

TESIS DOCTORAL

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: “Estudio y desarrollo de técnicas moleculares para la detección de resistencia a fungicidas en *Podospaera xanthii*”

DOCTORANDA: Alejandra Vielba Fernández

PROGRAMA DE DOCTORADO: Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular

DIRECTORES: Alejandro Pérez García y Dolores Fernández Ortuño

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION: Esta tesis doctoral se realizó en los laboratorios del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga. La financiación procedía de una Beca de Formación de Personal Universitario del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad (FPU17/00583) y del proyecto MINECO (AGL2016-76216-C2-1-R) titulado “Desarrollo de nuevas herramientas para el control de oídios”

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 4 de julio de 2022. Universidad de Málaga.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Francisco Cazorla López (presidente), Juan Moral Moral (secretario) y Antonieta de Cal y Cortina (vocal)

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*

RESUMEN:

Los oídios (*Erysiphales*) son hongos biotrofos estrictos que provocan una de las enfermedades más extendidas en plantas, afectando a más de 10.000 especies de angiospermas. Su sintomatología es una de las más fácilmente reconocibles, comenzando con la formación de manchas blancas de aspecto polvoriento en la superficie de las hojas, pudiendo llegar a cubrir la mayoría de la superficie vegetal y afectando a la capacidad fotosintética de la planta. Existen diversos métodos de control de estas enfermedades, como son las prácticas culturales, el empleo de cultivares resistentes o el control biológico. Aunque, hoy en día, el método de control más extendido es a través del control químico, mediante el empleo de fungicidas. Sin embargo, varias de las principales especies de oídio (*Blumeria graminis*, *Erysiphe necator* y *Podospaera xanthii*, entre otras) han sido catalogadas por el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) como especies de alto riesgo de desarrollo de resistencia a fungicidas (FRAC, 2020).

En esta tesis doctoral se plantearon cuatro objetivos. El primero, consistió en realizar un estudio bibliográfico de la situación actual de resistencia, a nivel mundial, de los oídios a diferentes

familias de fungicidas. Dentro de los datos recolectados en esta revisión, se observó que el oídio de las cucurbitáceas es la especie que más publicaciones relacionadas con la disminución de sensibilidad tiene registrados. Este dato es de especial importancia en nuestro país, ya que Andalucía es una de las principales productoras nacionales de hortalizas, representando la familia de las cucurbitáceas el 23.1% de este total. Dentro de las más de 200 enfermedades que pueden atacar a estos cultivos, el oídio, causado por *Podosphaera xanthii*, es una de las más importantes tanto en invernadero como en cultivos al aire libre.

En trabajos realizados anteriormente en nuestro país, se describieron altos niveles de resistencia de *P. xanthii* a diferentes familias de fungicidas; sin embargo, no existían datos de resistencia a una de las últimas familias registradas y comercializadas para el control del oídio de las cucurbitáceas, los fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI). Por ello, durante el segundo objetivo de esta tesis se definieron los niveles de resistencia a los fungicidas SDHI, boscalida y fluopiram, en *P. xanthii*. Para ello se analizaron un total de 296 aislados tomados desde las principales regiones productoras de cucurbitáceas del sur de España: Almería, Granada, Málaga y Murcia. Para boscalida, se detectaron 185 aislados sensibles (62,1%) y 113 aislados con diferentes fenotipos de resistencia (37,9%). Para fluopiram, se describieron 167 aislados sensibles (56%), mientras que 131 tenían algún nivel de resistencia (34%). Los resultados por provincias mostraron bajas frecuencias de resistencias en Málaga y Granada y altas en Almería, seguida de Murcia. Además, para determinar el mecanismo molecular que podría estar implicado en esta resistencia, se amplificaron y secuenciaron las subunidades B, C y D, implicadas en el bolsillo de unión de los fungicidas SDHI, en aislados con diferentes fenotipos de resistencia en ensayos *in vitro*. Tras el análisis de secuencias, se observaron dos mutaciones puntuales, una que resultaba en el cambio aminoacídico A86V, presente en todos los aislados resistentes, independientemente del fungicida o del fenotipo, y otra en el cambio G151R, observado únicamente en dos aislados resistentes a boscalida y sensibles o poco resistentes a fluopiram. Por otro lado, se analizó la posible penalización para la supervivencia que estas dos mutaciones podrían estar provocando en estos aislados, mostrándose que no existía ninguna diferencia significativa entre los aislados sensibles y resistentes a los fungicidas SDHI.

