



---

DESARROLLO DE NUEVOS  
PORTAINJERTOS PARA  
MELÓN MEDIANTE EL  
USO DE ESTRATEGIAS  
Y HERRAMIENTAS  
BIOTECNOLÓGICAS

---

ANDRÉS CACERES BURBANO

---

Directoras

Dra. María Belén Picó Sirvent

Dra. María Carmen Gisbert Domenech

Tesis Doctoral

Valencia, Abril 2020



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

Tesis doctoral

DESARROLLO DE NUEVOS  
PORTAINJERTOS PARA MELÓN  
MEDIANTE EL USO DE  
ESTRATEGIAS Y HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

*Tesis presentada por*

ANDRÉS CÁCERES BURBANO

*Directores*

Dra. María Belén Picó Sirvent

Dra. María Carmen Gisbert Domenech

Valencia, abril 2020



*A mi esposa y compañera de vida, Diana, incondicional e incansable*

*A mis padres, Manuel y Mélida, ejemplo y apoyo constante*

*A mis hermanos, Cami y Javier, por siempre haber creído en mí*



## Agradecimientos

Esta etapa ha llegado a su final. Ha sido un largo camino lleno de historias, aventuras, caídas, muchas dudas, pero también momentos inolvidables y alegres que no los cambiaría por nada.

Por todo esto, agradezco a Dios y a la vida por esta oportunidad y experiencia del doctorado a tantos kilómetros de mi tierra natal.

A mis dos directoras y tutoras, mi gratitud infinita por compartir su tiempo, conocimiento y experiencia, por los consejos y las horas de trabajo en el despacho, los laboratorios y el campo.

En primer lugar, a Belén, por abrirme las puertas de la Universidad y el COMAV, apoyarme desde el inicio para poder desarrollar mi tesis doctoral y brindarme su confianza en todo este tiempo. A Carmina por compartir largas jornadas de trabajo en el laboratorio y su inagotable energía y motivación por la investigación.

A mis compañeros doctorandos que me recibieron y me ayudaron a dar los primeros pasos en esta larga aventura. Gracias Cris por tu paciencia y ayuda con los virus y el ADN; Gorka por siempre estar pendiente de todo, tu apoyo en las jornadas de campo y laboratorio, las cosechas y el fenotipado interminable; a mis compañeros doctores, Tania y Rubén, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y ayudarme con todas mis inquietudes desde el primer día; Gerardo, incansable y metódico, tu amistad y apoyo en todos estos años fueron claves para llegar a la meta. A todos mis compañeros del COMAV con los que compartimos de una u otra forma el trabajo y el amor por la investigación, Bea, Angela, Alberto, Jaime, Alex, Deysi, José, Gabriel, Alba, Estefanía, Carol.

A todo el equipo humano que forma parte del COMAV; Rosa por tu buena energía y siempre estar pendiente; Alicia por tus palabras de aliento; Eva por guiarme en mis primeros pasos en los ensayos de la Universidad y por tus palabras de motivación;

María, Carlos, Jaime, Merche y Raúl por su trabajo y colaboración para los ensayos y publicaciones. Gracias a todo el personal técnico de los invernaderos y laboratorios que forman el gran equipo humano de la UPV y el COMAV.

A toda la gente tan amable que conocí en esta etapa de mi vida. A mis compañeras de piso, Diana, Ceci por las charlas y consejos. A mi buena amiga Lorena por recibirme al llegar a Valencia desde el primer día y compartir su experiencia y amistad. A los “futboleros” y a los “ecuatorianos” con quienes compartimos gratos momentos. A mis amigos en Barcelona que siempre tuvieron palabras de aliento y apoyo, Aida, Mar, Sergio, Jelena, Moni, Lino, Aby.

Quiero agradecer a toda mi familia que está en Ecuador porque desde el primer día me dieron su apoyo y aliento; a mis abuelitos Hugo y Marina, que han sido una fuente inagotable de amor, unión y ejemplo; a mis tíos, tías, primos, primas (son muchos y me faltarían líneas) y mi suegra Amparito porque a pesar de la distancia siempre tuvieron palabras y gestos de apoyo y ánimo durante toda esta etapa.

A mis padres, que me han inculcado el trabajo honesto y responsable. Siempre han creído en mí y me han brindado fortaleza, amor, y apoyo incondicional.

A mis hermanos porque me han transmitido su alegría, confianza y energía en todo momento y han sido mi motivación.

A mi querida esposa y compañera de vida Diana, por ser un ejemplo de trabajo, tenacidad y valentía; gracias a tus palabras y actitud siempre logré levantarme y seguir adelante. Eres y serás mi inspiración, y sé que nada es imposible al estar juntos.

Finalmente agradecer a mi país Ecuador y a la SECRETARIA DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (SENACYT) y al INSTITUTO NACIONAL DE FOMENTO AL TALENTO HUMANO (IFTH) que me apoyaron con una beca de estudios para realizar mi tesis Doctoral, con la que espero aportar además de conocimiento científico, alternativas y soluciones para la realidad agrícola del país.

## Resumen

El melón (*Cucumis melo* L.) es una de las especies hortícolas más demandadas en el mundo, y como tal el mejoramiento vegetal tiene el desafío continuo de generar alternativas para el agricultor por medio del desarrollo de nuevas variedades que presenten, tolerancia/resistencia a factores de estrés biótico (plagas y enfermedades) y abiótico (temperatura, humedad, suelo) y a su vez atributos de calidad apreciados por el consumidor.

El mejoramiento convencional en melón por medio de cruzamientos entre líneas seleccionadas es una estrategia ampliamente utilizada, pero que presenta algunas limitaciones, como las barreras de cruzabilidad entre las variedades comerciales y el germoplasma silvestre, además de los períodos extensos de tiempo requeridos para evaluar las progenies.

En este contexto, el injerto y el desarrollo de nuevos patrones están siendo adoptados a nivel mundial como estrategias alternativas de mejora en cultivos hortícolas, que permite aprovechar caracteres de interés presentes en especies no cultivadas o no comerciales sin necesidad de realizar largos y complejos planes de mejora (cruzamiento y retrocruzamiento).

El uso de la diversidad intra e interespecífica como portainjertos para sandía ha dado muy buenos resultados, documentados en una amplia bibliografía científica. Sin embargo, las ventajas y beneficios del injerto presentan inconsistencias en los estudios realizados en melón. Esto se explica por los diferentes métodos de cultivos evaluados, así como por la amplia gama de variedades y tipos comerciales de melón existentes; esto exige a su vez, mayor inversión y fortalecimiento de la investigación en esta área del conocimiento. La presente Tesis Doctoral tiene por objetivo la generación de información relacionada al injerto en melón mediante la evaluación de portainjertos desarrollados en los grupos de mejora del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), donde se ha llevado a cabo este trabajo, utilizando para ello



diferentes condiciones de cultivo, y por lo tanto estrés, y utilizando dos tipos de melón muy consumidos en España y Europa como el ‘Piel de Sapo’ y el ‘Cantalupo’, además de una variedad tradicional muy apreciada por su calidad, el ‘Meló d’Or d’Ontinyent’.

La recuperación de variedades tradicionales es un reto para la agricultura moderna y gracias al injerto validamos el potencial de esta técnica para producir ‘Meló d’Or d’Ontinyent’ bajo condiciones de estrés por la presencia de un hongo patógeno como *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker en el suelo. El patrón experimental UPV-PRMc, desarrollado por el grupo de mejora de cucurbitáceas del COMAV de la Universidad Politécnica de Valencia, mediante la hibridación de un melón tipo ‘Piel de Sapo’ y una accesión de un melón silvestre del tipo *agrestis*, mostró su capacidad para proporcionar resistencia y vigor a la variedad tradicional, que sin el uso de un portainjerto resistente sería incapaz de culminar su ciclo de cultivo bajo estas condiciones. Ensayos de campo complementarios permitieron evaluar el comportamiento de diferentes portainjertos experimentales y comerciales de *Cucurbita* y *Cucumis*, en condiciones de estrés bajo sistemas de producción convencional en campo abierto. Con relación al vigor y al desarrollo de las plantas injertadas, los patrones de *Cucurbita* mostraron un retraso en el vigor temprano del cultivo y tanto Ma x Mo EF como Pe x Pe ZS tuvieron los más bajos rendimientos. Destaca el uso del híbrido Ma x Ec como una buena alternativa a los híbridos comerciales normalmente utilizados entre *C. maxima* x *C. moschata*. Por su parte los portainjertos de *C. melo* mostraron una mejor afinidad y mayor vigor consistentemente a lo largo de los 3 años de estudio, al igual que los híbridos interespecíficos Fi x My y Fi x An. Adicionalmente al estudio de la compatibilidad entre el melón Piel de Sapo y los diferentes patrones experimentales y comerciales, también se abordó el impacto sobre la calidad del fruto. Este aspecto es quizá el más controvertido en relación al injerto por el uso de patrones filogenéticamente distantes que pueden pertenecer a otra especie o género distinto al melón. Nuestros datos reflejaron que los patrones de *Cucurbita* tuvieron efecto sobre la forma del fruto y la cavidad seminal, mientras que los patrones de *Cucumis melo* presentaron un menor impacto sobre los parámetros de calidad del fruto. También es importante destacar que los patrones de especies silvestres o no cultivadas de *Cucumis* no afectaron significativamente la calidad, a pesar de que *C. metuliferus* E. Meyer

ex Naudin mostró signos de colapso en el segundo año de evaluación y consistentemente produjo los frutos más pequeños en comparación a las plantas sin injertar. El estudio complementario sobre el perfil metabólico y aromático de los frutos ha permitido ampliar los criterios de selección de portainjertos de melón. Se observó la variación en el contenido de ácidos y azúcares principalmente debido al grado de maduración y en menor medida a una combinación de patrón-variedad específica. La modificación del perfil de compuestos volátiles mostró un efecto claro de los portainjertos de *Cucurbita* sobre la variedad de melón, con el incremento de compuestos aromáticos relacionados a la calabaza y la reducción de otros compuestos claves en el aroma del melón Piel de Sapo.

Con la perspectiva de aprovechar el germoplasma silvestre como portainjerto, en el Capítulo 2 de la presente tesis doctoral, presentamos los estudios enfocados en la caracterización de especies silvestres o no cultivadas del género *Cucumis*, que son una fuente de resistencias a patógenos y enfermedades de importancia económica como nematodos, oído o *Fusarium*, y que están ausentes en las variedades comerciales de melón. La estandarización de metodologías para optimizar la germinación de accesiones de *Cucumis* silvestres ha sido un primer paso para maximizar el rendimiento de la semilla como material de partida, ya que la dormancia presente en el germoplasma no cultivado suele ser un factor limitante. Basados en los estudios preliminares de campo en los que se observó la diferencia de vigor entre una accesión de *C. metuliferus* y el melón ‘Piel de Sapo’, se estudió si los híbridos interespecíficos desarrollados por el grupo de mejora suponían una opción para el incremento del vigor y la combinación de características deseables en una misma planta capaz de soportar el injerto de una variedad comercial de melón. Las barreras de incompatibilidad, impidien los cruzamientos viables con *C. metuliferus* (filogenéticamente separado del resto de *Cucumis* africanos) pero los híbridos interespecíficos de los cruzamientos entre *Cucumis ficifolius* A. Rich. x *Cucumis anguria* L. y *Cucumis ficifolius* x *Cucumis myriocarpus* Naudin son viables. Estos materiales F1, mostraron un mayor vigor, un incremento en el diámetro de su hipocótilo y una buena compatibilidad con melones de tipo ‘Cantalupo’ y ‘Piel de Sapo’, bajo condiciones de invernadero y a campo abierto. Un alto grado de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* como resultado de la combinación de sus genomas

parentales, así como una buena tolerancia al estrés osmótico bajo condiciones *in vitro*, destacan como características deseables en estos dos híbridos interespecíficos.

