

Physiological responses induced by different rootstocks against the infestation of *Meloidogyne incognita* in a greenhouse pepper crop

Respuestas fisiológicas inducidas por diferentes porta-injertos frente a la infestación de *Meloidogyne incognita* en un cultivo de pimiento en invernadero

A. Gálvez^{1*}, F.M. Del Amor¹, C. Ros², J. López-Marín¹

¹Departamento de Producción Vegetal y Agrotecnología. Equipo de Horticultura. IMIDA. La Alberca. Murcia. Spain

²Departamento de Protección de Cultivos. Equipo de Protección de Cultivos. IMIDA. La Alberca. Murcia. Spain

*1297@coitarm.es

Abstract

In the pepper greenhouses of Campo de Cartagena (Murcia) *Meloidogyne incognita* is widely distributed and after the elimination of methyl bromide, it has become an emerging problem in more than 40% of greenhouses. The use of resistant rootstocks has proved to be a viable technique for dealing with *Meloidogyne incognita* in several crops (tomato, melon, watermelon, etc.). However, little research has been done on the physiological and nutritional effect of pepper grown in greenhouses under Mediterranean climate conditions. Therefore, we studied a susceptible variety (Gacela) grafted on resistant rootstocks (C19, C25 and RT17), and compared it with non-grafted and autografted (GAL) plants. Total phenols and carotenoids were significantly affected, as was the amino acid profile. These results provide new insights into traits that can identify nematode-resistant rootstocks, and therefore new tools to induce resistance, while avoiding the use of soil disinfectants.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; biotic stress; resistance genes; grafting; Gacela.

Resumen

En los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena (Murcia) *Meloidogyne incognita* está ampliamente distribuido y tras la eliminación del bromuro de metilo, se ha convertido en un problema emergente en más del 40% de los invernaderos. El uso de porta-injertos resistentes ha demostrado ser una técnica viable para lidiar con *Meloidogyne incognita* en varios cultivos (tomate, melón, sandía, etc.). Sin embargo, se ha investigado poco acerca del efecto fisiológico y nutricional del pimiento cultivado en invernadero en condiciones de clima mediterráneo. Por lo tanto, estudiamos una variedad susceptible (Gacela) injertada en porta-injertos resistentes (C19, C25 y RT17), y la comparamos con las plantas no injertadas y autoinjertadas (GAL). Los fenoles totales y carotenoides se vieron afectados significativamente, al igual que el perfil de aminoácidos. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos en los rasgos que pueden identificar porta-injertos resistentes a nematodos, y por lo tanto nuevas herramientas para inducir resistencia, mientras que evitamos el uso de desinfectantes de suelo.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L.; estrés biótico; genes de resistencia; injerto; Gacela.

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos del género *Meloidogyne* son uno de los principales patógenos de los cultivos protegidos debido a los daños que ocasionan en sus raíces, impidiendo a la planta una correcta absorción de agua y nutrientes, y provocando pérdidas de cosecha que representan entre un 10 y un 15% de promedio [1], pudiéndose alcanzar entre un 30 y un 60% en suelos altamente infestados. Aunque el uso del injerto como técnica de propagación de plantas ha sido usado durante muchos siglos en plantas de hoja perenne no queda muy claro cómo actúan los mecanismos fisiológicos en el restablecimiento de los tejidos en la unión del injerto. Durante el siglo XX, el uso generalizado del injerto principalmente en especies pertenecientes a cucurbitáceas y solanáceas, llevaron a significativos avances de aspectos fisiológicos de herbáceas injertadas [2]. El objetivo de este trabajo fue obtener información sobre los mecanismos por los cuales las plantas injertadas son capaces de superar el deterioro de los efectos perjudiciales producidos por nematodos e identificar los mecanismos de respuestas fisiológicas que les confieren esta tolerancia diferencial en un cultivo de pimiento en invernadero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones del invernadero

Se evaluaron plantas de la variedad Gacela 'F1' (Syngenta Seeds) autoinjertadas (GAL) e injertadas sobre 3 porta-injertos: Atlante (C25) y C19 (Ramiro Arnedo Seeds S.A.) y Robusto (RT17) (Syngenta Seeds S.A.). Plantas de Gacela sin injertar e injertadas sobre los mismos porta-injertos sin inocular, se usaron como control. Cada planta se cultivó individualmente en macetas de 10 L y se infestó con 2400 J2 de nematodos de una población de *M. incognita* obtenida de una sola masa de huevos de raíces de Atlante infestadas de forma natural [3].