Por otro lado, durante el tercer objetivo de esta tesis doctoral, se planteó esclarecer el mecanismo de resistencia a otra importante familia de fungicidas, los inhibidores de la respiración mitocondrial (QoI), aún desconocido de acuerdo con un estudio anterior en el que no se había observado la principal mutación responsable de la resistencia, el cambio aminoacídico G143A, en los aislados resistentes analizados. Por ello, se planteó si la heteroplasmia mitocondrial (presencia simultánea de alelos diferentes de un gen mitocondrial

en una misma célula) era responsable de la resistencia a los fungicidas QoI. Para corroborar esta hipótesis, se analizó el gen *cytb* de aislados sensibles y resistentes de *P. xanthii*. En los resultados obtenidos se pudo observar la presencia simultánea del alelo sensible y resistente en un mismo aislado, confirmándose la heteroplasmia como mecanismo molecular de resistencia a los fungicidas QoI. Para poder analizar de una manera más rápida el porcentaje de estos alelos, se desarrolló una técnica de PCR específica de alelo junto con una PCR cuantitativa, denominada ARMS-qPCR de sus siglas en inglés Amplification-Refractory Mutation System. Debido a la naturaleza mitocondrial de esta resistencia, únicamente esta técnica podría servir como una alternativa rápida de diagnóstico molecular.

Finalmente, como último objetivo, en esta tesis nos centramos en la búsqueda de herramientas moleculares que pudieran ser incorporadas en programas de monitorización de la resistencia a gran escala, pudiendo así analizar un gran número de aislados en un menor periodo de tiempo, agilizando la generación y transmisión de resultados a los agricultores. Para completarlo, se usaron aquellas familias de fungicidas cuya resistencia viniera determinada por mutaciones puntuales, como es el caso de los fungicidas metil benzimidazol carbamatos (MBC) y SDHI. La amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP, por sus siglas en inglés (Loop-Mediated Isothermal Amplification), es una técnica de amplificación que emplea una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, de tal manera que la amplificación se puede realizar a una temperatura constante. El LAMP se desarrolló para la detección de las mutaciones responsables de la resistencia a los fungicidas MBC y SDHI (E198A y A86V/G151R, respectivamente) en aislados de *P. xanthii* obtenidos en España y en otros países europeos. En el caso de los fungicidas MBC, se obtuvo amplificación de los aislados portadores de la mutación E198A a los 75 minutos en una reacción LAMP incubada a 65°C. En el caso de los fungicidas SDHI, la mutación A86V fue amplificada específicamente en 16 minutos a 65°C, mientras que la mutación G151R amplificó a los 21 minutos y 30 segundos, a 62,7°C. La implementación de estas técnicas en programas de monitorización permitiría un seguimiento de la resistencia a fungicidas de una manera rápida y asequible para laboratorios pequeños. Además, los agricultores conocerán los fungicidas que son realmente eficaces en sus parcelas, evitando así tanto la pérdida económica como el vertido al medio ambiente de productos innecesarios. Esto junto con el empleo de otras técnicas de control, como es el uso de cultivares resistentes o el control biológico, permitirían un control más eficaz y sostenible de la enfermedad, pudiendo así evitar los perjuicios asociados a la resistencia a fungicidas.



La doctoranda y los directores de la tesis. De izquierda a derecha: Dolores Fernández Ortuño, Alejandra Vielba Fernández y Alejandro Pérez García.

Trabajos derivados de la Tesis que ya han sido publicados:

1. Vielba-Fernández, A., Bellón-Gómez, D., Torés, J. A., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2018). Heteroplasmy for the cytochrome b gene in *Podosphaera xanthii* and its role in resistance to QoI fungicides in Spain. *Plant Disease*, 102(8), 1599-1605. (Q1 - Factor de Impacto 3.583).
2. Vielba-Fernández, A., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2019). Monitoring Methyl Benzimidazole Carbamate-resistant isolates of the cucurbit powdery mildew pathogen, *Podosphaera xanthii*, using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease*, 103(7), 1515-1524. (Q1 - Factor de Impacto 3.809).
3. Vielba-Fernández, A., Polonio, Á., Ruiz-Jiménez, L., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2020). Fungicide resistance in powdery mildew fungi. *Microorganisms*, 8(9), 1431. (Q2 - Factor de Impacto 4.128).
4. Vielba-Fernández, A., Polonio, Á., Ruiz-Jiménez, L., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2021). Resistance to the SDHI fungicides boscalid and fluopyram in *Podosphaera xanthii* populations from commercial cucurbit fields in Spain. *Journal of Fungi*, 7(9), 733. (Q1 - Factor de Impacto 5.816).