Utilizando especies silvestres e híbridos de *Cucumis*, se evaluaron distintas metodologías para la obtención de poliploides, con el objetivo de potenciar el vigor de las plántulas (tamaño y diámetro del hipocótilo) y estudiar los efectos de la poliploidización. La colchicina fue el compuesto antimitótico más efectivo aplicado sobre semillas pregerminadas de dos híbridos interespecíficos de *Cucumis*. En líneas homocigóticas de *C. anguria*, *C. ficifolius*, *C. myriocarpus*, o *C. metuliferus*, la duplicación del genoma no fue estable en ningún caso. La evaluación del nivel de ploidía confirmó que los alopoliploides obtenidos fueron hexaploides ( $6n=72$ ). Los nuevos materiales obtenidos, son alopoliploides sintéticos que resultaron de la duplicación de un genoma híbrido. A diferencia de sus antecesores triploides, los alopoliploides mostraron la recuperación de su fertilidad, asociado posiblemente a la presencia de SNPs concretos relacionados a genes que codifican procesos reproductivos. La mejora de características de interés en especies silvestres (mayor diámetro de los hipocótilos) ha sido posible por medio de la poliploidización, lo que favorece el procedimiento de realización del injerto y la producción de la planta injertada.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido posibles gracias a la colaboración de grupos de investigación interdisciplinarios de la Universidad Politécnica de Valencia, la Universidad Jaime I de Castellón y la Politécnica de Cataluña, en el marco del proyecto AGL2014-53398-C2-2-R APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS Y CULTURALES PARA LA MEJORA DE LAS RESISTENCIAS Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN MELON Y SANDIA y con apoyo de los proyectos AGL2017-85563-C2-1-R de FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades–Agencia Estatal de Investigación, y proyecto para Grupos de Excelencia PROMETEO 2017/078 además del apoyo de la SECRETARIA DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (SENECYT-ECUADOR) que por medio del Instituto de Fomento al Talento Humano (IFTH), proporcionó una beca de estudio al doctorando.

## Abstract

The melon (*Cucumis melo* L.) is one of the most demanded horticultural species in the world and as such, plant improvement has the constant challenge of thinking up alternatives for the farmer through the development of new varieties with tolerance / resistance to biotic (pests and diseases) and abiotic (temperature, humidity, soil) stress factors and quality attributes appreciated by the consumer.

Conventional breeding in melon through crossings between selected lines is a widely used strategy, but it has some limitations, such as cross barriers between commercial varieties and wild germplasm, in addition to the extended periods of time required to evaluate the progeny.

In this context, grafting and the development of new rootstocks are being adopted worldwide as alternative breeding strategies in horticultural crops, which allows to take advantage of relevant characteristics present in non-cultivated or non-commercial species without extensive and complex breeding programs (crossing and backcrossing).

Development of rootstocks for watermelon crop derived from intra and interspecific diversity have been successful and well documented in a wide scientific bibliography. However, advantages and benefits from grafting show inconsistent data in melon assays. These results can be explained since different cultivation methods have been evaluated and because of the large number of commercial varieties of melon; this fact motivates a higher investment and strengthening of research in this area of knowledge. The present Doctoral Thesis has as objective the generation of information related with melon grafting, through the development, characterization and study under stress conditions of novel rootstocks used for two commercial cultivars consumed in Spain and Europe, like 'Piel de Sapo' and 'Cantaloupe', besides a traditional variety as the 'Meló d'Or d'Ontinyent'.

Recovery of traditional cultivars is a challenge for modern agriculture and thanks to grafting we have validated the potential of this technique to crop ‘Meló d’Or d’Ontinyent’ in soil stressed by *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker. The experimental rootstock UPV-PRMc, developed by Institute for the Preservation and Improvement of Valencian Agro-diversity (COMAV) of the Polytechnic University of Valencia, from an hybridization between one ‘Piel de Sapo’ melon and one accession of wild *agrestis* melon, provided resistance and vigor to the traditional variety, which is not able to complete the crop cycle without be grafted onto a resistant rootstock. Complementary field trials allowed to test the behavior of experimental and commercial rootstocks of *Cucurbita* and *Cucumis* under stress conditions in conventional production systems. Regarding vigor and growth of grafted plants, *Cucurbita* rootstocks showed a delay in early vigor of plants and Ma x Mo EF and Pe x Pe ZS had the lowest yields. The Ma x Ec hybrid highlights as a good alternative to the *C. maxima* x *C. moschata* hybrids, commonly used in commercial grafting. On the other hand, *C. melo* rootstocks showed better affinity and higher vigor consistently along these 3 years, as well as the interspecific hybrids Fi x My and Fi x An. Additionally to the compatibility behavior between ‘Piel de Sapo’ melon and different experimental and commercial rootstocks, also the impact on fruit quality was studied. This issue is one of the most controversial about grafting because of the use of rootstocks phylogenetically distant that belong to other species or genera than melon. Our data showed an effect over shape and size of seed cavity when using *Cucurbita* rootstocks, while *Cucumis melo* ones showed a lower impact on fruit quality traits. It is important to note that rootstocks derived from wild or non-cultivated *Cucumis* species did not alter significantly the quality, despite of that *C. metuliferus* E. Meyer ex Naudin showed vine decline symptoms in the second year and consistently the smallest fruits compared to non-grafted plants. The complementary analysis of the aromatic and metabolic profile from fruits have allowed to increase the selection criteria for melon rootstocks. Variation in acids and sugars was observed mainly due to maturation degree and to a lesser extent to a specific rootstock-scion combination. The modification in volatile compounds levels displayed an effect of the *Cucurbita* rootstocks on melon cultivar, increasing aromatic compounds related to pumpkin and decreasing other key compounds in ‘Piel de Sapo’ aroma melon.

With the prospect to take advantage from wild germplasm to develop new rootstocks, in the Chapter 2 in this Doctoral Thesis, we showed the studies focused on the characterization of wild or non-cultivated species in the *Cucumis* genus, which are a resistance resource against pathogens and diseases of economic importance like nematodes, powdery mildew or *Fusarium*, and that are absent in commercial melon. The standardization of methodologies to optimize the germination of wild *Cucumis* accessions has been the first step to maximize the seed yield as a started material, since the dormancy in non-cultivated germplasm is usually a limiting factor. Based on preliminary field studies, where the differences in vigor between *C. metuliferus* and ‘Piel de Sapo’ melon were observed, the development of interspecific hybrids was approached as an option to increase the vigor and combine characteristics of interest in one same plant able to bear the grafting with a commercial variety of melon. The incompatibility barriers prevented viable crosses with *C. metuliferus* (phylogenetically distant of the rest of African *Cucumis*), although two interspecific hybrids were viable from crosses between *Cucumis ficifolius* A. Rich. x *Cucumis anguria* L. and *Cucumis ficifolius* x *Cucumis myriocarpus* Naudin. These F1 plants had higher vigor, hypocotyl diameter and good compatibility with ‘Cantaloupe’ and ‘Piel de Sapo’ melons under field and greenhouse conditions. High level of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* as result of the combination of their parental genomes, as well as a good tolerance to osmotic stress under *in vitro* conditions, highlight as desirable characteristics in these two new interspecific hybrids.

With the preliminary results on the improvement of traits in wild *Cucumis* germplasm from the hybridization, some methodologies were evaluated to obtain polyploids, in order to enhance the desirable features in these hybrids (vigor, hypocotyl size and diameter). Colchicine was the most effective antimetabolic agent applied over pregerminated seeds of two *Cucumis* interspecific hybrids. In homozygous lines of *C. anguria*, *C. ficifolius*, *C. myriocarpus*, or *C. metuliferus*, genome duplication was not stable. The polyploidy level confirmed that allopolyploids obtained were hexaploids ( $6n=72$ ). The novel materials obtained are synthetic allopolyploids that result from the duplication of a hybrid genome. Unlike their triploid ancestors, allopolyploids showed the recovery

of their fertility, possibly associated with the presence of specific SNPs related to genes that encode reproductive processes. The improvement of characteristics of interest in wild species has been possible through polyploidization, which favors the development of new improved materials capable of adapting to the grafting process

The results presented in this Doctoral Thesis have been possible thanks to the collaboration of interdisciplinary research groups from Polytechnic University of Valencia, Jaime I University of Castellón and Polytechnic University of Catalonia, within the framework of the AGL2014-53398-C2-2 project. -R BIOTECHNOLOGICAL AND CULTURAL APPROACHES FOR THE IMPROVEMENT OF RESISTANCES AND THE CONTROL OF DISEASES IN MELON AND WATERMELON and with the support of the projects AGL2017-85563-C2-1-R of FEDER / Ministry of Science, Innovation and Universities-State Agency of Research and project for Groups of Excellence PROMETEO 2017/078, in addition to the support of the SECRETARIA DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (SENECYT-ECUADOR) which through the Institute for the Promotion of Human Talent (IFTH), provided a scholarship for the doctoral candidate.

## Resum

El meló (*Cucumis melo* L.) és una de les espècies hortícoles més demandades en el món, i consegüentment el millorament vegetal té el desafiament continu de generar alternatives per a l'agricultor per mitjà del desenvolupament de noves varietats que presenten, tolerància/resistència a factors d'estrès biòtic (plagues i malalties) i abiòtic (temperatura, humitat, sòl) i al seu torn atributs de qualitat apreciats pel consumidor.

El millorament convencional en meló mitjançant creuaments entre línies seleccionades és una estratègia àmpliament utilitzada, però que presenta algunes limitacions, com la impossibilitat de creuar-se d'algunes varietats comercials i determinat germoplasma silvestre d'interès, a més dels períodes extensos de temps requerits per a avaluar les progènies.

En aquest context, l'empelt i el desenvolupament de nous patrons estan sent adoptats a nivell mundial com a estratègies alternatives de millora en cultius hortícoles. L'empelt permet aprofitar caràcters d'interès presents en espècies no cultivades o no comercials sense necessitat de realitzar llargs i complexos plans de millora (creuament i retrocruzamiento).

L'ús de la diversitat intra i interespecífica com a portaempelts de meló d'Alger ha donat molt bons resultats, documentats en una àmplia bibliografia científica. No obstant això, els avantatges i beneficis de l'empelt presenten inconsistències en els estudis realitzats en meló. Això s'explica pels diferents mètodes de cultius avaluats, així com per l'àmplia gamma de varietats i tipus comercials de meló existents; això exigeix al seu torn, major inversió i enfortiment de la investigació en aquesta àrea del coneixement. La present Tesi Doctoral té per objectiu la generació d'informació relacionada amb l'empelt en meló, mitjançant l'avaluació de nous portaempelts que s'han obtingut en els grups de millora del COMAV (Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana) on s'ha dut a terme aquest treballs fent servir diferents condicions de cultiu i per tant de estressos i dos tipus de meló molt consumits a Espanya i Europa com el 'Piel



de Sapo' i el 'Cantalupo' a més d'una varietat tradicional reconeguda per la seua excel·lent qualitat, el 'Meló d'Or d'Ontinyent'.

La recuperació de varietats tradicionals és un repte per a l'agricultura moderna i mitjançant l'empelt validem el potencial d'aquesta tècnica per a produir 'Meló d'Or d'Ontinyent' sota condicions d'estrès degudes a la presència en la terra d'un fong patògen com es el *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker. El patró experimental UPV-PRMc, desenvolupat pel grup de millora de cucurbitàcies del COMAV, mitjançant la hibridació d'un meló tipus 'Piel de Sapo' i una accessió d'un meló silvestre del tipus *agrestis*, va mostrar la seua capacitat per a proporcionar resistència i vigor a la varietat tradicional, que sense l'ús d'un portaempelt resistent no completaria el cicle de cultiu sota aquestes condicions. Assajos de camp complementaris van permetre avaluar el comportament de diferents portaempelts experimentals i comercials de *Cucurbita* i *Cucumis*, en condicions d'estrès en sistemes de producció convencional a camp obert. En relació amb el vigor i al desenvolupament de les plantes empeltades, els patrons de *Cucurbita* van mostrar un retard en el vigor a l'inici del cultiu i tant Ma x Mo EF com Pe x Pe ZS van tindre els rendiments més baixos. Destaca l'ús de l'híbrid Ma x Ec com una bona alternativa als híbrids comercials normalment utilitzats que deriven de creuaments *C. maxima* x *C. moschata*. Per la seua part els portaempelts de *C. melo* van mostrar una millor afinitat i major vigor consistentment al llarg dels 3 anys d'estudi, igual que els híbrids interespecífics Fi x My i Fi x An. Addicionalment a l'estudi de la compatibilitat entre el meló 'Piel de Sapo' i els diferents patrons experimentals i comercials, també es va estudiar l'impacte sobre la qualitat del fruit. Aquest aspecte és potser el que més controvèrsia crea al voltant de l'ús de l'empelt on s'utilitzen portampelts filogenèticament distants que poden pertànyer a una altra espècie o gènere diferent al meló. Les nostres dades van reflectir que els patrons de *Cucurbita* van tindre efecte sobre la forma del fruit i la cavitat seminal, mentre que els patrons de *Cucumis melo* van presentar un menor impacte sobre els paràmetres de qualitat del fruit. També és important destacar que els patrons d'espècies silvestres o no cultivades de *Cucumis* no van afectar significativament la qualitat, a pesar que *C. metuliferus* E. Meyer ex Naudin va mostrar signes de col·lapse en el segon any d'avaluació i consistentment va produir els fruits més xicotets en comparació a

les plantes sense empeltar. L'estudi complementari sobre el perfil metabòlic i aromàtic dels fruits ha permès ampliar els criteris de selecció de portaempelts de meló. Es va observar la variació en el contingut d'àcids i sucres principalment com a conseqüència del grau de maduració i en menor mesura a una combinació de patró-varietat específica. La modificació del perfil de compostos volàtils va mostrar un efecte clar dels portaempelts de *Cucurbita* sobre la varietat de meló, amb l'increment de compostos aromàtics relacionats amb la carabassa i la reducció d'altres compostos claus en l'aroma del meló tipus 'Piel de Sapo'.

