadero. Cada parcela elemental consistió de una fila de 26 plantas en Inv-H y 20 plantas in Inv-E. El espacio entre plantas fue de 0.40 metros dentro de la misma fila y de 1 metro entre filas (2.5 plantas/m²). El cultivo se desarrolló desde principios de enero hasta la segunda semana de agosto siguiendo las prácticas de cultivo integrado, similares a las empleadas en invernaderos comerciales.

Al finalizar el cultivo se evaluó la resistencia a *Meloidogyne incognita*. Para ello se arrancaron diez plantas de cada fila, escogidas al azar, y se llevaron al laboratorio, donde se procedió al lavado y examen de las raíces. Se calculó el porcentaje de plantas infectadas y se evaluaron los daños a las raíces por el nematodo siguiendo la escala de 0 a 10 del índice de nodulación (IN) desarrollada por Bridge y Page (1980). Además en el Inv-H se midió la producción comercial de cada genotipo, obteniendo la Producción Comercial total (PCt), a partir de la suma de los valores de las sucesivas recolecciones, y las Producciones Comerciales parciales correspondientes, diferenciando tres periodos de cosecha: inicial (Periodo 1), central (Periodo 2) y final (Periodo 3).

Análisis estadísticos

Utilizando el programa estadístico StatGraphics se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para los datos de IN, porcentaje de plantas afectadas, y la interacción de los factores Genotipo X Invernadero, utilizando el test LSD al 95% de confianza para la diferenciación entre medias de genotipos. Previamente los datos fueron transformados mediante Log 10 (X+1) para el IN y Arcoseno \sqrt{x} para el porcentaje de plantas afectadas. Los datos de la producción comercial total y la correspondiente a cada periodo parcial de cosecha también se analizaron mediante un ANOVA y posterior test LSD para la diferenciación de medias correspondientes a cada genotipo, transformando los datos previamente mediante Log 10 (X+1). Además se realizó un análisis de correlación entre los factores IN y Producción Comercial Total a partir de los datos

medios de todos los genotipos, excluyendo del análisis al porta-injerto ‘Atlante’ y a la variedad ‘Coyote’, no injertado, cuyo carácter híbrido podría interferir en la interpretación del resultado.

4.4. Resultados

Resistencia a *Meloidogyne*

En ambos invernaderos se encontraron diferencias entre genotipos (tabla 2) y también para la interacción Genotipo X Invernadero ($P < 10^{-3}$), tanto en el IN como en el porcentaje de plantas infestadas.

En el Inv-H, en seis de los genotipos evaluados apenas se encontraron daños por *M. incognita* (valores de IN inferiores a 1, similares a los de ‘Atlante’ portador de *Me3*). ‘YW’, ‘AMC’ y ‘BRB’ se infestaron con valores de IN similares o mayores que ‘Coyote’ no injertado. En el Inv-E, sólo ‘HDA330’ y ‘P13’ mostraron valores de IN inferiores a 1. ‘AMC’, ‘BRB’, ‘Coyote’ no injertado y ‘Atlante’ mostraron los valores de IN más elevados (entre 4.9 y 5.6). Los genotipos ‘CT5’, ‘CTL’ y ‘SCM’ mostraron valores intermedios (entre 2.3 y 3.2) diferentes del resto de genotipos excepto de ‘YW’, aunque éste tampoco fue diferente de ‘Coyote’ no injertado.

En un tercio de los genotipos evaluados en el Inv-H se encontraron valores superiores al 96% de plantas afectadas, similares a Coyote no injertado. Otro tercio (‘SCM’, ‘CTL’ y ‘P14’) presentó valores entre el 20 y el 30%, similar a ‘Atlante’. En los tres restantes se encontraron agallas en menos del 20% de las plantas. En el Inv-E, seis de los ocho genotipos mostraron valores por encima del 82% de plantas afectadas por *M. incognita*, siendo del 100% en 4 de ellos (al igual que en ‘Atlante’ y ‘Coyote’ no injertado). Sólo ‘HDA330’ (21%) y ‘P13’ (0%), mostraron diferencias para este parámetro.

TABLA 4.2. Índice de nodulación y porcentaje de plantas infectadas (media \pm error estándar) por *Meloidogyne incognita* para cada invernadero y genotipo.

Variedad/porta-injertos	Índice de nodulación ¹		Porcentaje de plantas infectadas	
	Inv-H	Inv-E	Inv-H	Inv-E
Coyote no injertado	4.4 \pm 0.78 b	5.6 \pm 0.31 a	97 \pm 0.03 a	100 \pm 0 a
Coyote/Atlante	0.37 \pm 0.27 c	4.9 \pm 0.35 a	27 \pm 0.17 bc	100 \pm 0 a
Coyote/YW	7.5 \pm 0.06 a	3.93 \pm 0.47 ab	100 \pm 0 a	100 \pm 0 a
Coyote/HDA330	0 \pm 0 c	0.26 \pm 0.17 c	0 \pm 0 d	21 \pm 0.12 b
Coyote/SCM	0.2 \pm 0.06 c	2.35 \pm 0.68 b	20 \pm 0.06 bc	83 \pm 0.17 a
Coyote/AMC	6.13 \pm 0.19 ab	5.1 \pm 0.47 a	97 \pm 0.03 a	100 \pm 0 a
Coyote/BRB	4.9 \pm 0.35 b	5.53 \pm 0.47 a	100 \pm 0 a	100 \pm 0 a
Coyote/CTL	0.3 \pm 0.06 c	2.67 \pm 0.24 b	30 \pm 0.06 b	100 \pm 0 a
Coyote/CT5	0.2 \pm 0.12 c	3.2 \pm 1.53 b	17 \pm 0.09 bc	87 \pm 0.13 a
Coyote/P13	0.3 \pm 0.3 c	0 \pm 0 c	10 \pm 0.1 cd	0 \pm 0 c
Coyote/P14	0.2 \pm 0.06 c	No evaluado	20 \pm 0.06 bc	No evaluado

Inv-H, invernadero H; Inv-E, invernadero E.

Valores seguidos de distinta letra fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$; ANOVA y test LSD).

¹ Escala de índice de nodulación (0-10) acorde a Bridge y Page (1980).

Producción comercial

Se hicieron siete recolecciones entre el 19 de abril y el 10 de agosto, que finalizó el cultivo. Las dos primeras cosechas se asignaron al Periodo 1 (inicial), las 3 siguientes al Periodo 2 (central), y las dos últimas comprendieron el Periodo 3 (final). Se encontraron diferencias significativas entre genotipos, tanto en la producción total como en la producción de los periodos 2 y 3 (figura 1).

Los datos de la producción total muestran a ‘P13’ (12.87 kg/m²) como el genotipo con el valor más elevado de entre los nueve evaluados, aunque sin diferencias respecto a los valores de ‘HDA330’, ‘SCM’, ‘CTL’, ‘CT5’ y ‘P14’, ni tampoco respecto a ‘Atlante’ y ‘Coyote’ no injertado. ‘YW’ fue el menos productivo, con un valor de producción total inferior en más del 40% respecto de ‘P13’, seguido por ‘AMC’ y ‘BRB’, con producciones inferiores en más del 25% respecto de ‘P13’.

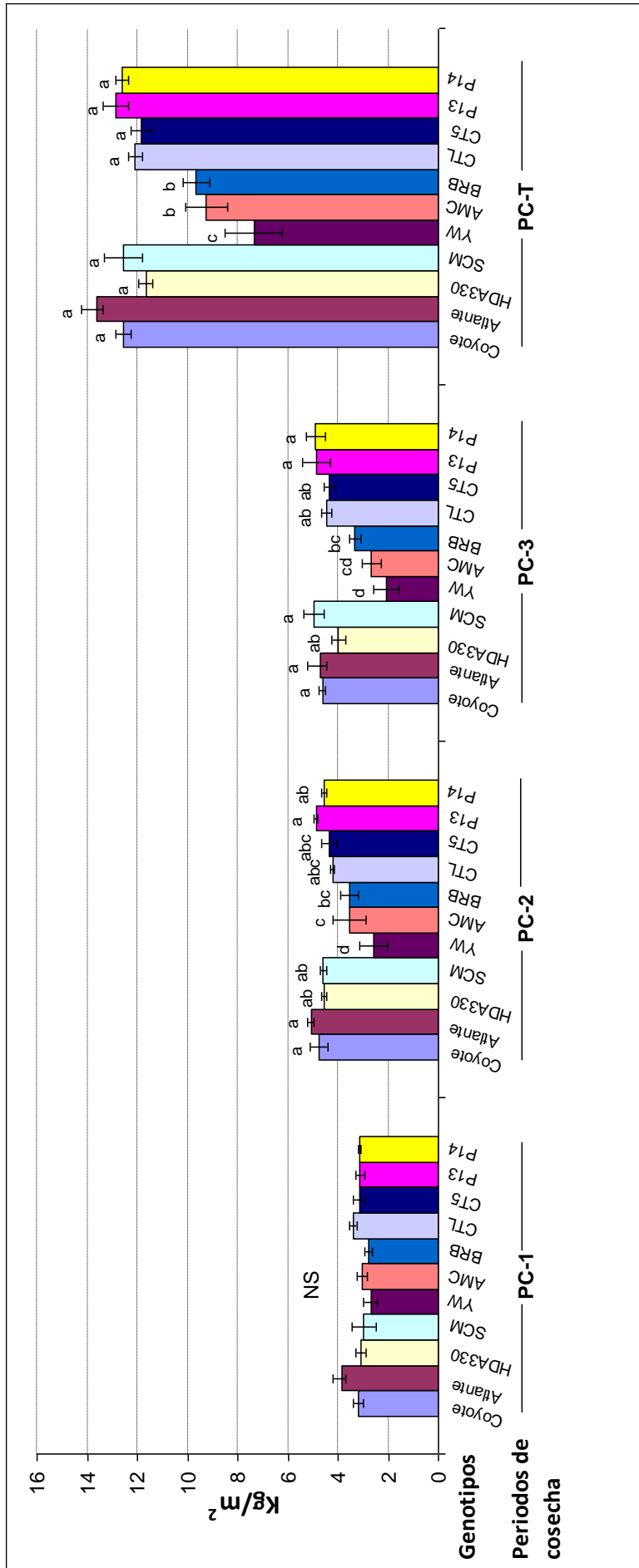


FIGURA 4.1. Producción comercial en kg/m², de cada genotipo obtenida en el Inv-H. PC-1, PC-2 and PC-3 corresponden a la producción obtenida durante los periodos de cosecha 1 (inicial), 2 (central) y 3 (final), respectivamente. PC-T corresponde a la producción comercial total. Letras diferentes dentro de cada periodo de cosecha indican diferencias ($P < 0.05$; ANOVA y test LSD). NS indica diferencias no significativas.

En el periodo 1 las producciones oscilaron entre los 3.40 kg/m² de ‘CTL’ y los 2.69 kg/m² de ‘YW’, sin diferencias estadísticas. En el Periodo 2 el mayor valor de producción corresponde a ‘P13’ (4.88 kg/m²), pero sin diferencias con otros de los 5 genotipos evaluados ni tampoco respecto a ‘Coyote’ no injertado y ‘Atlante’. Los menos productivos fueron ‘YW’, para el que se obtuvo un 47% menos de producción que para ‘P13’, y ‘AMC’ y ‘BRB’, que fueron un 23% menos productivos que ‘P13’. En el último periodo de cosecha los tres genotipos más productivos fueron ‘SCM’, ‘P13’ y ‘P14’, no diferentes de ‘Coyote’ no injertado y ‘Atlante’. Los menos productivos fueron ‘YW’, que produjo menos de la mitad que los anteriores, seguido de ‘AMC’ y ‘BRB’ con producciones inferiores a ‘SCM’ en un 46% y 37% respectivamente. Los valores de ‘HDA330’, ‘CTL’ y ‘CT5’ no fueron diferentes de los más productivos ni de ‘BRB’.

Correlación entre el IN y la producción comercial

Se encontró una fuerte correlación inversa (valor de -0.9656; $P < 10^{-4}$) para los factores índice de nodulación y producción comercial.

4.5. Discusión

Los genotipos mostraron diferente grado de resistencia/susceptibilidad a *Meloidogyne incognita*, y algunos se comportaron de manera distinta en cada invernadero. Los resultados de IN y porcentaje de plantas afectadas coincidieron en la valoración de cada genotipo, aunque se encontraron algunas discrepancias para algunos materiales en Inv-E, para los cuales IN resultó más discriminatorio.

‘HDA330’, portador de *Me1*, se comportó como resistente en los dos invernaderos. ‘SCM’ y ‘Atlante’, portadores de *Me3*, se comportaron como resistentes en Inv-H, pero se infestaron en Inv-E, debido al carácter virulento de la población del nematodo en ese invernadero. En las condiciones de los ensayos, la resistencia conferida por el gen *Me1* fue más robusta que la conferida por *Me3*, lo cual coincide con otros trabajos en los que se describen casos de virulencia para el gen *Me3*, pero no se ha encontrado para el gen *Me1* (Castagnone *et al.*, 1996; Djian-Caporalino *et al.*, 2011). También es notable la diferencia entre ‘SCM’ y ‘Atlante’ en el Inv-E, pese a portar el mismo gen-R,

comportándose ‘SCM’ como parcialmente resistente y ‘Atlante’ como susceptible (se infestó al mismo nivel que ‘Coyote’ no injertado). Este hecho puede ser debido al fondo genético, cuya influencia sobre los genes de resistencia ha sido probada en recientes estudios (Barbary *et al.*, 2014).

Otros cuatro genotipos mostraron resistencia frente a *M. incognita*, aunque se desconoce su fuente genética. Así ‘P13’ fue tan resistente como ‘HDA330’, en ambos invernaderos. Por otro lado, tanto ‘CTL’ y ‘CT5’ se comportaron del mismo modo que ‘SCM’, resistentes en Inv-H y parcialmente resistentes en Inv-E. ‘P14’ fue resistente en ‘Inv-H’ aunque no se evaluó en ‘Inv-E’. La resistencia de estos 4 genotipos puede ser debida a genes ya conocidos (*Me* o *N*) o estar conferida por nuevas fuentes genéticas, lo cual sería necesario comprobar a partir de los pertinentes análisis genéticos.

‘AMC’, ‘BRB’ y ‘YW’, al igual que ‘Coyote’ no injertado (control susceptible), fueron susceptibles a *M. incognita* en ambos invernaderos. Sin embargo, en otros trabajos ‘YW’ se considera parcialmente resistente a *M. incognita* (Djian-Caporalino *et al.*, 2007b; Barbary *et al.*, 2014). Esta discrepancia en la caracterización de ‘YW’, probablemente sea debida a las diferentes condiciones en que se realizaron las evaluaciones, ya que en los citados trabajos utilizan poblaciones de *M. incognita* obtenidas a partir de una sola masa de huevos (con poca variabilidad genética), mientras que en nuestro caso ‘YW’ fue evaluado en invernaderos con poblaciones naturales (heterogéneas) de *M. incognita*, donde es posible una selección hacia aquellos individuos con mayor agresividad hacia ‘YW’. Djian-Caporalino *et al.* (2011) observan que la reproducción potencial de determinados aislados y poblaciones naturales de *M. incognita* obtenida en ‘YW’ es similar a la obtenida en pimiento susceptible.

El comportamiento agronómico como porta-injertos, medido a través de su rendimiento productivo, mostró diferencias entre genotipos. Las mayores producciones comerciales se obtuvieron con ‘HDA330’, ‘SCM’, ‘CTL’, ‘CT5’, ‘P13’ y ‘P14’, que fueron similares a las del porta-injertos comercial ‘Atlante’, utilizado como referencia. Las menores producciones se obtuvieron con ‘YW’, ‘AMC’ y ‘BRB’. Sin embargo, tal y como muestran los resultados en cada periodo de cosecha, estas diferencias entre genotipos no fueron apreciables al inicio del cultivo (sin diferencias en el periodo 1), sino que fueron apareciendo y haciéndose más patentes conforme fue avanzando el cultivo.

Es destacable la coincidencia observada entre resistencia y producción, encontrando que los seis genotipos resistentes ('HDA330', 'SCM', 'CTL', 'CT5', 'P13' y 'P14') fueron igualmente los más productivos mientras que los tres que se comportaron como susceptibles ('YW', 'AMC' y 'BRB') fueron los menos productivos. De hecho, el valor obtenido del análisis de correlación entre ambos factores (-0.9656) indica precisamente esto, que a mayores daños en las raíces causados por *M. incognita* la producción de ese genotipo como porta-injerto fue menor. Sin embargo, no podemos asegurar la relación inversa entre IN y producción, ya que no conocemos las potencialidades intrínsecas como porta-injertos de cada genotipo, aunque atendiendo a la aleatoriedad en la elección de los mismos para este carácter sí que consideramos muy probable esta hipótesis. Además el hecho de que los descensos de la producción en los genotipos susceptibles aparecieran en fases avanzadas del cultivo podría ser explicado porque en ese momento las densidades del nematodo alcanzaron el valor suficiente para influir en la cosecha, tal y como se ha constatado para pimiento (Di Vito *et al.*, 1985) y en tomate (Ehwaeti *et al.*, 1998; Kamran *et al.*, 2013).

En cambio, 'Coyote' no injertado, que fue susceptible al patógeno, tuvo un rendimiento productivo muy superior al encontrado en las plantas injertadas sobre los genotipos susceptibles ('YW', 'AMC' y 'BRB'), lo que contrasta con la relación observada entre daño en la raíz y producción. Posiblemente, estas diferencias estén influenciadas con aspectos relacionados con el injerto. De hecho, en otros trabajos se ha visto que no siempre el uso de porta-injertos en pimiento supone una mejora de la producción. En ensayos llevados a cabo en suelos sin nematodos, no se encontraron diferencias en la producción entre plantas injertadas y no injertadas (Jang *et al.*, 2013) o sólo se encontraron en determinados porta-injertos, que resultaron más productivos (López-Marín *et al.*, 2013). Asimismo Leal-Fernández *et al.* (2013) obtuvieron una producción menor de la variedad Triple Star injertada en 'SCM334' que no injertado. Sin embargo en nuestro estudio no encontramos diferencias entre 'Coyote' injertado sobre 'SCM' y 'Coyote' no injertado. En definitiva, la disparidad de resultados mostrada en distintos trabajos indica que diversos factores están implicados en el rendimiento productivo de las plantas injertadas, como puede ser la interacción patrón-variedad, presencia de otros patógenos, determinadas condiciones ambientales, entre otras.

4.6. Conclusiones

En este capítulo se ha mostrado que en condiciones de cultivo en invernadero y utilizando el material vegetal como porta-injertos, el gen *Me1*, portado por 'HDA330', confiere una resistencia más robusta frente a *M. incognita*, que el gen *Me3*, portado por SCM y Atlante.

Se han hallado cuatro nuevos genotipos con resistencia a *M. incognita*, 'P13', 'CTL', 'CT5' y 'P14', presentando el primero de ellos un nivel de resistencia similar al de 'HDA330'. Estos genotipos constituyen un interesante material para su empleo en la mejora genética de variedades y porta-injertos de pimiento. Los análisis genéticos pertinentes para determinar la naturaleza de estas resistencias son de gran interés debido a la posible presencia de nuevas resistencias genéticas o fondos genéticos favorables para la expresión de las mismas.

Se ha encontrado una estrecha relación entre resistencia a *M. incognita* y producción, mostrando mejor comportamiento agronómico como porta-injertos aquellos genotipos más resistentes, lo que coincide con los efectos negativos atribuidos al nematodo sobre los rendimientos productivos del cultivo.

5. CAPÍTULO II

Caracterización de la resistencia a *Meloidogyne* spp. conferida por el fondo genético del pimiento y su efecto cuando se combina con los genes mayores de resistencia

Publicado en: *Plant Pathology* (2015). Doi: 10.1111/ppa.12459 (ver anexo 3).



5.1. Resumen

Meloidogyne spp. figuran a escala mundial entre los principales patógenos que afectan a los cultivos de solanáceas, incluyendo el pimiento (*Capsicum annuum*). El control de estos nematodos mediante resistencias constituye una alternativa económica y ambientalmente sostenible respecto al control tradicional, mediante desinfección química del suelo. En pimiento, la resistencia a las principales especies del género *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*) está conferida por los genes mayores (genes-R) *Me1*, *Me3* y *N*. Sin embargo, las poblaciones de *Meloidogyne* spp. son capaces de desarrollar virulencias haciendo peligrar la eficiencia de los genes-R. La resistencia de naturaleza cuantitativa en pimiento frente a *Meloidogyne* spp. se prevé, bien como una alternativa a los genes-R, o bien para ser combinada con éstos para incrementar su eficiencia y durabilidad. Con el fin de explorar la aptitud de la resistencia cuantitativa en el control de *Meloidogyne* spp., se evaluaron cinco líneas puras de pimiento de diferente nivel de resistencia cuantitativa conferida por su fondo genético frente a varios aislados de *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. incognita*. También se evaluó la resistencia cuando estas líneas se combinaron, en híbridos F1, con los genes *Me1* y *Me3*. Los aislados de *M. arenaria* y *M. javanica* mostraron ser poco patógenos a pimiento, al contrario que los aislados de *M. incognita*. La resistencia cuantitativa controlada por el fondo genético de algunas variedades de pimiento proporcionó elevado nivel y amplio espectro de resistencia, efectiva frente a aislados avirulentos y virulentos al gen *Me3*. La resistencia cuantitativa también se expresó cuando se combinó con *Me1* y *Me3*, aunque presentó efectos genéticos aditivos, de forma que los híbridos F1 mostraron menos resistencia que las líneas puras. El descubrimiento de esta resistencia cuantitativa apunta a ser de gran utilidad para preservar la eficiencia y durabilidad de la resistencia a los nematodos.

5.2. Introducción

Los nematodos noduladores del género *Meloidogyne*, denominados como RKNs por sus siglas en inglés (root-knot nematodes) son considerados a escala mundial los más importantes nematodos fitoparásitos que afectan a los cultivos (Castillo, 2010; Onkendi *et al.*, 2014; Rudolph *et al.*, 2015), y constituyen uno de los principales problemas patológicos en solanáceas (Netcher y Sikora, 1990; Khan y Haider, 1991),

incluyendo el pimiento (Di Vito, 1985; Robertson, 2006). Debido a las limitaciones en el uso de desinfectantes químicos del suelo impuestas en los últimos años (Collange *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2012), el interés por el uso de resistencias genéticas para el control de RKNs ha experimentado un fuerte incremento ya que supone un método sostenible económica y medioambientalmente (Djian-Caporalino *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2012). Sin embargo, la elevada plasticidad genómica y diversidad genética que presenta *Meloidogyne* spp. (Castagnone-Sereno, 2002; Castagnone-Sereno *et al.*, 2013) le confieren un gran potencial de adaptación a los hospedadores y facilidad para desarrollar poblaciones virulentas, superando las resistencias vegetales, como así ha ocurrido en tomate (Verdejo-Lucas *et al.*, 2009) y pimiento (Thies, 2011; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). No obstante se ha encontrado un coste en la reproducción del nematodo asociado a la virulencia (Castagnone-Sereno *et al.*, 2007; Djian-Caporalino *et al.*, 2011) que junto a la utilización de nuevas fuentes de resistencia, puede ser integrado en estrategias (de mejora genética y manejo agronómico de la resistencia) encaminadas al control efectivo y sostenible de estos nematodos.

En pimiento se han identificado y caracterizado varios genes-R frente a RKNs. De todos ellos los denominados como *Me1*, *Me3* y *N* son los más importantes y estudiados, ya que presentan un amplio espectro de acción, con efectiva resistencia frente a *M. incognita*, que es considerada la principal especie que afecta a pimiento, y también frente a *M. arenaria* y *M. javanica* (Hendy *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Thies y Fery, 2000; Castagnone-Sereno *et al.*, 2001). Los genes *Me1*, *Me3* y *N* fueron identificados en entradas distantes geográfica y genéticamente y han sido mapeados en un clúster de genes-R del cromosoma P9 (Djian-Caporalino *et al.*, 2007b; Fazari *et al.*, 2012). Respecto a las resistencias cuantitativas a RKNs aún son muy poco conocidas en pimiento, aunque se han identificado resistencias parciales en algunas líneas (Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Sánchez-Solana *et al.*, 2015a) y se ha demostrado su efecto positivo en la preservación de la eficacia de los genes-R (Barbary *et al.*, 2014). Sin embargo, se conoce poco acerca del efecto directo de la resistencia cuantitativa sobre los RKNs, y acerca de la durabilidad y base genética de tal resistencia.

En este estudio se explora la capacidad de la resistencia cuantitativa para controlar diversos aislados de RKNs, y su potencial uso para diversificar y complementar las fuentes de resistencia actualmente explotadas en pimiento. Los experimentos se

plantearon con los objetivos de: i) estimar la capacidad de la resistencia cuantitativa para reducir la reproducción de aislados de *Meloidogyne* con y sin virulencia a genes *Me*; ii) explorar la influencia del fondo genético del pimiento controlando la resistencia cuantitativa cuando se combina con genes mayores de resistencia a *Meloidogyne*, y su modo de herencia.

5.3. Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron ocho entradas de *Capsicum annuum* procedentes del banco de germoplasma del IMIDA. En la tabla 5.1 se muestran sus características y resistencia a *Meloidogyne* spp. Además, con el fin de conocer la influencia del fondo genético sobre la resistencia a nematodos se construyeron quince híbridos F1 (tabla 5.3) a partir del cruzamiento de las tres líneas portadoras de *Me1* ('HDA330') o *Me3* ('HDA149' y 'SCM') con cada una de las otras cinco líneas ('Amc', 'Brb', 'Ctl', 'Dlr' y 'YW'), seleccionadas por su diferente fondo genético y diferente nivel de resistencia/susceptibilidad a RKNs. Como control se empleó la variedad susceptible 'DLL' ('Doux Long des Landes').

Aislados de nematodos

Se utilizaron cinco aislados (obtenidos de una sola masa de huevos) procedentes de la colección de nematodos mantenida en el IMIDA (tabla 5.2). Tres de estos aislados fueron avirulentos a los genes *Me* de pimiento: *M. arenaria* (M-are) procedente de un cultivo de tabaco en Losar de la Vera (Cáceres), *M. javanica* (M-jav) procedente de un cultivo de clavel en Chipiona (Cádiz), y *M. incognita* (Mi-avir) obtenido de raíces de pimiento susceptible naturalmente infectadas. Los otros dos aislados, de *M. incognita*, fueron virulentos a *Me3* (Mi-virCH y Mi-virB) obtenidos de raíces naturalmente infectadas de pimiento resistentes (*Me3*). Los tres aislados de *M. incognita* proceden de distintos invernaderos del Campo de Cartagena (Murcia). Todos los aislados fueron identificados en el laboratorio de referencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid) donde se determinó que el aislado de *M. arenaria* pertenece a la "raza 3", el aislado de *M. javanica* pertenece a la "raza 1" y los aislados de *M. incognita* pertenecen a la "raza 2", según el test de hospedantes diferenciales (Robertson

et al., 2006 y 2009; López-Pérez *et al.*, 2011). Los aislados M-are, M-jav y Mi-avir fueron mantenidos y multiplicados en plantas de tomate susceptible de la variedad ‘Marmande Claudia’ (Clausse Tezier S.A.) y los aislados Mi-virCH y Mi-virB en plantas de pimiento ‘Atlante’ (Semillas Ramiro Arnedo S.L.) portadoras de *Me3*. La obtención de juveniles de segundo estadio (J2), fase infectiva del nematodo, se llevó a cabo en una cámara de cultivo ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) a partir de raíces con masas de huevos (infectadas 8 semanas antes), recogiendo y guardando los J2 durante los tres días previos a la inoculación de las plantas.

TABLA 5.1. Características de las líneas puras de pimiento utilizadas como parentales de los genotipos híbridos F1.

