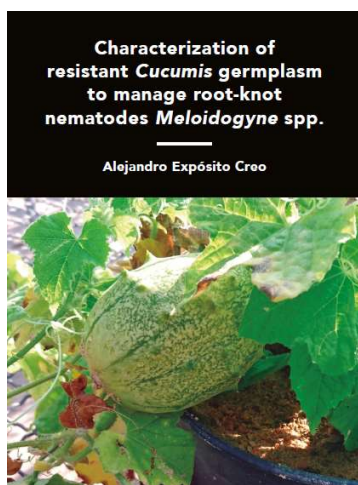


TESIS DOCTORAL

“Characterization of resistant *Cucumis* germplasm to manage root-knot nematodes *Meloidogyne* spp.”



DOCTORANDO: Alejandro Expósito Creo

DIRECTOR: Dr. Francisco Javier Sorribas Royo

INSTITUCIONES: Universitat Politècnica de Catalunya (UPC). Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia (DEAB)

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 5 de febrero de 2021, online

TRIBUNAL: presidenta Dr. Isabel Abrantes (Universidad de Coímbra); vocal Dr. Pablo Castillo (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC); secretaria Dr. Lydia Serrano (UPC).



Fotografía del acto de lectura y defensa. Alejandro Expósito Creo (Doctorando) y su director de tesis, el Dr. Francisco Javier Sorribas Royo. La tesis recibió la calificación de sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN

La resistencia vegetal es una medida eficaz para controlar las poblaciones de *Meloidogyne* y reducir las pérdidas de producción de los cultivos. Sin embargo, el uso reiterativo de genes R específicos puede seleccionar poblaciones virulentas para esos genes. Actualmente se encuentran disponibles varios cultivares y portainjertos comerciales resistentes para cultivos de solanáceas. Sin embargo, en cucurbitáceas solo unos pocos portainjertos están disponibles y ninguno para melón y pepino. Algunas especies de cucurbitáceas silvestres se han caracterizado por ser resistentes a *Meloidogyne*, entre ellas, algunas especies del género *Cucumis*. *Cucumis metuliferus* es un patrón prometedor para melón y pepino, pero hay poca información sobre su respuesta frente a poblaciones del nematodo procedentes de diversas áreas de producción, el efecto que tiene sobre la dinámica poblacional del nematodo, la compatibilidad con variedades del cultivo y el efecto sobre la cantidad y calidad de la producción en presencia y ausencia del nematodo. Esta información es esencial para caracterizar el nuevo germoplasma e introducirlo en los sistemas de producción. La disponibilidad de nuevas y diferentes fuentes de resistencia que puedan incorporarse en secuencias de rotación podría reducir la tasa de crecimiento de la población del nematodo, así como la probabilidad de seleccionar poblaciones virulentas a genes R específicos favoreciendo la durabilidad de los mismos. Con esta hipótesis de partida, nos planteamos estudiar la respuesta de la resistencia de *C. metuliferus* a *Meloidogyne* spp. y su compatibilidad con melón, la durabilidad de la resistencia en rotación con tomate resistente portador del gen *Mi1.2* y el efecto de los portainjertos y las densidades de nematodos sobre el rendimiento y la calidad de los frutos de ambos cultivos. La información derivada de este trabajo es útil para caracterizar germoplasma resistente capaz de ser utilizado como patrón de melón y pepino y para proponer alternativas de uso de la resistencia vegetal para mejorar su durabilidad reduciendo las pérdidas de producción. El trabajo está en sintonía con la directiva europea de uso sostenible de productos fitosanitarios (Directiva 2009/128/EC) aportando alternativas a los métodos de control químico que permitan reducir la dependencia a los mismos con el fin de mejorar la sostenibilidad en los sistemas de producción hortícola.