Amb la perspectiva d'aprofitar el germoplasma silvestre per al desenvolupament de nous portaempelts, al Capítol 2 de la present tesi doctoral, presentem els estudis enfocats a la caracterització d'espècies silvestres o no cultivades del gènere *Cucumis*, que són una font de resistències a patògens i malalties d'importància econòmica com a nematodes, oïdi o *Fusarium*, i que no tenen en les varietats comercials de meló. L'estandardització de metodologies per a optimitzar la germinació d'accessions de *Cucumis* silvestres ha sigut un primer pas per a maximitzar el rendiment de la llavor com a material de partida, ja que la dormància present en el germoplasma no cultivat sol ser un factor limitant. Basats en els estudis preliminars de camp en els quals es va observar la diferència de vigor entre una accessió de *C. metuliferus* i el meló 'Piel de Sapo', es van avaluar els híbrids interespecífics desenvolupats als grups de millora com una opció per incrementar el vigor i combinar característiques desitjables en una mateixa planta que a l'hora fora capaç de suportar l'empelt d'una varietat comercial de meló. Les barrees d'incompatibilitat, no fan possible la hibridació amb *C. metuliferus* (filogenèticament separat de la resta de *Cucumis* Africans) però els híbrids interespecífics viables dels creuaments entre *Cucumis ficifolius* A. Rich. x *Cucumis anguria* L. i *Cucumis ficifolius* x *Cucumis myriocarpus* Naudin són viables. Aquests materials F1, van mostrar un major vigor, un increment en el diàmetre del seu hipocòtil i una bona compatibilitat amb melons de tipus 'Cantalupo' i 'Piel de Sapo', en condicions d'hivernacle i a camp obert. També aquests materials han mostrat un alt grau de resistència a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* i una bona tolerància a l'estrès osmòtic (avaluada en condicions de cultiu *in vitro*), característiques desitjables en aquests dos nous híbrids interespecífics.

Partint del germoplasma de *Cucumis* silvestre i els híbrids obtinguts, es va avaluar diferents metodologies per a l'obtenció de poliploides, amb l'objectiu de potenciar el vigor de les plàntules (grandària i diàmetre dels hipocòtil) i estudiar els efectes de la poliploidització. La colxicina va ser el compost antimitòtic més efectiu al aplicar-lo a llavors pregerminadas dels dos híbrids interespecífics de *Cucumis*. En línies homozigòtiques de *C. anguria*, *C. ficifolius*, *C. myriocarpus*, o *C. metuliferus*, la duplicació del genoma no va ser estable en cap cas. L'avaluació del nivell de ploidia va confirmar que els al·loploiploides obtinguts van ser hexaploides ( $6n=72$ ). Els nous materials obtinguts, són al·loploiploides sintètics que van resultar de la duplicació d'un genoma híbrid. A diferència dels seus antecessors triploides, els al·loploiploides van mostrar la recuperació de la seua fertilitat, associat possiblement a la presència de SNPs concrets relacionats a gens que codifiquen processos reproductius. La millora de les característiques d'interès (major diàmetre dels hipocòtils) ha sigut possible mitjançant l'obtenció de poliploides, la qual cosa facilita el procediment per a dur a terme l'empelt i per tant la producció de planta empeltada.

Els resultats presentats en aquesta Tesi Doctoral han sigut possibles gràcies a la col·laboració de grups d'investigació interdisciplinaris de la Universitat Politècnica de València, la Universitat Jaume I de Castelló i la Politècnica de Catalunya, en el marc del projecte AGL2014-53398-C2-2-R APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS Y CULTURALES PARA LA MEJORA DE LAS RESISTENCIAS Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN MELON Y SANDIA i amb suport dels projectes AGL2017-85563-C2-1-R de FEDER/Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats–Agència Estatal d'Investigació, i projecte per a Grups d'Excel·lència PROMETEO 2017/078 a més del suport de la SECRETARIA DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA, TECNOLOGIA E INNOVACIÓN (SENECYT-L'Equador) que per mitjà del 'Instituto de Fomento del Talento Humano' (IFTH), va proporcionar una beca d'estudi al doctorand.

# Índice

|  |    |
|--|----|
| 1. Introducción.....   | 1  |
| 1.1. Origen y clasificación del melón ( <i>Cucumis melo</i> L.).....   | 3  |
| 1.2. Importancia Económica.....  | 6  |
| 1.3. Limitaciones en la producción de melón.....   | 9  |
| 1.3.1. Plagas y enfermedades.....  | 9  |
| 1.3.2. Factores ambientales.....   | 14 |
| 1.4. El injerto como herramienta de mejora frente a estreses bióticos y abióticos en el cultivo del melón..... | 18 |
| 1.4.1. La técnica del injerto: Metodologías.....   | 20 |
| 1.5. Desarrollo de patrones/portainjertos para melón.....  | 22 |
| 1.5.1. Portainjertos del género <i>Cucurbita</i> .....   | 22 |
| 1.5.2. El género <i>Cucumis</i> como recurso para el desarrollo de nuevos portainjertos de melón.....          | 24 |
| 1.5.2.1. Hibridación interespecífica en el género <i>Cucumis</i> .....   | 27 |
| 1.5.2.2. Poliploidización como herramienta de mejora.....  | 34 |
| 1.6. Impacto y efectos del injerto.....  | 37 |
| 1.6.1. Interacción portainjerto-variedad.....  | 37 |
| 1.6.2. El injerto y la resistencia a estrés biótico y abiótico.....  | 38 |
| 1.6.3. Impacto del injerto sobre el vigor y floración de la variedad injertada.....                            | 39 |
| 1.6.4. Efectos negativos del injerto: impacto sobre la calidad del fruto.....                                  | 40 |
| 1.6.5. Estructura de la presente tesis doctoral.....   | 42 |
| 1.7. Bibliografía.....   | 43 |
| <br>   |    |
| 2. Objetivos y Justificación.....  | 63 |

|  |     |
|--|-----|
| 3. Capítulos.....  | 67  |
| Capítulo 1. Evaluación de portainjertos experimentales para el cultivo de melón.....   | 69  |
| 1.1. Uso de portainjertos para la recuperación de variedades tradicionales.....  | 71  |
| El injerto como técnica para la recuperación de variedades tradicionales el ‘Meló d’Or’<br>d’Ontinyent’, un caso de estudio.....   | 72  |
| 1.2. Evaluación de portainjertos comerciales y experimentales de <i>Cucurbita</i> spp y <i>Cucumis</i><br>spp para el cultivo de melón de tipo Piel de Sapo.....   | 87  |
| Impacto de portainjertos de <i>Cucurbita</i> y <i>Cucumis</i> sobre el desarrollo y la calidad del<br>fruto de melón Piel de Sapo ( <i>Cucumis melo</i> L. subsp. <i>melo</i> grupo <i>ibericus</i> )..... | 88  |
| Capítulo 2. Caracterización de germoplasma de <i>Cucumis</i> para su potencial utilidad como<br>portainjerto de melón.....   | 137 |
| 2.1. Caracterización de especies silvestres e híbridos de <i>Cucumis</i> spp.....  | 139 |
| Germination of Wild <i>Cucumis</i> Species and Interspecific Hybrids.....  | 140 |
| 2.2. Caracterización de un híbrido de <i>Cucumis</i> como potencial portainjerto para<br>melón.....  | 150 |
| Use of Wild <i>Cucumis</i> as Potential New Rootstocks for Melons.....   | 151 |
| 2.3. Desarrollo de híbridos interespecíficos como portainjertos de melón.....  | 163 |
| New <i>Cucumis</i> rootstocks for Melon: ‘UPV-FA’ and ‘UPV-FMy’.....   | 164 |
| Capítulo 3. Poliploidización como herramienta de mejora en portainjertos.....  | 185 |
| 3.1. Desarrollo de alopoliploides para su uso como portainjertos de melón.....   | 187 |
| Characterization of allopolyploid plants from two interspecific <i>Cucumis</i> hybrids<br>(UPV-FA and UPV-FMy) useful as melon rootstocks.....   | 188 |

|  |     |
|--|-----|
| 4. Discusión General .....   | 221 |
| Evaluación de portainjertos experimentales para el cultivo de melón (capítulo 1).....                                    | 224 |
| Caracterización de germoplasma de <i>Cucumis</i> para su potencial utilidad como portainjerto de melón (Capítulo 2)..... | 228 |
| Poliploidización como herramienta de mejora en portainjertos (Capítulo 3).....   | 231 |
| Bibliografía.....  | 235 |
| <br>   |     |
| 5. Conclusiones.....   | 243 |



## Índice Tablas

### Introducción

|  |       |
|--|-------|
| TABLA 1 ■ Cruzamientos directos (A) y recíprocos (B) realizados entre distintas especies del género <i>Cucumis</i> en 3 estudios clásicos considerados compatibles (C), parcialmente compatibles (PC) e incompatibles (I)..... | 30-31 |
|--|-------|

### El injerto como técnica para la recuperación de variedades tradicionales el 'Meló d'Or' d'Ontinyent', un caso de estudio

|  |    |
|--|----|
| TABLA 1 ■ Promedios de los índices de vigor de planta y calidad de las raíces anotados al final del cultivo en una escala de 0-5. Vigor (0= planta muerta; 5=planta muy vigorosa); Difi cultad de extracción (0=sin difi cultad; 5= muy difícil de extraer); Síntomas (0=no se detectan visualmente lesiones fúngicas; 5= raíz muy dañada con podredumbres, necrosis, raíces rotas y/o presencia de peritecios); Ramifi cación (0= raíces muy poco ramifi cadas, 5= raíces con mucha ramifi cación lateral)..... | 79 |
| TABLA 2 ■ Análisis de calidad en frutos de la variedad tradicional 'Meló d'Or' .....   | 82 |
| TABLA 3 ■ Análisis de calidad en frutos de la variedad comercial de tipo Piel de sapo cv. 'Finura' .....   | 82 |

