

## ***Effect of genetic background on resistance to Meloidogyne incognita in pepper***

**F. Sánchez-Solana, C. Ros, C.M. Lacasa, M.C. Martínez, A. Lacasa**

Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos. IMIDA, C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: fulgencio.sanchez8@carm.es

### **Resumen**

En pimiento (*Capsicum annuum* L.) los genes mayores *Me1*, *Me3* y *N* confieren resistencia cualitativa frente a *M. incognita* (principal nematodo patógeno de solanáceas). Sin embargo se han encontrado poblaciones del nematodo virulentas a algunos de estos genes que comprometen la eficacia de estas resistencias. No obstante se ha constatado una mayor durabilidad de estos genes mayores cuando se introgresan en fondos genéticos parcialmente resistentes. El objetivo fue explorar la influencia del fondo genético del pimiento controlando la resistencia parcial cuando se combina con los genes *Me1* y *Me3*, su estabilidad y su modo de herencia. Se utilizaron líneas puras de pimiento susceptibles, parcialmente resistentes y portadoras de *Me1* o *Me3*, y se construyeron diversos híbridos F1. Este material vegetal se testó frente a 3 aislados de *M. incognita* (dos de éstos virulentos a *Me3*), y se comparó su nivel de resistencia. Los resultados mostraron diferencias de tipo cuantitativo en la resistencia a *M. incognita* debidas al efecto del fondo genético, que se expresaron tanto en ausencia como en presencia de genes mayores de resistencia. Esta resistencia cuantitativa se mostró estable frente a los distintos aislados del patógeno y presentó un modo de herencia intermedio.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, resistencia genética, nematodos, virulencia

### **Abstract**

In pepper, three major genes –*Me1*, *Me3* and *N*–confer qualitative resistance against *Meloidogyne incognita* (main pathogen nematode of Solanaceae). However, nematode virulent populations to some of these genes have been found, threatening the effectiveness of these resistances. Nevertheless higher durability of these major genes has been found when these are introgressed in partially resistant genetic background. The aim was to explore the influence of pepper genetic background controlling partial resistance when combined with *Me1* and *Me3* genes, its stability and its mode of inheritance. Some pepper inbred lines susceptible, partially resistant or resistant (that carriers *Me1* or *Me3*) were used, and several hybrids F1 were built. This plant material was tested against 3 *M. incognita* isolates (two virulent to *Me3*), and their level of resistance was compared. The results showed quantitative differences in resistance to *M. incognita* due to the effect of genetic background, which was expressed both in presence and absence of qualitative resistance genes. This quantitative resistance was stable against different isolates of the pathogen and presented an intermediate inheritance mode.

**Keywords:** *Capsicum annuum*, genetic resistance, nematodes, virulence

### **1. Introducción**

*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood (Tylenchida) está considerado el principal nematodo fitopatógeno a escala mundial que afecta, entre otros cultivos, al pimiento (*Capsicum annuum* L.) provocándole daños en las raíces y ocasionando descensos importantes en sus cosechas [1]. En los últimos años, las restricciones en el uso de nematicidas y desinfectantes químicos han motivado el uso de resistencias genéticas como alternativa para el control del patógeno [2]. Consecuentemente, en la actualidad se están desarrollando programas de mejora genética con el fin de introgresar los genes de resistencia en porta-injertos y variedades élite.

En pimiento se han identificado tres genes mayores que confieren resistencia cualitativa frente a *M. incognita*, denominados *Me1*, *Me3* y *N*, y localizados en la misma región cromosómica [3]. Sin embargo, tanto en condiciones controladas como en cultivo en campo, se han encontrado casos de poblaciones virulentas a algunos de estos genes que comprometen la eficacia de estas resistencias [4, 5]. Estudios recientes han demostrado que la introgresión de genes mayores de resistencia en fondos genéticos parcialmente resistentes pueden reducir los casos de virulencia, favoreciendo la durabilidad de la resistencia [6].

El objetivo de este estudio fue explorar la influencia del fondo genético del pimiento controlando la resistencia parcial cuando se

combina con genes mayores de resistencia a *Meloidogyne incognita*, su estabilidad frente a diferentes aislados del nematodo y su modo de herencia.