2.2 Concentración mineral

Los frutos de pimiento se secaron en estufa a 65°C durante 72 h. Los cationes se extrajeron con 20 mL de agua desionizada en el material vegetal molido (0,4 g) y se determinaron por espectrometría de emisión de plasma óptico acoplado inductivamente (ICP-OES) (Varian Vista-MPX, Varian Australia, Mulgrave, Victoria, Australia).

2.3 Compuestos fenólicos totales y carotenoides

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Piñero *et al.* [4]. Los carotenoides se calcularon de acuerdo con Almela *et al.* [5], utilizando un estándar comercial de β -caroteno de Sigma (Madrid, España).

2.4 Aminoácidos libres

Los aminoácidos libres se extrajeron de los frutos (-80°C): la savia se extrajo tras centrifugación a 5000 g (10 min, 4°C) y se analizó con el método AccQ.Tag-ultra (UPLC) (Waters, UPLC Amino Acid Analysis Solution. Waters Corporation, Milford, MA, 2006) según metodología descrita por Piñero *et al.* [6].

2.5 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue en bloques al azar de 4 bloques por 5 repeticiones. Se calcularon las diferencias significativas por ANOVA y las medias se compararon con una probabilidad de $P \leq 0,05$ de acuerdo al test Duncan.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las plantas inoculadas, los porta-injertos menos susceptibles, RT17 y C19, dieron concentraciones de Ca más altas que en las plantas sin injertar y autoinjertadas (GAL) (Tabla 1). La concentración de Ca en productos hortícolas se ha relacionado con la captación de agua [7],

nuestros resultados indican que los efectos significativos de la inoculación en la regulación estomática afectaron claramente a la absorción de Ca y redujo su concentración en frutos en porta-injertos susceptibles, y especialmente en las plantas no injertadas. Sin embargo, este patrón se invirtió para Na, B y Mn: RT17 y C19 mostraron concentraciones más bajas en comparación con las plantas no injertadas o autoinjertadas (GAL). Con respecto a la concentración de fenoles totales en los frutos, se encontraron diferencias significativas entre los porta-injertos estudiados (Fig. 1a). Así la respuesta de las plantas a la inoculación con nematodos aumentó en un 34% los fenoles totales para las plantas no injertadas, y en un 37% y 33% respectivamente para GAL y C25 cuando se compararon con las plantas no inoculadas. Sin embargo, este aumento en los fenoles totales se atenuó para C19, y el nivel en RT17 no se vio afectado por la inoculación, lo que concuerda con investigaciones recientes sobre tomate [8]. Los carotenoides totales (Fig. 1b) mostraron una respuesta similar a la inoculación, los porta-injertos C19 y RT17 no se vieron afectados. Otros estudios de nematodos y carotenoides mostraron resultados similares [9]. Sin embargo, Arimboor *et al.* [10], han indicado que esos cambios en el contenido y estructura de los carotenoides en plantas pueden ser marcadores de estrés ambiental, lo que concuerda con nuestros resultados. El efecto del injerto sobre la concentración total de aminoácidos fue relevante en la ausencia de inoculación (Tabla 1). Aunque el efecto más destacado fue en RT17, que obtuvo concentraciones más altas de Gly y Met que el resto de los tratamientos. Además, las plantas sin injertar tenían los niveles más altos de Thr, Cys, Lys, Val, Leu y Phe. Por lo tanto, las concentraciones más altas en las plantas no injertadas se redujeron significativamente, específicamente para Gly, Thr, Ala, Cys, Val, Ile, Leu y Phe; en contraste, Pro fue el único aminoácido cuya concentración aumentó debido a la inoculación en estas plantas, y la misma respuesta se encontró en plantas autoinjertadas (GAL). Pratelli y Pilot han demostrado que la infección por patógenos conlleva a cambios específicos en la expresión de muchos genes involucrados en el metabolismo y transporte de aminoácidos [11].