### Impacto de portainjertos de *Cucurbita* y *Cucumis* sobre el desarrollo y la calidad del fruto de melón Piel de Sapo (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* grupo *ibericus*)

|  |       |
|--|-------|
| TABLA 1 ■ Portainjertos utilizados en los distintos ensayos de campo de Picassent 2015 y 2016, y Meliana 2017 (Valencia-España).....   | 92    |
| TABLA 2 ■ Compuestos volátiles cuantificados en los frutos de la variedad de melón Piel de Sapo Finura cosechados sobre plantas no injertadas e injertadas en los distintos patrones. Se indican el número CAS, el peso molecular (MW), el tiempo de retención (Rt), el índice de retención (Ri, calculado con n-alcános en columna capilar Supelcowax), el ión de cuantificación (Quan. ion), parámetros cromatográficos obtenidos de los cromatogramas GC-MS (extracción de purga y trampa usando cartuchos EnviCarb 500mg, 30 g de muestra), el rango de linealidad (Linearity range, correspondiente a la concentración real de los patrones empleados en la calibración)..... | 96-98 |
| TABLA 3 ■ Efecto del portainjerto sobre la floración de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura. Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado (NG).....  | 103   |
| TABLA 4 ■ Efecto del portainjerto sobre el cuajado del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura. Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado .....  | 103   |
| TABLA 5 ■ Efecto del portainjerto sobre la producción de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura.....   | 104   |
| TABLA 6 ■ Efecto del portainjerto sobre distintos parámetros asociados a la calidad del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2015). Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado.....  | 109   |



|   |         |
|---|---------|
| <p><b>TABLA 7</b> ■ Efecto del portainjerto sobre distintos parámetros asociados a la calidad del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2016). Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado.....</p>   | 110     |
| <p><b>TABLA 8</b> ■ Efecto del portainjerto sobre distintos parámetros asociados a la calidad del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2017). Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado.....</p>   | 111     |
| <p><b>TABLA 9</b> ■ Efecto del portainjerto sobre el contenido en ácidos orgánicos y azúcares de los frutos de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2015). Se indica la media y el error estándar en cada caso.....</p>   | 115     |
| <p><b>TABLA 10</b> ■ Efecto del portainjerto sobre el contenido en ácidos orgánicos y azúcares de los frutos de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2016). Se indica la media y el error estándar en cada caso.....</p>  | 116     |
| <p><b>TABLA 11</b> ■ Efecto del portainjerto sobre el contenido en ácidos orgánicos y azúcares de los frutos de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2017). Se indica la media y el error estándar en cada caso.....</p>  | 117     |
| <p><b>TABLA 12</b> ■ Compuestos volátiles detectados en pulpa de melones de la variedad F1 Finura Piel de Sapo recogidos sobre plantas injertadas en distintos patrones de <i>Cucurbita</i> en comparación con NG y SG (año 2016). Las características de cada compuesto están más detalladas en la Tabla 2.....</p>  | 121     |
| <p><b>TABLA 13</b> ■ Compuestos volátiles detectados en pulpa de melones de la variedad F1 Finura Piel de Sapo recogidos sobre plantas injertadas en distintos patrones de <i>Cucumis</i> en comparación con NG y SG y con el patrón de <i>Cucurbita</i> Ma x Mo CO (año 2016). Las características de cada compuesto están más detalladas en la Tabla 2.....</p> | 122     |
| <p><b>TABLA 14</b> ■ Compuestos volátiles detectados en pulpa de melones de la variedad F1 Finura Piel de Sapo recogidos sobre plantas injertadas en distintos patrones de <i>Cucumis</i> en comparación con NG y SG y con el patrón de <i>Cucurbita</i> Ma x Mo CO (año 2017). Las características de cada compuesto están más detalladas en la Tabla 2.....</p> | 124–125 |

### New *Cucumis* rootstocks for Melon: 'UPV-FA' and 'UPV-FMy'

|   |     |
|---|-----|
| <p><b>TABLE 1</b> ■ Plant fresh and dry weight and root parameters of 'UPV-FA', 'UPV-FMy' and <i>C. metuliferus</i> after 45 days of culture on BM medium with sorbitol (0, 0.05, 0.1 and 0.2M).....</p>  | 172 |
| <p><b>TABLE 2</b> ■ Characteristics of cantaloupe melon fruits harvested from non-grafted plants (NG) and plants grafted onto the experimental hybrids 'UPV-FMy' (<i>C. ficifolius</i> x <i>C. myriocarpus</i>) and 'UPV-FA' (<i>C. ficifolius</i> x <i>C. anguria</i>).....</p>  | 174 |
| <p><b>TABLE 3</b> ■ Marketable yield and quality traits of melon fruits cv. 'Finura' (Piel de Sapo) harvested from non-grafted plants (NG), self-grafted plants (SG) and plants grafted onto the experimental <i>Cucurbita</i> (<i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i>) hybrid F1, the commercial <i>Cucurbita</i> hybrid Cobalt, the commercial <i>Cucumis melo</i> rootstock 64-376RZ, and two new experimental <i>Cucumis</i> F1: 'UPV-FMy' (<i>C. ficifolius</i> x <i>C. myriocarpus</i>) and 'UPV-FA' (<i>C. ficifolius</i> x <i>C. anguria</i>).....</p> | 176 |

## Characterization of allopolyploid plants from two interspecific *Cucumis* hybrids (UPV-FA and UPV-FMy) useful as melon rootstocks

|  |     |
|--|-----|
| TABLE 1 ■ Generation of UPV-FA and UPV-FMy polyploid plants.....   | 195 |
| TABLE 2 ■ Number of seeds per fruit, seed weight and germination ability of allo-UPV-FA (6n) and allo-UPV-FMy (6n), plants resulting from crosses <i>C. ficifolius</i> x <i>C. anguria</i> (UPV-FA, 3n) and <i>C. ficifolius</i> x <i>C. myriocarpus</i> (UPV-FMy, 3n) and plants derived from the corresponding parentals by selfing.....                           | 198 |
| TABLE 3 ■ Morphological and reproductive traits (Hypocotyl diameter, stem diameter, plant height, number of male and female flowers and leaf morphological traits) measured from 7 to 21 days post-sowing (dps) and 20 to 40 days post-transplanting (dpt) in allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n) and their respective parentals..... | 200 |
| TABLE 4 ■ Evaluation of plant height (cm.) up to 65 days post-transplanting (dpt) in Charentais and Piñonet plants grafted onto experimental rootstocks, allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n), Me x Ag, and 'Cobalt' (Commercial <i>Cucurbita</i> rootstock) under greenhouse conditions.....  | 202 |
| TABLE 5 ■ External characteristics of Charentais and Piñonet Piel de sapo melon fruits harvested from plants grafted onto allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n), Me x Ag and the commercial <i>Cucurbita</i> hybrid 'Cobalt'.....   | 203 |
| TABLE 6 ■ Internal characteristics of charentais and piñonet melon fruits harvested from plants grafted onto allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n), 'Me x Ag' and the commercial <i>Cucurbita</i> hybrid 'Cobalt'.....  | 204 |
| TABLE 7 ■ SNPs monomorphic in parentals and triploid hybrids and polymorphic in hexaploids, allo-UPV (6n) hybrids.....   | 206 |
| TABLE 8 ■ Genes affected by SNP variants detected in the allo-UPV (6n) hybrids and absent in the 3n hybrids and in the corresponding parentals.....  | 207 |



## Índice Figuras

### Introducción

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 ■ Especies de importancia económica en la familia Cucurbitaceae. A) melón ( <i>Cucumis melo</i> L. var. <i>cantalupensis</i> ), B) sandía ( <i>Citrullus lanatus</i> ), C) calabazas ( <i>Cucurbita</i> spp.).....  | 3  |
| FIGURA 2 ■ Polinizadores naturales del melón ( <i>C. melo</i> ).....   | 4  |
| FIGURA 3 ■ <i>Cucumis melo</i> L. perteneciente al Grupo <i>Ibericus</i> , A) subgrupo Amarillo (Meló d'or d'Ontinyent'), B) subgrupo Piel de Sapo y C) al Grupo <i>Cantalupensis</i> subgrupo Charentais (Pitrat, 2017).....  | 6  |
| FIGURA 4 ■ Comparativa de la A) producción, B) superficie cosechada C) y rendimiento del cultivo de melón en los cinco continentes. FAO. 2020. FAOSTAT <a href="http://faostat3.fao.org">http://faostat3.fao.org</a> (Acceso 10 Feb 2020).....   | 7  |
| FIGURA 5 ■ Los diez mayores productores de melón en el mundo. FAO. 2020. FAOSTAT <a href="http://faostat3.fao.org">http://faostat3.fao.org</a> (Accessed 10 Feb 2020).....   | 8  |
| FIGURA 6 ■ Patógenos fúngicos que afectan a Cucurbitáceas, A) <i>Podosphaera xanthii</i> (Oidio) sobre hojas de un melón silvestre <i>Cucumis metuliferus</i> B), pudrición carbonosa por <i>Macrophomina phaseolina</i> en raíces y tallo de un híbrido de calabaza ( <i>Cucurbita pepo</i> x <i>Cucurbita pepo</i> ) utilizado como porta injerto y C) <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> inoculado en <i>C. melo</i> var. <i>cantalupensis</i> ..... | 13 |
| FIGURA 7 ■ Principales métodos de injerto en plantas: A) Injerto en orificio de inserción; B) injerto de aproximación; C) injerto de empalme; D) injerto de hendidura.....   | 20 |
| FIGURA 8 ■ Procedimiento de injerto en melón por el método de empalme. 1) Se hace un corte en bisel (ángulo de 45°) en el hipocótilo del portainjerto eliminando el ápice de crecimiento (se deja un cotiledón y una hoja verdadera) y de la misma forma en el vástago, 2) se juntan con cuidado hasta que queden en contacto tanto el portainjerto como el vástago y 3) finalmente se coloca una pinza o clip para sostener las dos partes unidas.....              | 22 |
| FIGURA 9 ■ Algunas especies silvestres del género <i>Cucumis</i> , A) <i>Cucumis myriocarpus</i> , B) <i>Cucumis ficifolius</i> , C) <i>Cucumis anguria</i> y D) <i>Cucumis metuliferus</i> .....  | 25 |
| FIGURA 10 ■ Grados de compatibilidad observados en distintos tipos de cruzamientos entre diferentes especies del género <i>Cucumis</i> .....   | 28 |
| FIGURA 11 ■ Frutos de <i>Actinidia chinensis</i> Hort16A provenientes de plantas diploides, 2x (A) y autotetraploides inducidos, 4x (B) (Wu et al., 2012); Frutos del melón MO1-3 ( <i>Cucumis melo</i> L.) tetraploides, 4x (C) y diploides, 2x (D) (Zhang et al., 2010); Variación del tamaño y área foliar en plantas de <i>Gerbera jamesonii</i> Bolus cv. Sciella diploides, 2x (E), y tetraploides, 4x (F) (Gantait et al., 2011).....                         | 35 |

### El injerto como técnica para la recuperación de variedades tradicionales el 'Meló d'Or' d'Ontinyent', un caso de estudio

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 ■ A. Aspecto de una de las filas del campo de cultivo en el que se observa el decaimiento de algunos bloques de plantas que se corresponden con la variedad 'Meló d'Or' no injertadas (MO) o autoinjertadas (MO-MO). B. Extracción de raíces para la visualización de síntomas asociados a patógenos presentes en el suelo en una planta MO. C y D. Detalle de peritecios de <i>Monosporascus cannonballus</i> (3x y 5x) observados en las raíces..... | 79 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 2 ■ Aspecto de las plantas de la variedad tradicional 'Meló d'Or' no injertadas (A) e injertadas en el patrón comercial (B) y en el patrón experimental con resistencia a <i>Monosporascus cannonballus</i> (C) al final del cultivo. Detalle de raíces extraídas de una planta de cada combinación tras la cosecha de los frutos (D, E y F)..... | 80 |
| FIGURA 3 ■ Detalle de uno de los frutos de 'Meló d'Or' obtenidos de las combinaciones: plantas no injertadas (MO), injertadas utilizando como patrón 'Meló d'Or' (MO-MO), injertadas en el patrón comercial (PC-MO) e injertadas en el patrón experimental (PRMc-MO).....  | 83 |
| FIGURA 4 ■ Detalle de uno de los frutos de melón tipo 'Piel de Sapo' (cv. 'Finura') obtenidos de las combinaciones: plantas no injertadas (PS), autoinjertadas (PS-PS), injertadas en el patrón comercial (PC-PS) e injertadas utilizando el patrón experimental (PRMc-MPs).....   | 84 |

### Impacto de portainjertos de *Cucurbita* y *Cucumis* sobre el desarrollo y la calidad del fruto de melón Piel de Sapo (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* grupo *ibericus*)

