



Evaluación del grado de resistencia a *Erysiphe necator* y *Plasmopara viticola* de híbridos de uva de vinificación

Diego José Fernández-López^{1*}, Sara I. Blanco², María del Mar Hernández², Christina Pease², Ana María Fuentes-Denia¹, Adrián Yepes-Hita¹, Leonor Ruiz-García¹, Cristina Menéndez²

¹Equipo de Mejora Genética Molecular del IMIDA. C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia. *Autor para la correspondencia: E-mail: diegoj.fernandez@carm.es

²Departamento de Viticultura, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Finca La Grajera, Logroño, La Rioja, España.

Resumen

El IMIDA inició en 2012 un programa de mejora con el fin de obtener nuevas variedades de uva de vinificación más tolerantes al oídio, causado por el ascomiceto *Erysiphe necator*, y al mildiu, causado por el oomiceto *Plasmopara viticola*. Para ello, se realizaron cruzamientos dirigidos entre Monastrell, variedad sensible a estos patógenos, y variedades más tolerantes portadoras de *loci* de resistencia a oídio (*Ren*) y/o a mildiu (*Rpv*), como Regent (*Ren3, Ren9, Rpv3*), Kishmish vatkana (*Ren1*) y Solaris (*Ren3, Ren9, Rpv3, Rpv10*). Se establecieron en campo los híbridos preseleccionados con marcadores moleculares ligados a estos *loci* de resistencia. En este trabajo se presenta un estudio del grado de resistencia a oídio y mildiu de 27 de estos híbridos. Las inoculaciones se realizaron en condiciones controladas, mediante una torre de vacío para oídio y mediante el pipeteo de una suspensión de esporas para mildiu, sobre hojas jóvenes esterilizadas. Las evaluaciones fenotípicas se hicieron a los 7 y 14 días para oídio y a los 7 y 10 días para mildiu. Cinco de los híbridos analizados mostraron un grado de resistencia elevado tanto a oídio como a mildiu (MRomS1, MRomS16, MRomK9, MRomK24, MRomK28), superior en algunos casos al de los parentales tolerantes.

1. Introducción

El oídio y mildiu, causados por el ascomiceto *Erysiphe necator* y el oomiceto *Plasmopara viticola*, respectivamente, son dos de las enfermedades más devastadoras en viticultura. Estas enfermedades no solo comprometen el rendimiento del viñedo, al reducir significativamente la producción de uva, sino que también afectan la calidad organoléptica y química del fruto, lo que repercute negativamente en la elaboración del vino. El control de estas enfermedades requiere la aplicación intensiva de fungicidas, lo que incrementa considerablemente los costes de producción y plantea serios desafíos ambientales y de salud pública debido a la acumulación de residuos químicos en suelos y ecosistemas circundantes. Ante esta problemática, numerosos programas de mejora genética han centrado esfuerzos en la introgresión de *loci* de resistencia, presentes en especies de vid americanas o asiáticas, en variedades de *Vitis vinifera* de alta calidad enológica pero altamente susceptibles a estos patógenos (Töpfer et al., 2011; Villano y Aversano, 2020).



El presente trabajo se enmarca dentro del programa de mejora genética que el IMIDA inició en 2012, cuyo propósito es desarrollar y seleccionar nuevas variedades de uva de vinificación con mayor tolerancia a *E. necator* y *P. vitícola* (Ruiz-García et al., 2021; Menéndez et al., 2023). Para ello, se llevaron a cabo cruzamientos entre la variedad Monastrell, variedad referente en la Región de Murcia y susceptible a estos patógenos, y diversas variedades portadoras de *loci* de resistencia al oídio (*Ren*) y/o al mildiu (*Rpv*), tales como Regent (*Ren3, Ren9, Rpv3*), Kishmish vatkana (*Ren1*) y Solaris (*Ren3, Ren9, Rpv3, Rpv10*). La identificación de los híbridos que habían heredado los respectivos *loci* de resistencia, se realizó en su día mediante PCR (Ruiz-García et al., en preparación), utilizando marcadores moleculares estrechamente asociados a dichos *loci* (Röckel et al., 2020). Una vez identificados los híbridos, se establecieron en campo para seguir con su estudio.

El objetivo del presente trabajo, realizado dentro del proyecto SHIELD4GRAPE (HORIZON-CL6-2023-BIODIV-01-14_NUMBER 101135088), fue evaluar fenotípicamente el grado de resistencia a oídio y mildiu en híbridos de uva de vinificación portadores de los mencionados *loci* de resistencia.

