

## Identificación de nuevas fuentes de resistencia a la fusariosis vascular, al oídio y al pulgón en melón (*Cucumis melo* L.)

A. Garcés-Claver<sup>1</sup>, H. Chikh-Rouhou<sup>2</sup>, R. Sta-Baba<sup>2</sup>, V. González<sup>1</sup> y ML. Gómez-Guillamón<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CITA de Aragón. IA2. Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, España.

<sup>2</sup> CRRHAB/IRESA. Chott-Mariem, Túnez.

<sup>3</sup> IHSM 'La Mayora', UMA-CSIC, 29750-Algarrobo, Málaga, España.

**Palabras clave:** *Fusarium oxysporum*, *Aphis gossypii*, *Podosphaera xanthii*, cucurbits

### Resumen

El cultivo de melón en la costa mediterránea es afectado por distintas patologías que reducen considerablemente su producción. Tres de ellas son la fusariosis vascular, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (*Fom*), el oídio causado por el hongo *Podosphaera xanthii* y el pulgón *Aphis gossypii*, vector de importantes virus no persistentes. La detección de genotipos resistentes permitiría su uso bien como cultivares en zonas afectadas o bien como parentales en programas de mejora de esta especie. En este trabajo, fruto de una colaboración entre España y Túnez se presenta la evaluación de la resistencia a las citadas enfermedades de una colección de cultivares tunecinos de melón mediante bioensayos de inoculación artificial con aislados de los patógenos y el uso de marcadores moleculares asociados a los genes de resistencias a las razas 0, 1 y 2 de *Fom* y al gen *Vat*, responsable de la resistencia al pulgón *A. gossypii*.

### INTRODUCCIÓN

La fusariosis vascular y el odio son dos enfermedades fúngicas que, junto con el pulgón, limitan el cultivo del melón en las principales áreas de producción. La fusariosis vascular en melón es debida a la presencia de alguna de las cuatro razas fisiológicas descritas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (*Fom*): 0, 1, 2 y 1,2 (Risser et al., 1976). Mientras que la resistencia frente a la raza 1,2 tiene un control poligénico recesivo, las resistencias a las razas 0, 1 y 2 tienen un control monogénico dominante, siendo el gen *Fom-2* responsable de la resistencia a las razas 0 y 1 y *Fom-1* de las razas 0 y 2. El oídio está causado por el hongo *Podosphaera xanthii*, muy variable en su patogeneicidad y virulencia por la existencia de un gran número de patotipos y razas (Candido et al., 2014). Se han descrito numerosos genes de resistencia, en su mayoría monogénicos dominantes específicos de raza, y algunos recesivos, así como genes modificadores (Yuste-Lisbona et al., 2010). El pulgón, perteneciente a la especie *Aphis gossypii*, es considerado una plaga importante del melón siendo además un vector muy eficiente de virus no persistentes que afectan seriamente al cultivo. El gen *Vat* confiere resistencia a la infestación de *A. gossypii* y existen marcadores moleculares que permiten la distinción entre los genotipos resistentes y susceptibles (Dogimont et al., 2004). Estas patologías son muy frecuentes en los cultivos de esta especie, pero en algunos casos no existen resistencias en los frutos demandados por los consumidores y cuando existen suelen ser muy específicas de raza. La localización de nuevas fuentes de resistencia que permitan fortalecer las conocidas es siempre un objetivo presente en la mejora de melón. En este trabajo, fruto de una colaboración entre España y

Túnez, se ha explorado la diversidad existente en un grupo de cultivares de origen tunecino para las resistencias a la fusariosis vascular, al oídio y al pulgón.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la evaluación frente a *Fom* se han considerado 27 entradas locales de melón procedentes de Túnez. Doce plantas por entrada, en estado de cotiledones expandidos, fueron inoculadas artificialmente con sendas suspensiones conidiales ( $3 \cdot 10^6$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ ) de las razas 1 y 2 de *Fom*, mediante inmersión radicular durante 15 min. Posteriormente, las plántulas fueron depositadas en macetas de plástico (4 plantas/maceta) que contenían sustrato formado por turba, arena y tierra y mantenidas en una cámara de cultivo durante 30 días. La anotación de la severidad de los síntomas se realizó cada semana de acuerdo a una escala de 0-4, considerándose resistente de 0 a 1, susceptible  $> 2$  y heterogénea si la mitad de las plantas fueron resistentes. Como controles se utilizaron las líneas 'Charentais T', susceptible a todas las razas de *Fom*, 'Charentais Fom1' resistente a las razas 0 y 2 y 'Charentais Fom2' resistente a las razas 0 y 1. Catorce de estas entradas se inocularon artificialmente con la raza 5 de *P. xanthii*, una de las más frecuentes y extendidas en las zonas de producción de melón en el área mediterránea. El aislado procedía de un cultivo de melón de la zona (Málaga) y se mantuvo en condiciones axénicas en cotiledones de calabacín 'Negro Belleza'. La inoculación se realizó mediante depósito de inóculo en la segunda hoja verdadera de cada planta. Se inocularon diez plantas de cada una de las entradas a evaluar. La evaluación se realizó a los 12 días después de la inoculación y los síntomas se evaluaron en una escala de 0-3, en la que 0 y 1 corresponden a resistencia pues la enfermedad no se inicia o no progresa y 2 y 3 a susceptibilidad pues se observan signos de enfermedad débiles o intensos (Yuste-Lisbona et al. 2010). Como indicadores de raza se utilizaron las líneas diferenciales de melón 'PMR45' y 'Edisto47' susceptibles a raza 5 y 'PMR5' resistente.