Entrada ¹	Origen	Conocimiento sobre su resistencia o susceptibilidad a <i>Meloidogyne</i> spp.
HDA330	Línea doble haploide obtenida en el INRA de Aviñón (Francia)	Resistente a <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. javanica</i> (gen <i>Me1</i> , Hendy <i>et al.</i> , 1985)
HDA149	Línea doble haploide obtenida en el INRA de Aviñón (Francia)	Resistente a <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. javanica</i> (gen <i>Me3</i> , Hendy <i>et al.</i> , 1985)
SCM	Línea pura procedente de la variedad Criollo de Morelos 334 (México)	Resistente a <i>M. Incognita</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. javanica</i> (gen <i>Me3</i> , Fazari <i>et al.</i> , 2012)
Amc	Línea pura procedente de la variedad local Americano (Murcia).	Susceptible a <i>M. incognita</i> (Sánchez-Solana <i>et al.</i> , 2015a)
Brb	Línea pura procedente de la variedad local Belrubí (Murcia)	Susceptible a <i>M. incognita</i> (Sánchez-Solana <i>et al.</i> , 2015a)
Ctl	Línea pura procedente de la variedad local Costal (Murcia)	Resistencia cuantitativa a <i>M. Incognita</i> (Sánchez-Solana <i>et al.</i> , 2015a)
Dlr	Línea pura procedente de la variedad local Dátler (Murcia)	Desconocido
YW	Yolo Wonder. Variedad obtenida en la Universidad de California (EE.UU.)	Resistente a <i>M. javanica</i> (gen <i>Me5</i> , Hendy <i>et al.</i> , 1985). Parcialmente resistente o susceptible a <i>M. incognita</i> and <i>M. arenaria</i> (Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 1999 y 2001; Barbary <i>et al.</i> , 2014; Sánchez-Solana <i>et al.</i> , 2015a)

¹ Entradas mantenidas en el Banco de Germoplasma del IMIDA. Las semillas de las entradas ‘HDA330’ y ‘HDA149’ fueron proporcionadas por el Dr. Alain Palloix del INRA de Aviñón (Francia), y las semillas de la entrada ‘YW’ por Intersemillas S.A. (España).

TABLA 5.2. Aislados de nematodos utilizados.

Aislado	Especie	Características
M-are	<i>Meloidogyne arenaria</i>	Avirulento
M-jav	<i>Meloidogyne javanica</i>	Avirulento
Mi-avir	<i>Meloidogyne incognita</i>	Avirulento
Mi-virCH	<i>Meloidogyne incognita</i>	Virulento al gen <i>Me3</i> de pimiento
Mi-virB	<i>Meloidogyne incognita</i>	Virulento al gen <i>Me3</i> de pimiento

Procedimiento experimental y evaluación

Las plantas de las líneas puras e híbridos F1 se cultivaron individualmente en macetas de 200 ml de capacidad con un sustrato compuesto por una mezcla previamente esterilizada de arena (50%), vermiculita (25%) y tierra franco-arcillosa (25%). Para cada genotipo de pimiento y aislado de *Meloidogyne* se realizaron al menos 12 repeticiones, con una planta por repetición. Los experimentos se llevaron a cabo en una cámara de cultivo mantenida a una temperatura constante de 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperiodo de 15 horas de luz y humedad relativa del 50-60%. Cada planta a la edad de 7 semanas (4-6 hojas verdaderas) se inoculó con 400 (± 50) J2 del nematodo suspendidos en un volumen de 5 ml de agua y depositados en dos agujeros practicados en el sustrato, junto a la raíz. Transcurridas ocho semanas (el tiempo suficiente para completar un ciclo de vida de los nematodos), se arrancaron las plantas y se lavaron las raíces cuidadosamente con agua del grifo. Después se sumergieron durante 10 minutos en una solución acuosa de eosina (0.1 g/litro de agua), con la cual se tiñen específicamente las masas de huevos (Roberts *et al.*, 1990). Posteriormente se examinaron con una lupa para contar el número total de masas de huevos (MHs) de cada planta, correspondiente al número total de J2 que completaron su ciclo, utilizándose como parámetro de resistencia de la planta ó de infectividad del aislado del nematodo.

Análisis de los datos

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa informático Statgraphics statistical Package. El conjunto de los datos procedentes de los biotests genotipos x aislados se sometieron a análisis de varianza usando un modelo ANOVA de dos vías

con interacción: $Y_{g,i,k} = \mu + \alpha_g + \beta_i + \gamma_{g,i} + \varepsilon_{g,i,k}$, en donde $Y_{g,i,k}$ representa el valor de MHs del genotipo 'g' inoculado con el aislado 'i' en la repetición 'k', μ representa la media poblacional, α_g el efecto del genotipo, β_i el efecto del aislado, $\gamma_{g,i}$ la interacción genotipo-aislado y $\varepsilon_{g,i,k}$ el error residual. Las diferencias significativas entre genotipos de pimiento y/o aislados de *Meloidogyne* se determinaron mediante el test HSD de Tuckey con un nivel del 95% de confianza. Previamente a los análisis, los valores de MHs se transformaron mediante la expresión $[(1+x)-1/4]$ para cumplir con los requisitos de normalidad y homocedasticidad de los valores, que fueron comprobados con las pruebas de Shapiro-Wilk y Barlett, respectivamente.

Para conocer el modo de herencia (aditiva o dominante) de la resistencia cuantitativa, los valores de las MHs de los híbridos F1 se compararon con el valor medio de sus respectivas líneas parentales. Los efectos aditivos se definieron como $a = (MH_{parental1} - MH_{parental2})/2$ y los efectos dominantes como $d = MH_{F1} - (MH_{parental1} + MH_{parental2})/2$. Los efectos genéticos se clasificaron por el valor del ratio dominancia/aditividad (o ratio 'd/a') según Stuber *et al.* (1987), considerando efectos aditivos cuando 'd/a' < 0.2, efectos parcialmente dominantes cuando $0.2 \leq d/a < 0.8$, efectos dominantes cuando $0.8 \leq d/a \leq 1.2$ y sobredominantes cuando 'd/a' > 1.2.

5.4. Resultados

Valores de MHs por cada genotipo de pimiento y aislado de *Meloidogyne* spp.

En la tabla 5.3 se muestran todos los valores medios de MHs para todos los genotipos de pimiento y aislados de *Meloidogyne*. Como era previsible la variedad 'DLL' (control susceptible) presentó en general los valores más elevados de MHs para cada aislado, 'HDA330' (portador de *Me1*) no se infectó, y 'HDA149' y 'SCM' (portadores de *Me3*) sólo se infectaron con los aislados virulentos. En 'DLL', tanto *M. arenaria* como *M. javanica* mostraron valores muy bajos de MHs, inferiores a un 65% y 85%, con respecto a los valores obtenidos con los aislados de *M. incognita*. Además, prácticamente no infectaron al resto de genotipos (excepto M-are a 'Brb'). Por lo tanto M-are y M-jav se consideraron ser muy poco patogénicos a pimiento y no se incluyeron en los análisis estadísticos posteriores.

TABLA 5.3. Promedio del número de masas de huevos/planta (\pm error estándar) para cada genotipo de pimiento y aislado de *Meloidogyne*.

Características	Genotipo	Aislados <i>Meloidogyne</i> spp.				
		M-are	M-jav	Mi-avir	Mi-virCH	Mi-virB
Control Susceptible	DLL	67.4 \pm 7	22 \pm 4.5	206.7 \pm 13	194.7 \pm 10.3	184.5 \pm 14
Líneas parentales resistentes	HDA330	0.2 \pm 0.1	0	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2	0
	HDA149	0.1 \pm 0.1	0	0.1 \pm 0.1	192.9 \pm 13.4	153.5 \pm 17
	SCM	0	0	0.1 \pm 0.1	69.1 \pm 5	81.5 \pm 11
Líneas parentales susceptibles o parcialmente resistentes	Amc	4.8 \pm 1	0.1 \pm 0.1	197.5 \pm 12	163.7 \pm 18.9	175 \pm 21.5
	Brb	26.6 \pm 3	0	179.5 \pm 18	161.4 \pm 22.6	134.4 \pm 14
	Ctl	0.2 \pm 0.1	0	25 \pm 5.4	10.8 \pm 2	29.5 \pm 4.9
	Dlr	3.4 \pm 0.9	0	149.3 \pm 11	65.3 \pm 7.1	117 \pm 15.6
	YW	6.9 \pm 2.2	0.2 \pm 0.1	196.6 \pm 16	153.5 \pm 22.2	151 \pm 8.2
Híbridos portadores de <i>Me1</i>	A1 (Amc x HDA330)	0.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.5	19.7 \pm 2.5	6.9 \pm 1.2	14.8 \pm 2.8
	B1 (Brb x HDA330)	0.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.3	10.3 \pm 1.8	4.0 \pm 0.6	7.7 \pm 1.1
	C1 (Ctl x HDA330)	0 \pm 0	0 \pm 0	9.2 \pm 1.8	0.8 \pm 0.4	1.5 \pm 0.6
	D1 (Dlr x HDA330)	0.3 \pm 0.2	0 \pm 0	9.6 \pm 2.1	5.3 \pm 0.9	6.4 \pm 1
	Y1 (YW x HDA330)	0.8 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	11.8 \pm 3.5	4.4 \pm 0.8	4.9 \pm 1.2
Híbridos portadores de <i>Me3</i> procedentes de HDA149	A3h (Amc x HDA149)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	195.0 \pm 13.6	150 \pm 20.2
	B3h (Brb x HDA149)	0 \pm 0	0 \pm 0	0.3 \pm 0.2	128.3 \pm 18	110 \pm 12.7
	C3h (Ctl x HDA149)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	80.8 \pm 10.7	97 \pm 14.5
	D3h (Dlr x HDA149)	0 \pm 0	0 \pm 0	0.3 \pm 0.2	138.1 \pm 10	96.5 \pm 12.7
	Y3h (YW x HDA149)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	129 \pm 12.9	114.0 \pm 12.7
Híbridos portadores de <i>Me3</i> procedentes de SCM	A3s (Amc x SCM)	0 \pm 0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	97.8 \pm 7.5	111.1 \pm 11.6
	B3s (Brb x SCM)	0.1 \pm 0.1	0 \pm 0	0.3 \pm 0.2	98.3 \pm 8.8	120.8 \pm 11.3
	C3s (Ctl x SCM)	0 \pm 0	0 \pm 0	0.2 \pm 0.1	51.2 \pm 6	69.7 \pm 7.3
	D3s (Dlr x SCM)	0 \pm 0	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	64.7 \pm 5.6	90.3 \pm 12.8
	Y3s (YW x SCM)	0 \pm 0	0 \pm 0	0.3 \pm 0.2	97.3 \pm 5.6	129.2 \pm 11.9

Efecto de las líneas puras y los aislados de RKNs sobre el nivel de infección

Para este análisis sólo se consideraron los datos de MHs obtenidos de las nueve líneas puras ('DLL' y líneas parentales) inoculadas con los tres aislados de *M. incognita*. El ANOVA a dos vías mostró efectos significativos del genotipo de pimiento ($P < 10^{-4}$), del aislado de *M. incognita* ($P < 10^{-4}$) y de la interacción 'genotipo x aislado'

($P < 10^{-4}$). Los valores medios de MHs/planta de las 9 líneas puras de pimiento se compararon individualmente para cada aislado del nematodo (figura 5.1A). Entre los genotipos sin genes-R, ‘Amc’, ‘Brb’ y ‘YW’ mostraron valores similares a ‘DLL’ (control susceptible) con cualquiera de los aislados de *M. incognita*, mientras que ‘Ctl’ presentó valores significativamente inferiores de MHs para los tres aislados. En ‘Dlr’, los valores de MHs fueron inferiores a los anteriores genotipos, pero únicamente significativos para el aislado Mi-virCH. Respecto a las tres líneas portadoras de genes-R, ‘HDA330’ (portadora de *Me1*) no se infectó con ninguno de los aislados, mientras que ‘HDA149’ y ‘SCM’ (portadoras de *Me3*) presentaron resistencia frente al aislado avirulento, pero fueron susceptibles a los aislados virulentos a *Me3*. Con estos aislados virulentos, ‘HDA149’ mostró valores de MHs similares a los pimientos susceptibles, mientras que ‘SCM’ valores de MHs significativamente inferiores.

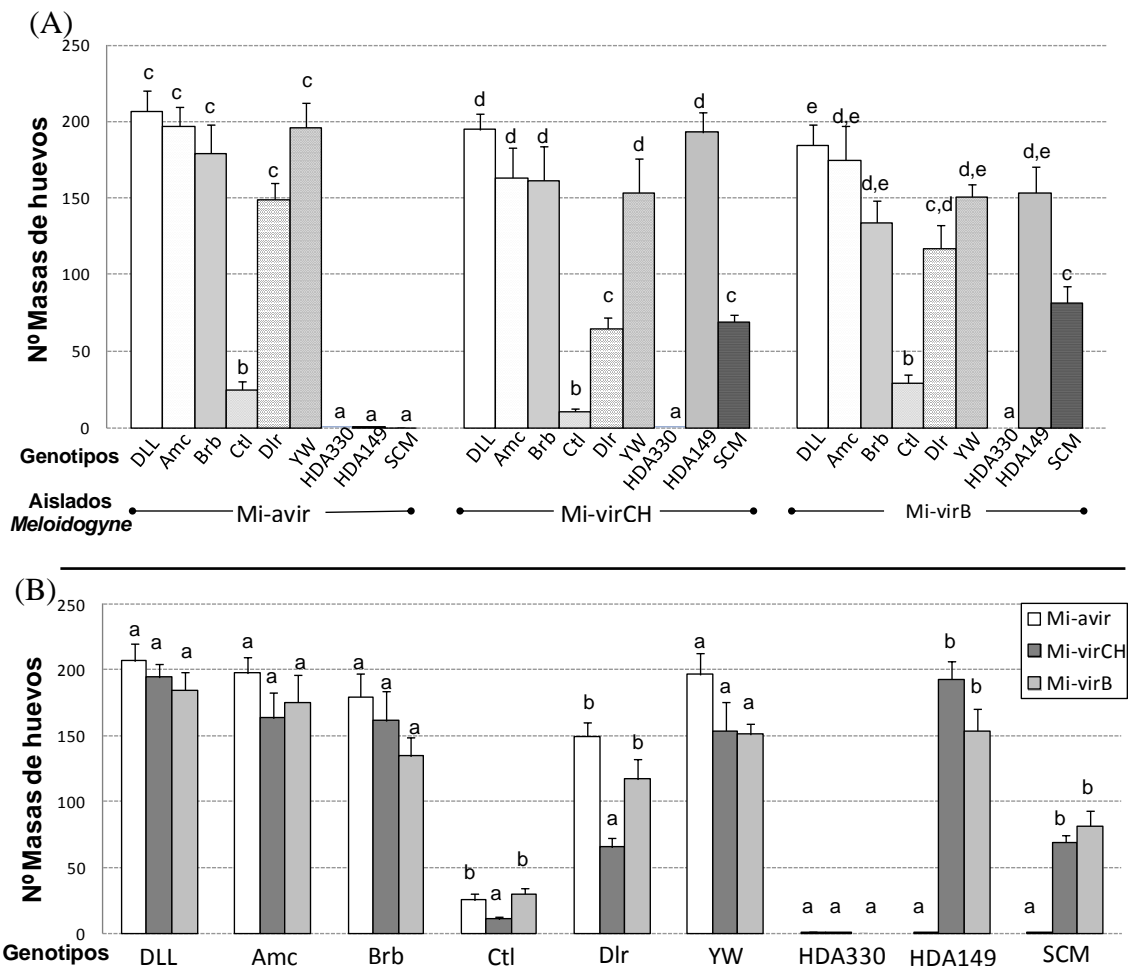


FIGURA 5.1. Número medio de masas de huevos por planta para cada genotipo de pimiento y aislado de *Meloidogyne incognita*. Letras diferentes dentro de cada aislado (A) o dentro de cada genotipo (B) indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA y test HSD).

A partir de los mismos datos, se compararon los tres aislados de *M. incognita* para sus valores de MHs, considerando separadamente cada genotipo de pimiento (figura 5.1B). En ‘DLL’, ‘Amc’, ‘Brb’, ‘YW’ y ‘HDA330’ no se obtuvieron diferencias entre los tres aislados. Como era previsible, en las líneas ‘HDA149’ y ‘SCM’ (portadoras de *Me3*) los aislados virulentos mostraron valores de MHs mucho mayores que el aislado avirulento. En los genotipos ‘Ctl’ y ‘Dlr’ se obtuvieron menos MHs con el aislado Mi-virCH que con los aislados Mi-avir y Mi-virB.

Infección por los diferentes aislados de los híbridos F1 portadores de *Me1*.

En este análisis se consideraron los valores de MHs de los cinco híbridos F1 portadores de *Me1*, procedentes del cruce de ‘HDA330’ (donador de *Me1*) con las cinco líneas susceptibles o parcialmente resistentes, inoculados con los tres aislados de *M. incognita*. Los valores de MHs fueron generalmente bajos, como cabía esperar por la resistencia conferida por *Me1*. El ANOVA a dos vías para este parámetro mostró efectos significativos del genotipo de pimiento ($P < 10^{-4}$) y del aislado de *M. incognita* ($P < 10^{-4}$), pero no de la interacción ‘genotipo x aislado’ ($P = 0.0865$). La comparación de los valores medios de MHs (figura 5.2A) mostró diferencias significativas entre los cinco genotipos, que conformaron tres grupos: con ‘A1’ (fondo genético de ‘Amc’) que presentó el mayor valor de MHs; ‘B1’, ‘D1’ e ‘Y1’ con valores intermedios; y ‘C1’ (fondo genético de ‘Ctl’) con el menor valor de MHs.

La comparación entre los tres aislados de *M. incognita*, mediante sus valores promedios de MHs obtenidos en los cinco híbridos (figura 5.2B), mostró diferencias significativas entre los tres, mostrando el aislado avirulento el mayor valor de infección, y el aislado Mi-virCH el menor valor.

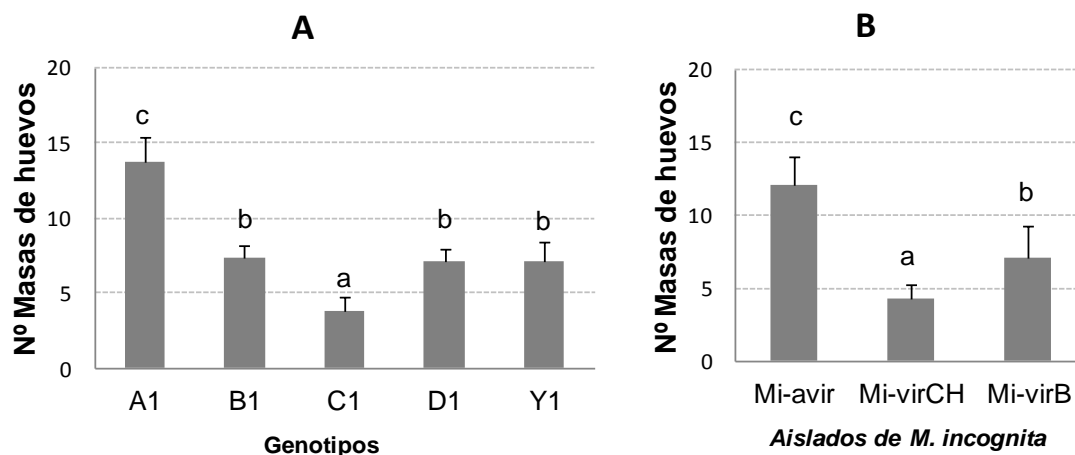


FIGURA 5.2. Número medio de masas de huevos por planta (MHs/planta) para cada genotipo evaluado frente a los tres aislados de *Meloidogyne incognita* (A), y para cada aislado de *M. incognita* inoculado en los cinco genotipos híbridos portadores de *Me1* (B). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA y test HSD).

Infección por los aislados virulentos de los híbridos F1 portadores de *Me3*

Los datos procedentes del aislado avirulento no se incluyeron en el análisis ya que todos los genotipos presentaron valores de MHs muy bajos (< 0.4). Consecuentemente, para este análisis sólo se consideraron las inoculaciones con los aislados Mi-virCH y Mi-virB en los cinco híbridos F1 de cada línea pura parental portadora de *Me3* ('HDA149' y 'SCM'). Para los híbridos de 'HDA149', el ANOVA a dos vías mostró efectos significativos para el genotipo de pimiento ($P < 10^{-4}$), pero no para el aislado de *M. incognita* ($P = 0.0533$) ni para la interacción 'genotipo x aislado' ($P = 0.1792$). La comparación entre las medias de MHs de cada genotipo (figura 5.3A) mostró que 'C3h' (con fondo genético de 'Ctl') se infectó menos que los otros, excepto que 'B3h'. 'A3h' (con fondo genético de 'Amc') mostró el mayor valor de MHs, con diferencias significativas respecto a los otros híbridos, excepto con 'Y3h'. Como se obtuvo del ANOVA, las diferencias entre ambos aislados no llegaron a ser significativas (figura 3B).

Respecto a los híbridos de 'SCM', el ANOVA a dos vías identificó efectos significativos del genotipo ($P < 10^{-4}$) y del aislado ($P = 10^{-4}$), pero no de la interacción 'genotipo x aislado' ($P = 0.9856$). Al comparar las medias de MHs de los cinco híbridos (figura 5.4A), 'C3s' (con fondo genético de 'Ctl') fue el que menos se infectó pero sin

diferencias respecto a ‘D3s’ (con fondo genético de ‘Dlr’). ‘A3s’, ‘B3s’ e ‘Y3s’ presentaron valores de MHs significativamente mayores que ‘C3s’ y ‘D3s’. La comparación entre aislados para sus valores de MHs en estos genotipos (figura 4B) mostró que Mi-virCH produjo menos MHs.

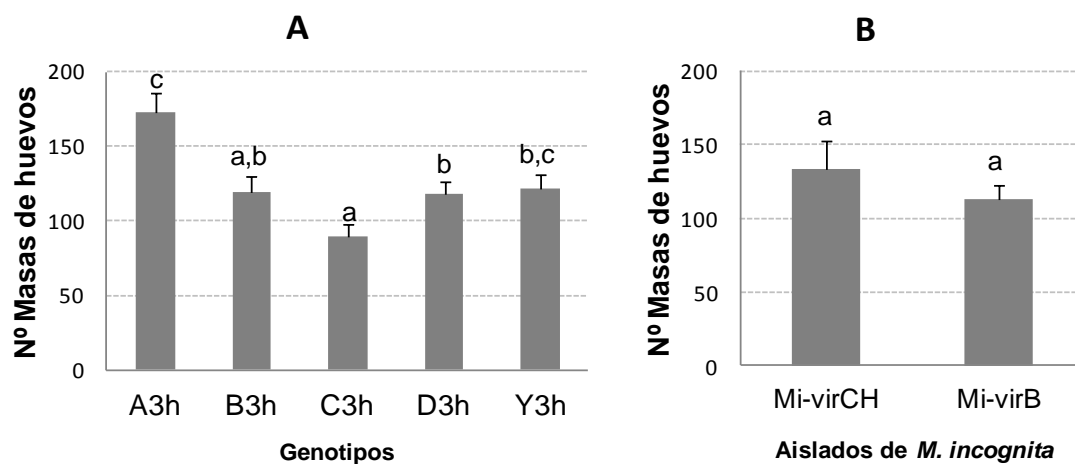


FIGURA 5.3. Número medio de masas de huevos por planta (MHs/planta) para cada genotipo evaluado frente a los dos aislados virulentos de *Meloidogyne incognita* (A), y para cada aislado virulento de *M. incognita* inoculado en los cinco genotipos híbridos portadores de *Me3* procedentes de ‘HDA149’ (B). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05; ANOVA y test HSD).

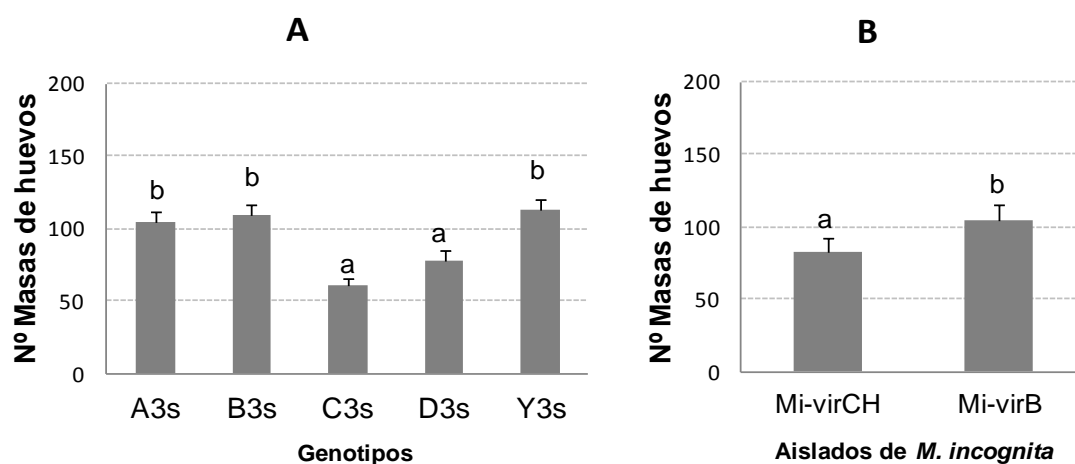


FIGURA 5.4. Número medio de masas de huevos por planta (MHs/planta) para cada genotipo evaluado frente a los dos aislados virulentos de *Meloidogyne incognita* (A), y para cada aislado virulento de *M. incognita* inoculado en los cinco genotipos híbridos portadores de *Me3* procedentes de ‘SCM’ (B). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05; ANOVA y test HSD).

Patrones de herencia de la resistencia cuantitativa

Para este análisis sólo se incluyeron los genotipos híbridos procedentes de parentales con diferente nivel de resistencia debido al efecto de su fondo genético. Consecuentemente, se excluyeron los híbridos portadores de *Me1* (testados con todos los aislados) y los híbridos portadores de *Me3* testados frente al aislado avirulento, ya que en estos casos el efecto dominante del gen-R predominó sobre el efecto de la resistencia cuantitativa. En la mayoría de los casos, los valores de MHs de los híbridos F1 fueron cercanos a los valores medios de sus respectivos parentales. Los valores del ratio 'd/a' indicaron herencia aditiva para la resistencia cuantitativa portada por 'Ctl' y 'Dlr' cuando se cruzaron con 'HDA149', y mayormente aditiva o parcialmente dominante en los demás casos (tabla 5.4).

TABLA 5.4. Comparación del número de masas de huevos por planta (MHs), entre el valor obtenido en los genotipos híbridos portadores de *Me3* y el valor medio de sus obtenido en las respectivas líneas parentales con los dos aislados virulentos de *Meloidogyne incognita*, y estimación del ratio 'd/a'.

Genotipo	Aislado	MHs en F1	Valor medio de MHs de las líneas parentales	¹ ratio d/a
Ctl x DH149	Mi-virCH	80.8±10.7	101.9±6.2	-0.23
	Mi-virB	97.2±14.5	91.5±8.2	0.09
Dlr x DH149	Mi-virCH	138.1±10	129.1±8.3	0.14
Amc x SCM	Mi-virCH	97.8±7.5	116.4±10.1	0.39
	Mi-virB	111.1±11.6	128.4±10.3	0.37
Brb x SCM	Mi-virCH	98.3±8.8	115.2±11.5	0.36
	Mi-virB	120.8±11.3	107.9±6.5	-0.48
Ctl x SCM	Mi-virCH	51.2±6	39.9±2.7	0.39
	Mi-virB	69.7±7.3	55.5±4.9	0.55
YW x SCM	Mi-virCH	97.3±5.6	111.3±11.2	0.33
	Mi-virB	129.2±11.9	116.3±4.5	-0.37

¹ El ratio de los efectos aditivos y dominantes (d/a) estima el grado de dominancia de acuerdo a Stuber *et al.* (1987): aditividad ($0 \leq d/a < 0.20$); dominancia parcial ($0.21 \leq d/a < 0.80$); dominancia completa ($0.80 \leq d/a \leq 1.20$); sobredominancia ($d/a > 1.20$). MHs= masas de huevos.

5.5. Discusión

En este trabajo se ha testado la resistencia de 24 genotipos de pimiento (9 líneas puras y 15 híbridos F1) frente a 5 aislados de *Meloidogyne* spp. que ha permitido profundizar en el conocimiento de las resistencias cuantitativas y su influencia sobre la reproducción de RKNs, su efecto combinado con resistencias cualitativas y su expresión en la descendencia.