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 1 ■ Evolución del índice de vigor (IV), en los 3 años evaluados, de plantas de melón de tipo Piel de Sapo variedad 'Finura' injertadas sobre 4 patrones híbridos de <i>Cucurbita</i> spp. experimentales Ma x Mo EF, Mo x Mo NL EF, Pe x Pe ZS, Ma x Ec, el patrón comercial Ma x Mo CO, en comparación con plantas autoinjertadas (SG) y no injertadas (NG). Los asteriscos indican diferencias significativas en el vigor con respecto a NG en la última fecha evaluada .....  | 100 |
| FIGURA 2 ■ Evolución del índice de vigor (IV), los 3 años evaluados, de plantas de melón tipo Piel de Sapo variedad 'F1 Finura' injertadas sobre 4 patrones experimentales de <i>Cucumis</i> spp, Met ( <i>C. metuliferus</i> ), Me x Ag ( <i>C. melo</i> subsp <i>melo</i> grupo <i>ibericus</i> , PS, x <i>C. melo</i> subsp <i>agrestis</i> grupo <i>chinensis</i> , Pat 81), Fi x My ( <i>C. ficifolius</i> x <i>C. myriocarpus</i> ) y Fi x An ( <i>C. ficifolius</i> x <i>C. anguria</i> ) y el patrón comercial Me x Me SP ( <i>Cucumis melo</i> subsp <i>melo</i> x <i>C. melo</i> subsp <i>melo</i> grupo <i>cantalupensis</i> ) en comparación con plantas autoinjertadas (SG) y no injertadas (NG). Los asteriscos indican diferencias significativas en el vigor con respecto a NG en la última fecha evaluada .....                                  | 101 |
| FIGURA 3 ■ Desarrollo vegetativo de plantas de melón tipo Piel de Sapo de la variedad "F1 Finura" a 20, 40 y 50 DDT (días después del transplante) injertado sobre patrones híbridos de <i>Cucurbita</i> A) Ma x Mo EF, B) Pe x Pe ZS, C) Ma x Ec, D) Ma x Mo CO, y plantas de melón E) NG (no injertado) como control en 2016.....   | 102 |
| FIGURA 4 ■ Desarrollo vegetativo de la variedad híbrida F1 Finura de <i>Cucumis melo</i> subsp <i>melo</i> grupo <i>inodorus</i> a 20, 40 y 50 DDT (días después del transplante) injertado sobre patrones de <i>Cucumis</i> spp. A) Met, B) Me x Ag, C) Me x Me SP, y plantas de melón D) NG (no injertado) como control en 2016.....  | 105 |
| FIGURA 5 ■ Detalle de la unión injerto-patrón de plantas injertadas de la variedad F1 Finura sobre distintos patrones de calabaza y melón en comparación con la variedad autoinjertada (SG). Primera fila 2016, segunda y tercera 2017.....   | 107 |
| FIGURA 6 ■ Representación del análisis MANOVA realizado con los compuestos volátiles analizados en la pulpa de la variedad F1 Finura Piel de Sapo no injertados (NG) y autoinjertados (SG), e injertados sobre distintos patrones de <i>Cucurbita</i> y <i>Cucumis</i> . A. Se representa el efecto de los patrones de <i>Cucurbita</i> Ma x Mo EF, Mo x Mo NL EF, Pe x Pe ZS, Ma x Ec, Ma x Mo CO, empleando como referencia el patrón de <i>Cucumis melo</i> Me x Ag, con respecto al control SG y NG (año 2016). B. Se representa el efecto de los patrones de <i>Cucumis</i> Met, Me x Ag, Me x Me SP, Fi x My y Fi x An, empleando como referencia el patrón de <i>Cucurbita</i> Ma x Mo CO, con respecto al control SG y NG (año 2016). C. Se representa el efecto de los patrones de <i>Cucumis</i> Met, Me x Ag, Me x Me SP, Fi x My y Fi x An, empleando |     |

como referencia el patrón de *Cucurbita* Ma x Mo CO, con respecto al control SG y NG (año 2017). Compuestos (se detallan en la Tabla 2): 1.1 = 1-Pentanol, 1.2 = 1-Hexanol, 1.3 = 1-Octanol, 1.4 = 1-Nonanol, 1.5 = 1-Decanol, 1.6 = (Z)-3-hexen-1-ol, 1.7 = (Z)-3-Nonen-1-ol, 1.8 = (Z)-6-Nonen-1-ol, 1.9 = (E,Z)-2,6-Nonadien-1-ol, 1.10 = Benzyl Alcohol, 1.11 = 2-Phenylethanol, 2.1 = Hexanal, 2.2 = Heptanal, 2.3 = Octanal, 2.4 = Nonanal, 2.5 = Decanal, 2.6 = (E)-2-Heptenal, 2.7 = (E)-2-Octenal, 2.8 = (Z)-6-Nonenal, 2.9 = (E)-2-Nonenal, 2.10 = (E)-2-Methyl-2-butenal, 2.11 = (E,E)-2,4,-Heptadienal, 2.12 = (E,Z)-2,6-Nonadienal, 2.13 = (E,E)-2,4-Decadienal, 2.14 = Benzaldehyde, 2.15 = Phenylacetaldehyde, 3.1 = 2-Methyl propyl acetate, 3.2 = Butyl acetate, 3.3 = Octyl acetate, 3.4 = Benzyl acetate, 3.5 = Phenylethyl acetate, 3.6 = Ethyl butanoate, 3.7 = Ethyl-2-methyl butyrate, 4.1 = 6-Methyl-5-hepten-2-one, 4.2 = Geranylacetone, 4.3 = Beta-Ionone..... 126

**FIGURA SUPLEMENTARIA 1** ■ Frutos de la variedad F1 Finura recogidos en plantas injertadas sobre distintos patrones de calabaza y melón en comparación con la variedad no injertada (NG). Se muestran frutos de los ensayos de 2016 y 2017..... 135

### Germination of Wild *Cucumis* Species and Interspecific Hybrids

**FIGURE 1** ■ Percentage of germination for genotypes (A) and treatments (B) noted after 5 and 20 days of culture (grey and dark grey, respectively). A. Genotypes: *C. ficifolius*, *C. anguria*, *C. metuliferus*, *C. ficifolius* x *C. anguria* (CxA); *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (CxMy). B: T1 (sowing in Petri dishes: in vitro culture), T2 (stratification at 4°C for 10 days and in vitro culture), T3 (sowing directly in substrate); T4 (stratification 4°C for 10 days and sowing in substrate); T5 (incubation for 2 days at 37°C and sowing in substrate); T6 (stratification at 4°C for 10 days, 2 days incubation at 37°C and sowing in substrate)..... 145

### Use of Wild *Cucumis* as Potential New Rootstocks for Melons

**FIGURE 1** ■ Empty seed from the hybrid *C. ficifolius* x *C. metuliferus* (A) Viable embryo from the hybrid *C. ficifolius* x *C. anguria* (B)..... 155

**FIGURE 2** ■ Taxonomic characters of *C. anguria*, *C. ficifolius* and their hybrids *C. ficifolius* x *C. anguria* (F x A). Top: Presence of simple hairs in the stems of *C. anguria*, while F x A and *C. ficifolius* have aculei. Middle: Shape and presence of aculei in ovaries of both parentals and the intermediate F x A. Bottom: detail of aculei. The blue bar represents the hyaline part and the red bar the opaque part..... 156

**FIGURE 3** ■ Hypocotyls diameter (left) and length (right), means and standard errors measured in *C. ficifolius*, *C. anguria* and their corresponding hybrid (FxA), 20 days after germination..... 157

**FIGURE 4** ■ True leaves (left) and plant length (right) measured in *C. ficifolius*, *C. anguria* and F1 hybrid (FxA) from 15 to 60 days after transplanting..... 158

**FIGURE 5** ■ Plants of *C. melo* var. *cantalupensis* grafted onto F x A at 10 days of grafting by the cleft procedure using early grafting (A) or mature grafting (B). The second ones were transplanted for evaluation under greenhouse conditions (C)..... 158

### New *Cucumis* rootstocks for Melon: 'UPV-FA' and 'UPV-FMy'

**FIGURE 1** ■ Discriminant morphological characters among *Cucumis ficifolius* (F), *C. anguria* (A), *C. myriocarpus* (My), and their hybrids 'UPV-FMy' and 'UPV-FA'. From top to bottom: leaves, stems, aculei from ovaries with an inferior opaque part and a superior hyaline part, and fruits. The morphology was evaluated on greenhouse growing plants..... 168

**FIGURE 2** ■ Response of the two hybrids, 'UPV-FA' and 'UPV-FMy', compared with a melon susceptible control against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: plants of cantaloupe (A), 'UPV-FA' (B) and 'UPV-FMy' (C); against *Monosporascus cannonballus*: roots extracted from naturally infested soil of cv. 'Piñonet Piel de Sapo' (D), 'UPV-FA' (E) and 'UPV-FMy' (F); against powdery mildew: plants cultivated in and open field of cv. 'Piñonet Piel de Sapo' (G), 'UPV-FA' (H) and 'UPV-FMy' (I).....170

**FIGURE 3** ■ Fruit of cantaloupe melons cv. Vedrantaïs (Charentais type) from ungrafted plants (A) and plants grafted onto 'UPV-FMy' (B) and 'UPV-FA' (C).....174

**FIGURE 4** ■ Fruit of Piel de Sapo melons cv. Finura from ungrafted plants (A) and plants grafted onto *C. maxima* x *C. moschata* hybrid Cobalt (B), the *Cucumis* melo 64-376RZ (C) 'UPV-FMy' (D) and 'UPV-FA' (E).....177

### Characterization of allopolyploid plants from two interspecific *Cucumis* hybrids (UPV-FA and UPV-FMy) useful as melon rootstocks

**FIGURE 1** ■ Polypoidy detection by flow cytometry. Histogram showing (A) G1 peak of diploid *C. anguria* (Channel 100,  $2x=2n=24$ ), (B) G1 peak of diploid *C. myriocarpus* (Channel 100,  $2x=2n=24$ ), (C) G1 peak of tetraploid *C. ficifolius* (Channel 200,  $4x=2n=48$ ), (D) G1 peak of triploid hybrid UPV-FA (Channel 150,  $3x=2n=36$ ), (E) G1 peak of hexaploid hybrid UPV-FA (Channel 300,  $6x=2n=72$ ), (F) G1 peak of triploid hybrid UPV-FMy (Channel 150,  $3x=2n=36$ ), (G) G1 peak of hexaploid hybrid UPV-FMy (Channel 300,  $6x=2n=72$ ). G2 peaks show cells under division.....196

**FIGURE 2** ■ Male sterility of triploid plants and male fertility of allopolyploids. (A) UPV-FA (3n) at 40 days post-transplanting (dpt). (B) allo-UPV-FA (6n) at 40 (dpt). (C) Male flower developed after 90 dpt in a UPV-FA (3n) plant. (D) Pollen from a plant allo-UPV-FA (6n) stained with tetrazolium. (E) Pollen from a flower developed after 90 dpt in a UPV-FA (3n) plant incubated in germination medium. (F) Pollen from a plant allo-UPV-FA (6n) germinated *in vitro*.....197

**FIGURE 3** ■ Seeds from which derived the triploid hybrids (A,G) UPV-FA (3n), (C,I) UPV-FMy (3n) and seeds of fruit from hexaploid plants-(B,H) allo-UPV-FA (6n), (D,J) allo-UPV-FMy (6n). Juvenile plants of (E) allo-UPV-FA-s (6n) and (F) allo-UPV-FMy-s (6n). Hypocotyl comparison between triploid F1 hybrids (K) UPV-FA (3n), (M) UPV-FMy (3n) and their allopolyploids counterparts (L) allo-UPV-FA-s (6n) and (N) allo-UPV-FMy-s (6n).....198

**FIGURE 4** ■ Leaf and fruit morphology on (A) allo-UPV-FA-s (6n), (B) allo-UPV-FMy-s (6n) (C) UPV-FA (3n), (D) UPV-FMy (3n) plants and the parental genotypes (E) *C. anguria*, (F) *C. ficifolius* and (G) *C. myriocarpus*.....201

## INTRODUCCIÓN





## Introducción

### 1.1. Origen y clasificación del melón (*Cucumis melo* L.)

El melón (*Cucumis melo* L.) pertenece a la familia Cucurbitaceae, que abarca aproximadamente 1000 especies y 96 géneros (Renner & Schaefer, 2017). La familia incluye, además del melón, otras especies y cultivos de gran importancia económica como la sandía (*Citrullus lanatus* [Thumb.] Matsum & Nakai), pepino (*Cucumis sativus* L.), zapallos y calabazas (*Cucurbita maxima* Duchesne; *Cucurbita moschata* Duchesne) y calabacín (*Cucurbita pepo* L.) (Figura 1). Además, incluye otros cultivos menores entre los que se pueden citar *Momordica charantia* L. (melón amargo, cundeamor chino o balsamina), *Lagenaria siceraria* (Molina.) Standley (mate, calabaza de peregrino, calabaza vinatera, jícaro, acocote), *Benincasa hispida* (Thunb.) (calabaza china, calabaza blanca, calabaza de la cera), *Luffa* spp.(calabaza esponjosa), y *Trichosanthes* spp.(calabaza serpiente) (McCreight, 2017; Endl et al., 2018).