## 2. Materiales y Métodos

Partiendo de las líneas puras resistentes HDA330 (portadora de *Me1*), HDA149 y SCM (ambas portadoras de *Me3*), y de las líneas AMC, BRB, YW (susceptibles) y CTL y DLR, (parcialmente resistentes) se obtuvieron 15 líneas F1, resultado del cruzamiento de cada línea resistente (portadora de gen *Me*) por cada línea susceptible o resistente parcial. Cada una de las líneas (parentales e híbridos) se testó frente a dos poblaciones virulentas a *Me3* y una avirulenta de *M. incognita*. Cada planta, que se cultivó individualmente en maceta, se inoculó con una dosis de 400 juveniles de segundo estadio de desarrollo del nematodo y se mantuvo durante 8 semanas en condiciones ambientales controladas (temperatura  $24 \pm 2$  °C y fotoperiodo de 16 h. de luz). Al cabo de este tiempo (duración de un ciclo del nematodo) se examinaron las raíces y se contó el número total de masas de huevos por planta (MH) que se utilizó como parámetro de resistencia. Los datos obtenidos de MH fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) a dos vías para los factores 'genotipo de pimiento', 'aislado de nematodo' y la interacción 'genotipo X aislado'. Se utilizó el test de Tuckey para discriminar entre medias, cuando éstas fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Para conocer el modo de herencia (intermedia o dominante) de la resistencia cuantitativa los valores de las MH de los híbridos F1 se compararon con el valor medio de sus respectivas líneas parentales utilizando la prueba T de Student. Además, los efectos genéticos de este carácter se clasificaron mediante el valor del ratio 'd/a' como aditivos ( $'d/a' < 0.2$ ), parcialmente dominante ( $0.2 < 'd/a' < 0.8$ ), dominante ( $0.8 < 'd/a' < 1.2$ ) o sobredominante ( $'d/a' > 1.2$ ) de acuerdo a Stuber et al. [7], donde 'a' equivale al valor medio de la diferencia entre las líneas parentales, y 'd' equivale a diferencia entre el valor del híbrido y la de la media de sus parentales.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Líneas parentales

En las líneas parentales, el ANOVA para los datos de MH resultó significativo para los factores

'genotipo', 'aislado' y la interacción 'genotipo X aislado'. Entre las líneas no portadoras de genes *Me*, CTL fue la que menos se infestó con cualquiera de los tres aislados de *M. incognita*. DLR también se infestó menos que AMC, BRB y YW, pero las diferencias respecto a éstos sólo fueron significativas con uno de los tres aislados utilizados. Las líneas portadoras de genes mayores de resistencia, HDA330 (portadora de *Me1*) no se infestó con ninguno de los aislados, y HDA149 y SCM (portadores de *Me3*) sólo se infestaron con los dos aislados virulentos, aunque SCM presentó menos MH que HDA149, el cual se infestó al mismo nivel que las líneas susceptibles. Estos resultados ponen de manifiesto la presencia de resistencia parcial en las líneas CTL, DLR y SCM conferida por su fondo genético, y que coincide con lo obtenido anteriormente en condiciones de campo [8].

### 3.2. Líneas híbridas

El ANOVA de los cinco híbridos procedentes de HDA330 (portadores de *Me1*) mostró efecto de los factores 'genotipo' y 'aislado', pero no para la interacción entre ambos factores. El híbrido con fondo genético de CTL fue el más resistente y el de fondo genético de AMC el que más se infestó, aunque en todos los casos los valores de MH fueron muy bajos debido al efecto de *Me1*. Los híbridos portadores de *Me3* no se infestaron con el aislado avirulento, por lo que en el ANOVA sólo se tuvieron en cuenta los datos procedentes de los dos aislados virulentos a *Me3* de *M. incognita*. Tanto en los híbridos procedentes de HDA149 como en los procedentes de SCM se encontró efecto para el factor 'genotipo', pero no para la interacción 'genotipo X aislado'. Sólo en los híbridos procedentes de SCM fue significativo el factor 'aislado'. Los híbridos con fondo genético de CTL fueron los que menos se infestaron mientras que los procedentes de AMC y YW los que más. Los híbridos con fondo genético de DLR siempre mostraron mayor nivel de resistencia que los de AMC.

Por lo tanto la resistencia parcial conferida por el fondo genético también se expresó cuando se combinó con genes de resistencia cualitativa, disminuyendo cuantitativamente la reproducción del nematodo, lo cual coincide con los resultados obtenidos en un trabajo anterior [6]. Además se comprobó que su efecto es estable frente a diferentes aislados de *M. incognita*, ya que no se encontró interacción 'genotipo X aislado', lo que la define como resistencia de tipo horizontal, una característica

frecuentemente asociada a las resistencias de tipo cuantitativo [9].

### 3.3. Modo de herencia

Para su análisis sólo se incluyeron los genotipos híbridos procedentes de parentales con diferente grado de resistencia debido sólo al efecto de su fondo genético. Por consiguiente se excluyeron tanto los híbridos portadores de *Me1* como los portadores de *Me3* testados frente al aislado avirulento, ya que en estos casos el efecto dominante del gen mayor de resistencia predominó sobre el efecto de la resistencia cuantitativa. La comparación entre el valor de MH de cada híbrido F1 respecto al valor promedio de sus respectivos parentales, testados frente al mismo aislado, no resultó significativamente diferente en ningún caso (tabla 1). Esto se corresponde con un patrón de herencia intermedia de la resistencia cuantitativa y que es acorde con el predominante efecto aditivo estimado mediante el cálculo del ratio 'd/a' que presentó valores desde 0,09 (completamente aditiva) a 0,54 (parcialmente dominante) (tabla 1). Probablemente este tipo de resistencia esté controlado por un sistema poligénico (QTLs), como ocurre en la mayoría de caracteres cuantitativos [10], aunque tal hipótesis debe de ser comprobada con un apropiado análisis genético (actualmente en desarrollo).