En primer lugar, se llevaron a cabo cinco experimentos en macetas para caracterizar la respuesta de dos líneas de *C. metuliferus* (BGV11135 y BGV10762) frente aislados de *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* avirulentos y virulentos al gen *Mi1.2* procedentes de diversas áreas de producción hortícola del litoral mediterráneo; la histopatología de la interacción; la compatibilidad con dos tipos de melón y el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas del fruto. Las líneas de *C. metuliferus* fueron proporcionadas por las Dr. Carmina Gisbert i Dr. Belén Picó, del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV-UPV). El pepino susceptible cv. Dasher II o el melón cv. Paloma se incluyeron como controles susceptibles al nematodo. Las plántulas se trasplantaron en macetas de 200 cm³ que contenían arena esterilizada. Una semana después, se inocularon con 1 J2 cm⁻³ de suelo y se mantuvieron en cámara de cultivo a 25 °C y 16h:8h (luz:oscuridad) de fotoperiodo durante 40 días. Al final de los ensayos, se evaluó el número de masas de huevos y el número de huevos por planta, y se calculó el índice de reproducción (IR) como el porcentaje de huevos producidos en las líneas de *C. metuliferus* en comparación con los producidos en los cultivares susceptibles. Los estudios histopatológicos se realizaron utilizando muestras de raíz infectadas del pepino cv. Dasher II de 2 µm de sección embebidas en resina epoxi obtenidas con un Ultramicrotomo y observadas al microscopio óptico. Adicionalmente, se realizaron

estudios histopatológicos mediante microscopía láser confocal con tomate susceptible y resistente, melón y *C. metuliferus* 15 días después de haber sido inoculados con el nematodo para determinar el volumen de las células gigantes, el número y volumen de las mismas por sitio de alimentación, el número de núcleos por célula gigante, y el número de núcleos por sitio de alimentación. La compatibilidad con melón y la calidad de los frutos se evaluó injertando los cultivares Vedrantaís y Paloma, ambos del tipo Charentais, y el cv. Finura del tipo Piel de Sapo, y se cultivaron en condiciones hidropónicas en un invernadero comercial.

Los resultados de los ensayos mostraron que el nivel de resistencia de ambas líneas de *C. metuliferus* varió de muy resistente (RI <1%) a resistente ($1\% \leq \text{RI} \leq 10\%$) independientemente de los aislados de *Meloidogyne*. Los estudios histopatológicos permitieron apreciar que las células gigantes inducidas por *Meloidogyne* spp. en *C. metuliferus* estaban, o bien poco desarrolladas y con múltiples vacuolas, o sin citoplasma y con áreas necróticas que rodeaban al nematodo. A través de la microscopía láser confocal, se observó un menor número de células gigantes por sitio de alimentación tanto en el tomate como en el melón susceptible en comparación con los germoplasmas resistentes, pero fueron más voluminosas y tuvieron un mayor número de núcleos por célula gigante y por sitio de alimentación. En relación a la compatibilidad con melón y la calidad de los frutos, no se observaron diferencias entre el desarrollo de las plantas injertadas en la línea BGV11135 de *C. metuliferus* y las autoinjertadas, ni tampoco efectos negativos sobre la calidad de los frutos.

En vista de los resultados, se decidió utilizar *C. metuliferus* como portainjerto de melón en una rotación de cultivos con tomate resistente cultivado en un invernadero en condiciones comerciales durante tres años (2015 a 2017). La rotación tomate-melón o melón-tomate se realizó con el tomate susceptible cv. Durinta no injertado o injertado sobre el patrón resistente 'Aligator' y el melón susceptible cv. Paloma no injertado o injertado sobre *C. metuliferus* BGV11135. Los cultivos susceptibles y resistentes se cultivaron en las mismas parcelas infestadas o no con *M. incognita*. Para cada cultivo, se determinaron las densidades de nematodos en el suelo, el índice de agallas, el número de huevos por planta y el rendimiento del cultivo (cantidad y calidad). Se evaluó si la relación entre las densidades del nematodo en el suelo en pretrasplante (P_i) de cada cultivo y la producción relativa se ajustaba al modelo de pérdidas de producción de Seinhorst para estimar la tolerancia (T) y la producción relativa mínima (m). Además, al final de cada cultivo, se evaluó si se había producido selección de virulencia a ambas resistencias en experimentos en macetas en condiciones controladas, utilizando las poblaciones extraídas de las plantas injertadas y sin injertar e inoculándolas en los germoplasmas resistentes y susceptibles de *Cucumis* y de tomate.