Capacidad reproductiva de *M. arenaria* y *M. javanica*

En anteriores trabajos se ha puesto de manifiesto que la frecuencia de poblaciones patógenas a pimiento de *M. arenaria* y *M. javanica* es bastante inferior que en el caso de *M. incognita* (Hartman y Sasser, 1985; Robertson *et al.*, 2006; Talavera *et al.*, 2012; C. Ros *et al.*, datos no publicados). En el presente estudio todos los aislados de *Meloidogyne* infectaron a la variedad susceptible ‘DLL’, por lo que se consideraron patógenos a pimiento. Esto contrasta con la caracterización previa del aislado de *M. javanica*, perteneciente a “raza 1” (no patógeno de pimiento). Esta discrepancia probablemente se deba a que la variedad de pimiento ‘Sonar’ fue la empleada en el test de hospedantes diferenciales para la caracterización racial (Robertson *et al.*, 2009) y, en base a observaciones propias, ‘Sonar’ no es tan susceptible a RKNs como ‘DLL’. Sin embargo, incluso en esta variedad altamente susceptible, la reproducción de *M. arenaria* y *M. javanica* fue muy inferior a la mostrada por *M. incognita*. Castagnone-Sereno *et al.* (2001) observaron en poblaciones de *M. arenaria* y *M. javanica* menor tasa de reproducción en pimiento ‘DLL’ que en tomate susceptible, mientras que las poblaciones de *M. incognita* mostraron similar patogenicidad en ambos hospedantes. Probablemente, la elección de aislados de *M. arenaria* y *M. javanica* (de muy baja patogenicidad a pimiento) para el presente estudio explica la baja reproducción en pimiento en comparación con los aislados de *M. incognita*. Aunque también, los resultados de los trabajos citados sugieren que *M. arenaria* y *M. javanica* son especies menos adaptadas a pimiento

En este estudio también se ha mostrado que ‘Amc’, ‘Brb’, ‘Ctl’, ‘Dir’ y ‘YW’ se comportaron como completamente resistentes a los aislados M-are y/o M-jav, pero no a los aislados de *M. incognita*. De forma similar, Djian-Caporalino *et al.* (1999) observaron que diversas variedades de pimiento (incluyendo ‘Yolo Wonder’) se

infectaron con *M. incognita*, pero fueron completamente resistentes a poblaciones de *M. arenaria* y *M. javanica* (patogénas en pimiento). También Pandravada *et al.* (2010) obtuvieron un amplio rango de niveles de resistencia (desde totalmente resistente hasta totalmente susceptible) en 172 entradas de pimiento testadas frente a un mismo aislado de *M. javanica*. Estos resultados, junto con los obtenidos en el presente estudio, evidencian la existencia de otros factores genéticos de resistencia distintos a *Me1*, *Me3* y *N* que confieren resistencia a *M. javanica* y *M. arenaria*, los cuales podrían corresponderse con los ya descritos genes *Me2*, *Me4* ó *Me5* (éste presente en ‘YW’) (Hendy *et al.*, 1985) o deberse a nuevos factores genéticos.

Comparación de la capacidad reproductiva de los aislados de *M. incognita* avirulento y virulentos a *Me3*

Son pocos los artículos en los que se ha documentado acerca del coste en la aptitud reproductiva de aislados de *Meloidogyne* spp. asociado a la adquisición de virulencia frente a genes de resistencia de tomate y pimiento (Djian-Caporalino *et al.*, 2011). En tomate, los aislados virulentos al gen *Mi* presentaron menor reproducción potencial que los avirulentos (Castagnone-Sereno *et al.*, 2007). En pimiento, el coste en la reproducción asociado a la virulencia a *Me3* se observó en tres poblaciones de las seis evaluadas (Djian-Caporalino *et al.*, 2011), por lo que no ha de ser generalizado. En el presente estudio, las diferencias de infectividad no llegaron a ser significativas en los genotipos totalmente susceptibles (es decir, en ‘DLL’, ‘Amc’, ‘Brb’ y ‘YW’). Sólo en los híbridos portadores de *Me1*, que redujo mucho la infección en todos los genotipos, los aislados virulentos infectaron significativamente menos que el aislado avirulento (y *Mi-virCH* menos que *Mi-virB*). En los genotipos ‘Ctl’ y ‘Dlr’ el aislado *Mi-virCH* fue menos infectivo que los aislados *Mi-avir* y *Mi-virB*. También en los genotipos portadores de *Me3*, *Mi-virCH* presentó menos MHs que *Mi-virB* cuando se inocularon en los híbridos procedentes de ‘SCM’. Esta menor reproducción del aislado *Mi-virCH* puede ser atribuida a los factores genéticos de resistencia cuantitativa presentes en los fondos genéticos de ‘Ctl’ ‘Dlr’ y ‘SCM’, como así se ha documentado en otros patosistemas (Pariaud *et al.*, 2009; Lannou, 2012). Por lo tanto, los experimentos del presente capítulo no han revelado un coste reproductivo asociado a la virulencia a *Me3*, pero se han puesto de manifiesto diferencias entre aislados en relación a su capacidad reproductiva en genotipos portadores de resistencia cuantitativa y *Me1*.

Efecto de la resistencia cuantitativa conferida por el fondo genético

Inicialmente la resistencia cuantitativa se evaluó en las líneas de pimiento no portadoras de los alelos de resistencia *Me1* ni *Me3*, para conocer así el efecto de la resistencia debida sólo a los factores genéticos presentes en el fondo genético. En esta evaluación, ‘Ctl’ mostró el mayor nivel de resistencia frente a los tres aislados de *M. incognita*, y ‘Dlr’ mostró un nivel intermedio, en comparación a las otras líneas puras (‘DLL’, ‘Amc’, ‘Brb’ y ‘YW’) que fueron muy susceptibles. De forma análoga, entre las dos líneas puras portadoras de *Me3*, ‘SCM’ fue cuantitativamente más resistente que ‘HDA149’ frente a los dos aislados virulentos de *M. incognita*, lo que sugiere la presencia de factores genéticos adicionales a *Me3* en el genoma de ‘SCM’. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en evaluaciones realizadas en invernaderos con poblaciones de *M. incognita* virulentas a *Me3* y avirulentas, en las cuales ‘Ctl’ mostró mayor nivel de resistencia respecto a ‘Amc’, ‘Brb’ y ‘YW’ (‘Datler’ no se evaluó), y lo mismo fue observado en ‘SCM’ respecto a otra variedad portadora de *Me3* (Sánchez-Solana *et al.*, 2015a). La similitud de estos resultados obtenidos en diferentes condiciones de evaluación y naturaleza virulenta del patógeno demuestra el amplio espectro de acción de la resistencia debida al fondo genético.

Cuando las líneas susceptibles o parcialmente resistentes se combinaron con los alelos *Me1* o *Me3*, los efectos obtenidos debidos al fondo genético fueron similares. En combinación con *Me1*, y pese a los bajos valores de MHs observados (todos los aislados fueron avirulentos a este alelo), el híbrido ‘C1’ (procedente de ‘Ctl’) mostró el menor valor de infección y ‘A1’ (procedente de ‘Amc’) el mayor valor. Esto coincide con los resultados obtenidos por Barbary *et al.* (2014), quienes observaron una mayor eficiencia de la resistencia de *Me1* y *Me3* cuando los genes fueron introgresados en un fondo genético con resistencia parcial. Curiosamente, ‘HDA330’ no se infectó (MH=0.3) mientras que sus híbridos sí (máximo 19.7 MHs en ‘A1’). Esto, según Barbary *et al.* (2014), no sería debido a un efecto de dosis alélica (estatus heterocigótico de *Me1* en los híbridos F1, y homocigótico en ‘HDA330’), sino debido a los efectos del fondo genético de ‘HDA330’ que presentaría resistencia cuantitativa, independiente de *Me1*.

Los híbridos portadores de *Me3* no se infectaron con el aislado avirulento (valores entre 0 y 0.3 masas) independientemente de la susceptibilidad del fondo genético, pero sí se infectaron a distintos niveles con los aislados virulentos. La ausencia de infección

con el aislado avirulento contrasta con lo observado por Barbary *et al.* (2014), quienes pusieron de manifiesto que la eficiencia de *Me3* decreció al introgresarlo en un fondo genético muy susceptible ('DLL'). Probablemente, esta discrepancia sea debida a diferencias en la dosis de inóculo empleado en cada estudio: 400 J2/planta en el presente estudio y 5000 J2/planta (12.5 veces mayor) en el caso de Barbary *et al.* Cuando se inocularon con los dos aislados virulentos, los híbridos portadores de *Me3* mostraron diferencias en su nivel de resistencia relacionadas directamente con los efectos del fondo genético observados en sus líneas parentales: mayor resistencia en 'C3h' y 'C3s' (obtenidos de 'Ctl') e intermedia en 'D3h' y 'D3s' (obtenidos de 'Dlr'). Al igual que lo observado en los híbridos de *Me1*, dicho efecto fue estable frente a los dos aislados (interacción 'genotipo x aislado' no significativa).

La herencia de la resistencia cuantitativa portada por 'Ctl' y 'Dlr' resultó aditiva en los híbridos F1, y mayormente aditiva con dominancia parcial en los cruces de 'SCM'. De hecho, los híbridos F1 obtenidos de 'Ctl' y 'Dlr' mostraron valores mayores de MHs al inocularlos con los aislados virulentos a *Me3* que las propias líneas parentales (homocigóticas) 'Ctl' y 'Dlr', indicando claramente que los factores de resistencia presentes en el fondo genético son más eficientes en homocigosis. En cualquier caso, el control de tal resistencia por uno o varios factores genéticos (QTLs) es desconocido, y su estudio ha de abordarse con generaciones segregantes.

Implicaciones prácticas

Estos nuevos conocimientos sobre los efectos del fondo genético del pimiento son de importante aplicación práctica para conservar la durabilidad de las resistencias a RKNs. En estrategias de mejora genética de variedades, se ratifica la ventaja de combinar genes-R y resistencias cuantitativas en un mismo genotipo, puesta de manifiesto en anteriores trabajos (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Djian-Caporalino *et al.*, 2014). Incluso sin genes-R, variedades con resistencia cuantitativa (como 'Ctl') pueden ser eficaces en el control de *Meloidogyne*, constituyendo una nueva fuente de resistencia con diferente expresión (cuantitativa) y efecto genético (aditivo). Esta resistencia cuantitativa también puede ser explotada en estrategias de manejo de las resistencias. Djian-Caporalino *et al.* (2014) demostraron que la alternancia del cultivo de plantas portando *Me1* y *Me3* es un método eficaz de controlar a los nematodos y de

umentar la durabilidad de las resistencias. La inclusión de una fuente genética de elevada resistencia cuantitativa como ‘Ctl’, ayudará a diversificar las resistencias. Además, la disminución de la reproducción potencial de algunos aislados virulentos (como Mi-virCH) puede contribuir en una disminución de la frecuencia de aparición de tales aislados en el suelo, favoreciendo así la durabilidad de las resistencias.

5.6. Conclusiones

En este capítulo se ha puesto de manifiesto que la resistencia cuantitativa a RKNs, controlada por el fondo genético del pimiento, es estable frente a diferentes aislados de *M. incognita*, se mantiene su efecto cuando se combina con genes-R y presenta efectos genéticos aditivos o parcialmente dominantes.

Particularmente, la variedad ‘Costal’ (‘Ctl’) ha mostrado un elevado nivel de resistencia cuantitativa, eficaz frente a aislados de *M. incognita* avirulentos y virulentos a *Me3*, y que incrementa la eficiencia de los híbridos portadores de *Me1*.

Se ha visto que algunos aislados de *M. incognita* presentan menor aptitud reproductiva hacia genotipos con factores de resistencia cuantitativa y hacia portadores de *Me1*.

Se considera interesante comprobar los efectos de la resistencia cuantitativa en condiciones de campo, y llevar a cabo un análisis genético de la resistencia de ‘Costal’ para conocer su control oligogénico o poligénico.

6. CAPÍTULO III

Influencia de la resistencia cuantitativa conferida por el fondo genético del pimiento sobre los genes de resistencia *Me1* y *Me3* en el control de *Meloidogyne incognita* en condiciones de campo



6.1. Resumen

En el pimiento (*Capsicum annuum*), los genes mayores (genes-R) *Me1*, *Me3* y *N* confieren resistencia a *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*, consideradas las principales especies de nematodos que afectan al pimiento. En condiciones de infestación natural, se ha observado el desarrollo de poblaciones virulentas a los genes *Me3* y *N* cuando éstos se han utilizado en cultivo reiterado en un mismo suelo, lo que pone en peligro su eficacia. La combinación de genes-R y factores de resistencia cuantitativa en un mismo genotipo se considera una buena estrategia para incrementar la durabilidad de los genes-R. El reciente descubrimiento de altos niveles de resistencia conferidos por el fondo genético del pimiento, con eficacia frente a aislados de *M. incognita* avirulentos y virulentos a *Me3*, se espera que pueda ser de importante aplicación para preservar la eficiencia de la resistencia a nematodos. Con el fin de conocer la capacidad de la resistencia incrementando la durabilidad de los genes-R del pimiento frente a *Meloidogyne* spp., cinco líneas puras, de diferente nivel de resistencia cuantitativa, se combinaron con los genes *Me1* o *Me3* en híbridos F1. La resistencia de las líneas puras e híbridos (usados como porta-injertos) se evaluó en dos campañas de cultivo sucesivas, en un invernadero con el suelo infestado naturalmente por *M. incognita*. En ambas campañas, los genotipos portadores de un mismo gen-R se infectaron menos cuando se combinaron con resistencia cuantitativa. Se observó un incremento en la infección en la segunda campaña de cultivo, que fue pequeño en los genotipos portadores de *Me1* y notable en los genotipos portadores de *Me3*, independientemente de su resistencia cuantitativa. El nivel de infección en las líneas puras no portadoras de genes-R fue similar en ambas campañas. En base a estos resultados se discute si la resistencia cuantitativa incrementa el nivel de resistencia general, pero no previene el incremento de la frecuencia de virulencia a los genes-R una vez emergida.

6.2. Introducción

El uso de resistencias genéticas en plantas cultivadas es un método muy ventajoso para el control de plagas y enfermedades. Sin embargo, uno de los principales problemas es la pérdida de eficacia de muchas fuentes de resistencia, que son

remontadas en poco tiempo por poblaciones virulentas del patógeno (ej: Turner *et al.*, 1983; McDonald y Linde, 2002). Actualmente, muchas investigaciones se centran en el diseño de estrategias que incrementen la durabilidad de las resistencias. Se ha observado que la introgresión de genes mayores de resistencia (genes-R) en fondos genéticos con factores de resistencia cuantitativa dificulta la aparición de formas virulentas del patógeno capaces de remontar a los genes-R. Así se ha demostrado para el gen *Rlm6*, que confiere resistencia en *Brassica napus* frente al hongo *Leptosphaeria maculans* (Brun *et al.*, 2010), o para el gen *pvr2³* de resistencia en pimiento frente al virus Y de la patata (PVY) (Palloix *et al.*, 2009). Según Quenouille *et al.*, (2013), el efecto beneficioso del fondo genético preservando la eficacia de los genes-R se explicaría por un conjunto de causas que disminuyen la presión de selección de individuos virulentos del patógeno, como son: el mayor nivel de resistencia proporcionada por la resistencia cuantitativa, el requerimiento de una mayor acumulación de mutaciones en el patógeno y una pérdida de la capacidad reproductiva debido a la adquisición de virulencia.

Los nematodos del género *Meloidogyne* están considerados, a escala mundial, entre los patógenos edáficos más dañinos que afectan a los cultivos de solanáceas (Netcher y Sikora, 1990; Khan y Haider, 1991; Barbary *et al.*, 2015). En el pimiento (*Capsicum annuum*), la resistencia frente a *Meloidogyne incognita* (Robertson, 2006) viene conferida por los genes-R *Me1*, *Me3* y *N* (Hendy *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Thies y Fery, 2000). Sin embargo, este nematodo desarrolla- con facilidad- poblaciones virulentas frente a los genes *Me3* y *N*, cuando se reitera el cultivo de plantas portadoras de éstos en un mismo suelo (Thies, 2011; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). Sólo el gen *Me1* se ha mostrado- hasta la fecha- como la única fuente durable de resistencia (Sánchez-Solana *et al.*, 2015a; Barbary *et al.*, 2015).

Recientemente se han identificado elevados niveles de resistencia cuantitativa frente a *Meloidogyne* spp. controlados por el fondo genético de algunas variedades de pimiento, como ‘Costal’ y ‘Dátler’ (Sánchez-Solana *et al.*, 2015a y 2015b). Su utilización en estrategias de uso durable de las resistencias se espera que resulte eficaz, ya que, como se ha observado en condiciones controladas, esta resistencia es efectiva frente a aislados de *M. incognita* avirulentos y virulentos a *Me3*. También se ha comprobado que presenta efectos genéticos aditivos o parcialmente dominantes, de manera que el efecto de la resistencia cuantitativa se expresa cuando se combina con los

genes *Me1* o *Me3*, incrementando su eficiencia en el control de *M. incognita* (Barbary *et al.*, 2014; Sánchez-Solana *et al.*, 2015b).

El conocimiento acerca de las prestaciones de la resistencia cuantitativa del pimiento en cultivo en campo es escaso. Como se vio en el apartado de Introducción General (subapartados 1.2.3. y 1.3.3.), en estas condiciones, las plantas están sometidas a largos ciclos de cultivo, con amplias oscilaciones de los parámetros ambientales. Las poblaciones del patógeno suelen ser altamente heterogéneas y pueden presentar varias generaciones durante una misma campaña. En evaluaciones previas en invernaderos del Campo de Cartagena (Murcia), algunas variedades de pimiento con resistencia cuantitativa mostraron resultados satisfactorios en el control de *M. incognita*, empleando las plantas como porta-injertos (Sánchez-Solana *et al.*, 2015a). Sin embargo, bajo estas condiciones, se desconoce su efecto preservando la eficacia de los genes-R. En este trabajo se estudia la influencia del fondo genético sobre los genes *Me1* y *Me3*, en plantas utilizadas como porta-injertos y cultivadas en condiciones de invernadero con suelo naturalmente infestado por *M. incognita*. Los experimentos se focalizaron en dos objetivos concretos sobre el efecto de la resistencia cuantitativa cuando se combina con resistencia cualitativa: i) su capacidad reduciendo las infecciones del nematodo, y ii) su influencia sobre el desarrollo de poblaciones virulentas a *Me1* y *Me3*.

6.3. Materiales y Métodos

Material vegetal

Los genotipos utilizados se indican en la tabla 6.1, que coinciden con los del capítulo anterior. Tres genotipos son líneas puras resistentes, portadoras de *Me1* ('HDA330') o *Me3* ('HDA149' y 'SCM') (ver Material y Métodos Generales, apartado 3.1.1.). Otros cinco ('Americano', 'Belrubí', 'Costal', 'Dátler' y 'Yolo Wonder') son líneas puras no portadoras de *Me1* ni *Me3*, pero de diferente fondo genético y nivel cuantitativo de resistencia frente a *M. incognita*. Del cruzamiento entre cada línea pura portadora de *Me1* o *Me3* con cada una de las otras cinco líneas puras se obtuvieron los quince híbridos F1. Todos los genotipos se evaluaron como patrones, sobre los cuales se injertó la variedad 'Gacela' (Syngenta Seeds, S.A.), de tipo California rojo. La misma variedad sin injertar se utilizó como control susceptible. La metodología empleada para

la siembra, injerto y crianza en el semillero de las plantas se describe en Material y Métodos Generales (apartado 3.3.2.).

Diseño experimental y condiciones de cultivo

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero (E) de la finca experimental de Torre-Blanca que el IMIDA tiene en el Campo de Cartagena (Murcia). El suelo está naturalmente contaminado por *M. incognita*. Al inicio de los trabajos la población del nematodo se caracterizó como “en proceso de desarrollo de virulencia al gen *Me3*” (ver Materiales y Métodos Generales, apartado 3.3.1.), ya que, en cultivos precedentes, algunos patrones portadores del gen *Me3* se habían infectado con índices de nodulación en las raíces superiores a 3.

Se estableció un diseño de bloques al azar con tres repeticiones por genotipo. En cada parcela elemental (repetición) se puso una fila de 20 plantas, al marco de 0,40 m entre plantas en la fila y 1,0m de separación entre filas (2.5 plantas/m²). El cultivo se repitió durante dos campañas consecutivas. En la primera campaña se plantó el 22 de diciembre de 2011 y finalizó el cultivo el 2 de agosto de 2012, y en la segunda campaña se plantó el 18 de diciembre de 2012 y se arrancaron las plantas el 8 de agosto de 2013. En la segunda campaña el cultivo de cada genotipo se reiteró en la misma parcela donde se había cultivado en la campaña anterior. Entre las dos campañas se llevó a cabo una biosolarización tardía (octubre) del suelo con el aporte de 2,5 kg/m² de estiércol fresco de ovino, con el fin de reducir el efecto de la fatiga del suelo, pero sin afectar significativamente a la población del nematodo. El laboreo del suelo se hizo procurando no mezclar la tierra entre parcelas. Las prácticas de cultivo fueron las habituales utilizadas en la zona (ver Introducción General, apartado 1.2.3.).

Parámetros de evaluación y análisis de los datos

Se evaluó el nivel de resistencia a *M. incognita* de cada genotipo. Al finalizar el cultivo se arrancaron al menos 10 plantas, tomadas al azar, de cada repetición, se examinaron las raíces y se evaluaron los daños causados por el nematodo siguiendo la escala de 0 a 10 del índice de nodulación (IN) desarrollada por Bridge y Page (1980). También se calculó el porcentaje de plantas infectadas de cada genotipo.

Los valores de IN se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con interacción, para los factores genotipo y año (campaña). Cuando el ANOVA resultó significativo para el factor genotipo, se utilizó la prueba HSD de Tuckey al 95% de confianza para la diferenciación de medias. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático StatGraphics.

6.4. Resultados

Valores de infección por *M. incognita*

Los valores medios de IN y del porcentaje de plantas afectadas de todos los genotipos, obtenidos al final de cada campaña, se muestran en la tabla 6.1. El rango de valores varió entre 0 y 5.93 para el IN, y entre 0 y 100% para la proporción de plantas con nódulos. Todos aquellos genotipos con valores de IN superiores a 3.24, presentaron un porcentaje de plantas afectadas del 100%, lo cual indica una distribución uniforme de la población de *M. incognita* en el suelo del invernadero.

En las dos campañas la variedad ‘Gacela’ (control susceptible) mostró elevados valores de infección, y ‘HDA330’ (portadora de *Me1*) se mostró resistente, no presentando apenas nódulos en las raíces. Los genotipos portadores del gen *Me3* (‘HDA149’ y ‘SCM’) mostraron un alto porcentaje de plantas infectadas (76-100%), y valores de IN con variaciones entre años (mayores en el segundo), y entre genotipos (menores en ‘SCM’).

Resistencia en genotipos no portadores de *Me1* y *Me3*

En el análisis sólo se consideraron los IN de cada año obtenidos para ‘Gacela’ (control susceptible) y para las cinco líneas puras, sin genes mayores de resistencia a *M. incognita*, utilizadas como parentales, con la finalidad de estimar por sí sólo el efecto de la resistencia cuantitativa de cada genotipo conferida por el fondo genético.

El ANOVA a dos vías mostró efectos significativos para el factor ‘genotipo’, pero no para el factor ‘año’ ni para la interacción ‘genotipo x año’ (tabla 6.2). La comparación de los valores medios de IN de los seis genotipos (figura 6.1) no mostró diferencias significativas entre ‘Americano’, ‘Belrubí’, ‘Yolo Wonder’ y ‘Gacela’. Sin

embargo, ‘Costal’, que fue el que menos se infectó, y ‘Dátler’, mostraron diferencias significativas con los otros genotipos, a excepción de ‘Dátler’ con ‘Yolo Wonder’.

TABLA 6.1. Índice de nodulación medio y porcentaje de plantas afectadas (\pm desviación estándar) en cada genotipo, al final de cada campaña de cultivo (2012 Y 2013).

Resistencia a <i>M. incognita</i>	GENOTIPO	Año 2012		Año 2013	
		Índice Nodulación	Plantas afectadas (%)	Índice Nodulación	Plantas afectadas (%)
Control susceptible	Gacela no injertada	4.8 \pm 0.7	100 \pm 0	5.7 \pm 0.18	100 \pm 0
Parentales resistentes portadores de <i>Me1</i> o <i>Me3</i>	HDA330	0 \pm 0	0 \pm 0	0.3 \pm 0.17	21 \pm 22
	HDA149	2.6 \pm 0.1	93 \pm 12	4.9 \pm 0.5	100 \pm 0
	SCM	1.6 \pm 0.3	100 \pm 0	2.7 \pm 0.45	76 \pm 40
Parentales no portadores de <i>Me1</i> o <i>Me3</i>	Americano	5.3 \pm 0.1	100 \pm 0	5.27 \pm 0.5	100 \pm 0
	Belrubí	5.1 \pm 0.3	100 \pm 0	5.9 \pm 0.3	100 \pm 0
	Costal	2.3 \pm 0.1	93 \pm 12	2.60 \pm 0.3	100 \pm 0
	Dátler	3.6 \pm 0.6	100 \pm 0	2.9 \pm 0.5	100 \pm 0
	Yolo Wonder	4.5 \pm 0.7	100 \pm 0	4 \pm 0.4	100 \pm 0
Híbridos portadores de <i>Me1</i> procedentes de HDA330	A1	0.3 \pm 0.2	33 \pm 41	0.9 \pm 0.2	59 \pm 2
	B1	0 \pm 0	0 \pm 0	0.4 \pm 0.1	20 \pm 10
	C1	0.1 \pm 0.1	7 \pm 12	0.4 \pm 0.2	30 \pm 17
	D1	0.1 \pm 0.1	7 \pm 12	0.3 \pm 0.1	33 \pm 23
	Y1	0.3 \pm 0.2	23 \pm 19	0.6 \pm 0.3	46 \pm 46
Híbridos portadores de <i>Me3</i> procedentes de HDA149	A3h	3.5 \pm 0.2	100 \pm 0	4.9 \pm 0.3	100 \pm 0
	B3h	1.8 \pm 0.5	68 \pm 21	4.1 \pm 0.4	100 \pm 0
	C3h	0.9 \pm 0.4	67 \pm 31	3.1 \pm 0.8	97 \pm 6
	D3h	2 \pm 0.3	93 \pm 12	4.1 \pm 0.7	100 \pm 0
	Y3h	3.4 \pm 0.4	100 \pm 0	4.8 \pm 0.6	100 \pm 0
Híbridos portadores de <i>Me3</i> procedentes de SCM	A3s	3.2 \pm 0.4	92 \pm 7	5.5 \pm 0.4	100 \pm 0
	B3s	2.8 \pm 0.7	100 \pm 0	4.9 \pm 0.5	100 \pm 0
	C3s	1.1 \pm 0.2	67 \pm 23	3.1 \pm 0.8	95 \pm 10
	D3s	1.8 \pm 0.3	93 \pm 12	4 \pm 0.6	100 \pm 0
	Y3s	3.7 \pm 0.5	100 \pm 0	4.4 \pm 1	100 \pm 0

TABLA 6.2. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) a dos vías, evaluando los efectos del genotipo ('Gacela', 'Americano', 'Belrubí', 'Costal', 'Dátler' y 'Yolo Wonder'), del año de cultivo (2012 y 2013) y la correspondiente interacción de ambos factores para el índice de nodulación.

Fuente	Gl	Razón-F	Valor-P
Efectos principales			
Genotipo	5	15.95	<10 ⁻⁴
Año	1	0.24	0.6264
Interacción			
Genotipo*Año	5	1.19	0.3425
Residuos	24		
Total	35		

Gl: grados de libertad

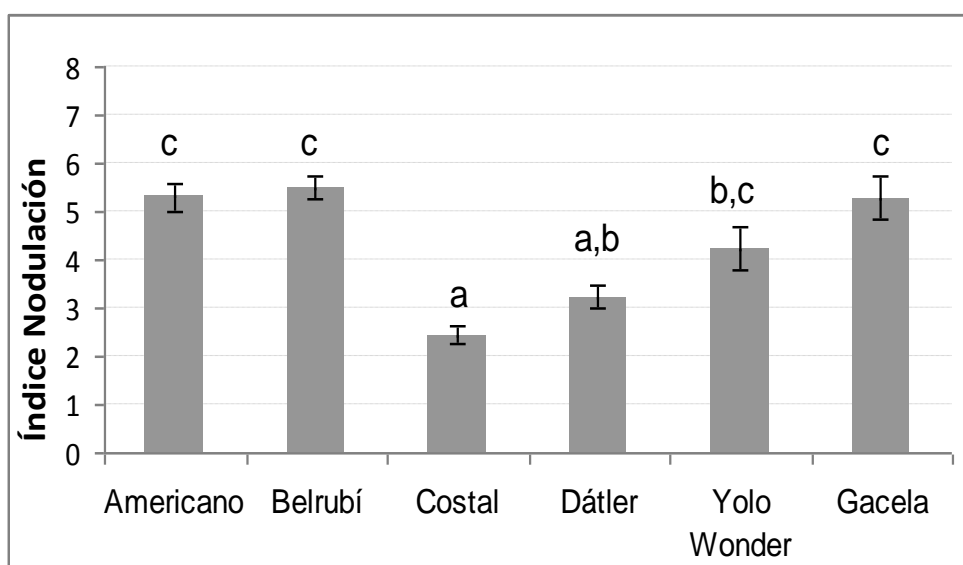


FIGURA 6.1. Índice de nodulación medio de las dos campañas de cultivo para cada genotipo no portador de genes *Me1* y *Me3*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA y prueba de HSD). Las barras verticales representan la desviación estándar.