FIGURA 1 ■ Especies de importancia económica en la familia Cucurbitaceae. A) melón (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*), B) sandía (*Citrullus lanatus*), C) calabazas (*Cucurbita* spp.).

*Cucumis melo* es una especie diploide ( $2n=2x=24$ ). Al igual que otras cucurbitáceas, el melón es una planta de zonas cálidas que se cultiva en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es una especie que presenta polinización cruzada, gracias a polinizadores naturales como las abejas y abejorros (Figura 2), pero también es posible reproducirla por autofecundación.



FIGURA 2 ■ Polinizadores naturales del melón (*C. melo*).

Existen evidencias de que el melón se ha cultivado desde hace aproximadamente 4000 años, aunque no se ha podido verificar cuando y donde fue domesticado (Pitrat, 2017). Restos arqueológicos, iconografía y textos diversos evidencian la existencia de este cultivo en Irán y China (3000 a.C), India (2000 a.C), Egipto (1500 a.C), así como la introducción y dispersión de este cultivo en Europa por los griegos y romanos (Walters, 1989; Decker-Walters, 1999; Szabó et al., 2005; Pitrat, 2008; Esteras et al., 2012).

Tradicionalmente, África ha sido considerado como el centro de origen y domesticación del melón, ya que numerosas especies silvestres del género *Cucumis* (*Cucumis sagittatus* Wawra & Peyritsch, *C. myriocarpus* Naudin, *C. ficifolius* A. Richard, *C. anguria* Linnaeus, *C. hirsutus* Sonder, *C. pustulatus* Naudin ex Hook.f., *C. dipsaceus* Ehrenberg ex Spach., *C. humifructus* Stent, *C. heptadactylus* Naudin, *C. metuliferus* E. Meyer ex Naudin) se encuentran frecuentemente en este continente (Den Nijs & Visser, 1985). La amplia diversidad de estas especies silvestres, además de la similitud en el número de cromosomas entre *C. melo* y los *Cucumis* africanos han apoyado la hipótesis de su origen en África. Sin embargo, esta propuesta no ha podido ser corroborada por otras evidencias, como la incapacidad de producir una descendencia F1 fértil entre *C. melo* y otras especies africanas y la innegable diversidad genética de las variedades locales de *C. melo* en la India y el este asiático. Los recientes estudios filogenéticos han sugerido que el género *Cucumis* tiene un origen asiático, incluidos los dos cultivos principales (melón y pepino) que se derivaron de un ancestro común hace aproximadamente nueve millones de años (Sebastian et al., 2010).

De acuerdo con Sebastian et al. (2010), el progenitor silvestre del melón podría proceder de la India y su pariente más cercano (*Cucumis picocarpus* F. Muell) de Australia. Los estudios más recientes apuntan a la ocurrencia de dos domesticaciones independientes, una en Asia y la otra en África (Endl et al., 2018). El melón ha sufrido un intenso proceso de diversificación, debido a la selección llevada a cabo en diferentes regiones. La domesticación ocurrida en Asia, probablemente en la zona de la India, ha resultado en una amplia variabilidad de tipos distribuidos principalmente en Asia y en la zona Mediterránea, a partir de los cuales se derivaron la mayoría de los tipos comerciales cultivados en todo el mundo.

*Cucumis melo* es una de las especies más polimórficas. La gran variabilidad intraespecífica se ha clasificado bajo diversos criterios y propuestas. Sin embargo, una de las más usadas tradicionalmente es la división a nivel de subespecie de acuerdo con la pubescencia del ovario. Con este criterio se describen dos grupos, subsp. *melo* que presenta vellosidades y subsp. *agrestis* con un ovario sedoso o con pequeñas vellosidades (Jeffrey, 1980; Kirkbride, 1993). Los grupos botánicos pertenecientes a la subsp. *agrestis* se encontrarían distribuidos desde el este de la India hasta Japón, mientras que los pertenecientes a la subsp. *melo*, se distribuirían desde la India hasta Europa y el continente americano (Fernández-Trujillo et al., 2011).

Sin embargo, estos criterios no han sido suficientes para clasificar toda la diversidad estudiada, por lo que otras propuestas a nivel infra específico que consideran los rasgos sexuales y características del fruto han sido aceptadas positivamente (Pitrat, 2017). Este enfoque puede ser muy útil y práctico, ya que la amplia variabilidad de *C. melo* resultante de los procesos de domesticación y selección, está claramente diferenciada entre los melones silvestres y cultivados, y puede facilitar la clasificación e inclusión de toda la diversidad. Entre las clasificaciones más utilizadas, destaca la de Pitrat (2008) quien propone 15 grupos (*cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *chate*, *flexuosus*, *dudaim* y *tibish* (en subsp. *melo*), y *momordica*, *conomon*, *chinensis*, *makuwa*, y *acidulus* (en subsp. *agrestis*) (Figura 3). Una modificación más reciente de esta clasificación describe 19 grupos, uniendo *cantalupensis* y *reticulatus*

(Munger & Robinson, 1991) en un mismo grupo, separando *inodorus* en tres grupos, *cassaba*, *ibericus* e *inodorus* y finalmente añadiendo dos nuevos grupos *kachri* e *indicus*, todos con sus respectivos sub grupos (Pitrat, 2017).



FIGURA 3 ■ *Cucumis melo* L. perteneciente al Grupo *Ibericus*, A) subgrupo Amarillo (Meló d'or' d'Ontinyent'), B) subgrupo Piel de Sapo y C) al Grupo *Cantalupensis* subgrupo Charentais (Pitrat, 2017).

## 1.2. Importancia Económica

La familia Cucurbitaceae es después de la familia Solanaceae (que incluye el tomate, el pimiento, la berenjena y la patata), el grupo que comprende a las hortalizas económicamente más importantes a nivel mundial. El melón tiene un lugar clave dentro de la familia Cucurbitaceae por su alto valor económico y por ser una especie modelo para estudiar caracteres biológicos relevantes. Esto último, ha sido posible gracias a la secuenciación de su genoma y al desarrollo de múltiples herramientas biotecnológicas de gran utilidad para los programas de mejora (García-Mas et al., 2012).

La producción mundial de melón se ha ido incrementando progresivamente en las últimas décadas (8.8, 13.5 y 19.8 millones de toneladas en 1980, 1990 y 2000, respectivamente). En la última década, ha continuado este incremento, pasando la producción de 25.4 a 27.4 millones de toneladas en 2008 y 2018, respectivamente, mientras que el área cosechada se ha reducido en 54.000 hectáreas en el mismo período (FAOSTAT, 2020). Existen importantes diferencias entre los cinco continentes en términos de producción, área cosechada y rendimiento (Figura 4).

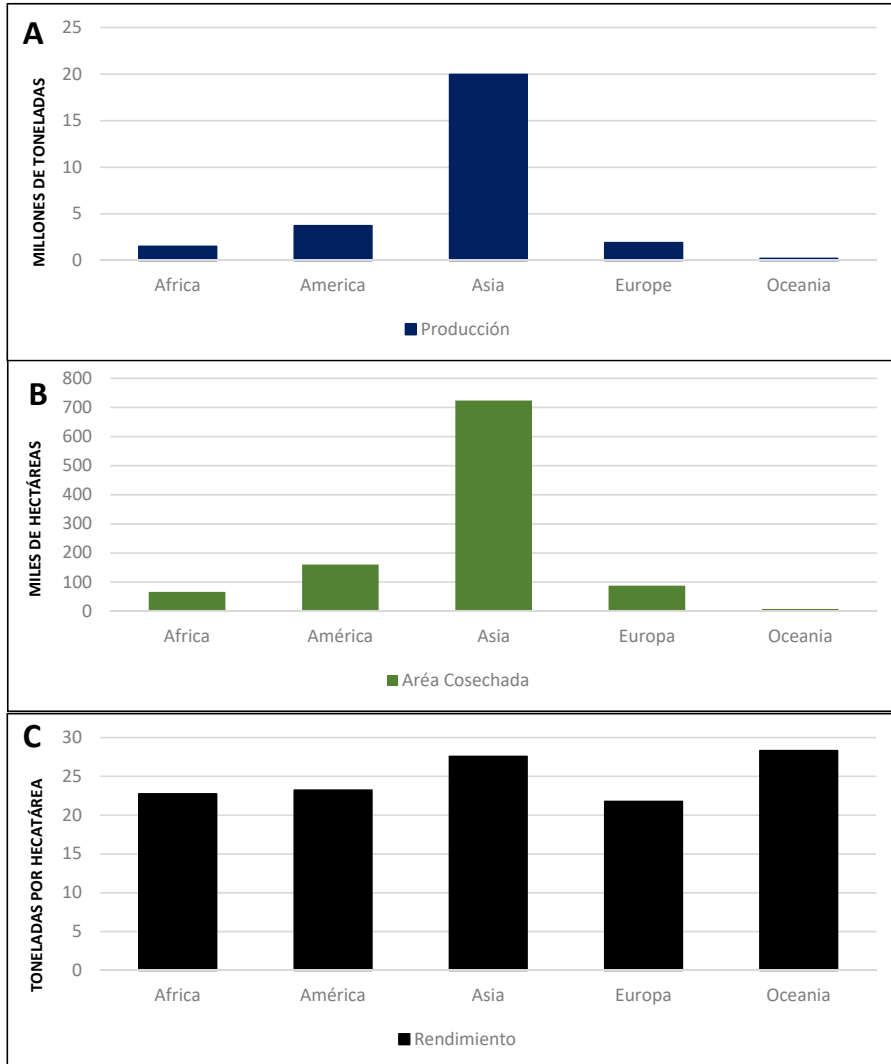


FIGURA 4 ■ Comparativa de la A) producción, B) superficie cosechada C) y rendimiento del cultivo de melón en los cinco continentes. FAO. 2020. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org> (Acceso 10 Feb 2020).

El melón es el noveno cultivo hortícola en términos de producción total a nivel mundial y el continente asiático concentra más de las tres cuartas partes (Figura 4). China es el mayor productor mundial, seguido por países de medio oriente como Turquía e Irán. España es el primer país europeo que destaca en la lista de los diez países con mayor producción, con un volumen superior a las 664.000 toneladas en 2018. Italia cierra este grupo con un volumen aproximado de 608.000 toneladas (Figura 5).

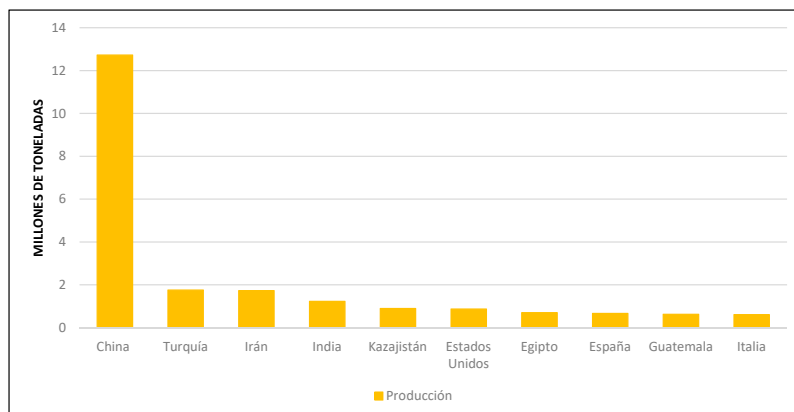


FIGURA 5 ■ Los diez mayores productores de melón en el mundo. FAO. 2020. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org> (Accessed 10 Feb 2020).