Estas entradas fueron también evaluadas frente a *A. gossypii*. Para ello se criaron colonias a partir de individuos colectados en un invernadero de melón (Málaga) que se mantuvieron en plantas del cultivar español ANC-57, susceptible a pulgón. Para evaluar la resistencia a la colonización se depositaron 10 adultos ápteros sobre la primera hoja verdadera de cada planta (5 plantas/entrada) y al cabo de 72 horas se contó el número de individuos en la hoja inoculada. Siete días después de la infestación se evaluó la hoja donde se depositaron los pulgones. Las plantas con hoja arrugada se consideraron susceptibles y las no arrugadas se consideraron tolerantes. Como controles se utilizaron las líneas de melón 'PI414723' y 'Bola de oro', respectivamente tolerantes y susceptibles a la colonización del pulgón.

Para la caracterización molecular, se extrajo el ADN genómico a partir de hojas jóvenes de las 27 entradas utilizando el método CTAB con algunas modificaciones (Garcés-Claver et al., 2007). Para evaluar la resistencia a las razas 0 y 1 de *Fom* se utilizaron los cebadores Fom2-ResF, Fom2-ResR, Fom2-SusF, Fom2-Sus R asociados al gen *Fom2* (Oumouloud et al., 2012) y para la raza 2 los cebadores Fom-1F y Fom-1R ligados al gen *Fom1* (Oumouloud et al., 2015). Para confirmar la presencia del gen *Vat*, se utilizaron los marcadores D y E (Dogimont et al., 2004). Para todas las PCRs, las condiciones fueron las descritas por los autores. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó el cultivar Tortuga, como control susceptible a las razas 0, 1 y 2 de *Fom*, y el cultivar Bola de Oro, susceptible a la colonización del pulgón. La entrada PI161375 se utilizó como control resistente a las razas estudiadas de *Fom* y como genotipo portador del gen *Vat*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las inoculaciones artificiales y del genotipado para la resistencia a *Fom* se determinó que dos entradas fueron resistentes para la raza 1 aunque fueron heterocigotas y nueve para la raza 2 (Tabla 1). Para esta última raza, tres de ellas fueron heterocigotas, como en el caso de la raza 1, siendo necesario un proceso de selección de estos materiales frente a *Fom*. El menor número de pulgones ( $2,5 \pm 1,9$ ) en la hoja infestada a las 72 horas después de la infestación lo mostró el control resistente 'PI414723'. Nueve de los diez pulgones depositados en las plantas del control susceptible 'Bola de oro' permanecieron en la hoja infestada después de 72 horas desde la infestación por lo que se confirmó su susceptibilidad a esta especie. Solamente 'Ananas' mostró un comportamiento similar al del control resistente ( $5,0 \pm 1,9$ ). En el resto de las entradas el número de pulgones en hoja infestada fue similar a 'Bola de oro'. Las hojas de todas las entradas ensayadas se mostraron arrugadas a los 7 días desde el inicio de los experimentos excepto las del control resistente y las de 'Ananas'. Los análisis moleculares determinaron que tanto los controles PI161375 como PI414723 utilizados como 'Ananas' presentaba, los marcadores Vat D y Vat E asociados al gen *Vat*, por lo que solamente la entrada 'Ananas' se consideró de interés como posible donante de la resistencia a la colonización por *A. gossypii* y a la transmisión de virus por este áfido. Todas las entradas fueron susceptibles a la raza 5 de *P. xanthii*.

La entrada 'Ananas' pertenece al grupo botánico *reticulatus*, el fruto es elíptico-alargado, de unos 1,5 kg de peso, 27 cm de longitud y 16,5 cm de anchura, de carne amarillo-anaranjada y con un contenido en sólidos solubles del orden de 10,7 °Brix. Dadas sus características agronómicas la hacen un parental muy adecuado para la consecución de variedades/híbridos de este tipo con resistencias a la raza 2 de *Fom* y a la transmisión de virus por *A. gossypii*. Se pretende inscribir esta entrada en el Servicio de Inscripción Varietal del Ministerio de Agricultura de Túnez y será utilizada como parental multi-resistente en futuros programas de mejora.