Efecto de la resistencia cuantitativa en los genotipos portadores de *Me1*

Para este análisis se consideraron sólo los genotipos portadores del gen *Me1*. Por tanto se incluyeron la línea pura parental 'HDA330' (donadora del gen de resistencia) y

sus cinco híbridos F1, para así poder estimar las diferencias en el nivel de resistencia debidas al fondo genético.

Los seis genotipos mostraron una alta resistencia al nematodo con IN inferiores a 1 en todos los casos, debido al efecto de *Me1*. A pesar de esto, el ANOVA a dos vías mostró efectos significativos para el factor año, pero no para el factor genotipo ni para la interacción ‘genotipo x año’ (tabla 6.3a). Como el valor-P para el parámetro genotipo (P=0.0541) fue muy próximo al límite fijado de significancia (P<0.05), y el valor-P para la interacción ‘genotipo x año’ no fue significativo (P=0.9097), se decidió realizar de nuevo el ANOVA a dos vías, pero sin incluir la interacción entre ambos factores. Este análisis (tabla 6.3b) mostró efectos significativos del genotipo y del año. La comparación de los valores medios de IN de los seis genotipos (figura 6.2) mostró que las diferencias sólo fueron significativas entre ‘HDA330’, que presentó el menor IN, y ‘A1’ (‘Americano’ x ‘HDA330’), que fue el genotipo más afectado.

TABLA 6.3. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) a dos vías, evaluando los efectos del genotipo (‘HDA330’, ‘A1’, ‘B1’, ‘C1’, ‘D1’ e ‘Y1’), y ‘año de cultivo’ (2012 y 2013) para el índice de nodulación. Se consideraron dos modelos de ANOVA: incluyendo la correspondiente interacción entre ambos factores, ‘genotipo x año’ (A); y sin incluir interacción (B).

A				B			
Fuente	Gl	Razón-F	Valor-P	Fuente	Gl	Razón-F	Valor-P
Efectos principales				Efectos principales			
Genotipo		2.56	0.0541	Genotipo		2.91	0.0299
Año		14.19	<10 ⁻³	Año		16.15	<10 ⁻⁴
Interacción				Residuos	9		
Genotipo*Año		0.30	0.9097	Total	5		
Residuos	4						
Total	5						

Gl: grados de libertad

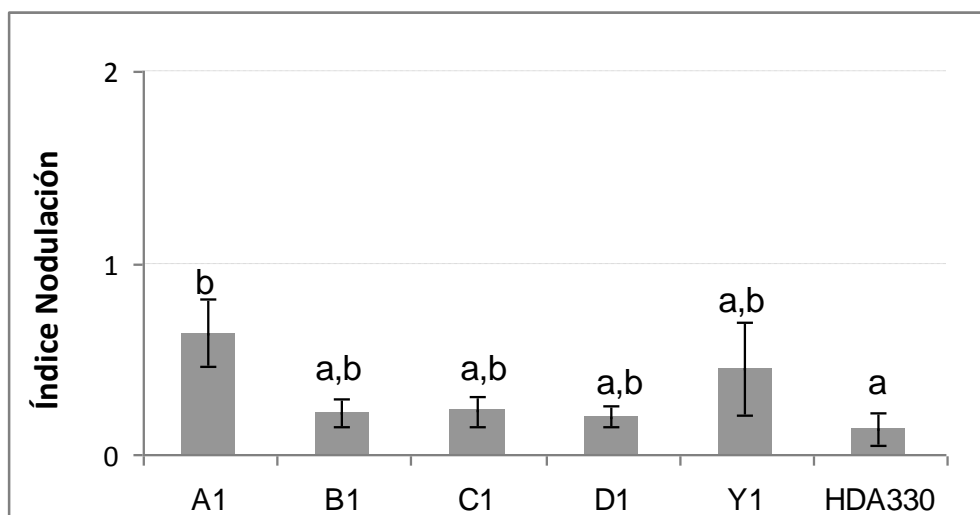


FIGURA 6.2. Índice de nodulación medio de las dos campañas de cultivo para cada genotipo portador de *Me1*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA y prueba de HSD). Las barras verticales representan la desviación estándar.

Efecto de la resistencia cuantitativa en los genotipos portadores de *Me3*

Para este análisis se consideraron todos los genotipos portadores de *Me3*. Los datos se analizaron en dos grupos, separando los genotipos en base a la línea parental donadora de *Me3*, ‘HDA149’ ó ‘SCM’, con el fin de estimar sólo los efectos debidos al fondo genético de las líneas parentales, no portadoras del gen de resistencia.

El ANOVA a dos vías de los datos de IN de ‘HDA149’ y de los cinco híbridos F1 procedentes de esta línea mostró efectos significativos de los factores ‘genotipo’ y ‘año’, pero no de la interacción ‘genotipo x año’ (tabla 6.4). La comparación de los valores medios de IN en estos genotipos (figura 6.3) mostró que el genotipo de mayor resistencia, ‘C3h’ (fondo genético de Costal), fue significativamente diferente de los tres que más se infectaron (‘A3h’, ‘Y3h’ y ‘HDA149’). Los genotipos ‘B3h’ y ‘D3h’ mostraron valores intermedios de IN que no resultaron estadísticamente diferentes de los demás.

En los genotipos con fondo genético de ‘SCM’ el ANOVA a dos vías mostró efectos significativos de los parámetros ‘genotipo’ y ‘año’, pero no de la interacción ‘genotipo x año’ (tabla 6.5). La comparación de los valores medios de IN en estos genotipos (figura 6.4) mostró que ‘C3s’ (fondo genético de Costal) y ‘SCM’ fueron los que menos se infectaron, con diferencias significativas respecto a ‘A3s’, ‘B3s’ e ‘Y3s’.

El genotipo ‘D3s’ (fondo genético de ‘Dátler’) mostró un valor intermedio, sin diferencias significativas respecto a ninguno de los otros genotipos.

TABLA 6.4. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) a dos vías evaluando los efectos del genotipo (‘HDA149’, ‘A3h’, ‘B3h’, ‘C3h’, ‘D3h’ e ‘Y3h’), del año de cultivo (2012 y 2013) y la correspondiente interacción de ambos factores para el índice de nodulación.

Fuente	Gl	Razón-F	Valor-P
Efectos principales			
Genotipo	5	6.07	$<10^{-3}$
Año	1	52.24	$<10^{-4}$
Interacción			
Genotipo*Año	5	0.38	0.8578
Residuos	24		
Total	35		

Gl: grados de libertad

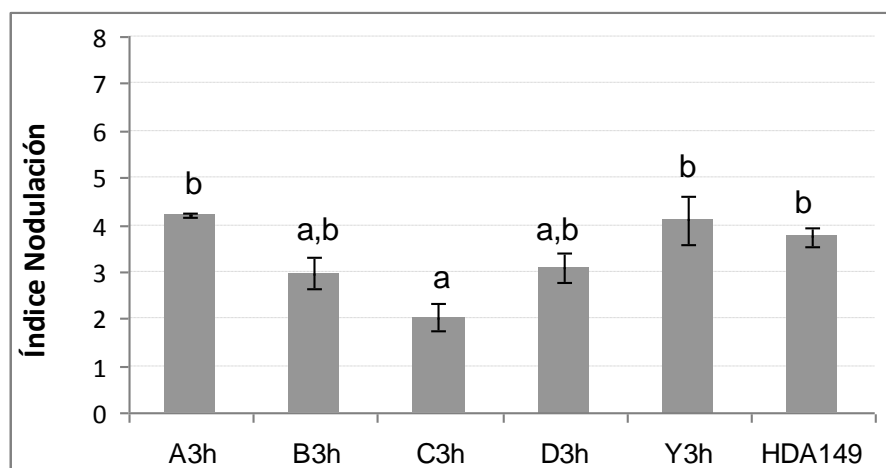


FIGURA 6.3. Índice de nodulación medio de las dos campañas de cultivo para cada genotipo portador de *Me3* procedente de ‘HDA149’. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA y prueba de HSD). Las barras verticales representan la desviación estándar.

TABLA 6.5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) a dos vías evaluando los efectos del genotipo ('SCM', 'A3s', 'B3s', 'C3s', 'D3s' e 'Y3s'), del año de cultivo (2012 y 2013) y la correspondiente interacción de ambos factores para el índice de nodulación.

Fuente	Gl	Razón-F	Valor-P
Efectos principales			
Genotipo	5	6.70	$<10^{-3}$
Año	1	29.14	$<10^{-4}$
Interacción			
Genotipo*Año	5	0.72	0.6134
Residuos	24		
Total	35		

Gl: grados de libertad

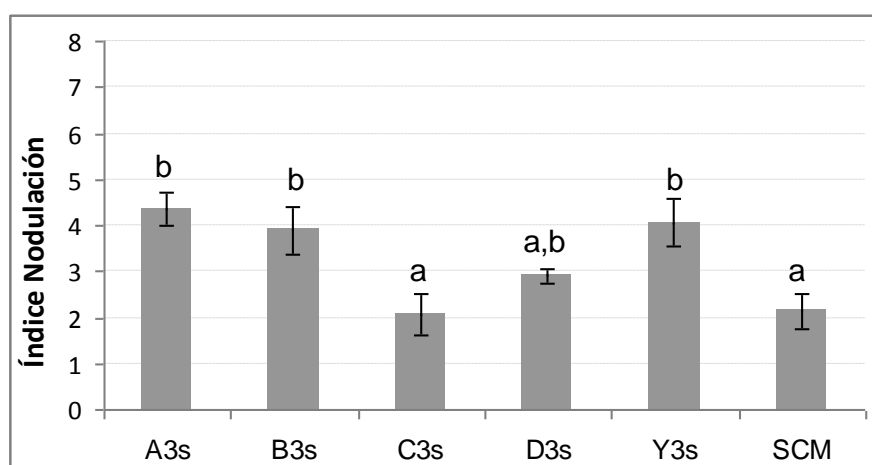


FIGURA 6.4. Índice de nodulación medio de las dos campañas de cultivo obtenido en cada genotipo portador de *Me3* procedente de 'SCM'. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA y prueba de HSD). Las barras verticales representan la desviación estándar.

Comparación interanual de los índices de nodulación

En el análisis se comparó la variación de los índices de nodulación entre las dos campañas de cultivo. Como el ANOVA para la interacción 'genotipo x año' no resultó

significativo en ninguno de los análisis anteriores (tablas 6.2, 6.3, 6.4 y 6.5), se obtuvo el valor promedio de cada grupo de genotipos considerando: no portadores de *Me1* y *Me3*; portadores de *Me1*; portadores de *Me3* procedentes de ‘HDA149’; y portadores de *Me3* procedentes de ‘SCM’. Dichos valores se representan en la figura 6.5.

En los cuatro grupos de genotipos los IN de la segunda campaña fueron más elevados que los de la primera, aunque sin diferencias significativas en el caso de los genotipos no portadores de *Me1* ni *Me3* (tabla 6.2) que mostraron valores muy parecidos en ambos años (IN=4.3 en 2012; IN=4.4 en 2013). En los genotipos portadores de *Me1* o *Me3* el incremento interanual del IN fue más notable, mostrando diferencias significativas (tablas 6.3, 6.4 y 6.5). El IN promedio de los genotipos portadores de *Me1* fue de 0.1 en 2012 y 0.5 en 2013. Los portadores de *Me3* mostraron un IN de 2.4 en la primera campaña de cultivo. En la segunda los valores fueron próximos a los obtenidos en los genotipos sin genes mayores de resistencia, mostrando un IN promedio de 4.3 en el caso de los genotipos procedentes de ‘HDA149’, y de 4.1 en aquellos procedentes de ‘SCM’.

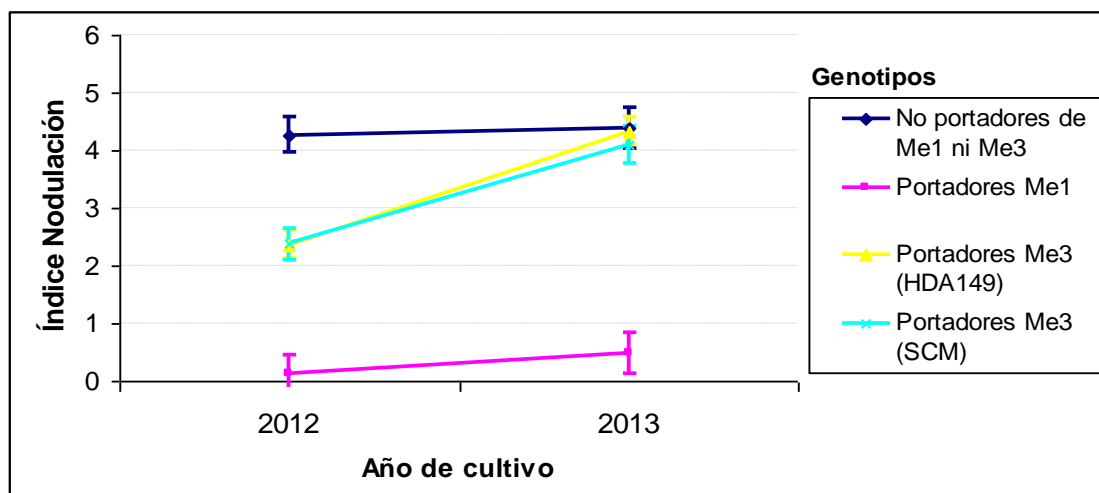


FIGURA 6.5. Representación del incremento del índice de nodulación de cada grupo de genotipos obtenido en dos campañas de reiteración del cultivo. Las barras verticales representan la desviación estándar.

6.5. Discusión

En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que los efectos de la resistencia cuantitativa, disminuyendo la infección por *M. incognita* en pimiento se muestran en condiciones de invernadero o de infestación natural. Estos efectos se observaron tanto en los genotipos sin genes-R como cuando la resistencia cuantitativa se combinó con los

genes *Me1* o *Me3*, lo cual coincide con los resultados obtenidos previamente en evaluaciones en condiciones controladas (Sánchez-Solana *et al.*, 2015b). En este sentido, se reafirmaron los niveles de resistencia identificados en ‘Costal’ y ‘Dátler’ así como su efecto, reduciendo la infección por el nematodo cuando ‘Costal’ se combinó con *Me3*. Sin embargo, en el caso de los híbridos de ‘Dátler’ portadores de *Me3* este efecto no llegó a ser completamente significativo. Esto podría explicarse por la menor resistencia cuantitativa en ‘Dátler’ en comparación a ‘Costal’, junto con una menor expresión de esta resistencia en los híbridos, debido a su modo de herencia intermedio (Sánchez-Solana, *et al.*, 2015b). En referencia al gen *Me1*, todos los genotipos portadores de éste mostraron una alta resistencia y estabilidad frente a *M. incognita*. Sin embargo, la eficacia de *Me1* disminuyó cuando se introgresó en un fondo genético muy susceptible, (‘A1’, con fondo genético de ‘Americano’, se infectó más que ‘HDA330’). Estos resultados corroboran lo obtenido previamente en ensayos en condiciones controladas, tanto con los mismos genotipos (Sánchez-Solana, *et al.*, 2015b), como cuando *Me1* se introgresó en el fondo genético de ‘DLL’, otra variedad muy susceptible a *Meloidogyne* spp. (Barbary *et al.*, 2014). Igualmente, Djian-Caporalino *et al.* (2014) obtuvieron en un experimento llevado a cabo en invernadero menores infecciones en ‘HDA330’ que en el híbrido ‘HDA330 x DLL’.

Respecto al efecto sobre el desarrollo de poblaciones virulentas del nematodo, la combinación de resistencias cuantitativas con genes-R no pareció evitar el incremento de las infecciones obtenidas en el segundo año de cultivo. Este incremento ocurrió tanto para *Me1* como para *Me3*, con independencia del fondo genético con el cual se combinaron estos genes (ANOVA no significativo para la interacción ‘genotipo x año’). Por el contrario, en los genotipos no portadores de genes-R los valores de infección en ambas campañas fueron similares (ANOVA no significativo para el factor año). Entre estos figuraron ‘Costal’ y ‘Dátler’, revelando que la resistencia cuantitativa controlada por su fondo genético no fue erosionada por el nematodo en el transcurso de las dos campañas de cultivo. Así, la introgresión de *Me1* y *Me3* en estos fondos genéticos en estatus de homocigosis para los factores que controlan la resistencia cuantitativa, se prevé que dote de mayor resistencia que la mostrada por los híbridos F1. Sin embargo, queda por demostrar la eficacia de tal resistencia en un plazo de tiempo mayor, donde podría ocurrir una adaptación del patógeno a estos genotipos. De hecho así se ha observado en el caso de otras resistencias de tipo cuantitativo, como por ejemplo en la

conferida por determinados QTLs de manzano frente a la sarna causada por *Venturia inaequalis* (Caffier *et al.*, 2014), o en resistencias parciales de vid frente a mildiu (Delmotte *et al.*, 2014).

El incremento durante el segundo año en las infecciones obtenidas en los genotipos portadores de *Me1* y *Me3* podría ser atribuido a una mayor densidad poblacional del nematodo en la segunda campaña de cultivo respecto a la primera. Así, en cultivos de tomate se demostró una correlación entre el nivel de densidad poblacional de *Meloidogyne* spp. al inicio del cultivo y daños en las plantas (Ehwaeti *et al.*, 1998). Sin embargo, en nuestro caso esta razón resulta poco probable, ya que no explicaría los resultados obtenidos en los genotipos sin genes-R (susceptibles y resistentes parciales), en los cuales se obtuvo similar nivel de daños en ambas campañas. Una causa más probable de dicho incremento sería por un aumento de la frecuencia de individuos virulentos del patógeno a los genes-R, como consecuencia de la presión de selección ejercida al cultivar plantas portadoras de *Me1* o *Me3*. En el caso de *Me1*, la virulencia de *M. incognita* a este gen no se ha demostrado. Sin embargo, en coincidencia con lo observado en este estudio, Djian-Caporalino, *et al.*, (2014) obtuvieron un incremento de las infecciones por el nematodo al reiterar durante tres campañas de cultivo consecutivas plantas portadoras de *Me1*. En el caso del *Me3*, estudios previos demostraron claramente el desarrollo de virulencia a partir de poblaciones avirulentas de *M. incognita* cuando se someten a una fuerte presión del gen *Me3*, tanto en condiciones de laboratorio (Castagnone-Sereno *et al.*, 1996), como en invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena (Ros-Ibáñez *et al.*, 2014).

La disminución de la reproducción potencial debido a la adquisición de virulencia por el patógeno se ha postulado como causa que evita la superación de las resistencias conferidas por genes-R cuando éstos se combinan con resistencias cuantitativas (Palloix *et al.*, 2009; Quenouille *et al.*, 2013). En *M. incognita*, Djian-Caporalino *et al.* (2011) comprobaron una menor reproducción de algunas poblaciones virulentas a *Me3* respecto a poblaciones avirulentas, cuando se inocularon en variedades de pimiento susceptible. En el mismo sentido, Sánchez-Solana *et al.* (2015b) encontraron una menor reproducción de algunos aislados en genotipos de pimiento con factores de resistencia cuantitativa, sugiriendo como posible causa de tal observación la ganancia de virulencia a *Me3*. Sin embargo, en el presente estudio, la evolución hacia la virulencia a *Me3* (y

Me1) observada en la población de *M. incognita* no pareció mitigarse cuando estos genes-R se combinaron con resistencias cuantitativas, a pesar de que mostraron mayor nivel de resistencia. Un hecho similar se demostró que ocurrió en la resistencia en *Brassica napus* hacia *Leptosphaeria maculans*, en un estudio desarrollado durante cinco años (Delourme *et al.* 2014). En él se observó que la combinación del gen-R *Rlm6* con factores genéticos de resistencia cuantitativa dispuso de mayor nivel que *Rlm6* sólo, pero no influyó sobre la proporción final de alelos virulentos del patógeno, obtenida al final del estudio.

6.6. Conclusiones

En este estudio se ha reafirmado, en condiciones de infestación natural una mayor resistencia cuantitativa frente a *M. incognita* en las variedades ‘Costal’ y ‘Dátler’, que además no ha sido erosionada por el patógeno tras dos campañas reiterando su cultivo en el mismo suelo.

La combinación en el pimiento de resistencia cuantitativa con *Me1* y *Me3* proporciona una mayor resistencia frente a *M. incognita* que la resistencia cualitativa sola. Sin embargo, no se observó un efecto significativo de la resistencia cuantitativa, mitigando el desarrollo de virulencia hacia los genes-R.

La resistencia conferida por *Me1* se muestra altamente estable, pero el incremento de la infección detectado al reiterar su cultivo en años sucesivos podría indicar una potencial capacidad de adaptación o virulencia de las poblaciones de *M. incognita* a este gen.

Desde un punto de vista aplicado a los cultivos de pimiento en invernadero, la utilización de los genes *Me1* y *Me3* como método de control de nematodos, ha de hacerse desde un inicio con variedades que además incorporen resistencia cuantitativa, ya que pueden incrementar la durabilidad de los genes-R.

7. CAPÍTULO IV

Análisis genético de la resistencia a *Meloidogyne incognita* en la variedad 'Costal'



7.1. Resumen

La variedad de pimiento (*Capsicum annuum*) 'Costal' presenta una elevada resistencia cuantitativa, eficaz frente a un amplio espectro de poblaciones del nematodo fitoparásito *Meloidogyne incognita*. Con el fin de estudiar el modo de herencia de esta resistencia, se evaluó frente a *M. incognita* la resistencia de una familia de seis generaciones compuesta por 'Costal', la variedad susceptible 'DLL' y sus F1, F2, BC1_R y BC1_S. Además, se llevó a cabo un test de alelismo a partir de la generación F2 procedente del cruce entre 'Costal' y la línea resistente 'HDA149' (portadora del gen mayor de resistencia *Me3*). Los análisis genéticos Mendeliano y cuantitativo de la familia de seis generaciones reveló que la resistencia a *M. incognita* del 'Costal' está controlada principalmente por un simple locus con efectos mayormente dominantes, pero con interacciones epistáticas de efectos genéticos 'aditivos x aditivos' y 'dominantes x dominantes'. El test de alelismo mostró que el control genético de la resistencia de 'Costal' es diferente del conferido por el locus *Me3* y por los loci estrechamente ligados *Me1* y *N*, poniendo de manifiesto que se trata de una nueva fuente genética de resistencia a nematodos en pimiento.

7.2. Introducción

Los nematodos del género *Meloidogyne* están considerados a escala mundial como uno de los principales patógenos del suelo que afectan a los cultivos de solanáceas (Netcher y Sikora, 1990; Khan y Haider, 1991). Su control mediante el empleo de resistencias constituye un método eficaz, inocuo y sostenible, que se erige como la mejor alternativa al control mediante desinfectantes químicos del suelo, de uso cada vez más limitado (Collange *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2012). Consecuentemente, en los últimos años, se han fomentado los estudios acerca de las resistencias genéticas a nematodos, así como el desarrollo de programas de mejora genética en patata, tomate o pimiento para la obtención de porta-injertos y variedades élite resistentes (Barbary *et al.*, 2015).

En pimiento (*Capsicum annuum*) se han identificado 9 genes que confieren resistencia cualitativa frente a diferentes especies de *Meloidogyne* (tabla 7.1). De éstos, sólo los genes dominantes *N*, *Me1* y *Me3* son eficaces frente a *Meloidogyne incognita*, la principal especie del género que afecta a pimiento (Robertson *et al.*, 2006). Estos tres

genes se han cartografiado en una posición muy cercana entre ellos (9 centimorgan) en el cromosoma P9, aunque se identificaron en líneas distantes genética y geográficamente: el gen *N* se identificó en *Capsicum frutescens* y fue transferido posteriormente a variedades de *C. annuum* (Hare, 1957 y 1966); el gen *Me1* se identificó en la línea ‘PI201234’ originaria de Centroamérica (Hendy *et al.*, 1985); el gen *Me3* se identificó en la línea ‘PI322719’, procedente de India (Hendy *et al.*, 1985), y en la variedad local de México ‘Serrano Criollo de Morelos’ (Fazari *et al.*, 2012). A pesar de que los tres genes confieren resistencia completa frente al nematodo, la otorgada por *N* y *Me3* es efímera, ya que cuando se reitera su uso se induce el desarrollo de poblaciones virulentas, capaces de infectar por igual a variedades susceptibles de pimiento y a las portadoras de *N* o *Me3* (Thies, 2011; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014).

Además, se han identificado resistencias parciales frente a nematodos en algunas líneas de pimiento (Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Barbary *et al.*, 2014; Sánchez-Solana *et al.*, 2015a y 2015b), aunque se conoce muy poco acerca de su naturaleza genética. La variedad ‘Costal’ fue obtenida en el IMIDA a partir de una variedad-población de pimiento para pimentón cultivada tradicionalmente en la Región de Murcia, y ha demostrado que puede ser una valiosa fuente de resistencia a nematodos. En estudios anteriores, se comprobó que esta variedad mostraba elevados niveles de resistencia cuantitativa frente a *M. incognita*, con efecto frente a poblaciones avirulentas y virulentas a *Me3*. Así se observó tanto en evaluaciones en condiciones controladas (Sánchez-Solana *et al.*, 2015b), como en evaluaciones en invernaderos utilizando ‘Costal’ como porta-injertos, en cuyas condiciones mantuvo la eficacia frente al nematodo tras dos años de cultivo reiterado en el mismo suelo (Sánchez-Solana *et al.*, 2015a; ver Capítulo III). La evaluación de híbridos F1 procedentes de ‘Costal’ ha mostrado que dicha resistencia presenta efectos genéticos principalmente aditivos y en combinación con *Me1* y *Me3* les confiere mayor eficiencia controlando a *M. incognita* (Sánchez-Solana *et al.*, 2015b; ver Capítulo III). Sin embargo, se requiere de un conocimiento genético más detallado sobre la resistencia de ‘Costal’ para que pueda ser utilizada de manera más eficiente en la mejora genética de variedades.

En el presente estudio se lleva a cabo un análisis genético de la resistencia a *M. incognita* en ‘Costal’ con el fin de conocer el modo de herencia, oligogénico o

poligénico, y el alelismo o ligamiento de los factores de resistencia a los genes de resistencia conocidos en pimiento.

TABLA 7.1. Genes de resistencia frente a *Meloidogyne* spp. identificados en pimiento

Gen	Resistencia conferida	Referencias
<i>N</i>	<i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. hapla</i>	Hare 1966; Fery <i>et al.</i> , 1998; Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 1999; Fazari <i>et al.</i> , 2012
<i>Me1</i>	<i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M. javanica</i>	Hendy <i>et al.</i> , 1985; Castagnone-Sereno <i>et al.</i> , 1996; Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 1999, 2001 y 2007b; Fazari <i>et al.</i> , 2012
<i>Me2</i>	<i>M. javanica</i> , <i>M. hispanica</i>	
<i>Me3</i>	<i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M. javanica</i>	
<i>Me4</i>	Determinados aislados de <i>M. arenaria</i>	
<i>Me5</i>	Determinados aislados de <i>M. javanica</i>	
<i>Me6</i>	Determinados aislados de <i>M. javanica</i> y <i>M. arenaria</i>	Wang y Bosland, 2006
<i>Mech1</i>	<i>M. chitwoodi</i>	Berthou <i>et al.</i> , 2003; Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 2004; Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 2007b
<i>Mech2</i>	<i>M. chitwoodi</i>	

7.3. Materiales y Métodos

Material vegetal

Para evaluar y analizar genéticamente la resistencia a *M. incognita* en ‘Costal’ se construyó una familia de 6 generaciones mediante cruzamiento con una variedad susceptible. Así, la línea pura ‘Costal’ (parental resistente) se cruzó con la línea pura ‘DLL’ (parental susceptible), obteniendo la generación F1, y las generaciones segregantes F2 (autofecundación de F1), BC1_R (primer retrocruzamiento de F1 con ‘Costal’) y BC1_S (primer retrocruzamiento de F1 con ‘DLL’).

Además se llevó a cabo un cruzamiento entre ‘Costal’ y la línea doble-haploide ‘HDA149’, portadora del gen de resistencia *Me3*, con el fin de realizar una prueba de alelismo entre los factores de resistencia de ambas líneas.