2. Material y Métodos

El material vegetal utilizado fueron 27 híbridos (13 MRomK y 14 MRomS) obtenidos mediante cruzamientos dirigidos de Monastrell con Regent (MRom), que a su vez se cruzaron por Kishmish vatkana (MRomK) y por Solaris (MRomS). Como controles se utilizaron las variedades parentales implicadas en los cruzamientos (Figura 1). Como se muestra en la Figura 1, los híbridos MRomK se caracterizan por la presencia de los *loci* de resistencia *Ren1, Ren3, Ren9* y *Rpv3*, y los híbridos MRomS por la presencia de *Ren3, Ren9, Rpv3* y *Rpv10*.

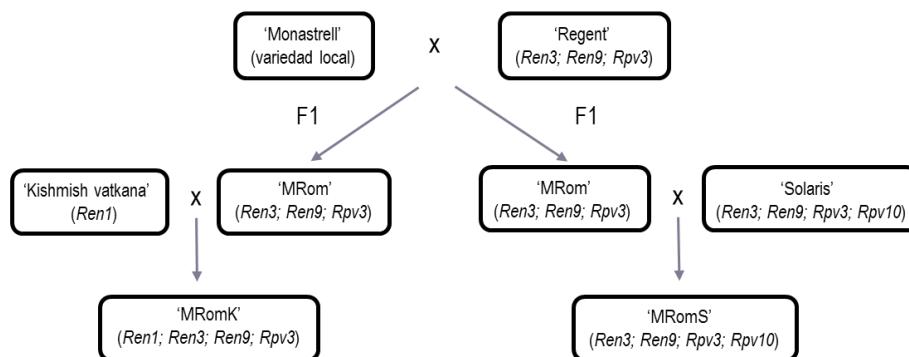


Fig. 1. Esquema de los cruzamientos realizados.

Las hojas utilizadas, recogidas entre la tercera y quinta desde el ápice, fueron esterilizadas previamente a la inoculación, sumergiéndolas durante 1 minuto en una solución de hipoclorito al 3% y enjuagándolas tres veces con agua destilada estéril. Despues del último enjuague, se secaron las hojas con papel estéril. En cuanto al medio, se preparó una solución de agar al 0,8% en agua destilada y se vertieron 20 ml de la solución en cada placa de Petri (90 mm de diámetro). Todo este proceso se realizó en el interior de una cabina de flujo laminar horizontal para evitar contaminaciones.



El inóculo de oídio se obtuvo a partir de la recolección de hojas frescas completamente infectadas de conidias en viñedos de La Rioja. Las hojas se inocularon en el ICVV mediante una inoculación masiva en una torre de vacío, colocándose las hojas en las placas con el envés hacia abajo. Las placas se incubaron a 20 °C y la evaluación del desarrollo fúngico se realizó a los 7 y 14 días post inoculación, utilizando una escala del grado de resistencia de 1 (muy bajo) a 9 (muy alto) conforme al descriptor OIV455-1, teniendo en cuenta tanto la extensión de las manchas como la fructificación del hongo. Se realizaron 4 réplicas por cada genotipo.

En cuanto al mildiu, evaluado en el IMIDA, se preparó una suspensión de esporas a partir de esporangióforos, ajustando la concentración a 20.000 esporas/mL mediante conteo en cámara de Neubauer. Posteriormente, las hojas se colocaron con el envés hacia arriba en las placas y se inocularon con gotas de 40 µL (aproximadamente 1000 esporas), retirándose el exceso de agua a las 24 h. Tras la inoculación, las placas se incubaron en una cámara de crecimiento a 22 °C, bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una humedad relativa del 95% dentro de la placa. La cuantificación de la incidencia y densidad de esporulación del mildiu se evaluó a los 7 y 10 días, siguiendo la escala del grado de resistencia de 1 (muy bajo) a 9 (muy alto) del descriptor OIV452-1 y el protocolo descrito por Schwander et al. (2012). De cada genotipo se realizaron 4 réplicas y se evaluaron de 5 a 6 discos de hoja por réplica, de 1,75 cm de diámetro.

3. Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran los valores medios y la desviación estándar (DE) del grado de resistencia fenotípica a *Erysiphe necator* (oídio) y *Plasmopara viticola* (mildiu) cuantificados a los 14 y 10 días post inoculación (DPI), respectivamente. Los valores obtenidos muestran una variabilidad en el grado de resistencia de los híbridos estudiados.