En la rotación tomate-melón, la densidad de nematodos al final del cultivo de tomate injertado aumentó progresivamente a lo largo de la rotación, siendo mayores que en las plantas no injertadas al final del estudio, pero no en la rotación melón-tomate. La producción comercial de los cultivos injertados fue mayor que la de los no injertados en las parcelas infestadas. El injerto del tomate no afectó la tolerancia al nematodo ($T = 10 \pm 7 \text{ J2 } 250 \text{ cm}^{-3}$), pero sí a las pérdidas de producción, siendo mayores en el no injertado (66%) que en el injertado (33%). La concentración de sodio en los frutos de tomate no injertado aumentó con la densidad de nematodos en suelo en los cultivos de primavera de 2015 y 2016, pero no en el tomate injertado. En el cultivo de melón, la tolerancia al nematodo en las plantas no injertadas no difirió de la de las plantas injertadas cultivadas en primavera ($T = 56 \pm 32 \text{ J2 } 250 \text{ cm}^{-3}$), pero sí cuando se cultivaron en verano ($T_{\text{injerto}} = 3 \pm 3 \text{ J2 } 250 \text{ cm}^{-3}$; $T_{\text{no injerto}} = 32 \pm 11 \text{ J2 } 250 \text{ cm}^{-3}$). El rendimiento mínimo relativo

del cultivo de melón sin injertar fue menor (2%) que el del cultivo injertado en primavera (62%) o verano (20%). La concentración de sodio en los frutos de melón de las plantas no injertadas aumentó con la densidad de nematodos. No se encontraron variaciones en la calidad del fruto del melón injertado cultivado en primavera, aunque se registró menor contenido de materia seca y de sólidos solubles totales a mayor densidad de nematodos cuando se cultivó en verano.

Los ensayos de selección de virulencia mostraron que se había producido la selección al gen *Mi1.2* después del primer cultivo de tomate resistente independientemente de haber sido cultivado en primavera o verano, pero no a *C. metuliferus*. La reproducción de *M. incognita* en el tomate resistente fue alrededor del 120% la registrada en el cultivar susceptible después del primer cultivo de tomate injertado, pero disminuyó entorno al 25% después del cultivo de melón injertado, manteniéndose a estos niveles al final del estudio. El fitness de la población virulenta en tomate y melón susceptibles se vio afectado disminuyendo la capacidad infectiva, reproductora y la fecundidad de las hembras con respecto a la población avirulenta. Este coste biológico, se observó solo después del tercer cultivo alterno de tomate injertado sobre el portainjerto "Aligator".

De los resultados del estudio se desprende que *Cucumis metuliferus* es un excelente portainjerto para ser incluido en las estrategias de manejo integrado de *Meloidogyne* en sistemas de producción hortícola, debido a su resistencia y tolerancia al nematodo, su efecto en la reducción del nivel de virulencia al gen *Mi1.2* y su compatibilidad con melón sin afectar la calidad del fruto.

Los estudios realizados en la tesis doctoral han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación y cofinanciados por fondos FEDER en los proyectos nacionales:

AGL2013-49040-C2-1R "Efecto de la resistencia de genes *R* y la inducida por hongos endófitos en la epidemiología de *Meloidogyne* y la producción y calidad de la cosecha en solanáceas - cucurbitáceas".

AGL2014-53398-C2-2-R "Aproximaciones biotecnológicas y culturales para la mejora de las resistencias y el control de enfermedades en melón y sandía"

AGL2017-89785-R. "Estrategias de gestión de germoplasma vegetal resistente a *Meloidogyne* para evitar la selección de virulencia"

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Expósito, A., Munera, M., Giné, A., López-Gómez, M., Cáceres, A., Picó, B., et al. (2018). *Cucumis metuliferus* is resistant to root-knot nematode *Mi1.2* gene (a)virulent isolates and a promising melon rootstock. *Plant Pathol.* 67, 1161-1187. doi: 10.1111/ppa.12815.

Expósito, A., García, S., Giné, A., Escudero, N., and Sorribas, F. J. (2019). *Cucumis metuliferus* reduces *Meloidogyne incognita* virulence against the *Mi1.2* resistance gene in a tomato–melon rotation sequence. *Pest Man. Scie.* 75, 1902-1910. doi: 10.1002/ps.5297.

Expósito, A., Pujolà, M., Achaerandio, I., Giné, A., Escudero, N., Fullana, A.M., Cunqueiro, M. Loza-Alvarez, P. and Sorribas, F.J. (2020). Tomato and melon

Meloidogyne resistant rootstocks improve crop yield but melon fruit quality is influenced by the cropping season. *Front. Plant Sci.* 11, 1742. doi: 10.3389/fpls.2020.560024.