Diseño experimental y evaluación de la resistencia

Se llevaron a cabo 2 ensayos independientes. En uno de ellos se evaluó la resistencia de la familia de 6 generaciones obtenida del cruce de 'Costal' x 'DLL', con el fin de conocer el modo de herencia de la resistencia. Se testaron 9 plantas del parental resistente ('Costal'), 11 plantas del parental susceptible ('DLL'), 10 plantas de F1, 136 plantas de F2, 73 plantas de BC1_R y 73 plantas de BC1_S. Se utilizó el aislado Mi-virCH, procedente de la colección de nematodos mantenida en el IMIDA, caracterizado como *M. incognita* raza 2 y virulento al gen *Me3*. Se eligió este aislado ya que se mostró como el más discriminante entre los fenotipos de 'Costal' y 'DLL', según un trabajo previo con diversos aislados de *M. incognita* (Sánchez-Solana *et al.*, 2015b),

En otro ensayo se evaluó la resistencia en las progenies procedentes del cruce entre 'Costal' y 'HDA'149' para lo cual se evaluaron respectivamente 17 y 6 plantas de cada parental, 7 plantas de F1 y 165 de F2. También se evaluaron 12 plantas de 'DLL' que se utilizó como control susceptible. En este experimento se utilizó el aislado Mi-avir (colección de nematodos de IMIDA), caracterizado como *M. incognita* raza 2 y avirulento, sin capacidad para infectar a plantas portadoras de *Me3* pero sí a la variedad 'Costal' y a variedades susceptibles, aunque con claras diferencias cuantitativas en el grado de infección (Sánchez-Solana *et al.*, 2015b).

Para evaluar el nivel de resistencia se utilizó el mismo método en ambos ensayos. Las plantas se cultivaron individualmente en macetas de 200 ml con un sustrato compuesto de una mezcla previamente esterilizada de arena (50%), vermiculita (25%) y tierra arcillosa (25%). En el estado de 4-6 hojas (siete semanas desde la siembra), cada planta se inoculó con una suspensión de 5ml de agua con 400(±50) juveniles de segundo estadio (J2) del nematodo, depositada en dos agujeros de 3 cm practicados en el sustrato junto a la raíz. Estos J2 se extrajeron a partir de raíces de plantas de pimiento previamente infectadas tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales (subapartado 3.2.3). Ocho semanas después de la inoculación (el tiempo suficiente para completar un ciclo de vida de los nematodos), se arrancaron las plantas y se lavaron cuidadosamente las raíces con agua del grifo. Después, las raíces se sumergieron durante 10 minutos en una solución acuosa de eosina (0.1 g/L de agua), con la que específicamente se tiñen de rojo las masas de huevos (Roberts *et al.*, 1990). Posteriormente se examinaron bajo una lupa para contar el número total de masas de

huevos (MHs) de cada planta, que corresponde al número total de J2 que consiguieron infectar a la planta y completar un ciclo vida.

Análisis de los datos

Para conocer el modo de herencia de la resistencia en 'Costal' se analizó el conjunto de los datos de los valores de MHs procedente de la generaciones 'Costal', 'DLL', F1, F2, BC1_R y BC1_S. En primer lugar se llevó a cabo un análisis Mendeliano de la segregación de la resistencia. Para ello, las plantas de las generaciones segregantes (F2, BC1_R y BC1_S) se clasificaron en tres clases fenotípicas, resistente (R), susceptible (S) y resistente intermedio (MR) que fueron establecidas en base al intervalo de confianza ($p=0.99$) calculado a partir de los valores de MHs obtenidos en las generaciones 'Costal', 'DLL' y F1, respectivamente. Los ratios de segregación obtenidos se compararon mediante un test de chi cuadrado a los ratios esperados para un modelo teórico de un solo factor de resistencia con efectos aditivos: F2 (R:MR:S=1:2:1); BC1_R (R:MR=1:1); BC1_S (MR:S=1:1). En segundo lugar se llevó a cabo un análisis cuantitativo de los datos. La hipótesis de un solo factor genético de resistencia en 'Costal' se comprobó en base a la forma de distribución segregante de los valores de MHs obtenidos en las generaciones BC1_R y BC1_S. Para ello se calculó el coeficiente de bimodalidad, según describen García-Cano *et al.* (2008), así como la desviación de los datos de una distribución normal y uniforme mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los efectos genéticos se estimaron a partir de los datos de MHs de las 6 generaciones según el método descrito por Mather y Jinks (1982), empleando una hoja de cálculo Excel diseñada por R. Fernández-Muñoz (CSIC, Málaga). Se comprobó el ajuste a un modelo aditivo-dominante puro y también incluyendo interacciones epistáticas mediante las pruebas de escalas de los parámetros *ABC*. Los modelos evaluados para estimar los efectos genéticos incluyeron efectos aditivos (*d*) y dominantes (*h*), y efectos epistáticos entre genes aditivos (aditivos x aditivos, *i*), entre genes aditivos y dominantes (aditivos x dominantes, *j*) y entre genes dominantes (dominantes x dominantes, *l*). Se consideró como el mejor modelo aquel que presentó los valores estimados de las medias de las generaciones más próximos a los valores observados, en base a la probabilidad calculada con la prueba de chi cuadrado. Se estimó la heredabilidad en sentido amplio (H^2) según el método indicado por Rodríguez-Herrera *et al.* (2000).

Para determinar un hipotético alelismo entre los factores genéticos de resistencia presentes en ‘Costal’ y ‘HDA149’ (gen *Me3*) se realizó un análisis Mendeliano de la generación segregante F2 procedente del cruzamiento entre las anteriores líneas. Las plantas de la F2 se clasificaron por su valor de MHs como totalmente resistente (TR), parcialmente resistente (PR) o susceptible (S). Estas clases fenotípicas se establecieron en base a los intervalos de confianza ($p=0.99$) para los valores de MHs obtenidos en ‘HDA149’ (TR), ‘Costal’ (PR) y ‘DLL’ (S). Mediante la prueba de chi cuadrado se comprobó el ajuste de los ratios de segregación observados en la F2 para dos modelos teóricos de segregación: i) considerando un solo factor de resistencia en ‘Costal’ alélico a *Me3* (TR:PR:S=3:1:0) y ii) considerando un solo factor de resistencia de efectos aditivos en ‘Costal’ e independiente de *Me3* (TR:PR:S=6:1:1).

7.4. Resultados

Valores de infección por *M. incognita* obtenidos en la familia de 6 generaciones del cruzamiento de ‘Costal’ x ‘DLL’

En la figura 7.1 se representa la proporción de plantas en relación a los valores de MHs obtenidos de las inoculaciones, con 400 J2 de *M. incognita*, de plantas de cada una de las 6 generaciones procedentes del cruzamiento entre ‘Costal’ y ‘DLL’. Como era esperable la línea parental resistente ‘Costal’ mostró un alto nivel de resistencia con valores comprendidos entre 13 y 50 MHs (masas de huevos por planta). La línea parental susceptible ‘DLL’ presentó valores entre 141 y 279 MHs. La generación F1, con valores entre 82 y 173 MHs, mostró un rango de resistencia intermedio entre ambos parentales, aunque ligeramente más próximos a los valores de ‘DLL’. Como cada una de estas tres generaciones se considera genéticamente homogénea, la variabilidad en los valores de MHs observada entre plantas de una misma línea se atribuyó a la naturaleza de la resistencia (cuantitativa) influida por la variabilidad intrínseca al método de evaluación de las plantas (dosis J2, condiciones ambientales de cultivo, evaluación del sistema radicular, etc.). Previsiblemente, las tres generaciones segregantes presentaron rangos amplios de valores de MHs. En la generación F2 los valores de MHs estuvieron comprendidos entre 0 y 259 y en la BC1_R el rango de valores varió entre 4 y 188 MHs. Destacar que en las generaciones F2 y BC1_R un 5% y un 15%, respectivamente, de las plantas presentaron valores de MHs inferiores a 13, el valor más bajo obtenido en

‘Costal’. La generación BC1_S presentó un rango de valores de MHs comprendido entre 35 y 257, resaltando la elevada proporción de plantas (42%) con valores inferiores a los obtenidos en la generación F1.

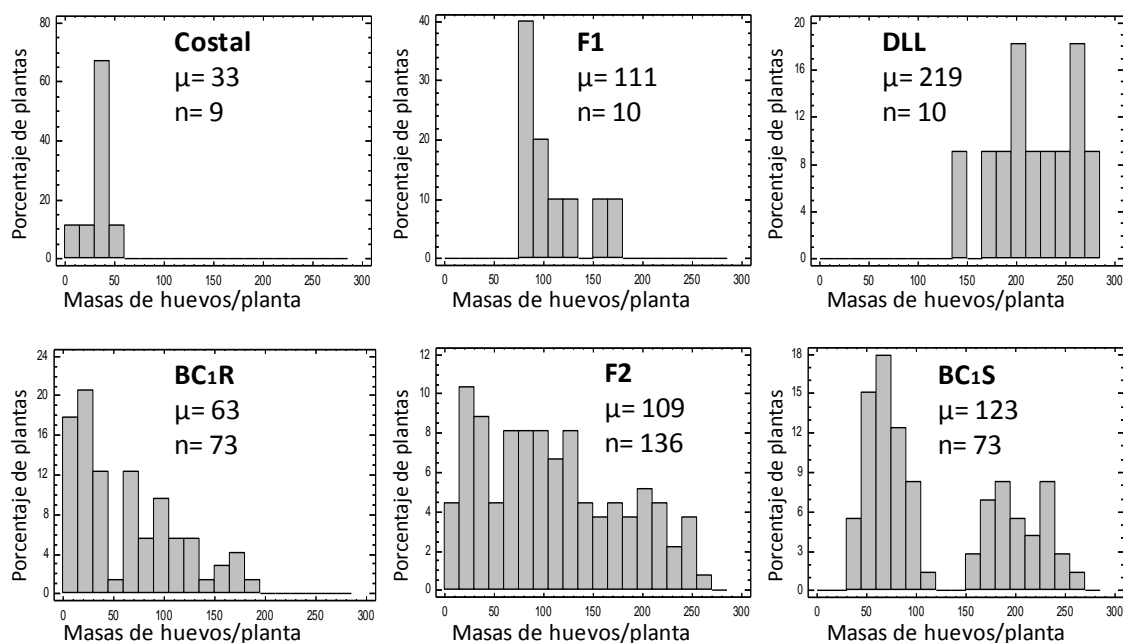


FIGURA 7.1. Distribución de frecuencias comprendidas en rangos de 10 y en una escala de 0 a 300 masas de huevos /planta, obtenidas en plantas de una familia de 6 generaciones procedente del cruce entre las variedades de pimiento ‘Costal’ x ‘DLL’, inoculadas individualmente con 400 J2 de *M. incognita*; BC1_R y BC1_S corresponden a los retrocruzamientos de la F1 hacia ‘Costal’ (parental resistente) y hacia ‘DLL’ (parental susceptible), respectivamente; μ y n indican el promedio y el tamaño de la población, respectivamente.

Modo de herencia de la resistencia de ‘Costal’

Para este análisis sólo se consideraron los datos de MHs obtenidos en la familia de 6 generaciones procedentes del cruzamiento ‘Costal’ x ‘DLL’.

Para el análisis Mendeliano se consideraron tres clases fenotípicas (R, S y MR) definidas en base a los valores de MHs obtenidos en las generaciones no segregantes (‘Costal’, ‘DLL’ y F1). Los rangos establecidos fueron 0-62 MHs para el fenotipo R, 63-162 MHs para el fenotipo MR y 163-279 MHs para el fenotipo S. En la generación BC1_R no se consideró la clase fenotípica S, incluyendo a todas las plantas con MH>62 dentro del fenotipo MR. De forma análoga, en la generación BC1_S no se consideró la clase R, incluyendo en el fenotipo MR a todas las plantas con MHs<163. Como se

indica en la tabla 7.2, el resultado de chi-cuadrado mostró un buen ajuste a un modelo teórico de segregación monogénica para las frecuencias fenotípicas estimadas en las generaciones F₂ y BC_{1R} ($p=0.452$ y $p=0.55$, respectivamente), pero no para la generación BC_{1S} ($p=0.047$) debido a la proporción notablemente mayor a la esperada de plantas con fenotipo MR.

Como el análisis genético cualitativo no fue suficientemente concluyente para determinar el modo de herencia de la resistencia en 'Costal', se llevó a cabo un análisis con métodos cuantitativos de los datos de MHs. En las generaciones BC_{1R} y BC_{1S} los coeficientes de bimodalidad obtenidos (0.578 y 0.706, respectivamente) fueron superiores al valor máximo considerado para una distribución unimodal (0.518). Además, los valores de probabilidad para una distribución normal y uniforme fueron muy bajos (0.016 y 0.003 para BC_{1R} y BC_{1S}, respectivamente). Estos resultados prueban una distribución de los valores de MHs con fuerte tendencia a la bimodalidad en las generaciones BC_{1R} y BC_{1S}, lo que pone de manifiesto que la resistencia de 'Costal' estaría controlada principalmente por un solo factor genético. Para estimar los efectos genéticos, los datos de MHs de la familia de 6 generaciones procedentes de 'Costal' x 'DLL' se transformaron mediante $\log(x+1)$. La prueba de escalas de los parámetros *ABC* resultó significativamente diferente de cero cuando se consideraron sólo efectos genéticos dominantes y aditivos, por lo que se tuvieron que incluir también efectos epistáticos entre genes. De entre todas las opciones probadas, el modelo de aditividad-dominancia con interacciones de genes aditivos x aditivos (*i*) y de genes dominantes x dominantes (*l*) resultó ser el de mayor probabilidad para la prueba de escalas *ABC* ($p=0.74$). Como se indica en la tabla 7.3, los efectos genéticos mayores fueron los dominantes (*h*) con valor negativo (tendencia hacia resistencia) y los debidos a interacción dominantes x dominantes (*l*) con valor positivo (tendencia hacia susceptibilidad). La heredabilidad en sentido amplio resultó muy elevada, con una estima de $H^2=0.908$.

TABLA 7.2. Frecuencias fenotípicas relativas a la resistencia frente a *M. incognita* obtenidas en una familia de 6 generaciones del cruce de las variedades de pimiento ‘Costal’ x ‘DLL’, y prueba de chi cuadrado para comprobar su ajuste a un modelo teórico de segregación para un factor genético de efectos aditivos.

Generación	Segregación observada (R:MR:S) ⁽¹⁾	Ratio esperado (R:MR:S) ⁽¹⁾	Valor χ^2	Valor -P
‘Costal’	9:0:0	1:0:0		
‘DLL’	0:0:11	0:0:1		
F1	0:10:0	0:1:0		
F2	40:62:34 ⁽²⁾	1:2:1	1.588	0.452
BC1 _R (F1 x ‘Costal’)	39:34:0 ⁽²⁾	1:1:0	0.342	0.55
BC1 _S (F1 x ‘DLL’)	0:45:28 ⁽²⁾	0:1:1	0.083	0.047

⁽¹⁾ Clases fenotípicas resistente (R), susceptible (S) y resistente intermedio (MR) establecidas en base al rango de MHs (número de masas de huevos por planta) obtenido en las progenies no segregantes ‘Costal’, ‘DLL’ y F1, respectivamente.

⁽²⁾ Los rangos de MHs considerados fueron: 0-63, clase fenotípica R; 64-162, clase fenotípica MR; 163-279 clase fenotípica S. En BC1_R no se consideró la clase fenotípica S, asignando todas las plantas con MHs>63 a la clase fenotípica MR. En BC1_S no se consideró la clase fenotípica R, asignando todas las plantas con MHs<163 a la clase fenotípica MR.

TABLA 7.3. Estimaciones de los efectos genéticos \pm error estándar (SE), pruebas de escalas (\pm SE), prueba de chi-cuadrado para determinar el modelo con mejor ajuste, y heredabilidad en sentido amplio para la infección por *Meloidogyne incognita* en una familia de 6 generaciones de pimiento procedente del cruzamiento ‘Costal’ x ‘DLL’.

⁽¹⁾ *m*, valor medio de los parentales; *d*, efectos aditivos; *h*, efectos dominantes; *i*, efectos aditivos x aditivos; *j*, efectos aditivos x dominantes; *l*, efectos dominantes x dominantes; *A*, *B* y *C*, prueba de escalas; H^2 , heredabilidad en sentido amplio.

⁽²⁾ Infección estimada mediante el número de masas de huevos/planta (MHs) obtenidos ocho semanas después de inocular cada planta con 400 juveniles de *Meloidogyne incognita*. Datos transformados mediante log (MHs+1).

Parámetros genéticos ⁽¹⁾	Infección por <i>M. incognita</i> ⁽²⁾
<i>m</i>	2.28 \pm 0.17
<i>d</i>	-0.41 \pm 0.03
<i>h</i>	-1.22 \pm 0.42
<i>i</i>	-0.35 \pm 0.17
<i>j</i>	...
<i>l</i>	0.98 \pm 0.26
<i>A</i>	-0.29 \pm 0.12
<i>B</i>	-0.33 \pm 0.08
<i>C</i>	-0.28 \pm 0.17
X^2	0.106 (1 df)
<i>p</i>	0.744
H^2	0.908

Prueba de alelismo entre los factores de resistencia de ‘Costal’ y ‘HDA149’

Para este análisis se consideraron los datos de MHs obtenidos en las líneas ‘Costal’, ‘HDA149’, sus respectivas generaciones F1 y F2, y la variedad ‘DLL’ utilizada como control susceptible, que se inocularon con 400 J2 de un aislado avirulento de *M. incognita*. Como era esperable ‘DLL’ mostró los niveles más altos de infección, con valores de MHs entre 105 y 192. ‘Costal’ presentó un nivel de infección claramente inferior, con valores de MHs entre 26 y 95. Por el contrario, ninguna planta de la línea ‘HDA149’, ni de la generación F1 (‘Costal’ x ‘HDA149’), portadoras del gen dominante de resistencia *Me3*, se infectó. En la generación F2 un 72% de las plantas, previsiblemente portadoras de *Me3*, no se infectaron (MHs=0), mientras que el resto mostraron valores de MHs entre 23 y 232. En esta generación las plantas se clasificaron según su valor de MHs en las clases fenotípicas TR (MHs=0), PR (MHs=1-102) y S (MHs>102), cuyos rangos de MHs se establecieron en base a los intervalos de confianza al 99% de los respectivos valores de ‘HDA149’, ‘Costal’ y ‘DLL’. En la tabla 4 se indican las frecuencias fenotípicas obtenidas y su ajuste a dos modelos teóricos de segregación de la resistencia. Como se deduce de la frecuencia de plantas susceptibles en la F2 y los valores de la prueba de chi-cuadrado, el factor genético de mayor efecto en la resistencia de ‘Costal’ sería independiente al locus de *Me3*.

TABLA 7.4. Frecuencias fenotípicas relativas a la resistencia frente a *M. incognita* obtenidas en las líneas de pimiento ‘DLL’ (susceptible), ‘Costal’(parcialmente resistente), ‘HDA149’ (portadora del gen de resistencia *Me3*) y las generaciones F1 y F2 procedentes del cruzamiento ‘Costal’ x ‘HDA149’. Se indica el valor de la prueba chi-cuadrado para dos modelos teóricos de segregación de la resistencia en la generación F2.

Genotipo	Frecuencias observadas (TR:PR:S) ⁽¹⁾	Ratio esperado (TR:PR:S) ⁽¹⁾	Valor χ^2	Valor <i>p</i>
‘DLL’ (control susceptible)	0:0:12	0:0:1		
‘HDA149’ (<i>Me3/Me3</i>)	6:0:0	1:0:0		
‘Costal’	0:17:0	0:1:0		
F1 (‘Costal x ‘HDA149’)	7:0:0	1:0:0		
F2 (‘Costal x ‘HDA149’)	119:25:21	3:1:0 ⁽²⁾ 6:1:1 ⁽³⁾
			1.117	0.572

⁽¹⁾ TR, plantas totalmente resistentes con MHs =0; PR, plantas parcialmente resistentes con MHs=1-102. S, plantas susceptibles con MHs>102. ⁽²⁾ Ratio teórico de segregación en caso de un factor de resistencia en ‘Costal’ alélico al gen *Me3*. ⁽³⁾ Ratio teórico de segregación en caso de un factor de resistencia en ‘Costal’ de efectos aditivos, e independiente del gen *Me3*.

7.5. Discusión

En los estudios precedentes, la resistencia de ‘Costal’ a *M. incognita* mostró ser de expresión cuantitativa y presentó un modo de herencia intermedio, de manera que cuando ‘Costal’ se cruzó con variedades con menor resistencia cuantitativa, el híbrido F1 exhibió un fenotipo (relativo al nivel de resistencia) intermedio entre ambos parentales (Sánchez-Solana *et al.*, 2015b). En el presente estudio, a partir de los análisis cualitativo y cuantitativo de una familia de seis generaciones obtenida al cruzar ‘Costal’ por una variedad susceptible (‘DLL’), se ha puesto de manifiesto que dicha resistencia es debida principalmente a un solo factor genético. El análisis Mendeliano (cualitativo) no puede considerarse completamente apropiado para este carácter debido a que las tres generaciones no segregantes (‘Costal’ ‘DLL’ y F1) mostraron una amplia varianza del carácter fenotipado, y a que la distribución en clases fenotípicas de las generaciones segregantes (F2, BC1_R y BC1_S) no resultó totalmente clara. No obstante, los resultados obtenidos en las generaciones F2 y BC1_R fueron acordes a la hipótesis monogénica de la resistencia. No así para BC1_S, aunque en esta generación, al igual que en BC1_R, el modelo de segregación monogénica se confirmó a través del análisis cuantitativo de los datos.

Paradójicamente, una elevada proporción de plantas de BC1_S (retrocruce de F1 hacia el parental susceptible) presentaron mayor nivel de resistencia que la F1. Así, el valor medio de MHs para el total de la población de BC1_S ($\mu=123$) fue cercano al obtenido en F1 ($\mu=109$), y muy alejado del obtenido en ‘DLL’ ($\mu=219$), cuando lo esperable era haber obtenido un valor intermedio entre F1 y ‘DLL’. Lo mismo se observó, aunque menos notable, en la generación BC1_R, con un valor medio de MHs ($\mu=63$) más cercano a ‘Costal’ ($\mu=33$) que a la generación F1 ($\mu=109$). Esto se explicaría por los efectos epistáticos puestos de manifiesto en la estima de los efectos genéticos. Así, uno de los parámetros que mostró tener mayor efecto, incrementando la susceptibilidad de la planta, fue el debido a la interacción entre genes dominantes x dominantes (*I*), cuya influencia fue máxima en el genotipo F1, pero mucho menor en los genotipos BC1_R y BC1_S.

El test de alelismo mostró que el factor genético responsable de la mayor resistencia en ‘Costal’ a *M. incognita* es diferente al gen mayor de resistencia *Me3*. Las frecuencias obtenidas en la F2 del cruce entre ‘Costal’ x ‘HDA149’ mostraron una

obtención correcta de las generaciones F1 y F2, ya que el porcentaje de plantas en la F2 totalmente resistentes (portadoras del alelo *Me3*) fue de un 72%, muy próximo al esperado (75%). Entre el 28 % de las plantas de la F2 que sí se infectaron, se encontró que prácticamente la mitad presentaron valores de masas superiores a los valores obtenidos en las plantas de 'Costal'. Este elevado ratio de plantas susceptibles permite descartar la hipótesis de alelismo o ligamiento entre el gen *Me3* y el factor genético que confiere la resistencia cuantitativa en 'Costal', ya que de haber sido alélicos ninguna planta de la F2 se hubiera infectado más que 'Costal'. Por lo tanto, también se puede descartar su alelismo a los genes *Me1* y *N*, cartografiados ambos a menos de 10cM de *Me3* (Fazari *et al.*, 2012), permitiendo afirmar la identificación de un nuevo factor genético de resistencia a *M. incognita* en pimiento.

Esta nueva fuente genética de resistencia complementa a las ya conocidas y se prevé de importante aplicación en la mejora genética de variedades de pimiento resistentes a nematodos. Su naturaleza monogénica y su elevada heredabilidad (en sentido amplio) la predisponen a una introgresión en otras variedades sencilla y efectiva. Su expresión cuantitativa le otorga, a priori, mayor durabilidad que las resistencias de tipo cualitativo, lo cual se ha mostrado en estudios anteriores (ver Capítulo III), y se ha comprobado que, generalmente, ocurre así en las resistencias cuantitativas frente a virus, hongos y bacterias de diversas especies cultivadas (Lindhout, 2002). Además, la independencia de este nuevo factor de resistencia de la región cromosómica que reúne a los genes mayores de resistencia a *M. incognita* conocidos, permiten una fácil piramidalización de éstos con la resistencia cuantitativa en líneas homocigóticas, hecho que incrementa la eficiencia de *Me1* y *Me3*, como ya se ha puesto de manifiesto anteriormente (Sánchez-Solana *et al.*, 2015b; ver Capítulo III).

7.6. Conclusiones

La resistencia cuantitativa a *Meloidogyne incognita* de la variedad 'Costal' está conferida fundamentalmente por un solo factor genético, con efectos genéticos principalmente dominantes, pero también con efectos genéticos epistáticos.

Este factor genético es independiente a los genes ya conocidos en pimiento que confieren resistencia a *M. incognita*, lo cual indica que se trata de una nueva fuente genética de resistencia en *Capsicum annuum*.

Se considera interesante una caracterización más detallada de la resistencia, y su localización en el mapa genético del pimiento mediante técnicas moleculares. Esto permitirá un mejor aprovechamiento de esta resistencia cuantitativa en la mejora genética de variedades de pimiento resistentes.

8. CAPÍTULO V

Evaluación de la alternancia en el empleo de fuentes de resistencia genética para el control de *Meloidogyne incognita* en invernaderos de pimiento



8.1. Resumen

En los invernaderos de pimiento (*Capsicum annuum*) del Campo de Cartagena, *Meloidogyne incognita* es uno de los principales patógenos edáficos. Su control mediante resistencias genéticas se erige, a medio plazo, como el método más ventajoso. Sin embargo, la emergencia de poblaciones del nematodo virulentas cuando se reitera en el mismo suelo el cultivo de porta-injertos portadores del gen de resistencia *Me3*, demanda el establecimiento de estrategias para el manejo durable de las resistencias. En este estudio se evaluó el efecto sobre la población de *M. incognita* del empleo de diferentes fuentes de resistencia, así como su eficacia cuando se reitera y cuando se alterna su uso. Las evaluaciones llevadas a cabo en dos invernaderos, mostraron que el cultivo de plantas resistentes durante una campaña junto con una desinfección posterior del suelo disminuye la incidencia del patógeno en la siguiente campaña. En un tercer invernadero, tras tres años de reiteración en el mismo suelo de diferentes fuentes de resistencia, la portada por 'Costal' no perdió eficacia, y las conferidas por los genes *Me1* y *Me3* se mostraron más durables cuando se encontraron en fondos genéticos de resistencia cuantitativa. La alternancia en el uso de fuentes de resistencia no supuso una ventaja respecto a la reiteración de las mismas, aunque su combinación con otras técnicas de control y/o su aplicación en otros invernaderos con poblaciones avirulentas del nematodo podría resultar más eficaz.

8.2. Introducción

En una prospección llevada a cabo en invernaderos del Campo de Cartagena con cultivo de pimiento se constató la presencia de *Meloidogyne incognita* en más del 50% de éstos, pese a la desinfección de los suelos en preplantación, produciendo pérdidas de cosecha y constituyendo un problema fitosanitario principal (C. Ros *et al.*, datos no publicados). La desinfección del suelo en preplantación con desinfectantes químicos ha sido el método de control más utilizado (Guerrero, 2013).

En la actualidad, la mayor parte de los invernaderos se desinfectan con la mezcla de 1,3-dicloropropeno y cloropicrina. Ambas sustancias cuentan con una autorización de uso excepcional de 120 días por año, al estar sometidas a nueva evaluación en el ámbito de las disposiciones de la Directiva Europea 91/414/EEC (Reglamento

1107/2009 on Plant Protection Products). Otra parte de los invernaderos se desinfectan mediante biosolarización, cuya eficacia muestra resultados aleatorios en el control de *M. incognita* según las condiciones ambientales y el tipo de suelo del invernadero, incluso si se inicia en agosto (Guerrero *et al.*, 2004b y 2004d). Pese a las deficiencias, esta forma de desinfección se aplica en más del 20% de los invernaderos de pimiento con cultivo convencional y en todos los calificados en agricultura ecológica (Guerrero *et al.*, 2013 y 2014b). El uso de resistencias para controlar al nematodo también ha sido utilizado en los invernaderos del Campo de Cartagena, anteriormente a través de porta-injertos y recientemente mediante el cultivo directo de variedades de calidad comercial resistentes al nematodo (Ros *et al.*, 2004b; Ros, 2012; Sánchez *et al.*, 2013). Aunque el empleo de resistencias constituye uno de los métodos más adecuados, su eficacia se ve comprometida debido a la emergencia de poblaciones virulentas de *M. incognita* (Ros-Ibáñez *et al.*, 2014).