En España, la exportación de melón en 2019 alcanzó un volumen de 433.824 toneladas, siendo Francia, Alemania y Reino Unido los principales destinos de estas, con un 26,87%, 22,33% y 13,3% del total respectivamente.

En la mayoría de los casos, la fruta de melón se cosecha y se consume al llegar a su madurez (por su alto contenido de azúcar), utilizándose como postre, aperitivo o en sopas frías y ensalada. Por otra parte, otras variedades de melón se cosechan y se consumen inmaduras (no dulces) o se usan como ornamentales. Es una fruta baja en calorías, grasa o colesterol y es una excelente fuente de vitaminas, especialmente A y C, y minerales, como el calcio, fósforo y hierro (Dhaliwal, 2008). Dependiendo de la región o el país, la demanda de diversos cultivares o grupos botánicos varía. Los melones pertenecientes a los grupos *cantalupensis*, *cassaba*, *ibericus* e *inodorus* son de gran interés comercial en los Estados Unidos, así como en varios países europeos, mediterráneos y asiáticos e incluyen cultivares que pertenecen a diferentes variedades comerciales. Algunas variedades populares como Charentais, Shipper, Ogen y Galia están en el grupo *cantalupensis*, mientras que los grupos *cassaba*, *ibericus* e *inodorus* albergan una colección de tipos comerciales como, Piel de Sapo, Rochet, Tendral, Amarillo Canario, Crenshaw, Honeydew y Kirkagac (Esteras et al., 2012; Pitrat, 2017).

En España, el consumo total de melones y sandías fue de 706 toneladas durante el 2018, mientras el consumo percapita fue de 15,44 kilogramos, destacándose el tipo de melón Piel de Sapo como el más demandado (MAPA, 2019).

### 1.3. Limitaciones en la producción de melón

El área de cultivo de melón ha expandido sus fronteras para satisfacer la demanda mundial durante todo el año y todas las estaciones. Se han probado diferentes sistemas de producción para adecuar y permitir la producción de variedades tradicionales y comerciales bajo condiciones ambientales poco favorables. Esta realidad ha favorecido el incremento y la adaptación de patógenos o enfermedades que no eran comunes en una región específica. Así mismo, se han acentuado los efectos negativos debido a estreses abióticos, como temperaturas excesivas o suelos inadecuados y pobres. Paralelamente, un nuevo marco legislativo para prohibir y limitar la fumigación del suelo con bromuro de metilo u otros nematocidas (Ristaino & Thomas, 1997) ha disminuido las alternativas disponibles para que los productores puedan realizar un control fitosanitario efectivo, especialmente en cultivos intensivos (Katan, 1999). A continuación, se describen las principales limitaciones actuales del cultivo de esta hortaliza.

#### 1.3.1. PLAGAS Y ENFERMEDADES

Entre las plagas más importantes que afectan al cultivo del melón se encuentran los pulgones y las moscas blancas. Además de su efecto como plaga, tienen un rol como vectores transmisores de virus. Precisamente son estos últimos, los causantes de varias enfermedades que afectan notablemente la producción de cucurbitáceas.

Dentro de los géneros *Aphis* y *Myz*, se han identificado las especies de áfidos más eficientes como vectores transmisores de virus (Garzo et al., 2004). Por su frecuencia y severidad los virus transmitidos por áfidos que más afectan al cultivo del melón son el



*Cucumber mosaic virus* (CMV, género *Cucumovirus*), *Watermelon mosaic virus* (WMV, género *Potyvirus*), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, género *Potyvirus*) y *Papaya ringspot virus* (PRSV, género *Potyvirus*). Además, el *Cucurbit aphid borne yellows virus* (CABYV, género *Polerovirus*) ha destacado por su alta prevalencia y dispersión en zonas productoras de cucurbitáceas en Murcia y la comunidad Valenciana (Juarez et al., 2013). Por otro lado, entre las virosis transmitidas por mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) destacan el *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV, género *Crinivirus*), *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV, género *Ipomovirus*), y desde el año 2012, el *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV, género *Begomovirus*) que ha causado severas epidemias desde su entrada en Europa procedente de la India. No existen métodos curativos para las virosis, por lo que las principales estrategias de lucha son el control del vector transmisor mediante tratamientos o prácticas culturales y el empleo de variedades resistentes. Se han descrito algunas entradas de melón de los grupos *momordica*, *acidulus* y *agrestis* con resistencia a algunos de estos virus, pero todavía no se han desarrollado variedades comerciales con resistencia útil a todos ellos (Sáez et al., 2017).

Además de las virosis, las enfermedades fúngicas se encuentran entre los principales factores limitantes de la producción en melón (Figura 6). Entre estas, destaca el oídio de las cucurbitáceas, relacionado fundamentalmente con dos especies *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun & N. Shishkoff (anteriormente *Sphaerotheca fuliginea*), más prevalente en zonas tropicales, y *Golovinomyces cichoracearum* DC. Ex Mérat. (anteriormente *Erysiphe cichoracearum*), más propia de zonas de clima templado (Cohen et al., 2004; Aguiar et al., 2012). Esta enfermedad es muy frecuente tanto en melón cultivado en campo abierto, como en invernadero. La baja humedad relativa ambiental favorece el desarrollo y esporulación de *G. cichoracearum*, mientras que *P. xanthii* puede aprovechar la humedad en los cultivos protegidos, incluso en zonas templadas (Vakalounakis et al., 1994; Aguiar et al., 2012). El oídio es fácilmente controlable con tratamientos químicos, pero también se han obtenido variedades resistentes, aunque la posibilidad de que se desarrollen nuevas razas del patógeno que superen la resistencia es muy alta. En melón, varias accesiones, principalmente

del grupo *momordica* y *acidulus* han sido identificadas y utilizadas como fuentes de resistencia a oídio. Sin embargo, la búsqueda de nuevos materiales por la aparición de nuevas razas que superan las resistencias es un trabajo continuo (Kousik et al., 2008; Pitrat, 2008; Nunes et al., 2017).

Aunque existen otros patógenos fúngicos que afectan a la parte aérea y son de importancia mundial (Pitrat, 2008), en nuestras condiciones los patógenos fúngicos de mayor relevancia y más difíciles de controlar son los asociados a infecciones vasculares o del sistema radicular. Entre los patógenos fúngicos de suelo más importantes destacan las fusariosis y el colapso o muerte súbita del melón. La fusariosis del melón está causada por distintas especies de *Fusarium*, entre las que destaca *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *melonis* (Leach & Currence) W. C. Snyder y H. N. Hans. Esta forma especializada es específica del melón y comprende 4 razas: 0, 1, 2 y 1.2. La raza 1.2 incluye variantes que causan marchitamiento y clorosis (1.2w y 1.2y) (Cohen et al., 2002; Oumouloud et al., 2013). Es una enfermedad prevalente y grave en todo el mundo (Schreuder et al., 2000; Kurt et al., 2002; Elena & Pappas, 2006), causando pérdidas de hasta el 100% de la producción debido al mecanismo de supervivencia del hongo como clamidosporas (Banhashemi & DeZeeuw, 1975). A pesar de la complejidad del patógeno, se han identificado fuentes de resistencia a todas las razas (Herman & Perl-Treves, 2007; Matsumoto et al., 2011), habiéndose clonado algunos genes responsables de la resistencia (Pitrat, 2008; Oumouloud et al., 2012; Oumouloud et al., 2015). La resistencia a la raza 1.2 es poligénica y recesiva, siendo difícil de manejar en los programas de mejora. Además, estudios recientes indican la existencia de nuevas especies de *Fusarium*, sobre todo aquellas pertenecientes al complejo *F. solani* para las que todavía no se dispone de resistencias (Gómez et al., 2014; González et al., 2019). Por ello, el problema de la fusariosis en melón todavía no está resuelto y se requiere desarrollar estrategias alternativas a los tratamientos que puedan combinarse con el empleo de resistencias genéticas.

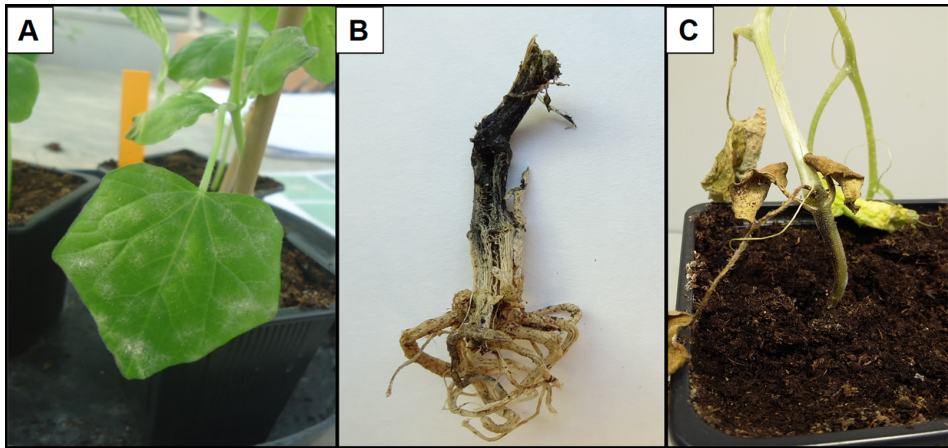
El colapso o muerte súbita del melón, son términos empleados para referirse a una de las principales amenazas para este cultivo, que desconcierta a los agricultores y patólogos por el repentino desplome de la planta en el momento previo a la cosecha y la dificultad

para identificar al agente responsable de este problema (Martyn & Miller, 1996; Fita et al., 2007a; Cohen et al., 2012; Cohen et al., 2016). Aparentemente, se trata de una enfermedad compleja en la que participan varios patógenos, pero además tiene una estrecha relación con las prácticas culturales y condiciones ambientales específicas que favorecen el estrés en el cultivo, p. ej., el calor extremo, sequías, la carga de producción que soporta la planta o incluso el ataque de insectos. Los principales agentes causales del colapso del melón son *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich.

*Monosporascus cannonballus* es un hongo ascomiceto (Pyrenomycete) del suelo, responsable de la pudrición de la raíz y colapso de las plantas, fundamentalmente cuando se acerca el momento de la cosecha. Se ha descrito en numerosas partes del mundo, y causa pérdidas económicas de relevancia en determinadas regiones, como el sur-oeste de los Estados Unidos, y las principales áreas de producción de cucurbitáceas de Centro y Sur América (Brazil, Guatemala, Honduras y México), la región Mediterránea (Israel, Túnez, España e Italia), y el Lejano y Medio oriente (Irán, Pakistán, India, Arabia Saudita, Japón, y Taiwán) (Martyn & Miller, 1996; Cohen et al., 2012; Ben Salem et al., 2013). Su patogenicidad ha sido comprobada tanto en melón como en sandía. Así mismo, el papel que juegan las plantas hospedadoras (no cucurbitáceas) en la epidemiología de este patógeno es un factor muy importante que requiere mayor estudio. Además de *M. cannonballus*, recientemente se ha descrito otra especie del género, *M. eutypoides*, asociada al síndrome de colapso en algunas regiones (Ben Salem et al., 2013).

*Macrophomina phaseolina* es un hongo patógeno ascomiceto ampliamente distribuido en las zonas cálidas, templadas y tropicales del planeta. Este hongo es el responsable de la enfermedad conocida como pudrición carbonosa de la raíz, por la coloración típica de los tejidos que infecta (Cohen et al., 2016). Esta característica es quizá la clave para el éxito de la supervivencia de este hongo, pues es capaz de sobrevivir en pequeñas estructuras denominadas esclerocios, ya sea en los restos del cultivo como en el suelo, por largos períodos de tiempo. Este patógeno se ha relacionado también con la aparición de colapso en plantas de melón.

Para el caso de estos dos hongos fitopatógenos se han realizado cribados para seleccionar germoplasma resistente, habiéndose descrito resistencia en algunos genotipos de la subespecie *agrestis*, preferentemente en melones orientales o indios y en germoplasma silvestre africano (Crosby, 2001; Dias et al., 2004; Roig et al., 2012; Ambrósio et al., 2015).



