TESIS DOCTORAL

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: "El oídio de las cucurbitáceas *Podosphaera xanthii*: nuevas perspectivas sobre su biotrofia, patogenia y control".

DOCTORANDA: Laura Ruiz Jiménez.

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 un Contrato Predoctoral para la Formación de Doctores (BES-2017-080414) de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y del proyecto MINECO (AGL2016-76216-C2-1-R) titulado "Desarrollo de nuevas herramientas para el control de oídios".

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 16 de octubre de 2023. Universidad de Málaga.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Diego Francisco Romero Hinojosa (presidente), Clara Pliego Prieto (secretaria) y Paloma Sánchez Torres (vocal).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN:

Los oídios (*Erysiphales*) son hongos biotrofos obligados que infectan hojas, tallos, flores y frutos de plantas económicamente importantes, convirtiéndose así en uno de los grupos de fitopatógenos de mayor relevancia en el sector hortofrutícola. En España y en las principales áreas productoras del mundo, el cultivo de las cucurbitáceas se ve afectado, entre otros problemas, por *Podosphaera xanthii*, identificado como el principal agente causal de oídio en estos cultivos. A pesar de los esfuerzos invertidos en el desarrollo de cultivares resistentes y en el uso de agentes de biocontrol, hoy en día, la aplicación de fungicidas es el método más extendido para el manejo de la enfermedad. Sin embargo, el impacto del control químico se ha visto condicionado tanto por la facilidad con la que *P. xanthii* desarrolla resistencias como por la incipiente puesta en marcha del Pacto Verde Europeo, que pretende, entre otros objetivos, reducir el empleo de fungicidas en un 50% para el año 2030, surgiendo así la necesidad urgente de identificar y desarrollar nuevas herramientas de fitoprotección para combatir la enfermedad.

En términos generales, el desarrollo de nuevas estrategias de control requiere una buena comprensión de la biología del agente patógeno responsable. Por ello, en esta Tesis Doctoral nos planteamos descifrar las bases moleculares de la biología de *P. xanthii*, centrando nuestros esfuerzos en la puesta a punto de nuevos métodos para el análisis funcional de genes que nos permitieran identificar proteínas claves para el desarrollo y/o patogenicidad de *P. xanthii* que pudieran ser de interés para su uso como dianas para el desarrollo de nuevas fitoterapias antioídio.

Sobre esta base, en primera instancia, teniendo en cuenta que, en los últimos años, el empleo de la tecnología del ARN interferente denominada silenciamiento génico inducido por pulverización (SIGS), basada en la aplicación directa de ARN de doble cadena (ARNdc) exógeno sobre la superficie foliar del huésped, con objeto de silenciar genes fúngicos esenciales e inhibir así el desarrollo fúngico y el establecimiento de la enfermedad, no sólo ha resultado ser una herramienta muy útil para el análisis funcional de genes fúngicos, sino también un enfoque prometedor para el control eficaz de una amplia gama de enfermedades de origen fúngico, en esta Tesis Doctoral, decidimos analizar, por primera vez, el potencial de la tecnología SIGS como herramienta para el análisis funcional de genes de *P. xanthii* y el control del oídio de las cucurbitáceas. En este sentido, la pulverización de hojas de melón con soluciones acuosas que contenían moléculas de ARNdc sintetizadas *in vitro* y dirigidas a genes esenciales de *P. xanthii*, se tradujo en altos niveles de control de la enfermedad en condiciones de cámara de crecimiento; posicionándose así la tecnología SIGS como una estrategia prometedora y específica para combatir el oídio de las cucurbitáceas de forma sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

Por otro lado, a fin de empezar a comprender las bases moleculares que sustentan la biotrofia de *P. xanthii*, en particular, y de otras especies de oídios en general, en esta Tesis Doctoral decidimos centrar nuestros esfuerzos en el estudio del metabolismo del azufre, una de las rutas metabólicas parcialmente ausentes en los genomas de oídios disponibles, al carecer de las enzimas involucradas en la conversión de sulfato a sulfito. A este respecto, la realización de un análisis *in silico* detallado y sistematizado de un conjunto de proteínas conservadas no anotadas (CNAPs) deducidas del transcriptoma integral de *P. xanthii* nos permitió identificar una de las enzimas involucradas en la asimilación de sulfato aparentemente ausente en los oídios. Asimismo, los datos obtenidos de un análisis RNA-seq durante los primeros estadios de la interacción *P. xanthii*-melón, no sólo revelaron un gran número de genes de la planta desregulados como consecuencia del desarrollo fúngico, sino también una expresión diferencial de los dos genes de la planta implicados en la ruta de asimilación de sulfato. Sobre esta base,

los datos resultantes de la realización de ensayos de silenciamiento génico y de complementación química, nos llevaron a concluir que el metabolismo del azufre en *P. xanthii* es totalmente funcional pero dependiente de la actividad de estos dos genes de la planta implicados en la asimilación de sulfato; lo que relaciona, por primera vez, funciones específicas del huésped con la biotrofia fúngica.

Sin embargo, a pesar de este progreso substancial, estos hallazgos relacionados con la biotrofia de *P. xanthii* no son más que la punta del iceberg ante las múltiples posibilidades que ofrecen otros enfoques para profundizar en el conocimiento del diálogo molecular entre este hongo biotrofo obligado y sus respectivos huéspedes. En este sentido, la realización de un análisis RNA-seq dual durante las primeras etapas de la interacción *P. xanthii*-melón, y la posterior construcción de una red de coexpresión génica (GCN), no sólo nos permitió la identificación de un gran número de módulos, entendiendo por módulos grupos de genes estrechamente relacionados entre sí, sino también la identificación de un alto grado de conectividad de los genes de *P. xanthii* expresados exclusivamente en el haustorio con numerosas rutas metabólicas de la planta huésped, como las rutas de señalización de fitohormonas y de biosíntesis de fenilpropanoides, entre otras; confirmándose así, por primera vez, el potencial de este enfoque para esclarecer las bases moleculares de la patogénesis fúngica y, por tanto, para el desarrollo racional de nuevas herramientas de fitoprotección contra este fitopatógeno tan importante.

FOTO. La doctoranda y los directores de la tesis junto con los miembros del tribunal. De izquierda a derecha: Diego Francisco Romero Hinojosa, Alejandro Pérez García, Laura Ruiz Jiménez, Dolores Fernández Ortuño, Clara Pliego Prieto y Paloma Sánchez Torres.

Trabajo derivado de la Tesis que ya ha sido publicado:

1. Ruiz-Jiménez, L., Polonio, Á., Vielba-Fernández, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2021). Gene mining for conserved, non-annotated proteins of *Podosphaera xanthii* identifies novel target candidates for controlling powdery mildews by spray-induced gene silencing. *Journal of Fungi*, 7(9), 735. (Q1-Factor de Impacto 5.724).