La durabilidad de la resistencia proporcionada por un gen está relacionada, entre otros factores, con la exposición de éste al patógeno, de manera que a mayor tiempo de exposición mayor es la posibilidad de que sea remontada por la aparición de formas virulentas del patógeno. Así, el cultivo reiterado de variedades portadoras de una determinada resistencia aboca, en la mayoría de casos, a una pérdida de su eficacia, como se ha comprobado en variedades de diversas especies portadoras de resistencia a virus, hongos, nematodos o insectos (Gallun, 1972; Castagnone-Sereno, 2002; McDonald y Linde, 2002; García-Arenal y McDonald, 2003). Diversas estrategias se han postulado como eficaces para evitar la rotura de las resistencias. La rotación de cultivos, la alternancia de variedades portadoras de distinto gen de resistencia o el co-cultivo de éstas son estrategias que pueden evitar la selección y predominancia de formas virulentas del patógeno (Zhu *et al.*, 2000; Mundt *et al.*, 2002; Fabre *et al.*, 2012). El uso de métodos de control (físicos, químicos o biológicos) del patógeno que disminuyen la densidad poblacional, combinados o no con el empleo de variedades resistentes (piramidalización de genes, selección de fondos genéticos confiriendo resistencia cuantitativa) reducen las posibilidades de aparición de individuos que superan las barreras de la resistencia (Mundt, 1990; Ros *et al.*, 2011a; Quenouille *et al.*, 2013).

La aplicación de estrategias para preservar la eficacia de las resistencias a *M. incognita* en pimiento se presenta dificultosa en los invernaderos del Campo de Cartagena, debido a que, en la mayoría de casos, es un monocultivo de ciclo largo (desde diciembre hasta agosto o septiembre). Esto complica la rotación con otros cultivos, y también la biosolarización del suelo, que realizada después de agosto resulta poco eficaz para controlar *M. incognita* (Guerrero, 2013). Además, el amplio espectro de hospedantes de *M. incognita*, su elevada tasa de multiplicación, y su potencial genético para generar diversidad, le dotan de una elevada capacidad para remontar las resistencias (Castagnone-Sereno *et al.*, 2013; Barbary *et al.*, 2015).

Las prestaciones agronómicas de los tres genes mayores de resistencia a *M. incognita* en pimiento se muestran desiguales. En evaluaciones previas a este estudio realizadas en invernaderos del Campo de Cartagena, se ha comprobado que el gen *N* es ineficaz (datos no publicados), y que la resistencia del gen *Me3*, aunque es completa frente a poblaciones avirulentas, se ve remontada ya a partir del segundo año de reiteración del monocultivo en el mismo invernadero (Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). Sólo el gen *Me1* se ha mostrado eficaz en todos los casos, aún reiterando su uso en el mismo suelo durante varios años (Ros *et al.*, 2011b; Sánchez *et al.*, 2013; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). Así mismo, la nueva fuente de resistencia cuantitativa portada por la variedad ‘Costal’ (ver Capítulo III) se ha mostrado estable y se presenta como una interesante alternativa para ser explotada en el control del nematodo. Aunque se conocen las prestaciones en campo de estas fuentes de resistencia, su empleo integrado en estrategias para preservar su eficacia apenas ha sido estudiado, conociéndose únicamente un trabajo publicado, desarrollado en el sureste de Francia (Djian-Capoalino *et al.*, 2014). En él, en una serie de tres años de cultivo en invernadero, se comparó entre la piramidalización de los genes *Me1* y *Me3*, la alternancia de éstos y el co-cultivo, poniéndose de manifiesto el primer método como el más efectivo.

Con el fin de diseñar estrategias sostenibles para el control de *M. incognita* en los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena, en este estudio se evalúa el efecto sobre la población de nematodos del empleo de diferentes fuentes de resistencia, así como su eficacia cuando se reitera y cuando se alterna su uso.

8.3. Materiales y Métodos

Condiciones de cultivo

Los ensayos se llevaron a cabo en dos invernaderos (K y AT) de agricultores en los que se realizan cultivos comerciales, y en un invernadero experimental (E) del IMIDA. Todos tenían el suelo infestado por *M. incognita*, cuyas poblaciones se caracterizaron previamente como patógenas a pimiento y, en el caso de las de los invernaderos K y E, virulentas al gen *Me3*. Además, los invernaderos K y AT estaban contaminados por el oomiceto *Phytophthora parasitica*. Las plantaciones se llevaron a cabo entre mediados de diciembre y principios de enero, extendiéndose el periodo de cultivo hasta la primera semana de agosto, o hasta finales de septiembre en el invernadero K. Las parcelas elementales estuvieron compuestas por una fila de plantas al marco de plantación de 0.4 m entre plantas y 1 m entre filas. La conducta de las plantas y las técnicas culturales fueron las habituales de la zona. En todos los invernaderos se llevó a cabo control integrado de plagas y enfermedades sin aplicaciones de plaguicidas al suelo.

En todos los invernaderos, las plantas de los genotipos a evaluar se utilizaron como porta-injertos. Sobre éstos se injertaron las variedades comerciales tipo California ('Gacela' en E y AT, y 'Traviata' en K), que también se utilizaron sin injertar como referencia susceptible.

Diseño experimental

En los invernaderos K y AT se plantearon sendos ensayos con el fin de estimar los efectos del cultivo de plantas resistentes sobre la incidencia de los daños en la campaña de cultivo posterior. En la tabla 8.1 se esquematizan los tratamientos y se indican los genotipos utilizados. En cada invernadero se establecieron tres tratamientos denominados como T-S, T-Me1 y T-Me3. En la primera campaña de cultivo (2012) se cultivaron genotipos de diferente fuente de resistencia a *M. incognita*: Susceptibles en T-S; portadores del gen *Me1* en T-Me1; y portadores del gen *Me3* en T-Me3. El diseño fue de bloques al azar con tres repeticiones por genotipo, correspondiendo cada repetición a una parcela de 53 plantas en el invernadero K y 38 plantas en el invernadero AT. En el segundo año en todos los tratamientos se cultivó únicamente la variedad comercial susceptible (sin injertar). Entre las dos campañas de cultivo se llevó

a cabo una desinfección del suelo, mediante biosolarización tardía (septiembre) en el invernadero AT, y mediante aplicación de mezcla 1,3-dicloropropeno + cloropicrina en el invernadero K. Las tareas de laboreo de la tierra se hicieron con especial cuidado para no mezclar la tierra entre parcelas.

TABLA 8.1. Tratamientos y genotipos de pimiento cultivados en cada campaña en los invernaderos K y AT.

Invernadero	Tratamiento	Genotipos cultivados 2012 ¹	Genotipos cultivados 2013 ¹
K	T-Susceptible	Traviata (S)	Traviata (S)
	T-Me1	Terrano (<i>Me1</i>) y P18 (<i>Me1</i>)	Traviata (S)
	T-Me3	Atlante (<i>Me3</i>), DRO3416 (<i>Me3</i>) y D3s (<i>Me3</i>)	Traviata (S)
AT	T-Susceptible	Gacela (S) y S1820 (S)	Gacela (S)
	T-Me1	HDA330 (<i>Me1</i>) y C1(<i>Me1</i>)	Gacela (S)
	T-Me3	Creonte (<i>Me3</i>) y D3s (<i>Me3</i>)	Gacela (S)

¹ (S), (*Me1*), (*Me3*) indican genotipos susceptibles, portadores del gen de resistencia *Me1* o del gen *Me3*, respectivamente. Traviata y Gacela son variedades de tipo California rojo de Rijk Zwaan S.A. y Syngenta S. A., respectivamente. El resto son porta-injertos de Syngenta (Terrano), Monsanto (Creonte y DRO3416), Ramiro Arnedo (Atlante) e IMIDA (P18, D3s, HDA330 y C1).

En el invernadero E se planteó un ensayo para estimar y comparar los efectos sobre la eficacia de las fuentes de resistencia cuando se reitera o se alterna su uso. El ensayo se desarrolló en la campaña de cultivo 2014. En la tabla 8.2 se indican los tratamientos y genotipos utilizados. Las parcelas de cultivo se clasificaron en 6 tratamientos, que se establecieron en función de la fuente de resistencia portada por los genotipos cultivados en las dos campañas precedentes (2012 y 2013), en las cuales se reiteró su cultivo en la misma parcela (ver Capítulo III). Los tratamientos fueron: T-S, donde se cultivaron genotipos susceptibles; T-Me1, donde se cultivaron genotipos portadores de *Me1*; T-Me3, donde se cultivaron genotipos portadores de *Me3*, T-Costal, donde se cultivó ‘Costal’ (genotipo con resistencia cuantitativa); T-Me1QR y TMe3QR, donde se cultivaron genotipos portadores de resistencia cuantitativa y de *Me1* o *Me3*. En la campaña 2014 se utilizaron seis genotipos, uno por cada fuente de resistencia, que fueron: ‘Gacela’ sin injertar (Susceptible), ‘Costal’, ‘A1’ (*Me1*), ‘HDA330’ (*Me1QR*), ‘A3h’ (*Me3*) y ‘C3s’ (*Me3QR*). Cada uno se cultivó en parcelas pertenecientes al tratamiento de la campaña precedente de similar fuente de resistencia, reiterando así el

cultivo de la misma fuente de resistencia. Además, ‘Gacela’, ‘Costal’, ‘HDA330’ y ‘C3s’ también se cultivaron en parcelas donde se había utilizado diferente fuente de resistencia en la campaña precedente, alternando en estos casos la fuente de resistencia. El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones por genotipo y tratamiento, correspondiendo cada repetición a una parcela de 10 plantas al marco de 0.40 m de separación entre plantas y 1.0 m de separación entre filas.

TABLA 8.2. Tratamientos y genotipos de pimiento cultivadas en cada campaña en el invernadero E.

Tratamiento	Genotipos cultivados en 2012 y 2013 ¹	Genotipos cultivados en 2014 ^{1,2}
T-S	<i>Susceptibles:</i> Gacela, Americano, Belrubí, Yolo Wonder	Gacela (S) Costal HDA330 (Me1QR) C3s (Me3QR)
T-Me1	<i>Portadores de Me1:</i> A1, Y1	Gacela (S) A1 (Me1)
T-Me3	<i>Portadores de Me3:</i> A3h, A3s, Y3h, Y3s	Gacela (S) Costal HDA330 (Me1QR) A3h (Me3)
T-Costal	Costal	Costal
T-Me1QR	<i>Portadores de Me1 y resistencia cuantitativa:</i> HDA330, Terrano, C1, B1, D1	Gacela (S) Costal HDA330 (Me1QR) C3s (Me3QR)
T-Me3QR	<i>Portadores de Me3 y resistencia cuantitativa:</i> C19, C3, C3s	Gacela (S) HDA330 (Me1QR) C3s (Me3QR)

¹ Gacela es una variedad tipo California rojo de Syngenta S. A. El resto de genotipos se utilizaron como porta-injertos y proceden del IMIDA.

² (S), variedad susceptible; (Me1) y (Me3), variedad portadora del gen de resistencia *Me1* y *Me3*, respectivamente; (Me1QR) variedad portadora de *Me1* y resistencia cuantitativa; (Me3QR) variedad portadora de *Me3* y resistencia cuantitativa.

Evaluación de los daños en plantas y análisis de los datos

La incidencia de *M. incognita* se evaluó al finalizar el cultivo. De cada parcela se arrancaron al menos 5 plantas tomadas al azar, se examinaron las raíces y se estimó el daño causado por el nematodo siguiendo la escala de 0 a 10 del índice de nodulación (IN) desarrollada por Bridge y Page (1980). Los valores de IN obtenidos en cada

campaña en los invernaderos K y AT se analizaron mediante ANOVA a dos vías para los factores ‘fuente de resistencia’, ‘repetición’ y la interacción ‘fuente de resistencia x repetición’. Se utilizó la prueba LSD al 95% de confianza para la diferenciación de medias. Los valores de IN obtenidos en el invernadero E en la campaña 2014 se compararon con los obtenidos en la campaña precedente (2013) mediante la prueba T-student, dentro de un mismo tratamiento y genotipos con similar fuente de resistencia. Además, los valores de IN de este invernadero obtenidos en la campaña 2014 en cada variedad se analizaron mediante ANOVA simple para el factor ‘Tratamiento’.

8.4. Resultados

Efecto en la incidencia de *M. incognita* en plantas susceptibles tras el cultivo de plantas resistentes

Se consideraron los datos procedentes de los ensayos planteados en los invernaderos K y AT. En los dos invernaderos y en ambas campañas de cultivo (2012 y 2013) el ANOVA con los IN obtenidos resultó significativo para el factor ‘Tratamiento’, pero no lo fue para el factor ‘Repetición’ ni para la interacción ‘Tratamiento x Repetición’ (tabla 8.3). Esto indica que los efectos sobre el patógeno fueron debidos predominantemente a la fuente de resistencia utilizada, con independencia del genotipo portador de ésta.

En el invernadero AT (población de *M. incognita* avirulenta), en la primera campaña, las plantas de los genotipos susceptibles (tratamiento T-S) presentaron elevados índices de nodulación, mientras que los genotipos portadores de genes mayores de resistencia (tratamientos T-Me1 y T-Me3) apenas mostraron síntomas de infección (tabla 8.4). En la segunda campaña, en la cual sólo se utilizó la variedad susceptible ‘Gacela’, se encontraron daños por *Meloidogyne* en todas las parcelas de cultivo, aunque con incidencia notablemente menor en aquellas donde el año anterior se habían cultivado plantas con genes de resistencia, correspondientes a los tratamientos T-Me1 y T-Me3 (tabla 8.4).

En el invernadero K (población de *M. incognita* virulenta al gen *Me3*), las plantas del genotipo susceptible y las de los tres genotipos portadores de *Me3* (tratamientos T-S y T-Me3) presentaron elevados índices de nodulación en la primera campaña, mientras

que en las plantas de los dos genotipos portadores de *Me1* (tratamiento T-Me1) apenas se encontraron síntomas de daños en las raíces (tabla 4). En la segunda campaña se observó una incidencia de *M. incognita* mucho menor en las plantas de la variedad susceptible ‘Traviata’ que se cultivaron en las parcelas de T-Me1, que en las que se cultivaron en T-S y T-Me3.

TABLA 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) de los valores del índice de nodulación obtenidos en plantas cultivadas en los invernaderos AT y K en las campañas 2012 y 2013.

Invern.	Fuente	Gl	Campaña 2012		Campaña 2013	
			Razón-F	Valor-P ¹	Razón-F	Valor-P ¹
AT	Efectos principales					
	<i>Tratamiento</i>	2	632.52	<10 ⁻⁴ *	12.16	0.0028*
	<i>Repetición</i>	2	0.39	0.6898	1.95	0.1979
	Interacción					
	<i>Tratamiento*Repetición</i>	4	0.37	0.8219	2.13	0.1589
	Residuos	9				
	Total	17				
K	Efectos principales					
	<i>Tratamiento</i>	2	30.14	10 ⁻⁴ *	6.25	0.0199*
	<i>Repetición</i>	2	0.18	0.8392	0.06	0.9392
	Interacción					
	<i>Tratamiento*Repetición</i>	4	0.17	0.9486	0.29	0.8771
	Residuos	9				
	Total	17				

¹ Valores inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Se indican con *

TABLA 8.4. Índice de nodulación (IN) medio obtenido en dos campañas consecutivas en plantas de pimiento cultivadas en un invernadero (AT) con población de *M. incognita* avirulenta y en otro (K) con población virulenta al gen *Me3*.

Tratamiento ¹	Invernadero AT		Invernadero K	
	IN 2012 ²	IN 2013 en variedad susceptible (Gacela) ^{2,3}	IN 2012 ²	IN 2013 en variedad susceptible (Traviata) ^{2,3}
T-S	5.2±0.4	6.0±0.6 b	4.1±0.5	2.3±0.1 b
T-Me1	0.0±0.1	3.2±0.5 a	0.1±0.2	0.7±0.4 a
T-Me3	0.0±0.0	4.3±0.3 a	4.3±1.1	2.3±1.0 b

¹ Corresponde a parcelas donde se cultivaron en la campaña de 2012 genotipos susceptibles a *M. incognita* (T-S), o portadores de los genes de resistencia *Me1* o *Me3* (T-Me1 y T-Me3, respectivamente).

² Índice de nodulación estimado en una escala de 0 (sin daños en la raíz) a 10 (raíz completamente dañada), según establecieron Bridge y Page (1980).

³ Letras diferentes en la misma columna indican valores de IN significativamente diferentes (ANOVA y prueba LSD; $p < 0.05$).

Efecto sobre la eficacia de las fuentes de resistencia cuando se reitera o se alterna su uso

Se consideraron los datos procedentes del ensayo desarrollado en el invernadero E. En la tabla 8.5 se indican los valores de IN obtenidos en 2013 y 2014 en cada tratamiento, y los resultados de los análisis estadísticos. La comparación en cada tratamiento mediante la prueba t-student de los IN obtenidos en 2013 y 2014, en variedades portadoras de similar fuentes de resistencia, mostró diferencias significativas en el caso de ‘Costal’, con una disminución en el último año del IN. En las parcelas donde se utilizó el gen *Me1* (T-Me1) se observó un incremento del IN, pasando de 0.6 en 2013 a 1.6 en 2014, aunque las diferencias no llegaron a ser completamente significativas ($p=0.07$). En los demás tratamientos los IN de 2014 fueron parecidos a los de 2013, sin diferencias significativas.

La comparación mediante ANOVA de los IN obtenidos en 2014 en plantas del mismo genotipo cultivado en parcelas de diferente tratamiento no mostró diferencias significativas en ninguno de los cuatro casos. La variedad susceptible ‘Gacela’ se cultivó en todos los tratamientos, excepto en T-Costal, y fue la que presentó los mayores valores de IN. ‘HDA330’, portador de *Me1* y resistencia cuantitativa, se comportó como totalmente resistente en los cuatro tratamientos donde se cultivó (T-S,

T-Me1QR, T-Me3 y T-Me3QR). ‘Costal’ se cultivó en T-S, T-Costal, T-Me1QR y T-Me3, y en todos mostró valores de IN notoriamente bajos (entre 0.8 y 1.4). ‘C3s’, portadora de *Me3* y resistencia cuantitativa, mostró un IN ligeramente inferior cuando se cultivó en T-S y T-Me1QR (1.3 y 1.8 respectivamente) que cuando se reiteró su cultivo en parcelas T-Me3QR (2.1) aunque estas diferencias no llegaron a ser significativas ($p=0.17$).

TABLA 8.5. Índice de nodulación (IN) obtenido en el invernadero E, en cada tratamiento en la campaña 2013, y en cada tratamiento y genotipo en la campaña 2014. En la última columna se indica el valor-P de la prueba T-student al comparar en cada tratamiento el IN de 2013 con el obtenido en 2014 (en negrita) en un genotipo con similar fuente de resistencia que la indicada en el tratamiento. En la última fila se indican los valores-P resultantes del análisis de la varianza de los valores de una misma columna (mismo genotipo cultivado en tratamientos diferentes).

Tratami. ¹	IN 2013 ²	IN 2014 ²						valor-P prueba-T ³
		Genotipos cultivados (y fuente de resistencia a <i>M. incognita</i>)						
		Gacela (Suscp)	Costal	A1 (Me1)	HDA330 (Me1QR)	A3h (Me3)	C3s (Me3QR)	
T-S	4.6±0.9	3.3±0.9	1.2±0.2	nc	0.1±0.0	nc	1.3±0.2	0.38
T-Costal	2.5±0.3	nc	1.2±0.1	nc	nc	nc	nc	0.005 (*)
T-Me1	0.6±0.2	4.2±0.6	nc	1.6±0.4	nc	nc	nc	0.07
T-Me1QR	0.2±0.1	4.8±0.3	0.8±0.2	nc	0.2±0.1	nc	1.8±0.4	0.75
T-Me3	4.8±0.5	3.3±0.2	1.4±0.3	nc	0.0±0.0	4.4±0.5	nc	0.60
T-Me3QR	2.8±0.7	4.4±0.6	nc	nc	0.1±0.0	nc	2.1±0.3	0.46
valor-P (ANOVA)³		0.37	0.40		0.15		0.17	

¹ Tratamiento. Corresponde a parcelas donde se cultivaron en la campaña de 2012 variedades susceptibles a *M. incognita* (T-S), portadoras de los genes de resistencia *Me1* o *Me3* (T-Me1 y T-Me3, respectivamente), y portadoras de los genes de resistencia *Me1* o *Me3* mas resistencia cuantitativa (T-Me1QR y T-Me3QR, respectivamente).

² Índice de nodulación estimado en una escala de 0 (sin daños en la raíz) a 10 (raíz completamente dañada), según establecieron Bridge y Page (1980). nc: no cultivado

³Valores $P<0.05$ indican diferencias significativas, indicados con (*)

8.5. Discusión

Disminución de la población de *M. incognita* por el cultivo de plantas resistentes

En determinados sistemas, el cultivo de plantas resistentes puede tener un efecto reductor sobre las poblaciones de la plaga o del patógeno, al tener éste limitada la

disponibilidad de hospedantes. Djian-Caporalino *et al.* (2014) observaron una disminución en la población de *M. incognita* tras cultivar plantas de pimiento portadoras del gen *Me1*, pero no se observó después de cultivar plantas susceptibles. En nuestro trabajo, se ha puesto de manifiesto que el uso de plantas resistentes (gen *Me1* en invernaderos K y AT, y gen *Me3* en invernadero AT) disminuye la incidencia de los daños de *M. incognita* en la siguiente campaña de cultivo. Sin embargo, esto no ocurrió en el invernadero E, donde el nematodo afectó por igual a plantas susceptibles con independencia de los antecedentes de la parcela de cultivo.

Esta discrepancia en los resultados entre el invernadero E y los invernaderos AT y K puede ser debida al efecto de la desinfección del suelo aplicada entre campañas de cultivo. Así, en los invernaderos K y AT, la combinación del cultivo de plantas resistentes y desinfección del suelo probablemente disminuyó las densidades de población a niveles lo suficientemente bajos como para obtener menores daños en las plantas al final de la siguiente campaña de cultivo. Sin embargo, el efecto individual de las resistencias, evaluado en el invernadero E, pudo reducir las densidades del nematodo, pero no lo suficiente como para evitar que, en ciclos de cultivo tan prolongados, el nematodo vuelva a alcanzar altas densidades. Este sinergismo entre los efectos de las resistencias y los efectos de la desinfección del suelo en el control de *M. incognita* se observó en un trabajo previo (Ros *et al.*, 2011a). En éste se obtuvo que, en invernaderos de pimiento, el cultivo de porta-injertos portadores del gen de resistencia *Me3* combinado con técnicas de biosolarización evitaba el desarrollo de poblaciones del nematodo virulentas al gen.

Pérdida de eficacia de las resistencias debido a su uso reiterado

En trabajos anteriores se puso de manifiesto que el uso reiterado de los genes *Me3* y *N* puede provocar el desarrollo de poblaciones virulentas de *M. incognita*, no ocurriendo así para la resistencia conferida por *Me1* (Ros, 2012; Ros-Ibáñez *et al.*, 2014). También se vio que las prestaciones agronómicas de la resistencia cuantitativa conferida por el fondo genético del pimiento no fueron erosionadas tras dos años de reiteración del cultivo, aunque en combinación con los genes *Me1* o *Me3* en un mismo genotipo no evitó un aumento de la incidencia del nematodo (ver Capítulo III).

En el presente estudio, en el que se han vuelto a reiterar las resistencias durante un tercer año de cultivo, se ha confirmado la estabilidad de la resistencia cuantitativa de 'Costal' que incluso mostró un descenso del IN con respecto a la anterior campaña. Respecto a los genes *Me1* y *Me3*, cuando se combinaron con resistencia cuantitativa (genotipos 'HDA330' y 'C3s') mantuvieron el mismo nivel de resistencia que el exhibido en la campaña precedente. Sin embargo, cuando *Me3* se introgresó en un fondo genético susceptible ('A3h') el nivel de daños por *M. incognita* fue, al igual que en la campaña precedente, de la misma magnitud que el obtenido en plantas susceptibles, confirmando la completa virulencia a *Me3* de la población del patógeno en esas parcelas de cultivo. En el caso de la eficacia de *Me1* en un fondo genético susceptible (genotipo 'A1'), el incremento del IN, aunque no llegó a considerarse estadísticamente significativo, fue semejante al obtenido por Djian-Caporalino *et al.* (2014). Los mencionados autores obtuvieron un incremento en la incidencia de los daños de *M. incognita* cuando *Me1* se introgresó en un fondo genético susceptible, pero no así en el genotipo 'HDA330'. Esto evidencia la posibilidad de una emergente virulencia de *M. incognita* hacia *Me1* que, en cierta medida, puede ser prevenida con la ayuda de fuentes de resistencia cuantitativa.

La alternancia en el uso de resistencia como método para preservar su eficacia

La alternancia del uso de fuentes de resistencia es una estrategia agronómica muy recomendada para preservar su efectividad. Sin embargo, los trabajos documentados son muy escasos. Djian-Caporalino *et al.* (2014) ensayaron durante tres campañas de cultivo consecutivas esta técnica, alternando los genotipos de pimiento 'HDA149' (*Me3*) y 'HDA330' (*Me1*), obteniendo un mejor control de *M. incognita* que la reiteración del 'HDA330' y que el co-cultivo en la misma parcela de 'HDA330' y 'HDA149'. En cambio, los resultados del presente estudio no mostraron, en ninguno de los casos, un mejor control del nematodo cuando se alternaron diferentes fuentes de resistencia respecto a cuando se reiteró su uso.

Varias causas pueden explicar que, en el invernadero E, la alternancia de las resistencias no supusiera una ventaja respecto a la reiteración. Por un lado, el efecto intrínseco de la resistencia explicaría los resultados obtenidos con 'HDA330' (*Me1QR*) que apenas se infectó, con independencia de la parcela del tratamiento en el que se

cultivó. Por otro lado, para ‘Costal’ y ‘C3s’ cultivados en T-Me1QR cabía esperar valores de infección más bajos que cuando se cultivaron en parcelas de otros tratamientos. Posiblemente, como anteriormente se ha argumentado, en el caso de ‘Gacela’ (susceptible), la reducción de la densidad poblacional del nematodo debida únicamente al cultivo de genotipos portadores del gen *Me1* (sin desinfección adicional del suelo) fue insuficiente como para repercutir al final de la siguiente campaña en una disminución de los daños en las raíces.

Además, los similares índices de nodulación obtenidos para C3s en los tres tratamientos en los que se cultivó, explicarían una irreversibilidad del proceso de adquisición de la virulencia a *Me3* de la población de *M. incognita*. Es decir, el carácter de incipiente desarrollo de virulencia de la población del patógeno (así determinado al inicio de los ensayos) no desapareció en los tratamiento T-S y T-Me1, en cuyas parcelas no hubo presión de selección hacia la virulencia. Casos similares se han observado tanto en condiciones de campo como de laboratorio, donde poblaciones o aislados virulentos a *Me3* mantienen tal condición tras sucesivas multiplicaciones en variedades de pimiento susceptibles (C. Ros, comunicación personal).

Implicaciones prácticas en el desarrollo de estrategias de manejo durable de las resistencias

Estos resultados son de gran interés y aplicación para el control de *M. incognita* en los cultivos de pimiento, ya que han sido obtenidos en las mismas condiciones que los cultivos comerciales. En base a esto, en invernaderos que presenten poblaciones avirulentas del nematodo, la alternancia de diferentes fuentes de resistencia combinada con desinfección del suelo puede ser una estrategia eficaz para preservar la efectividad de las resistencias. En invernaderos donde la población del nematodo haya remontado la resistencia a *Me3*, el uso de variedades con el gen *Me1* y o con resistencia cuantitativa (como ‘Costal’) pueden resultar eficaces, reduciendo las infecciones del patógeno, y que en alternancia e integración con otros métodos de control, puede constituir una estrategia de control durable. Además, con independencia de la estrategia a seguir, el empleo de genes mayores de resistencia debe de hacerse preferiblemente con variedades que, además, porten factores genéticos de resistencia cuantitativa, lo cual, como ya se

puso de manifiesto en un trabajo previo (Barbary *et al.*, 2014) se ha de tener en cuenta en los procesos de obtención de nuevas variedades.

