

TESIS DOCTORAL

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

“Diversity and prevalence of plant parasitic nematodes in Prunus rootstocks in Spain, with a focus on soil microbiota and biological control agents”. Tesis Doctoral realizada en el Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC (IAS-CSIC).

DOCTORANDA: Ilenia Clavero Camacho

PROGRAMA DE DOCTORADO: Programa de Doctorado en Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del Desarrollo Rural Sostenible (UCO).

DIRECTORES: Juan Emilio Palomares Rius (IAS-CSIC) y Pablo Castillo (IAS-CSIC).

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION: Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) en el Grupo de Investigación Fitopatologías de Sistemas Agrícolas Sostenibles del Departamento de Protección de Cultivos. Ilenia Clavero Camacho ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral PRE2019-090206 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por “FSE Invierte en tu futuro”. Este contrato es parte del proyecto de I+D+i RTI2018-095925-A-100 “Interacciones entre microorganismos en el suelo como una herramienta para la sostenibilidad de la resistencia de patrones de frutales frente a nematodos fitoparásitos” financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por “FEDER Una manera de hacer Europa”.

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 12 de diciembre de 2025. Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Luís Vicente López Llorca (Presidente), Carlos Agustí Brisach (Secretario), Isabel Luci Conceição (Vocal)

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN:

Los nematodos fitoparásitos (NFs) representan una amenaza significativa para los cultivos de *Prunus*. Entre los géneros más perjudiciales se encuentran los nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* spp.), los nematodos lesionadores de la raíz (*Pratylenchus* spp.), los nematodos daga (*Xiphinema* spp.), los nematodos aguja (*Longidorus* spp.) y los nematodos anillados (*Criconemoides* spp). Estos NFs pueden limitar gravemente la productividad e incluso la supervivencia de los árboles, especialmente en situaciones de replantación y bajo altas densidades de población de nematodos. Para estudiar la problemática actual asociada a NFs en

cultivos de *Prunus*, se realizó un estudio exhaustivo que comprendió 218 puntos de muestreo en 186 plantaciones comerciales, abarcando las principales zonas de producción de *Prunus* en España. Se identificaron un total de 84 especies de NFs, pertenecientes a 32 géneros, mediante taxonomía integrativa. Durante la identificación de nematodos, se observó una notable diversidad y distribución de especies de *Paratylenchus*, lo que motivó un estudio taxonómico detallado de este género. Esta investigación proporcionó una caracterización completa de 24 especies de *Paratylenchus* aisladas tanto de la rizosfera de *Prunus*, como de ambientes naturales y cultivos adyacentes a las plantaciones de *Prunus* muestreadas, de ellas tres especies fueron nuevas para la ciencia (*Paratylenchus indalus* sp. nov., *Paratylenchus pedrami* sp. nov. y *Paratylenchus zurgenerus* sp. nov.). Además, cinco de ellas constituyeron primeras citas para España (*P. enigmaticus*, *P. hamatus*, *P. holdemani*, *P. israelensis* y *P. veruculatus*), mientras que el resto ya habían sido citadas en nuestro país (*P. baldaccii*, *P. goodeyi*, *P. tateae* y *P. tenuicaudatus*). *Paratylenchus hamatus* y *P. tenuicaudatus* fueron las especies más abundantes y prevalentes de este género en plantaciones de *Prunus* en España. Las elevadas densidades de estos nematodos detectadas en la rizosfera de *Prunus* sugieren que ambas especies podrían ser patogénicas para estos cultivos. Con el objetivo de desarrollar una herramienta de diagnóstico rápida y eficaz, diseñamos cebadores específicos para *P. hamatus* y *P. tenuicaudatus*. Además, los resultados indicaron que el clima y las propiedades del suelo fueron los principales factores que determinan la composición de las comunidades de *Paratylenchus* en plantaciones de *Prunus*.

El enfoque de taxonomía integrativa aplicado en esta investigación también reveló la existencia de un nuevo complejo de especies crípticas dentro del género *Criconema*. Se describieron dos nuevas especies: *Criconema paraannuliferum* sp. nov., aislada en la rizosfera de cultivos de *Prunus*, y *Criconema plesioannuliferum* sp. nov., encontrada en un hábitat natural de tejo común (*Taxus baccata*).