4. CONCLUSIONES

La regulación de la captación y el transporte de agua vinculados con el control nutricional para contrarrestar la reducción de la captación de Ca, P y Cu- junto con el objetivo de la adición exógena de aminoácidos, cuyos niveles se deterioraron significativamente después de la infestación, debe ser parte de la solución para mejorar la tolerancia a *M. incognita* en pimiento.

5. REFERENCIAS

- [1] Bello, A. P., Escuer, M., Pastrana, M.A. 1996. Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. En: Patología vegetal Tomo II, eds. (Llácer, G., López, M.M., Trapero, A y Bello, A., Sociedad Española de Fitopatología), p.1039-1069.
- [2] Goldschmidt, E.E. 2014. Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Front. Plant Sci.* 5, 727.
- [3] Robertson, L., López-Pérez, J.A., Bello, A., Díez-Rojo, M.A., Escuer, M., Piedra-Buena, A., Ros, C., Martínez, C. 2006. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum*). *Crop Prot* 25, 440-445.
- [4] Piñero, MC, Pérez-Jiménez, M., López-Marín, J., Varó, P., del Amor, FM. 2018. Differential effect of the nitrogen form on the leaf gas Exchange, amino acid composition, and antioxidant response of sweet pepper at elevated CO₂. *Plant Growth Regul* <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0409-1>.
- [5] Almela L., López-Roca, J. M., Candela, M. E., Alcázar, M. D. 1991. Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1606-1609.
- [6] Piñero MC, Pérez-Jiménez M, López-Marín J, del Amor FM. 2016. Changes in the salinity tolerance of sweet pepper plants as affected by nitrogen form and high CO₂ concentration. *J Plant Physiol* 200, 18–27.
- [7] Del Amor, F.M., Marcelis, L.F.M. 2006. Differential effect of transpiration and Ca supply on growth and Ca concentration of tomato plants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 111, 17–23.

[8] Lobna, H., Aymen, E.M., Hajer, R., Naima, M.B., Najet, H.R. 2017. Biochemical and plant nutrient alterations induced by *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* co-infection on tomato cultivars with differing level of resistance to *M. javanica*. Eur. J. Plant Pathol. 148, 463–472.

[9] Atkinson, N.J., Dew, T.P., Orfila, C., Urwin, P.E. 2011. Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). J. Agric. Food Chem. 59, 9673–9682.

[10] Arimboor, R., Natarajan, R.B., Menon, K.R., Chandrasekhar, L.P., Moorkoth, V. 2015. Red pepper (*Capsicum annum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. J. Food Sci. Technol. 52, 1258–1271.

[11] Pratelli, R., Pilot, G., 2014. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. J. Exp. Bot. 65, 5535–5556.



Figura 1- Efectos de la inoculación con *M. incognita* sobre fenoles totales (A) y carotenoides (B) en frutos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos. Los valores son las medias ($n = 20 \pm SE$). Análisis de varianza: ns, no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

Tabla 1. Efectos de *M. incognita* en las concentraciones de macro y micronutrientes en frutos. Medias en columna seguidas por misma letra no son significativamente diferentes en $p \leq 0,05$, respecto test de múltiples rangos de Duncan ($n=20$). Análisis de varianza: ns, no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