8.6. Conclusiones

El uso de plantas portadoras de los genes de resistencia *Me1* y *Me3* (este gen, en invernaderos con población del patógeno avirulenta), además de evitar los daños ocasionados por *M. incognita*, puede reducir su densidad poblacional, lo cual, en combinación con otras técnicas de control, contribuye a preservar la eficacia de las resistencias.

Tras tres campañas consecutivas de uso en el mismo suelo, la resistencia de 'Costal', de expresión cuantitativa, ha mantenido su eficacia. Sin embargo, se confirma la fugacidad de la resistencia de *Me3* y se advierte del incipiente desarrollo de virulencia hacia *Me1*, sobre todo cuando se encuentran en un fondo genético susceptible. La combinación de *Me1* y *Me3* con factores de resistencia cuantitativa en un mismo genotipo puede ayudar a preservar su eficacia.

En las condiciones ensayadas, el método de alternancia en el uso de fuentes de resistencia no supuso una ventaja respecto a la reiteración de las mismas. Sin embargo, se prevé que dicho método, en combinación con otras técnicas (biosolarización) y/o en invernaderos con población avirulenta del nematodo, sí incremente la eficacia en el control del patógeno.

En futuros estudios de uso de fuentes de resistencia a *M. incognita*, la inclusión de otros parámetros no contemplados en este trabajo, como la determinación de las densidades poblacionales y la naturaleza virulenta del patógeno, pueden permitir un conocimiento más detallado del efecto de dichas resistencias, y por tanto un uso más certero en estrategias integradas para el control sostenible y durable de *M. incognita*.

9. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se han hallado cinco nuevas variedades de pimiento con resistencia total o parcial a *Meloidogyne incognita*: 'Costal', 'Dátler', 'P13', 'P14' y 'CT5'. Estas variedades constituyen un interesante material para su empleo en la mejora genética de variedades y porta-injertos de pimiento.
2. La resistencia conferida por el fondo genético de 'Costal' y 'Dátler' es de expresión cuantitativa. En las líneas 'HDA330' (portadora de *Me1*) y 'Serrano Criollo de Morelos' (portadora de *Me3*) también se han identificado ciertos niveles de resistencia cuantitativa controlada por su fondo genético, que es adicional a la conferida por los genes mayores de resistencia que portan dichas líneas.
3. Se ha puesto de manifiesto que la resistencia cuantitativa controlada por el fondo genético del pimiento es de amplio espectro, con eficacia frente a poblaciones de *M. incognita* avirulentas y virulentas al gen *Me3*, y presenta efectos genéticos aditivos o parcialmente dominantes.
4. Se ha demostrado la eficacia de la resistencia cuantitativa cuando las plantas se han empleado como porta-injertos y se han cultivado en invernaderos con suelo infestado naturalmente por *M. incognita*, no detectándose una pérdida de su eficacia tras dos campañas de reiterado uso en el mismo suelo.
5. Algunos aislados de *M. incognita* presentan menor aptitud reproductiva hacia genotipos con factores de resistencia cuantitativa y hacia portadores de *Me1*, pero no hacia genotipos totalmente susceptibles. Se sospecha de que la adquisición de virulencia del nematodo a *Me3* pueda motivar tal pérdida de aptitud reproductiva.
6. Se ha reafirmado, en condiciones controladas y en cultivo en invernadero, la elevada estabilidad y durabilidad del gen mayor de resistencia *Me1*, y la inestabilidad del gen *Me3*.

CONCLUSIONES GENERALES

7. La introgresión del gen *Me1* en un fondo genético con resistencia cuantitativa le confiere mayor eficiencia en el control de *M. incognita*. La introgresión de *Me1* en un fondo genético muy susceptible le predispone de mayor vulnerabilidad frente al nematodo, lo que facilita el potencial desarrollo de poblaciones virulentas.

8. En genotipos portadores de *Me3*, el fondo genético no influye sobre el desarrollo de virulencia de la población del nematodo a dicho gen, una vez el proceso se ha iniciado. Sin embargo, frente a poblaciones avirulentas, el fondo genético sí puede influir sobre la durabilidad de *Me3*.

9. En la variedad 'Costal' se ha constatado un elevado nivel de resistencia cuantitativa, que se ha mostrado eficaz tras tres años de cultivo como porta-injertos en el mismo suelo. Su utilización como fuente de resistencia se considera una alternativa factible a las resistencias cualitativas, especialmente en aquellos invernaderos con poblaciones de *M. incognita* virulentas al gen *Me3*.

10. La resistencia de 'Costal' 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*.

11. El cultivo de porta-injertos resistentes, portadores de *Me1* y de *Me3* (este gen, en invernaderos con población del patógeno avirulenta), además de evitar los daños ocasionados por *M. incognita*, puede reducir su densidad poblacional. Esto resulta trascendente en el diseño de estrategias para el uso durable de las resistencias a nematodos.

12. Desde un punto de vista aplicado a los cultivos de pimiento en invernadero, la utilización de los genes *Me1* y *Me3* como método de control de nematodos, ha de hacerse, desde el inicio, con variedades que, además, incorporen resistencia cuantitativa, ya que pueden incrementar la durabilidad de los genes-R.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, P., Favery, B., Rosso, M.N. y Castagnone-Sereno, P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4(4): 217-224.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th ed. Elsevier Academy. Burlington (EE.UU.). 922 pp.
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P.L., Roose, M.L. y Kim, S.C. 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chili peppers (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botanic*, 96: 1190-1202.
- Alemán, S., Costa, J.C., Fernández, V., y Martínez, V. 1982. Orígenes del pimiento. Iniciación de su cultivo y explotación en la Región de Murcia. En: C.F. Alacaraz (ed. coord.), *Estudio sectorial de pimiento para pimentón*. Consejería de Agricultura, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Murcia. Pág: 15-18.
- Andrews J. 1984. *Pepper, The domesticated Capsicum*. Austin, Texas, University of Texas Press, 163 pp.
- Ayliffe, M., Singh, R. y Lagudah, E. 2008. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opin Plant Biology*, 11(2): 187-192.
- Barbary, A., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Castagnone-Sereno, P. y Djian-Caporalino, C. 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(2): 499-507.
- Barbary, A., Djian-Caporalino, C., Palloix, A., y Castagnone-Sereno, P. 2015. Host genetic resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in Solanaceae: from genes to the field. *Pest Management Science*, 71(12): 1591-1598.
- Bartual, R., Lacasa, A., Marsal, J.I. y Tello J.C. 1993. Efectos epistáticos en la resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento (*Capsicum annuum*). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 19 (3): 485-490.
- Bartual, R., Carbonell, E.A., Marsal, J.I., Tello, J. y Campos, T. 1991. Gene action in the resistance of peppers (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora* stem blight (*Phytophthora capsici* L.). *Euphytica*, 54: 195-200.

- Bello, A., Escuer, M. y Arias, M. 1994a. Nematological problems, production systems and Mediterranean environments. *Bulletin OEPP/EPPO*, 24: 383-391
- Bello, A., Escuer, M. y Pastrana, M.A. 1994b. Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. En: G. Llácer, M.M. López, A. Trapero y A. Bello (eds.), *Patología vegetal*. SEF, Valencia. Pág: 1039-1069.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., García Álvarez, A., Arcos, S.C., Ros, C., Guerrero, M.M., Guirao, P. y Lacasa, A. 2004. Biofumigación con solarización para el control de nematodos en cultivo de pimiento. En A. Lacasa, M.M. Guerrero, M. Oncina y J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Pág: 129-208.
- Berthou, F., Palloix, A. y Mugniery, D. 2003. Characterisation of virulence in populations of *Meloidogyne chitwoodi* and evidence for a resistance gene in pepper *Capsicum annuum* L. line PM 217. *Nematology*, 5: 383-390.
- Blaya, J., Lacasa, C.M., Lacasa, A. y Pascual, J.A. 2014. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates in south-east Spain and their detection and quantification through a real-time TaqMan PCR. *Journal Science Food Agriculture*. Doi: 10.1002/jsfa.6813.
- Bleve-Zacheo, T., Bongiovanni, M., Melillo, M. y Castagnone-Sereno, P. 1998. The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science*, 133: 79-90.
- Bojórquez-Quintal, E., Velarde-Buendía, A., Ku-González, A., Carillo-Pech, M., Ortega-Camacho, D., Echevarría-Machado, I. y Martínez-Estévez, M. 2014. Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): Proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Frontiers in plant science*, 5, 605. Doi: 10.3389/fpls.2014.00605.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A. M., Caromel, B. y Lefebvre, V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics*, 115(2): 253-264.

- Bosland, P.W. y Votava E.J. 2000. Peppers: vegetable and spice capsicum. CABI, vol. 22. Cambridge, Massachusetts (EE.UU.). 204 pp.
- Boukema, I. W. 1980. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum L. Euphytica*, 29: 433-439.
- Boukema, I.W. 1984. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum Newsletter*, 3: 47-48.
- Bridge, J.S. y Page, L.J. 1980. Estimation of root-knot nematodes infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management*, 26: 296-298.
- Brun, H., Chevre, A.M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. y Andrivon, D. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytology*, 185: 285-299.
- Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., van de Weg, E., Expert, E., Denancé, C., Didelot, F., Le Cam, B. y Durel, C. E. 2014. Erosion of quantitative host resistance in the apple x *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution*, 27: 481-489.
- Cánovas, F. 1996. *Santomera y los pimientos*. Santomera, Murcia. 133 pp.
- Caranta, C., Palloix, A., Gebre-Selassie, K., Lefebvre, V., Moury, B. y Daubeze, A. M. 1996) A complementation of two genes originating from susceptible *Capsicum annuum* lines confers a new and complete resistance to pepper veinal mottle virus. *Phytopathology*, 86 (7): 739-743.
- Caranta, C., Palloix, A., Lefebvre, V. y Daubeze, A.M. 1997a. QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper: restriction of virus installation in hostcells. *Theoretical Applied Genetics*, 94: 431-438.
- Caranta, C., Lefebvre, V., y Palloix, A. 1997b. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 10: 872-878.
- Caranta, C., Pxiege, S., Lefebvre, V., Daubeze, A.M., Thabuis, A. y Palloix, A. 2002. QTLs involved in the restriction of Cucumber mosaic virus (CMV) long-distance movement in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 586-591.

- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., Palloix, A. y Dalmasso, A. 1996. Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistance determinants. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 585-590.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M. y Djian-Caporalino, C. 2001. New data on the specificity of the root-knot nematode resistance genes *Me1* and *Me3* in pepper. *Plant Breeding*, 120: 429-433.
- Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? *Euphytica*, 124: 193-99.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., Wajnberg, E. 2007. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. *Evolutionary Ecology*, 21: 259-270.
- Castagnone-Sereno, P., Semblat, J.P. y Castagnone, C. 2009. Modular architecture and evolution of the map-1 gene family in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Genetic Genomics*, 282: 547-554.
- Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., Perfus-Barbeoch, L. y Abad, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 203-220.
- Castillo, P., Vovlas, N., Subbotin, S. y Troccoli, A. 2003. A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp.(Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology*, 93(9), 1093-1102.
- Castillo, P. 2010. Book review. *Nematology*, 12: 483-484.
- Catálogo común de variedades de especies de plantas hortícolas, Trigésima segunda edición integral. *Diario Oficial de la Unión Europea*, Comunicación de la Comisión Europea. DOUE núm. C 312 A de 26/10/2013.
- Cenis, J. L. y Fuchs, P. 1988. Efecto comparado de la solarización y el metam-sodio en un cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en invernadero. *ITEA*, 75: 21-32.

- Chaim, B.A., Grube, R.C., Lapidot, M., Jahn, M. y Paran, I. 2001. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to Cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Theoretical Applied Genetics*, 102: 1213-1220.
- Chitwood, D.J. y Perry, R.N. 2009. Reproduction, physiology and biochemistry. En: R.N. Perry, M. Moens y J.L. Starr (eds.), *Root-Knot Nematodes*. CAB International. Wallingford (Reino Unido). Pág: 55–97.
- Colla, P., Gilardi, G. y Gullino M. L. 2012. A review and critical analysis of the European situation of soilborne disease management in the vegetable sector. *Phytoparasitica*, 40: 515-523.
- Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T. y Tchamitchia, M. 2011. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection*, 30: 1251-1262.
- Cook, A.A. y Guevara, Y.G. 1984. Hypersensitivity in *Capsicum chacoense* to race 1 of the bacterial spot pathogen of pepper. *Plant disease*, 68: 329-330.
- Costa, J., Tello, J., Lacasa, A, y Campos, T. 1978. La importancia del diagnóstico en el control de las enfermedades micológicas del pimiento. *La Verdad*, 19 de Feb, pág. 30.
- Costa, J. 1979. Pimiento pimentonero. Trabajos sobre selección y mejora. Ensayo sobre técnicas de cultivo. Características del fruto. *Hoja Técnica INIA*, 27: 1-18.
- Dao, D.F. 1970. Climatic influences on the distribution pattern of plant parasitic and soil inhabiting nematodes. *Meded. LandbHogesch. Wageningen*, 70 (2): 1-181.
- Davies, B.H., Matthews, S. y Kirk, J.T.O. 1970. The nature and biosynthesis of the carotenoids of different color varieties of *Capsicum annuum*. *Phytochemistry*, 9: 797-805.
- Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H.H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., Rouxel, M. y Delière, L. 2014. Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: Evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, 27: 500-508.

- Delourme, R., Bousset, L., Ermel, M., Duffé, P., Besnard, A.L., Marquer, B., Fudal, I., Linglin, J., Chadoeuf, J. y Brun, H. 2014. Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Infection, Genetics and Evolution*, 27: 490-499.
- Devran, Z., Kahveci, E., Özkaynak, E., Studholme, D. J., y Tör, M. 2015. Development of molecular markers tightly linked to Pvr4 gene in pepper using next-generation sequencing. *Molecular Breeding*, 35(4): 1-9.
- Di Vito, M., Greco, N. y Carrela, A. 1985. Population densities of *Meloidogyne incognita* and yield of *Capsicum annuum*. *Journal of Nematology*, 17: 45-49.
- Di Vito, M., Saccardo, F. y Zacchec, G. 1991. Response of lines of *Capsicum* spp. to italian populations of four species of *Meloidogyne*. *Nematología Mediterránea*, 19: 43-46.
- Di Vito, M., Cianciotta, V. y Zacchec, G. 1992. Yield of susceptible and resistant pepper in microplots infested with *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 22 (1): 1-6.
- Di Vito, M., Saccardo, F., Errico, A., Zema, V. y Zacchec, G. 1993. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in *Capsicum chacoense*, *C. chinense* and *C. frutescens*. *Journal of Genetics and Breeding*, 47: 23.
- Di Vito, M., Puglia, A. P. y Saccardo, F. 1999. Pepper varieties and resistance to soil-borne pathogens. *Methyl Bromide Alternatives for North African and Southern European Countries*, 49.
- Díez-Rojo, M. 2010. *Bases agronómicas para la utilización de restos agrarios en biodesinfección de suelos*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. 409 pp.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Januel, A., Lefebvre, V., Daubèze, A., Palloix, A. y Abad, P. 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 496-502.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O'Byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A. y Abad, P. 2001. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4*

- conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical Applied Genetics*, 103: 592-600.
- Djian-Caporalino, C., Berthou, F., Fazari, A., Lefebvre, A., Palloix, A., Pergard, A. y Pijarowski, L. 2004. Genetic, cytological and molecular bases of the resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in pepper (*Capsicum annum* L.). *Proceedings of the XIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplants*. Noordwijkerhout (Países Bajos). Pág: 17-19.
- Djian-Caporalino, C., Lefebvre, V., Sage-Daubèze, A.M. y Palloix, A. 2007a. *Capsicum*. En: R. J. Singh (ed.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement series*, Chapter 6, Volume 3, Vegetable crops. CRC Press, Florida (EE.UU.). Pág: 185-243.
- Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, M.J., Vernie, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., Lefebvre, V. y Abad, P. 2007b. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theoretical Applied Genetics*, 114: 473-486.
- Djian-Caporalino, C., Molinari, S., Palloix, A., Ciancio, A., Fazari, A., Marteu, N. y Castagnone-Sereno, P. 2011. The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 131(3): 431-440.
- Djian-Caporalino, C., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Barbary, A., Abad, P. y Castagnone-Sereno, P. 2014. Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biology*, 14(1): 53. Doi:10.1186/1471-2229-14-53.
- Dogimont, C., Palloix, A., Daubeze, A.M., Marchoux, E., Gebre-Selassie, K. y Pochard, E. 1996. Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses in haplodiploid progenies of pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica*, 88: 231-239.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D., Pochard, E. 1981. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annum*): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. *Agronomie*, 1 (10): 859-864.

- Eggink, P.M., D'hoop, B.B., Brouwer, M. y Deniau, A.X. 2013. U.S. Patent Application No. 13/837,989.
- Ehwaeti, M.E., Phillips, M.S. y Trudgill, D.L. 1998. Dynamics of damage to tomato by *Meloidogyne incognita*. *Fundamental and Applied Nematology*, 21: 627-635.
- Eisenback, J.D. 1997. Root-knot nematode taxonomic database. CD-ROM. Ed. CAB International, Reino Unido.
- Eisenback J.D. y Triantaphyllou, H.H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: W.R. Nickle (ed.), *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 191-274.
- Esbenshade, P.R. y Triantaphyllou, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 22(1): 10-15.
- Etxeberria, A., Mendarte, S. y Larregla, S. 2011. Thermal inactivation of *Phytophthora capsici* oospores. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2): 83-90.
- Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L. y Moury, B. 2012. Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytology*, 193: 1064-1075.
- FAOSTAT data, 2013. Food and Agriculture Organization (FAO). <http://faostat.fao.org>.
- Fazari, A., Palloix, A., Wang, L., Yan Hua, M., Sage-Palloix, A.-M., Zhang, B. X. y Djian-Caporalino, C. 2012. The root-knot nematode resistance *N*-gene co-localizes in the *Me*-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding*, 131(5): 665-673.
- Fery, R.L. y Dukes, P.D. 1996. The inheritance of resistance to the southern root-knot nematode in "Carolina Hot" cayenne pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(6): 1024-1027.
- Fery, R.L. y Thies, J.A. 1997. Evaluation of *Capsicum chinense* Jacq. cultigens for resistance to the southern root-knot nematode. *HortScience*, 32(5): 923-926.
- Fery, R.L. y Thies, J.A. 1998. Genetic analysis of resistance to the southern root-knot nematode in *Capsicum chinense* Jacq. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(6): 1008-1011.
- Fery, R.L., Dukes, P.D. y Thies, J. A. 1998. 'Carolina Wonder' and 'Charleston Belle': southern root-knot nematode-resistant bell peppers. *HortScience*, 33(5): 900-902.

- Fery, R.L. y Thies, J.A. 2000. Inheritance of resistance to the peanut root-knot nematode in *Capsicum chinense*. *Journal of the American Society for Horticultural Science.*, 125(5): 615-618.
- Franceschetti, U. 1971. Natural cross pollination in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Eucarpia Meeting on Genetic and Breeding of Capsicum*, Turin, Italy, 16-18 September 1971: 346-353.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. y Iwai, K. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiology*, 21: 1023-1030.
- Gallun, R.L. 1972. Genetic interrelationships between host plants and insects. *Journal of Environmental Quality*, 1 (3): 259-265.
- García-Arenal, F. y McDonald, B.A. 2003. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology*, 93: 941-952.
- García-Cano, E., Resende, R. O., Boiteux, L. S., Giordano, L. B., Fernández-Muñoz, R. and Moriones, E. 2008. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology*, 98: 618-627.
- González-Jaral, P., Moreno-Letelier, A., Fraile, A., Pinero, D. y García-Arenal, F. 2012. Impact of human management on the genetic variation of wild pepper, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. *PLoS one*, 6 (12). Doi: 10.1371/journal.pone.0028715.
- González-Pérez, S., Garcés-Claver, A., Mallor, C., Sáenz de Miera, L. E., Fayos, O., Pomar, F. y Silvar, C. 2014. New insights into *Capsicum* spp relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. *Plos one*, 9 (12). Doi:10.1371/journal.pone.0116276.
- Goodey, J.B., Franklin, M.T. y Hooper, D.J. 1965. T. Goodey's The nematode parasites of plants catalogued under their hosts. 3rd Ed. Farnham Royal, Commonw. Agric. Bur. 214 pp.
- Greenleaf, W.H. 1986. Pepper breeding, In: M.J. Bassett (ed), *Breeding vegetable crops*. AVI Publ., Westport, Connecticut (EE.UU.). 584 pp.

- Grube, R.C., Zhang, Y., Murphy, J.F., Loaiza-Figueroa, F., Lackney, V.K., Provvidenti, R. y Jahn, M. 2000. New source of resistance to Cucumber mosaic virus in *Capsicum frutescens*. *Plant Disease*, 84: 885-891.
- Guerrero, M.M., Guirao, P., Lacasa, A., Ros, C., Torres, J., Martínez, M.C., Oncina, M., Bielza, P. y Contreras, J. 2004a. La mezcla de dicloropropeno y cloropicrina, una alternativa al bromuro de metilo para la desinfección de suelos para el pimiento. En: A. Lacasa, M.M. Guerrero, M. Oncina y J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Pág: 99-128.
- Guerrero, M.M., Lacasa, A., Ros, C., Bello, A., Martínez, M.C., Torres, J. y Fernández, P. 2004b. Efecto de la biofumigación con solarización sobre los hongos del suelo y la producción: fechas de desinfección y enmiendas. En: A. Lacasa, M.M. Guerrero, M. Oncina y J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Pág: 208-238.
- Guerrero, M.M., Lacasa, A., Ros, C., Martínez, M.A., López, J.A., Guirao, P., Bello, A., Torres, J., Martínez, M.C. y González, A. 2004c. La reiteración de la biofumigación con solarización en la desinfección de suelos de invernaderos de pimiento. En: A. Lacasa, M.M. Guerrero, M. Oncina y J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Pág: 239-258.
- Guerrero, M.M., Ros, C., Martínez, M.A., Barceló, N., Martínez, M.C., Guirao, P., Bello, A., Contreras, J. y Lacasa, A. 2004d. Estabilidad en la eficacia desinfectante de la biofumigación con solarización en cultivos de pimiento. *Actas de Horticultura*, 42: 20-24.
- Guerrero, M.M., Martínez, M.A., Ros, C., Bello, A., Fernández, P., Martínez, M.C., Lacasa, A. 2007. Eficacia de la biosolarización como desinfectante del suelo en invernaderos de pimiento. *Actas de Horticultura*, 48: 451-454.
- Guerrero, M.M., Lacasa, C.M., Hernández, A., Martínez, V., Martínez, M.A. y Ros, C. 2012. Biosolarización e injerto para el manejo integrado de los patógenos del suelo en cultivos de pimiento en invernadero. *Actas de Horticultura*, 60: 321-326.

- Guerrero, M.M. 2013. *Biosolarización de invernaderos para cultivos de pimiento: manejo de patógenos y fatiga del suelo*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena. 201 pp.
- Guerrero, M.M., Lacasa, C.M., Hernández A., Martínez V. y Lacasa, A. 2013. Evaluation of repeated biodisinfestation using *Brassica carinata* pellets to control *Meloidogyne incognita* in protected pepper crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11 (2): 485-493.
- Guerrero, MM., Guirao, P., Martínez, MC., Tello, J. y Lacasa, A. 2014a. Soil fatigue and its specificity towards pepper plants in greenhouses. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12 (3): 644-652.
- Guerrero, M.M., Lacasa, CM., Hernández, A., Martínez, V., Martínez, MC., Fernández, P. y Lacasa, A. 2014b. Biosolarization with agroindustrial byproduct for the control of soilborne pathogens in protected pepper crops in Southeast Spain. *Acta Horticulturae*, 1044: 157-161.
- Hare, W.W. 1956. Resistance in pepper to *Meloidogyne incognita acrita*. *Phytopathology*, 46: 98-104.
- Hare, W.W. 1957. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in pepper. *Phytopathology*, 47(8): 455-459.
- Hare, W.W. 1966. New pimiento is resistant to nematodes. *Mississippi Farm Research*, 29 (2): 1-8.
- Hartman, K.M. y Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. En: K.R. Barker, C.C. Carter y J.N. Sasser (eds.), *Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. II. Methodology*. North Carolina State University Graphics, Raleigh (EE.UU.). Pág: 69-77.
- Hendy, H., Pochard, E., y Dalmaso, A. 1985. Transmission héréditaire de la résistance aux nématodes *Meloidogyne* Chitwood (Tylenchida) portée par 2 lignées de *Capsicum annuum* L.: étude de descendances homozygotes issues d'androgenèse. *Agronomie*, 5 (2): 93-100.

- Hunt, D.J., Handoo, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. En: R.N. Perry, M. Moens y J.L. Starr (eds.), *Root-Knot Nematodes*. CAB International. Wallingford (Reino Unido). Pág: 55–97.
- IBPGR, 1983. Genetic resources of *Capsicum*. *International Board for Plant Genetic Resources*, AGPG/IBPGR/82/12, Roma (Italia), 49.
- Jang, Y., Moon, J.H., Lee, J.W., Lee, S.G., Kim, S.Y. y Chun, C. 2013. Effects of different rootstocks on fruit quality of grafted pepper (*Capsicum annuum* L.). *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 31: 687-699.
- Janzac, B., Fabre, M.F., Palloix, A. y Moury, B. 2008. Characterization of a new potyvirus infecting pepper crops in Ecuador. *Archives of Virology*, 153: 1543-1548.
- Janzac, B., Fabre, M.F., Palloix, A. y Moury, B. 2009: Phenotype and spectrum of action of the Pvr4 resistance in pepper against potyviruses, and selection of virulent variants. *Plant Pathology*, 58: 443-449.
- Jeffers, D.P. y Roberts, P.A. 1993. Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-*Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology*, 83: 645-654.
- Johnson, R. 1981. Durable resistance: Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, 71: 567-568.
- Kaloshian, I., Williamson, V.M., Miyao, G., Lawn, D. y Westerdahl, B.B. 1996. 'Resistance-breaking' nematodes identified in California tomatoes. *California Agriculture*, 50: 18-19.
- Kamran, M., Anwar, S.A., Javed, N., Khan, S.A., Abbas, H., Iqbal, M.A. y Zohaib, A. 2013. The Influence of *Meloidogyne incognita* density on susceptible tomato. *Pakistan Journal of Zoology*, 45: 727-732.
- Karssen, G. 2002. *The plant-parasitic nematode genus Meloidogyne Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe*. Ed. Koninklijke Brill NV, Leiden, Países Bajos. 157 pp.
- Karssen, G. y Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. En: R.N. Perry y M. Moens (eds.), *Plant Nematology*. CABI, Wallinford, Reino Unido. Pág: 59-90.

- Khan, M.W. y Haider, S.H. 1991. Comparative damage potential and reproduction efficiency of *Meloidogyne javanica* and races of *Meloidogyne incognita* on tomato and eggplant. *Nematologica*, 37: 293-303.
- Kim, B. S. y Hartmann, R. W. 1985. Inheritance of a gene (*Bs3*) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant disease*.
- Kim, B.S. y Kim, J.H. 2004. Evaluation of *Phytophthora* and *Ralstonia* multiple resistance selections of pepper for adaptability as rootstocks. *Proceedings of the XIIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplants*. Noordwijkerhout (Países Bajos). Pág: 185.
- Kim, S., Park, M., Yeom, S.I., Kim, Y.M., Lee, J. M., Lee, H.A., Seo, E., Choi, J., Cheong, K., Kim, K.T., Jung, K., Lee, G.W., Oh, S.K., Bae, C., Kim, S.B., Lee, H.Y., Kim, S.Y., Kim, M.S., Kang, B.C., Jo, Y.D., Yang, H.B., Jeong, H.J. Kang, W.H., Kwon, J.K., Shin, C., Lim, J.Y., Park, J.H., Huh, J.H., Kim, J.S., Kim, B.D., Cohen, O., Paran, I., Suh, M.C., Lee, S.B., Kim, Y.K., Shin, Y., Noh, S.J., Park, J., Seo, Y.S., Kwon, S.Y., a Kim, H., Park, J.M., Kim, H.J., Choi, S.B., Bosland, P.W., Reeves, G., Jo, S.H., Lee, B.W., Cho, H.T., Choi, H.S., Lee, M.S., Yu, Y. , Do Choi, Y., Park, B.S., van Deynze, A., Ashrafi, H., Hill, T., Kim, W.T., Pai, H.S., Ahn, H.K., Yeom, I., Giovannoni, J. J., Rose, J.K.C., Sørensen, I., Lee, S.J., Kim, R.W., Choi, I.Y., Choi, B.S., Lim, J.S., Lee, Y.H. and y Choi, D. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, 46(3): 270-278.
- Knott, J.E. y Deanon, J.R. 1967. Eggplant, tomato and pepper. *Vegetable production in Southeast Asia*. Los Banos, Laguna, Philippines, University of the Philippines Los Banos Press. Pág: 99-109.
- Kou, Y.J. y Wang, S.P. 2010. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Current Opin Plant Biology*, 13 (2) :181-185.
- Kousik, C.S. y Ritchie, D.F. 1998. Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races which individually overcome major resistance genes. *Plant Disease*, 82 (2): 181-186.