## AGRADECIMIENTOS

Parte de este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2014-53398-C2-1-R, AGL2017-85563-C2-2-R y CléProd (IRESA).

## Referencias

- Candido, V., Campanelli, G., Viggiana, G., Lazzeric, L., Ferrari, V., Camelea I. 2014. Melon yield response to the control of powdery mildew by environmentally friendly substances. *Scientia Horticulturae* 166:70–77.
- Dogimont, C., Bendahmane, A., Pitrat, M., Burget-Bigeard, E., Hagen, L., Le Menn, A., Pauquet, J., Rouselle, P., Caboche, M., Chovelon, V. 2004. New polynucleotide implicated in plant resistance, useful for producing transgenic plants resistant to *Aphis gossypii* and associated viral transmission, also encoded protein. World patent WO2004072109-A.
- Garcés-Claver, A., Fellman, S.M., Gil-Ortega, R., Jahn, M., Arnedo-Andrés, M.S. 2007. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *Theor Appl Genet* 115:907–916.
- Ivanoff, S.S. 1945. A seedling method for testing aphid resistance and its application to breeding and inheritance studies in cucurbits and other plants. *J. Hered* 36:357.

- Oumouloud, A., El Otmani, M., Álvarez, J.M. 2015. Molecular characterization of Fom1 gene and development of functional markers for molecular breeding of resistance to Fusarium race 2 in melon. *Euphytica* 205:491-501.
- Oumouloud, A., Mokhtari, M., Chikh-Rouhou, H., Arnedo-Andrés, M.S., Gonzalez-Torres, R., Álvarez, J.M. 2012. Characterization of the Fusarium wilt resistance Fom-2 gene in melon. *Mol Breed* 30:325–334.
- Risser, G., Banihashemi, Z., Davis, DW. 1976. A proposed nomenclature of Fusarium oxysporum f.sp. melonis races and resistance genes in Cucumis melo. *Phytopathology* 66: 1105-1106.
- Yuste-Lisbona, F.J., López-Sesé, A.I., Gómez-Guillamón, M.L. 2010. Inheritance of resistance to races 1, 2 and 5 of powdery mildew in the melon TGR-1551. *Plant Breed.* 129:72-75.

Tabla 1. Fenotipo (F) y genotipo (G), de cultivares de melón, asociados a la resistencia a las razas 1 y 2 de *Fom*, a la colonización por *A. gossypii* y a la raza 5 de *P. xanthii*.

	<i>Fom</i>				<i>A. gossypii</i>		<i>P. xanthii</i>
	<b>Raza 1</b>		<b>Raza 2</b>		<b>F</b>	<b>G</b>	<b>F</b>
	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>G</b>			
MM Chott-Mariem	S	S	<b>R</b>	<b>H</b>	S	S	S
MM Menzel Chaker	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S	S	S
Maazoun Mehdi	S	S	H	R	S	S	S
Maazoun Fethi	S	S	S	S	-	-	-
Fakous (FL)	<b>R</b>	<b>H</b>	H	H	S	S	S
Fakous Salem 2014	S	S	S	H	-	-	-
Trabelsi	R	S	R	S	S	S	S
Galaoui	R	S	H	S	S	S	S
Dziri (DZ P5 2011)	R	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S	S	S
Lobneni	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	-	-	-
Arbi	S	S	S	S	S	S	S
Horchay	<b>R</b>	<b>H</b>	H	H	-	-	-
Arbi 1'	S	S	S	S	-	-	-
Arbi 2'	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	-	-	-
Arbi 3'	S	S	S	S	-	-	-
Sarachika	R	S	<b>R</b>	<b>H</b>	S	S	S
RD	R	S	S	S	-	-	-
Rupa	S	S	<b>R</b>	<b>H</b>	S	S	S
Ananas	R	S	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>Vat</b>	S
HTM Kairouan	S	S	S	S	-	-	-
Accr Jendouba	S	S	S	S	-	-	-
Dziri (Menzel Kamel)	S	S	S	S	-	-	-
Ecotype arbi Dz	S	S	S	S	-	-	-
Maazoun (Kairouan)	S	S	S	S	S	S	S
Asli	S	S	S	S	S	S	S
Stambouli	R	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S	S	S
V4 autoféc	S	S	S	S	-	-	-

Fenotipo = R: resistente; S: sensible; H: heterogéneo. Genotipo= R: resistente homocigoto; H: resistente heterocigoto; S: susceptible; Vat: presencia gen *Vat*.