Tratamientos		K (mg kg ⁻¹)	Ca (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	Mg (mg kg ⁻¹)	Na (mg kg ⁻¹)	B (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)										
Sin inocular	Sin injertar	33997,1	ab	31524,5	ab	2857,4	ab	15078,0	a	294,2	a	130,0	bc	250,1	b	1,93	ab	48,4	bc	68,1	cd
	GAL	40648,9	bc	31070,6	ab	3672,0	c	15770,1	ab	348,1	a	121,2	bc	188,6	a	3,42	cd	63,6	d	71,3	d
	C19	39232,7	bc	34916,3	b	3459,0	bc	16798,5	ab	273,7	a	96,5	a	165,3	a	3,35	cd	36,4	ab	42,9	a
	C25	39030,7	bc	35090,0	b	3868,7	c	16269,4	ab	255,5	a	117,9	abc	173,2	a	3,34	cd	46,6	bc	62,1	bc
	RT17	37861,3	bc	39840,8	c	3510,9	bc	17809,8	bc	259,2	a	105,5	ab	170,9	a	2,55	bc	55,5	c	61,3	bc
Inoculadas	Sin injertar	28262,7	a	28758,6	a	2331,3	ab	17783,3	bc	741,8	bc	165,3	d	210,3	ab	0,81	a	51,3	bc	62,4	bc
	GAL	37508,3	bc	29122,3	a	2746,3	ab	17963,0	bc	1035,3	c	132,2	c	176,5	a	2,21	ab	41,9	c	59,9	bc
	C19	36542,8	b	33573,1	b	2618,0	ab	15902,2	ab	324,9	a	107,6	ab	179,4	a	1,10	ab	35,1	a	38,9	a
	C25	37415,9	b	31337,6	ab	3007,0	ab	16529,6	ab	494,5	ab	123,7	bc	157,1	a	2,99	bc	40,3	ab	56,7	bc
	RT17	45380,8	c	34447,6	b	3849,4	c	19970,4	c	354,4	a	107,2	ab	179,5	a	4,32	d	53,0	a	53,7	b
Porta-injertos	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nemátodos	*	**	***	*	*	*	**	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Porta-injertos*Nemátodos	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	*	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 2. Efectos de la inoculación con *M. incognita* en las concentraciones aminoácidos.

Tratamientos		Gly	Thr	Ala	Pro	Cys	Lys	Met	Val	Ile	Leu	Phe											
Sin inocular	Sin injertar	81,3	cd	264,3	c	296,8	c	55,8	bc	388,1	c	459,8	c	10,4	bc	356,0	d	154,2	d	134,2	e	55,8	e
	GAL	61,1	abc	224,8	b	279,5	c	49,3	a	262,9	ab	308,1	a	12,3	cd	242,7	c	128,3	cd	84,4	bc	39,4	bc
	C19	56,0	abc	155,8	b	195,1	b	51,3	ab	198,3	a	306,6	a	10,8	cde	243,8	c	146,1	d	76,0	ab	48,9	c
	C25	52,3	abc	164,2	b	171,3	b	56,6	bc	225,6	a	319,2	ab	8,5	abc	228,6	bc	96,8	ab	95,9	bc	36,8	ab
	RT17	91,5	d	215,4	b	326,6	c	48,2	a	245,5	ab	318,9	ab	17,9	d	245,8	c	108,1	bc	101,4	cd	52,1	d
Inoculados	Sin injertar	42,0	ab	129,3	a	135,3	a	68,8	e	210,0	a	469,4	c	7,2	ab	183,1	ab	108,6	bc	93,6	bc	37,8	ab
	GAL	51,5	abc	161,7	b	115,0	a	69,9	e	246,4	ab	428,7	bc	5,4	a	212,9	abc	91,8	ab	112,0	de	33,6	ab
	C19	71,9	bcd	149,9	a	275,4	c	60,3	cd	331,2	bc	373,3	abc	5,4	a	215,2	abc	111,0	bc	107,4	cd	30,0	a
	C25	38,1	a	136,4	a	173,8	b	66,3	b	179,3	a	361,2	abc	5,5	a	168,9	a	79,0	a	68,3	a	32,1	ab
	RT17	46,1	ab	148,2	a	164,7	b	51,7	b	198,4	a	367,6	abc	14,4	cd	193,8	abc	86,9	ab	79,3	ab	33,6	ab
Porta-injertos	ns	*	ns	*	*	*	**	ns	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nemátodos	**	***	*	***	ns	ns	ns	**	***	*	ns	**	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Porta-injertos*Nemátodos	ns	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	***	ns	*	ns	***	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*