- Kovacs, J., Kazinczi, G., Takacs, A. P., Horvath, J. y Gaborjanyi, R. 2004. Reaction of different *Capsicum* genotypes to Tobamoviruses and Cucumber mosaic virus. *Proceedings of the XIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplants*. Noordwijkerhout (Países Bajos). Pág: 186.
- Kyle, M.M. y Palloix, A. 1997. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica*, 97: 183-188.
- Lacasa, A. y Contreras, J. 1993. Comportamiento de *Frankliniella occidentalis* en la transmisión del virus del bronceado del tomate. Planteamientos para su control en cultivos hortícolas. *Phytoma España*, 50: 33-39.
- Lacasa, A. y Guirao, P. 1997. Investigaciones actuales sobre alternativas al uso del bromuro de metilo en pimiento en invernaderos del campo de Cartagena. En: A. López y J.A. Mora (eds.), *Posibilidades de alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento en invernadero*. Jornadas 11, Publicaciones de la Consejería Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Región de Murcia. Pág: 21-36.
- Lacasa, A., Ros, C., Guerrero, M.M., Martínez, M.A., Barceló, N., Torres, J., Beltrán, C. y Bielza, P. 2006. Distribución del agua en la aplicación del 1,3-dicloropropeno + cloropicrina para la desinfección de invernaderos de pimiento. *Agrícola Vergel*, 292: 201-211.
- Lacasa, C.M., Martínez, V., Martínez, M.C., Lacasa, A. y Tello, J. 2013. *Phytophthora* en los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena (Murcia). *Agroecología*, 12: 18-19.
- Lafortune, D., Béramis, M., Daubèze, A. M., Boissot, N. y Palloix, A. 2005. Partial resistance of pepper to bacterial wilt is under oligogenically controlled and efficient under hot and rainy season in tropical climate. *Plant Disease*, 89: 501-506.
- Lannou, C. 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 319-338.
- Larregla, S. 2003. *Etiología y epidemiología de la "Tristeza" del pimiento en Bizkaia: su control*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. 756 pp.
- Leal-Fernández, C., Godoy-Hernández, H., Núñez-Colín, C.A., Anaya-López, J.L., Villalobos-Reyes, S. y Castellanos, J.Z. 2013. Morphological response and fruit

- yield of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) grafted onto different commercial rootstocks. *Biological Agriculture and Horticulture*, 29: 1-11.
- Lefebvre, V. y Palloix, A. 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical Applied Genetics*, 93 (4): 503-511
- Lefebvre, V., Daubèze, A. M., van der Voort, J. R., Peleman, J., Bardin, M. y Palloix, A. 2003. QTLs for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infections. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (4): 661-666.
- Levy, A., Harel, S., Palevitch, D., Akiri, B., Menagem, E. y Kanner, J. 1995. Carotenoid pigments and beta-carotene in paprika fruits (*Capsicum* spp.) with different genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 362-366.
- Lindhout, P. 2002 The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, 124 (2): 217-226.
- López, A. y Guirao, P. 1998. El bromuro de metilo y el cultivo del pimiento en el Campo de Cartagena. *Phytoma España*, 101: 26-30.
- López-Marín, J., Egea-Gilabert, C., González, A., Pérez-Alfocea, F. y Fernández, J.A. 2013. Grafting is an efficient alternative to shading screens to alleviate thermal stress in greenhouse-grown sweet pepper. *Scientia Horticulturae*, 149: 39-46.
- López-Pérez, J.A., Escuer, M., Díez-Rojo, M.A., Robertson, L., Piedra-Buena, A., López-Cepero, J. y Bello, A. 2011. Host range of *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Nematoda: Meloidogynidae) in Spain. *Nematropica*, 41: 130-40.
- Mallard, S., Cantet, M., Massire, A., Bachellez, A., Ewert, S. y Lefebvre, V. 2013. A key QTL cluster is conserved among accessions and exhibits broad-spectrum resistance to *Phytophthora capsici*: a valuable locus for pepper breeding. *Molecular Breeding*, 32 (2): 349-364.
- Mao, Z., Zhu, P., Liu, F., Huang, Y., Ling, J., Chen, G. y Xie, B. 2015. Cloning and functional analyses of pepper CaRKNR involved in *Meloidogyne incognita* resistance. *Euphytica*, 205 (3): 903-913.

- Margaria, P., Ciuffo, M. y Turina, M. 2004. Resistance breaking strain of tomato spotted wilt virus (Tospovirus; Buniaviridae) on resistant pepper cultivars in Almeria, Spain. *Plant Pathology*, 53 (6): 795.
- Martin, J.A., y Crawford, J.H. 1950. Breeding of pungent pepper. En: *Proceedings of the 47th Annual Convention of the Association of Southern Agricultural Workers held in Biloxi, Mississippi*. Association of Southern Agricultural Workers.
- Martin, J.A. y Crawford, J.H. 1958. *Carolina hot pepper*. South Carolina Agricultural Experiment Station, Clemson Agricultural College.
- Martínez, P.M. 2005. *Combinación del injerto en pimiento con desinfectantes químicos y no químicos del suelo como alternativa al bromuro de metilo*. Trabajo Final de Carrera. ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena. 133 pp.
- Martínez, M.A., Lacasa, A. y Tello, J. 2009. *Ecología de la microbiota fúngica de los suelos de los invernaderos de pimiento y su interés agronómico*. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid. 374 pp.
- Martínez, M.A., Martínez, M.C., Bielza, P., Tello, J. y Lacasa, A. 2010. Effect of biofumigation with manure amendments and repeated biosolarization on *Fusarium* density in pepper crops. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 38: 3-11
- Martínez, M.A., Martínez, M.C., Torres, J., Tello, J. y Lacasa A. 2011. Long-term effects of the application of organic amendments on soil fungal communities in pepper crops. *Bulletin OIBC/swrp*, 71: 81-84.
- Mather, K. y Jinks, J.L. 1982. *Biometrical Genetics*. 3rd ed. Chapman and Hall, London.
- McDonald, B.A. y Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathol*, 40 :349-379.
- McLeod, M.J., Eshbaugh, W.H., y Guttman S.I. 1979. A preliminary biochemical systematic study of the genus *Capsicum*, Solanaceae. En: J.G. Hawkes, R.N. Lester y A.D. Skelding (eds.), *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London. Pág: 701-714.
- McLeod, M.J., Guttman, S.I., Eshbough, W.H. y Rayle, R.E. 1983. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution*, 37: 562-574.

- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B.J. y Stall, R.E. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*-Pepper interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3(1): 41-47.
- Moscone, E. A., Scaldaferrò, M. A., Grabiele, M., Cecchini, N. M., Sánchez-García, Y., Jarret, R. y Ehrendorfer, F. 2006. The evolution of chili peppers (*Capsicum*-Solanaceae): a cytogenetic perspective. En: *VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity*, 745: 137-170.
- Moury, B., Palloix, A., Gebre-Selassie, K. y Marchoux, G. 1997. Hypersensitive resistance to tomato spotted wilt virus in three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. *Euphytica*, 94: 45-52.
- Moury, B., Gebre-Selassie, K., Marchoux, G., Daubeze, A.M. y Palloix, A. 1998. High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *European Journal Plant Pathology*, 104: 489-498.
- Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V. y Palloix, A. 2000. A Caps marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome*, 43, 137-142.
- Mundt, C.C. 1990. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. *Phytopathology*, 80: 221-223.
- Mundt, C.C., Cowger, C. y Garrett K.A. 2002. Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica*, 124: 245-252.
- Mundt, C. C. 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution*, 27: 446-455.
- Navarro, F. y Costa, J. *La oleorresina de pimentón*. "SÚPER EXTRACTOS S.L." Año desconocido. 83 pp.
- Netcher, C. y Sikora, R.A. 1990. Nematode parasites of vegetables. En: M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge (eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI Publishing. Wallingford, Reino Unido. Pág: 237-283.

- Nicolai, M., Cantet, M., Lefebvre, V., Sage-Palloix, A.M. y Palloix, A. 2013. Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60 (8): 2375-2390.
- Nonnecke, I.L. 1989. *Vegetable production*. AVI Book, Van Nostrand Reinhold. New York (EE.UU.). Pág: 229-239.
- Nuez, F., Gil Ortega, R., y Costa, J. 1996. *El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajies*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Barcelona, México. 607 pp.
- Núñez-Zofio, M., Larregla, S., Garbisu, C., Guerrero, M.M., Lacasa, C.M. y Lacasa, A. 2013. Application of sugar beet vinasse followed by solarization reduces the incidence of *Meloidogyne incognita* in pepper crops while improving soil quality. *Phytoparasitica*, 41: 181-191.
- Odland, M. L. y Porter, A. M. 1941. A study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). *American Society of Horticulture Sciences Proceeding*, 38: 585-588.
- Onkendi, E.M., Kariuki, G.M., Marais, M. y Moleleki, L.N. 2014. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. *Plant Pathology*, 63: 727-737.
- Orton Williams, K.J. 1972. *Meloidogyne javanica*. *C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes*, Set 1, N° 3. 4 pp.
- Orton Wiliams, K.J. 1973. *Meloidogyne incognita*. *C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes*. Set 1 n°3. 4pp.
- Orton Williams, K.J. 1974. *Meloidogyne hapla*. *C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes*, Set 3, N° 31. 4 pp.
- Orton Williams, K.J. 1975. *Meloidogyne arenaria*. *C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes*, Set 5, N° 62. 4 pp.
- Ozkaynak, E., Devran, Z., Kahveci, E., Doganlar, S., Baskoylu, B., Dogan, F. y Yuksel, M. 2014. Pyramiding multiple genes for resistance to PVY, TSWV and PMMoV in pepper using molecular markers. *European Journal of Horticultural Science*, 79 (4): 233-239.

- Palazón, C. 1988. *Estudio de los posibles métodos de control de la "Tristeza" o "Seca" del pimiento*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 231 pp.
- Palazón, C. y Palazón, I. 1989. Estudios epidemiológicos sobre la «tristeza» del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. *Boletín Sanidad Vegetal, Plagas*, 15: 233-262.
- Palloix, A., Pochard, E., Phaly, T. y Daubeze, A.M. 1990. Recurrent selection for resistance to *Verticillium dahliae* in pepper. *Euphytica*, 47 (1): 79-89.
- Palloix, A., Daubeze, A.M. y Pochard, E. 2004. Piments. En: M. Pitrat y C. Foury (eds.), *Histoire de légumes. Des origines à l'orée du XXIe siècle*. Edition INRA (París, Francia). Pág : 278-290.
- Palloix, A., Ayme, V. y Moury, B. 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytology*, 183: 190-199.
- Palomares, J.E., Vovlas, N., Troccoli, A., Liébanas, G., Landa, B.B. y Castillo, P. 2007. A new root-knot nematode parasitizing sea rocket from Spanish Mediterranean coastal dunes: *Meloidogyne dunensis* n. sp. (Nematodo: Meloidogyneae). *Journal of Nematology*, 39 (2): 190-202.
- Pandravada, S.R., Varaprasad, K.S., Janardhan Reddy, K. y Rao, E.S. 2010. Screening and identification of sources of resistance against root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in chilli (*Capsicum annuum*) germplasm. *Indian journal of agricultural science*, 80 (1): 92-94.
- Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. y Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant. *Plant Pathology*, 58: 409-424.
- Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P. y Djian-Caporalino, C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 95 (2): 158-165.
- Penella, C., Nebauer, S.G., López-Galarza, S., SanBautista, A., Gorbe, E. y Calatayud, A. 2013. Evaluation for salt stress tolerance of pepper genotypes to be used as rootstocks. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11: 1101-1107.

- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D.M., Piperno, D.R. y Zeidler, J.A. 2007. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315 : 986-988.
- Pickersgill, B. 1969. The domestication of chilli pepper, En: P.J. Ucko y G.W. Dimbleby (eds.), *The domestication and exploitation of plants and animals*. Duckworth. London. 443 pp.
- Pickersgill, B. 1991. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. En: T. Tsuchiya y P.K. Gupta (eds), *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Elsevier. Amsterdam. Pág: 139-160.
- Pickersgill, B., Heiser, C.B. y McNeill, J. 1979. Numerical taxonomic studies of variation and domestication in some species of *Capsicum*. En: J.G. Hawkes (ed), *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, New York. Pág: 679-699.
- Piedra-Buena, A., García-Álvarez, A., Díez-Rojo, M.A., Ros, C., Fernández, P., Lacasa A. y Bello, A. 2007. Use of pepper crop residues for the control of root-knot nematodes. *Bioresource Technology*, 98: 2846-2851.
- Ploeg, A.T. y Maris, P.C. 1999. Effect of temperature on the duration of the life cycle of a *Meloidogyne incognita* population. *Nematology*, 1 (4): 389-393.
- Pochard, E. 1977. Localization of genes in *Capsicum annuum* L. by trisomic analysis. *Annales de Amélioration des Plantes*, 27: 255-256.
- Pochard, E. y Dumas de Vaulx, R. 1982. Localization of vy2 and fa genes by trisomic analysis. *Capsicum Newslett*, 1: 18-19.
- Poulos, J.M., Reifschneider, F.J.B. y Coffman, W.R. 1991. Heritability and gain from selection for quantitative resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 56 (2): 161-167.
- Prot, J.C., Van Gundy, S.D. 1981. Influence of photoperiod and temperature on migrations of *Meloidogyne* juveniles. *Journal of Nematology*, 13: 217-220.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., Cheng, J., Zhao, Shancen Xu, M., Luo, Y., Yang, Y., Wu, Z., Mao, L., Wu, H., Ling-Hu, C., Zhou, H., Lin, H., González-Morales, S., Trejo-Saavedra, D. L., Tian, H., Tang, X., Zhao, M., Huang,

- Z., Zhou, A., Yao, X., Cui, J., Li, W., Chen, Z., Feng, Y., Niu, Y., Bi, S., Yang, X., Li, W., Cai, H., Luo, X., Montes-Hernández, S., Leyva-González, M., Xiong, Z., He, X., Bai, L., Tan, S., Tang, X., Liu, D., Liu, J., Zhang, S., Chen, M., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, Y., Liao, W., Zhang, Y., Wang, M., Lv, X., Wen, B., Liu, H., Luan, H., Zhang, Y., Yang, S., Wang, X., Xu, J., Li, X., Li, S., Wang, J., Palloix, A., Bosland, P.W., Li, Y., Krogh, A., Rivera-Bustamante, R.F., Herrera-Estrella, L., Yin, Y., Yu, J., Hu, K. y Zhang, Z. 2014. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(14): 5135-5140.
- Quenouille, J., Montarry, J., Palloix, A. y Moury, B. 2013. Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Molecular plant pathology*, 14 (2): 109-118.
- Rico, J. 1983. *Cultivo del pimiento de carne gruesa en invernadero*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 268 pp.
- Rincón, L., Pérez, A., Abadía, A., Sáez, J. y Pellicer, C. 2005a. Fertirrigación localizada en un cultivo de pimiento grueso de invernadero en producción integrada. I Respuesta productiva y balance del agua de riego. *Agrícola Vergel*, 286: 488-493.
- Rincón, L., Pérez, A., Abadía, A., Sáez, J. y Pellicer, C. 2005b. Fertirrigación localizada en un cultivo de pimiento grueso de invernadero en producción integrada. II Lixiviación de nutrientes. *Agrícola Vergel*, 287: 347-356.
- Roberts, P.A. 1987. The influence of planting date of carrot on *Meloidogyne incognita* reproduction and injury to roots. *Nematologica*, 33: 335-342.
- Roberts, P.A., Van Gundy, S.D. y McKinney, H.E. 1981. The effects of soil temperature and planting date of wheat on *Meloidogyne incognita* reproduction, soil populations and grain yield. *Journal of Nematology*, 13: 338-345.
- Roberts, P.A., Dalmasso, A., Cap, G.B. y Castagnone-Sereno, P. 1990. Resistance in *Lycopersicon peruvianum* to isolates of *Mi* genecompatible *Meloidogyne* populations. *Journal Nematology*, 22: 585-589.
- Robertson, L., López-Pérez, J.A., Bello, A., Díez-Rojo, M.A., Escuer, M., Piedra-Buena, A., Ros, C. y Martínez, C. 2006. Characterization of *Meloidogyne incognita*,

- M. arenaria* and *Meloidogyne hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum*). *Crop Protection*, 25: 440-445.
- Robertson, L., Díez-Rojo, M.A., López-Pérez, J.A., Piedra-Buena, A., Escuer, M., López-Cepero, J., Martínez, C. y Bello, A. 2009. New host races of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* from horticultural regions of Spain. *Plant Disease*, 93: 180-184.
- Rodríguez-Herrera, R., Rooney, W.L., Rosenow, D.T. y Frederiksen, R.A. 2000. Inheritance of grain mold resistance in grain sorghum without a pigmented testa. *Crop Science*, 40 (6): 1573-1578.
- Ros, C., Guirao, P., Lacasa, A., Guerrero, M.M., Beltrán, C., Bielza, P., Martínez, M.C., Torres, J. y Oncina, M. 2004a. El metan sodio y el dazomet en la desinfección del suelo en invernaderos de pimiento. En A. Lacasa, M.M. Guerrero, M. Oncina y J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia: Pág: 79-98.
- Ros, C., Guerrero, M.M., Lacasa, A., Guirao, P., González, A., Bello, A., López, J.A. y Martínez, M.A. 2004b. El injerto en pimiento. Comportamiento de patrones frente a hongos y nematodos. En A. Lacasa, M.M. Guerrero, M. Oncina y J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Pág: 279-312.
- Ros, C., Guerrero, M.M., Martínez, M.A., Barceló, N., Martínez, M.C., Rodríguez, I., Guirao, P., Bello, A. y Lacasa, A. 2005. Resistant sweet pepper rootstocks integrated into the management of soilborne pathogens in greenhouse. *Acta Horticulturae*, 698: 305-310.
- Ros, C., Martínez, M.A., Guerrero, M.M., Torres, J., Lacasa, C.M., Lacasa, A. y Bello, A. 2007. Comportamiento de la resistencia a *Phytophthora* y *Meloidogyne* de patrones de pimiento. *Actas de Horticultura*, 48: 534-537.
- Ros, C., Guerrero, M.M., Lacasa, C.M., Martínez, V., Díaz, M.A., Cano, A., Bello, A. y Lacasa, A. 2008. Combinación de biosolarización o solarización con injerto para el

- control de *Meloidogyne* en pimiento de invernadero. *Actas del VIII Congreso SEAE*, PII: 22.1-22.11.
- Ros, C., Martínez-Mora, C., Sánchez, F., Lacasa, C.M., Guerrero, M.M. y Lacasa A. 2011a. Biosolarization and grafting as a way mitigate the selection of virulent populations of *Meloidogyne incognita* in pepper. *Bulletin OIBC/swrp*, 7: 113-116.
- Ros, C., Martínez-Mora, C., Sánchez, F., Cano, A. y Lacasa A. 2011b. Changes in virulence of populations of *Meloidogyne incognita* to grow pepper plants resistant to nematodes. *Bulletin OIBC/swrp*, 7: 117-121.
- Ros, C. 2012. *Comportamiento de porta-injertos de pimiento frente a patógenos. Evaluación del injerto como alternativa al bromuro de metilo*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena. 220 pp.
- Ros, C., Lacasa, C.M., Martínez, V., Bielza, P. y Lacasa, A. 2014. Response of pepper rootstocks to co-infection of *Meloidogyne incognita* and *Phytophthora* spp. *European Journal of Horticultural Science*, 79: 22-28.
- Ros-Ibáñez, C., Robertson, L., Martínez-Lluch, M.C., Cano-García, A. y Lacasa-Plasencia, A. 2014. Development of virulence to *Meloidogyne incognita* on resistant pepper rootstocks. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12 (1): 225-232.
- Rudolph, R.E., Sams, C., Steiner, R., Thomas, S.H., Walker, S. y Uchanski, M.E. 2015. Biofumigation performance of four brassica crops in a green chile pepper (*Capsicum Annuum*) rotation system in Southern New Mexico. *HortScience*, 50: 247-253.
- Sánchez, J.A., García, F. Lacasa, A., Gutiérrez, L., Oncina, M., Contreras, J., y Gómez, J. 1997. Response of the anthocorids *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* and the phytoseiid *Amblyseius cucumeris* for the control of *Frankliniella occidentalis* in comercial crops of sweet pepper in plastic houses in Murcia (Spain). *Bulletin OILB/SROP*, 20 (4): 177-185.
- Sánchez, J.A. y Lacasa, A. 2006. A biological pest control story. *Bulletin OILB/srop*, 29 (4): 19-24.
- Sánchez, F., Hernández, A., Lacasa, C.M., Martínez, V., Guerrero, M.M., Sánchez, E., Gomariz, J., Ros, C. y Lacasa A. 2013. Pepper rootstocks: agronomic evaluation and behaviour against *Meloidogyne incognita* and *Phytophthora* spp. in greenhouses of Murcia (Spain). En: Lanteri, S. y Rotino, G.L. (eds), *Breakthroughs in the Genetics*

- and Breeding of Capsicum and Eggplant*. Comitato per l'organizzazione degli eventi (COE) DIFASA, Università degli Studi di Torino. Turín (Italia). Pág: 449-452.
- Sánchez-Solana, F., Ros, C., Guerrero, M.M., Lacasa, C.M., Sánchez-López, E. y Lacasa, A. 2015a. New pepper accessions proved to be suitable as a genetic resource for use in breeding nematode-resistant rootstocks. *Plant Genetic Resources: characterization and utilization*. Doi:10.1017/S1479262115000027.
- Sánchez-Solana, F., Ros, C., Lacasa, C.M., Palloix, A. y Lacasa, A. 2015b. Nematode quantitative resistance conferred by the pepper genetic background presents additive effects and is stable against different isolates of *Meloidogyne incognita*. *Plant Pathology*. Doi: 10.1111/ppa.12459.
- Schwarz, D., Rouphael, Y., Colla, G. y Venema, J.H. 2010. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: thermal stress, water stress and organic pollutants. *Scientia Horticulturae*, 127: 162-171.
- Siddiqi, M.R. 2000. *Tylenchida*. Parasites of Plants and Insects (2° Edition). Commonwealth Agricultural Bureaux. Slough, Reino Unido. 833 pp.
- Somos, A. 1984. *The paprika*. Akademiai Kiado. Budapest. 302 pp.
- Souza-Sobrinho, F., Maluf, W.R., Gomes, L.A.A. y Campos, V.P. 2002. Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* race 2 in the hot pepper cultivar Carolina Cayenne (*Capsicum annuum* L.). *Genetics and Molecular Research*, 1 (3): 271-279.
- Stewart, C., Mazourek, M., Stellari, G.M., O'Connell, M. y Jahn, M.M. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany*, 58 (5), 979-991.
- Stuber, C.W., Edwards, M. y Wendel, J.F. 1987. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Science*, 27: 639-648.
- Suzuki, K., Kuroda, T., Miura, Y. y Muria, J. 2003. Screening and wild traits of virus resistant source in *Capsicum* spp. *Plant Disease*, 87: 779-783.
- Szarka, J., Sardi, E., Szarka, E., y Csillery, G. 2002. General defence system in the plant kingdom. *International Journal of Horticultural Science*, 8 (3/4): 45-54.

- Talavera, M., Sayadi, S., Chirrosa-Ríos, M., Salmerón, T., Flor-Peregrín, E. y Verdejo-Lucas, S. 2012. Perception of the impact of root-knot nematode-induced diseases in horticultural protected crops of south-eastern Spain. *Nematology*, 14: 517-527.
- Tanksley, S.D. 1984. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma*, 89 (5): 352-360.
- Tello, J., Costa, J., Lacasa, A. y Campos, T. 1978. La importancia del diagnóstico en el control de las enfermedades micológicas del pimiento. *Diario La Verdad*, 19 de febrero, pág. 30.
- Tello, J. 1984. Enfermedades criptogámicas de las hortalizas. *Comunicaciones INIA*, 22: 213-228.
- Tello, J., Lacasa, A., Vares, F. y Mijares, A. 1987. Alteraciones radiculares en pimiento y habas de origen no parasitario. *Cuadernos de Fitopatología*, 10: 38-41.
- Tello, J. y Lacasa A. 1997. Problemática fitosanitaria del suelo en el cultivo del pimiento en el campo de Cartagena. En: A. López y J.A. Mora (eds.), *Posibilidades de alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento en invernadero*. Jornadas 11, Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Región de Murcia. Pág: 11-18.
- Tello, J. y Lacasa, A. 2004. Las enfermedades de origen edáfico y su control en los pimentonares del Campo de Cartagena. Una interpretación retrospectiva del sexenio 1979-1985. En A. Lacasa, M.M. Guerrero, M. Oncina y J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Jornadas 16, Publicaciones de la Consejería Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Pág: 11-26.
- Tewksbury, J.J. y Nabhan, G.P. 2001. Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature*, 412: 403-404.
- Thabuis, A., Palloix, A., Pflieger, S., Daubèze, A.M., Caranta, C. y Lefebvre, V. 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theoretical Applied Genetics*, 106 (8): 1473-1485.
- Thies, J.A. y Fery, R.L. 2000. Heat Stability of Resistance to *Meloidogyne incognita* in Scotch Bonnet Peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of Nematology*, 32 (4): 356-361.

- Thies, J.A., Fery, R.L., Mueller, J.D., Miller, G. y Varne, J. 2003. Response of bell pepper cultivars near-isogenic for the *N* gene to *Meloidogyne incognita* in field trials. *HortScience*, 38 (7): 1394-1396.
- Thies, J.A. 2011. Virulence of *Meloidogyne incognita* to expression of *N* gene in pepper. *Journal of Nematology*, 43 (2): 90-94.
- Tran, N.H. y Kim, B.S. 2010. Inheritance of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Horticulture environment and biotechnology*, 51 (5): 431-439.
- Triantaphyllou, A.C. 1981. Oogenesis and the chromosomes of the parthenogenetic root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 13: 95-104.
- Truong, H.T.H., Kim, K.T., Kim, D.W., Kim, S., Chae, Y., Park, J.H., Oh, D.G. y Cho, M.C, 2012. Identification of isolate-specific resistance QTLs to phytophthora root rot using an intra-specific recombinant inbred line population of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Pathology*, 61 (1): 48-56.
- Turner, S.J., Stone, A.R. y Perry, J.N. 1983. Selection of potato cyst nematodes on resistant *Solanum vernei* hybrids. *Euphytica*, 32: 911-917.
- Van der Plank, J.E. 1968. *Disease Resistance in Plants*. Academic Press, Nueva York, (EE.UU.). 206 pp.
- Verdejo-Lucas, S., Cortada, L., Sorribas, F.J. y Ornat, C. 2009. Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of *Mi* resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathology*, 58: 990-998.
- Votava, E.J., Nabhan, G.P. y Bosland, P.W. 2002. Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an in situ population and ex situ accessions of chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conservation Genetics*, 3 (2): 123-129.
- Wang, D. y Bosland, P.W. 2006. The genes of *Capsicum*. *HortScience*, 41 (5): 1169-1187.
- Wang, P., Liu, X., Guo, J., Liu, C., Fu, N. y Shen, H. 2015. Identification and expression analysis of candidate genes associated with defense responses to

- Phytophthora capsici* in pepper line “PI 201234”. *International journal of molecular sciences*, 16 (5): 11417-11438.
- Xie, Z., Si, W., Gao, R., Zhang, X. y Yang, S. 2015. Evolutionary analysis of RB/Rpi-blb1 locus in the Solanaceae family. *Molecular Genetics and Genomics*, 290 (6): 2173-2186.
- Yao, M., Li, N., Wang, F. y Ye, Z. 2013. Genetic analysis and identification of QTLs for resistance to in chili pepper (*L.*). *Euphytica*, 193 (2): 135-145.
- Zhu, Y., Chen, H., Fan, J., Wang, Y., Li, Y., Chen, J., Fan, J.X., Yang, S., Hu, L., Leung, H., Mew, T.W., Teng, P.S., Wang, Z. y Mundt C.C. 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*, 406: 718-722.

Anexo 1

Acreditación registro variedad 'Alcos', anteriormente denominada 'Costal'