Además de las nuevas especies descritas, este muestreo reveló la presencia de especies de NFs consideradas entre las más perjudiciales para las especies de *Prunus*, incluyendo *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *Pratylenchus penetrans* y *Pra. vulnus*. Las propiedades fisicoquímicas del suelo y las condiciones climáticas surgieron como los factores más influyentes, explicando el 13,36% y 11,64% de la variación, respectivamente. Curiosamente, las especies de *Meloidogyne* patogénicas para *Prunus* solo se detectaron en el sur de España, principalmente a lo largo del Valle del Guadalquivir, donde predominan los suelos arenosos y el patrón susceptible GF 677 es ampliamente utilizado. Asimismo, *Pra. penetrans* solo se detectó en el valle del Guadalquivir, mientras que *Pra. vulnus* mostró una amplia distribución por todo el país.

Dado que el uso de nematocidas químicos en estos cultivos está prohibido, el uso de patrones resistentes a nematodos nodulares, material vegetal certificado como libre de nematodos y agentes de control biológico son actualmente las estrategias más viables para reducir las densidades de NFs y prevenir su introducción y dispersión. Con el objetivo de determinar la presencia de posibles agentes de control biológico, se caracterizó la microbiota del suelo y de la rizosfera de almendros infestados con *Meloidogyne* mediante secuenciación masiva. También se estudiaron las comunidades de nematodos, incluidos los nematodos de vida libre y parámetros de la calidad del suelo. Esta investigación reveló la presencia de antagonistas frente a NFs, incluyendo *Metacordyceps chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum* y *Trichoderma asperellum*. Sin embargo, los niveles observados de parasitismo en huevos de *Meloidogyne* fueron insuficientes para ejercer un control biológico significativo en condiciones de campo.

En resumen, esta tesis doctoral ofrece una evaluación exhaustiva de la diversidad y distribución de los nematodos fitoparásitos asociados a cultivos de *Prunus* en España, así como de los factores ambientales y agronómicos que estructuran las comunidades de nematodos. Esta investigación destaca la necesidad de preservar la biodiversidad y mejorar la calidad de los suelos agrícolas para potenciar la actividad y eficacia de los agentes de control biológico nativos, promoviendo así la capacidad supresiva de los suelos.



La doctoranda, miembros del tribunal y directores después de la defensa de la tesis. De izquierda a derecha: Juan Emilio Palomares Rius (Codirector), Luís Vicente López Llorca (Presidente), Ilenia Clavero Camacho (Doctoranda), Carlos Agustí Brisach (Secretario), Pablo Castillo (Codirector) y Isabel Luci Conceição (Vocal en pantalla).

Trabajos derivados de la Tesis que ya han sido publicados:

1. Clavero-Camacho, I., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Castillo, P., and Palomares-Rius, J.E. (2021). Remarkable cryptic diversity of *Paratylenchus* spp. (Nematoda: Tylenchulidae) in Spain. *Animals* 11. doi: 10.3390/ani11041161.
2. Clavero-Camacho, I., Palomares-Rius, J.E., Cantalapiedra-Navarrete, C., León-Ropero, G., Martín-Barbarroja, J., Archidona-Yuste, A., and Castillo, P. (2021). Integrative taxonomy reveals hidden cryptic diversity within pin nematodes of the genus *Paratylenchus* (Nematoda: Tylenchulidae). *Plants* 10. doi: 10.3390/plants10071454.
3. Clavero-Camacho, I., Palomares-Rius, J.E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Castillo, P., Liébanas, G., and Archidona-Yuste, A. (2022). A proposed new species complex within the cosmopolitan ring nematode *Criconema annuliferum* (de Man, 1921) Micoletzky, 1925. *Plants* 11. doi: 10.3390/plants11151977.
4. Clavero-Camacho, I., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Castillo, P., and Palomares-Rius, J.E. (2022). Distribution, ecological factors, molecular diversity, and specific PCR for major species of pin nematodes (*Paratylenchus* spp.) in *Prunus* plantations in Spain. *Plant Disease* 106, 2711-2721. doi: 10.1094/pdis-01-22-0188-re.
5. Clavero-Camacho, I., Archidona-Yuste, A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Castillo, P., and Palomares-Rius, J.E. (2024). Prevalence and ecological factors affecting the distribution of plant-parasitic nematodes in *Prunus* groves in Spain. *Journal of Integrative Agriculture* 23, 566-589. doi: 10.1016/j.jia.2023.02.033.
6. Clavero-Camacho, I., Ruiz-Cuenca, A.N., Cantalapiedra-Navarrete, C., Castillo, P., and Palomares-Rius, J.E. (2024). Diversity of microbial, biocontrol agents and nematode abundance on a susceptible *Prunus* rootstock under a *Meloidogyne* root gradient infection. *Frontiers in Plant Science* 15. doi: 10.3389/fpls.2024.1386535.