En el caso de *Erysiphe necator*, el grado de resistencia a oídio de los parentales osciló entre muy bajo (OIV455-1 = 1) para Monastrell y elevado (OIV455-1 = 7) para Kishmish vatkana (*Ren1*). Los resultados sugieren que el locus *Ren1*, presente en Kishmish v., confiere un mayor grado de resistencia que *Ren3* y *Ren9*, presentes ambos en Regent y Solaris (OIV455-1 = 5), coincidiendo con lo descrito por Dry et al. (2019). En este sentido, los híbridos MRomS (*Ren3*, *Ren9*) presentaron en general un menor grado de resistencia que los híbridos MRomK (*Ren1*, *Ren3*, *Ren9*). Por otro lado, algunos híbridos como MRomS1 y MRomS16 presentaron un mayor grado de resistencia a oídio que Regent y Solaris, mientras que ninguno de los híbridos MRomK presentaron un grado de resistencia superior al de Kishmish v. (Tabla 1).

Para *Plasmopara viticola*, los parentales portadores de *loci* de resistencia a mildiu, Regent (*Rpv3*) y Solaris (*Rpv3* y *Rpv10*), mostraron un grado de resistencia elevado (OIV452-1=7), frente al grado bajo de Monastrell (OIV452-1=3) o muy bajo de Kishmish vatkana (OIV452-1=1), parentales no portadores de dichos de *loci* de resistencia a mildiu. El mismo grado de resistencia observado en Regente y Solaris indica que la presencia de *Rpv10* no incrementa el grado de resistencia en Solaris. En el caso de los híbridos MRomS, que combinan *Rpv3* y *Rpv10*, todos alcanzaron niveles de resistencia elevados (OIV452-1 = 7) similar al de Regent y Solaris, o incluso muy elevado (OIV452-1 = 9), superando el grado de resistencia de estos parentales (Tabla 1). Respecto a los híbridos MRomK (*Rpv3*), presentaron en general un menor grado de resistencia a mildiu que los MRomS (*Rpv3* y *Rpv10*). Cabe destacar el caso de MRomK5, que



mostró un grado de resistencia bajo ($OIV452-1 = 3$), lo que sugiere la posibilidad de la detección de un falso positivo por PCR de los *loci* de resistencia.

Tabla 1. Grado de resistencia fenotípica siguiendo la escala del descriptor OIV455-1 para oídio y la escala del descriptor OIV452-1 para mildiu.

Genotipo	<i>Erysiphe necator</i> (14 dpi)			<i>Plasmopara viticola</i> (10 dpi)		
	OIV 455-1	DE	Grado de resistencia	OIV 452-1	DE	Grado de resistencia
Monastrell	1	0,35	muy bajo	3	0,11	bajo
Regent	5	0,85	medio	7	0,25	elevado
Solaris	5	0,41	medio	7	0,42	elevado
Kishmish v.	7	1,00	elevado	1	0,15	muy bajo
MRomS1	7	0,76	elevado	9	0,00	muy elevado o total
MRomS2	3	0,85	bajo	7	0,28	elevado
MRomS3	3	0,48	medio	7	0,75	elevado
MRomS5	5	1,49	medio	9	0,39	muy elevado o total
MRomS6	3	1,41	bajo	9	0,55	muy elevado o total
MRomS7	5	0,25	medio	9	0,25	muy elevado o total
MRomS8	3	0,87	bajo	7	0,00	elevado
MRomS11	5	1,26	medio	7	0,34	elevado
MRomS15	3	1,00	bajo	7	0,54	elevado
MRomS16	7	0,71	elevado	9	0,58	muy elevado o total
MRomS17	5	0,29	medio	9	0,25	muy elevado o total
MRomS19	5	0,00	medio	7	0,41	elevado
MRomS21	5	1,04	medio	7	0,16	elevado
MRomS22	5	0,75	medio	9	0,47	muy elevado o total
MRomK5	7	0,96	elevado	3	0,54	bajo
MRomK7	5	0,10	medio	5	0,48	medio
MRomK8	7	0,50	elevado	5	0,20	medio
MRomK9	7	1,00	elevado	7	0,00	elevado
MRomK10	5	0,85	medio	7	0,71	elevado
MRomK13	5	0,50	medio	7	0,41	elevado
MRomK17	5	0,76	medio	5	0,35	medio
MRomK18	5	1,03	medio	7	0,17	elevado
MRomK19	5	1,25	medio	5	0,42	medio
MRomK20	7	1,11	elevado	5	0,85	medio
MRomK22	5	0,50	medio	5	0,14	medio
MRomK24	7	0,91	elevado	7	0,30	elevado
MRomK28	7	0,58	elevado	7	0,17	elevado

DE = desviación estándar.