## 4. Conclusiones

Se ha puesto de manifiesto que la resistencia parcial a *Meloidogyne incognita* identificada en algunas líneas de pimiento es de efectos cuantitativos y presenta un modo de herencia intermedio, con efectos genéticos aditivos. Además se muestra estable frente a diferentes aislados del nematodo. Se considera de gran interés profundizar en estudios de análisis genético y prestaciones agronómicas en campo de este tipo de resistencia, por el interés que supone para su uso en la mejora genética de resistencias durables.

## 5. Agradecimientos

El equipo de Horticultura (IMIDA) y el Dr. A. Palloix (INRA) proporcionaron el material vegetal. Estudio financiado a través del Proyecto INIA RTA2009-0058 participado con Fondos FEDER. F. Sánchez ha disfrutado de una beca FPI-INIA.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] Djian-Caporalino C., Fazari A., Arguel M. J., Vernie T., VandeCastele C., Faure I., Brunoud G., Pijarowski L., Palloix A., Lefebvre V., Abad P. 2007. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 114: 473–486.
- [2] Djian-Caporalino C., Palloix A., Fazari A., Marteu N., Barbary A., Abad P., Sage-Palloix A.M., Mateille T., Risso S., Lanza R., Taussig C., 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 Biol.* 14: 53.
- [3] Fazari A., Palloix A., Wang L.H., Hua M.Y., Sage-Palloix A.M., Zhang B.X., Djian-Caporalino C. 2012. The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the *Me*-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breed.* 131: 665–673.
- [4] Castagnone-Sereno P., Bongiovanni M., Palloix A., Dalmaso A. 1996. Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistance determinants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 585–590.
- [5] Ros-Ibáñez C., Robertson L., Martínez-Lluch M.C., Cano-García A., Lacasa-Plasencia A. 2014. Development of virulence to *Meloidogyne incognita* on resistant pepper rootstocks. *Span. J. Agric. Res.* 12: 225–232.
- [6] Barbary A., Palloix A., Fazari A., Marteu N., Castagnone-Sereno P., Djian-Caporalino, C. 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. *Theor. Appl. Genet.* 127: 499–507
- [7] Stuber C.W., Edwards M., Wendel J.F. 1987. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci.* 27: 639–648.
- [8] Sánchez-Solana F., Ros C., Guerrero M.M., Lacasa C.M., Sánchez-López E., Lacasa A. 2015. New pepper accessions proved to be suitable as a genetic resource for use in breeding nematode-resistant rootstocks. *Plant Genet. Resources: Characterization and Utilization.* DOI:10.1017/S1479262115000027.
- [9] Van der Plank J.E. 1968. Disease resistance in plants. Ed: Academic Press, Nueva York.

[10] St. Clair, D. A. 2010. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 247–268.

### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Comparación del número de masas de huevos por planta (MH) obtenidos en los híbridos portadores del gen *Me3* con respecto al valor promedio de sus respectivos parentales testados con dos aislados virulentos de *M. incognita* (Vir-1 y Vir-2), y estimación de los efectos genéticos (aditivos o dominantes) de la resistencia cuantitativa.

Genotipo	Aislado	Valor de MH Híbridos F1	Valor promedio de MH de los parentales	Valor-P T-test <sup>1</sup>	Efectos genéticos <sup>2</sup>
CTL x HDA149	Vir-1	80.8±10.7	101,9±6.2	0,096	PD
	Vir-2	97.2±14.5	91,5±8.2	0,989	A
DLR x HDA149	Vir-1	138.1±10.0	129,1±8.3	0,532	A
AMC x SCM	Vir-1	97.8±7.5	116,4±10.1	0,209	PD
	Vir-2	111.1±11.6	128,4±10.3	0,236	PD
BRB x SCM	Vir-1	98.3±8.8	115,2±11.5	0,339	PD
	Vir-2	120.8±11.3	107,9±6.5	0,513	PD
CTL x SCM	Vir-1	51.2±6.0	39,9±2.7	0,135	PD
	Vir-2	69.7±7.3	55,5±4.9	0,184	PD
YW x SCM	Vir-1	97.3±5.6	111,3±11.2	0,462	PD
	Vir-2	129.2±11.9	116,3±4.5	0,519	PD

<sup>1</sup>Valor-P<0.05 del T-test indica diferencias significativas.

<sup>2</sup> Efectos genéticos estimados mediante el cálculo del ratio 'd/a' según Stuber *et al.* [7]. A: efecto aditivo (d/a=0-0.2); PD: efecto parcialmente dominante (d/a= 0.21-0.8).