A partir de los datos obtenidos, destacan genotipos que combinan altos niveles de resistencia tanto a oídio como a mildiu. Entre ellos, MRomS1 y MRomS16 presentan el mayor grado de resistencia a mildiu ($OIV452-1 = 9$) y una resistencia elevada a oídio ($OIV455-1 = 7$).



Por otro lado, los híbridos MRomK9, MRomK24 y MRomK28 muestran una resistencia elevada a ambos patógenos (OIV452-1 y OIV455-1 = 7). Todos ellos son obtenciones muy valiosas para continuar con el programa de mejora.

Todos estos resultados sugieren la posibilidad de interacciones genéticas con otros factores que podrían incrementar o disminuir el grado de resistencia. Además, la presencia de más de un *locus* de resistencia no tiene por qué significar un mayor grado de resistencia, aunque sí se esperaría una mayor estabilidad y durabilidad en el tiempo de dicha resistencia, que podría depender de los mecanismos de resistencia implicados.

4. Conclusiones

Los resultados reflejan una amplia diversidad en la respuesta de los genotipos frente a *Erysiphe necator* y *Plasmopara viticola*. Estos resultados ponen de manifiesto el interés de la mejora genética en la obtención de variedades resistentes, y resaltan la importancia de combinar técnicas moleculares con el análisis fenotípico en la selección de las nuevas variedades. El siguiente paso será realizar estudios adicionales en condiciones de campo para confirmar el grado de resistencia y su estabilidad, además de evaluar la calidad agronómica y enológica que nos permita seleccionar y registrar nuevas variedades resistentes a oídio y mildiu que, además, tengan una gran calidad.

5. Bibliografía

- Dry, I.; Riaz, S.; Fuchs, M.; Sosnowski, M.; Thomas, M. 2019. Scion breeding for resistance to biotic stresses. In: Compendium of Plant Genomes, Springer International Publishing, 319–347
- Menéndez, C.; Hernández-Álamos, M.M.; Ruiz-García, L. 2023. PIWI: una herramienta para mejorar la sostenibilidad del viñedo. Fitopatología 9: 32-39.
- Röckel, et al. (2020): Vitis International Variety Catalogue - www.vivc.de – (febrero, 2020)
- Ruiz-García, L.; Gago, P.; Martínez-Mora, C.; Santiago, J. L.; Fernández-López, D. J.; Martínez, M. del C.; Bosco, S. 2021. Evaluation and pre-selection of new grapevine genotypes resistant to downy and powdery mildew, obtained by cross-breeding programs in Spain. Front. Plant Sci., 12, 674510. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.674510>
- Schwander, F; Eibach, R.; Fechter, I.; Hausmann, L.; Zyprian, E.; Töpfer, R. 2012. Rpv10: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet. 124, 163–176
- Töpfer, R.; Hausmann, L.; Eibach, R. 2011. Molecular breeding. In: Genetics, genomics, and breeding of grapes, eds A.-F. Adam-Blondon, J.-M. Martinez-Zapater, and C. Kole (Boca Raton: CRC Press), 160–185. doi: 10.1201/b10948
- Villano, C.; Aversano, R. 2020. Towards grapevine (*Vitis vinifera* L.) mildews resistance: molecular defence mechanisms and new breeding technologies. Italus Hortus 27, 1–17. doi: 10.26353/j.italhort/2020.3.0117



6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto europeo SHIELD4GRAPE (HORIZON-CL6-2023-BIODIV-01_NUMBER 101135088). Los híbridos se obtuvieron gracias a la financiación del programa de mejora genética con fondos FEDER 21-27 y regionales de la CARM. Los autores agradecen a Ana María Díez-Navajas y Helene Sánchez-Zelaia, investigadoras de NEIKER (Arkaute, Vitoria), por facilitarnos el inóculo de mildiu y por su asesoramiento con el protocolo de inoculación y de evaluación fenotípica.