**FIGURA 6** ■ Patógenos fúngicos que afectan a Cucurbitáceas. A) *Podosphaera xanthii* (Oidio) sobre hojas de un melón silvestre *Cucumis metuliferus* B) pudrición carbonosa por *Macrophomina phaseolina* en raíces y tallo de un híbrido de calabaza (*Cucurbita pepo* x *Cucurbita pepo*) utilizado como porta injerto y C) *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* inoculado en *C. melo* var. *cantalupensis*.

Adicionalmente a los hongos del suelo, otro factor limitante para el cultivo de melón son los nematodos, pertenecientes a diferentes especies del género *Meloidogyne*. Dentro de las Cucurbitáceas, se han descrito distintas respuestas entre accesiones de melón, pepino, calabaza y sandía frente a *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita* (Edelstein et al., 2010; López-Gómez & Verdejo-Lucas, 2014). Varios materiales se han clasificado como tolerantes o resistentes, pero no totalmente inmunes a estos parásitos (Edelstein et al., 2010). Una de las especies de mayor interés frente a estos patógenos es *C. moschata* que presenta un alto nivel de tolerancia, sin embargo, su limitante es que no impide la reproducción del patógeno (Sigüenza et al., 2005). La mayoría de las entradas de melón evaluadas son susceptibles a las distintas especies de nematodos, aunque se ha descrito resistencia en especies silvestres del género *Cucumis*, como *C. metuliferus*,

*C. ficifolius*, *C. myriocarpus* o *C. africanus* Linnaeus f. (Fassuliotis, 1970; Pofu et al., 2010). La introgresión de genes de resistencia efectiva (*Mi locus*) es una práctica rutinaria para desarrollar cultivares y portainjertos para tomate (Verdejo-Lucas et al., 2009; Louws et al., 2010), mientras que en las cucurbitáceas como el melón, la incorporación de la resistencia desde el germoplasma silvestre no ha tenido éxito, debido a barreras de incompatibilidad interespecífica (Beharav & Cohen, 1995). Para evitar los problemas de suelo descritos, se han empleado prácticas culturales como la solarización del suelo, cultivos de cobertura, enmiendas al suelo o el control biológico, así como tratamientos químicos con productos fungicidas o nematicidas (Martyn, 2008). Las prácticas culturales no han sido totalmente efectivas y los productos químicos que mejores resultados dan, como el bromuro de metilo, se están limitando o eliminando gradualmente. En Europa ya está prohibido su uso, por lo que la resistencia genética para el control de los nematodos es esencial.

Como se ha indicado, para las distintas enfermedades descritas anteriormente se ha identificado resistencia intraespecífica o interespecífica. La resistencia intraespecífica puede utilizarse en programas de introgresión mediante cruzamientos, pero en la mayoría de los casos las enfermedades son complejas y los modos de herencia no se han descritos o son multigénicos, lo que dificulta su manejo (Ambrósio et al., 2015). El uso de la resistencia interespecífica está limitado principalmente debido a la incompatibilidad existente en la mayoría de cruzamientos. Una forma alternativa, rápida y eficiente de emplear la variabilidad tanto intra como interespecífica frente a estrés biótico causado por los hongos y otros patógenos presentes en el suelo como los nematodos es mediante el empleo de las variedades resistentes como portainjertos de las variedades susceptibles (Thies et al., 2010; Guan et al., 2014; Gisbert et al., 2017).

### 1.3.2. FACTORES AMBIENTALES

Además de los patógenos descritos anteriormente también causan estrés otros factores ambientales, como las temperaturas extremas, el exceso de sal en agua o en suelo, la falta o el exceso de agua y la presencia de contaminantes que limitan el cultivo del melón

en numerosas regiones productoras del mundo. Los distintos tipos de estrés abiótico causan las mayores pérdidas en las especies cultivadas a nivel mundial, describiéndose reducciones de la producción superiores al 50% (Boyer, 1982). La creciente demanda e interés en productos hortícolas frescos ha incentivado el uso de la agricultura intensiva en muchas zonas, pero además la tendencia a utilizar prácticas más sostenibles o ecológicas hace que tanto el melón como muchas otras especies hortofrutícolas de importancia se cultiven con mayor frecuencia en condiciones ambientales y de suelo desfavorables.

Por otra parte, la exposición continua a temperaturas extremas (umbrales mínimos y máximos), produce estrés térmico en las especies sensibles. Al igual que otras especies susceptibles al frío, el melón puede sufrir una reducción del rendimiento, retraso en el desarrollo, trastornos fisiológicos y muerte celular bajo los umbrales de temperatura mínimos (8-12 °C) (Criddle et al., 1997; Schwarz et al., 2010). Temperaturas superiores a 35 °C pueden provocar envejecimiento prematuro y una disminución del rendimiento y la calidad del fruto, derivado del impacto sobre los procesos fotosintéticos y la capacidad antioxidativa (Zhang et al., 2014), siendo su temperatura óptima de desarrollo entre 25 y 32 °C. Los efectos de una exposición prolongada a temperaturas extremas se vinculan principalmente a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y consecuentemente los mecanismos de resistencia y tolerancia guardan relación con la síntesis de compuestos antioxidantes que mitigan su actividad (Hasanuzzaman et al., 2012). La identificación y cuantificación de metabolitos como los fitofuranos y fitoprostanos (Yonny et al., 2016) empleados como biomarcadores oxidativos han facilitado la evaluación de la eficacia de algunas moléculas con propiedades antioxidativas para combatir los efectos del estrés térmico en el melón (Zhang et al., 2014; Yonny et al., 2016). Es importante considerar que la variación de la temperatura del suelo es distinta a la ambiental y como consecuencia, las raíces pueden sufrir el impacto del mismo durante períodos más largos que la parte aérea (Rivero et al., 2003). Por ello, el estudio e identificación de un sistema radicular vigoroso y resistente a estas fluctuaciones de temperatura debe ser considerado en los programas de mejora.

Otro estrés abiótico importante es la salinidad en el suelo y en el agua de riego. Se considera el factor de estrés abiótico más extendido y, dependiendo la especie, los efectos pueden ser más o menos agresivos. El estrés salino afecta al metabolismo, reduce el crecimiento y altera la morfología de la planta (Shannon & Grieve, 1999; Huang et al., 2012). El estrés salino tiene dos componentes: el osmótico, que se refiere al estrés hídrico al disminuir el potencial hídrico en el suelo y el componente iónico, relacionado con la presencia de iones tóxicos como el  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  (Kramer, 1984; Rivero et al., 2003). El melón se considera una especie moderadamente tolerante a la salinidad, aunque existe variabilidad según el cultivar. Los mecanismos que emplea el melón frente a la salinidad difieren incluso entre los cultivares tolerantes (Kusvuran et al., 2007; Dasgan et al., 2009). Además de la disminución del rendimiento, la salinidad puede provocar alteraciones en el tamaño de los frutos, proporción del mesocarpio e incremento de sólidos solubles del fruto (Huang et al., 2012; García-Martínez et al., 2019). La detección de genotipos tolerantes o resistentes es un trabajo difícil, debido a la complejidad genética y fisiológica de este carácter (Wang et al., 2003; Flowers et al., 2004). Sin embargo, el estudio de la base genética cuantitativa del rendimiento y sus componentes, así como de rasgos de calidad del fruto, parecen ser claves para la mejora y selección de genotipos superiores de melón tolerantes a la salinidad (Akrami & Arzani, 2018, 2019).

Además del estrés térmico y el salino, las plantas pueden sufrir estrés hídrico por sequía e inundaciones. El melón es un cultivo tradicionalmente de secano, y que se ha sectorizado en zonas áridas o semiáridas de todo el mundo, pero gracias a las nuevas tecnologías en el uso y aprovechamiento del agua, más del 90% de la producción de melón en España está bajo regadío. Aunque el melón puede considerarse como tolerante a la sequía, no todas las variedades responden de igual manera a un déficit hídrico. Muchas especies han desarrollado mecanismos de adaptación para mitigar los efectos de este estrés, como la extensión de su sistema radicular, la alteración en el tamaño de las hojas o el enrollamiento de estas, la modificación de la permeabilidad de la cutícula, el desarrollo de una capa cerosa o tejido esponjoso y la modificación del tamaño de los estomas para evitar la evaporación excesiva (Althawadi & Grace, 1986; Bartels, 2005; Nabi et al.,

2019). Estos mecanismos están ausentes en genotipos de alto rendimiento o en cultivares comerciales, porque la selección y mejora se han centrado en caracteres productivos y de calidad realizada en condiciones no estresantes. En las variedades tolerantes de melón se ha comprobado que el cierre de estomas es el mecanismo que se activa con mayor rapidez y eficiencia. Como consecuencia se produce una reducción de la tasa de transpiración y un incremento de la temperatura foliar (Kusvuran, 2012).

El estrés hídrico afecta además de a la transpiración, a la actividad fotosintética, que provocan una disminución del crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta (Ribas et al., 2000; Kusvuran, 2012). Según Ansari et al. (2019), el melón se ha adaptado al déficit hídrico por medio de un mecanismo de escape, que implica la reducción del crecimiento para permitir que la planta conserve su homeostasis celular. En este proceso, ocurre un incremento en la expresión de genes que codifican enzimas antioxidativas. También se ha documentado en algunos cultivares, el incremento de la longitud de la raíz como respuesta al estrés por sequía (Kavas et al., 2013).

Para hacer frente a los diferentes tipos de estrés abiótico, los programas de mejora cuentan con poderosas herramientas bioinformáticas y biotecnológicas que han ampliado el conocimiento, especialmente a nivel de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés. La respuesta del melón frente a estrés abiótico parece estar regulada por diferentes familias de miRNAs. Se han identificado un total de 24 familias de miRNAs que muestran un patrón de expresión alterado bajo diferentes condiciones de estrés (Sanz-Carbonell et al., 2019).

A pesar de estos avances, todavía se conoce poco acerca de los mecanismos fisiológicos y genéticos involucrados en la respuesta a distintos tipos de estrés. Es importante mencionar que muchos de los estudios realizados han carecido de una visión global, y los efectos y mecanismos de respuesta han sido evaluados individualmente frente a un factor de estrés específico, olvidando que los daños causados en el cultivo siempre están relacionados con la interacción de más de un factor. La complejidad en el



manejo de factores ambientales y los efectos diversos sobre los cultivares de melón, obliga a buscar alternativas y soluciones adecuadas, económicas y a corto plazo, tanto para los productores como para las empresas relacionadas con la mejora vegetal.

El uso del injerto ha ganado aceptación para mitigar también problemas asociados al estrés abiótico. Ha demostrado ser una técnica efectiva para reducir las pérdidas causadas por condiciones ambientales adversas, como las bajas temperaturas del suelo y las altas concentraciones de sales en el mismo y va creciendo el número de estudios que muestran resultados promisorios (Lee et al., 2010; Louws et al., 2010; Colla et al., 2017). A continuación se detalla el uso de la técnica del injerto en el cultivo del melón.

#### 1.4. El injerto como herramienta de mejora frente a estreses bióticos y abióticos en el cultivo del melón.

El injerto es una técnica muy antigua que ha sido aprovechada en todo el mundo durante miles de años y que ha sido utilizada comúnmente en especies leñosas. En las últimas décadas, esta técnica se ha convertido en una valiosa herramienta para afrontar estreses de tipo biótico y abiótico en cultivos hortícolas (Gisbert et al., 2011; Rouphael et al., 2012; Farhadi et al., 2016).

Conceptualmente, el injerto es la unión de dos o más plantas en un solo organismo quimérico; el portainjerto (patrón) que aporta el sistema radicular y la variedad (copa/vástago) que crecerá con la alimentación y el soporte que le proporciona el portainjerto. De esta manera, si la combinación obtenida es adecuada, la variedad puede cultivarse en condiciones que no podría hacerlo gracias a las características aportadas por el portainjerto.

El uso del injerto se ha visto favorecido por el aumento en la demanda de frutas y verduras, en parte, por la globalización de los hábitos alimentarios, a la vez

que se ha producido un aumento de estreses bióticos y abióticos a consecuencia de la sobreexplotación de las tierras de cultivo, el uso inadecuado de agua, el manejo irresponsable de los agroquímicos y la retirada de alguno de ellos por problemas medioambientales, además de los problemas de estreses asociados con el cambio climático.

Actualmente, los programas de mejora de especies hortícolas incluyen el desarrollo de nuevos portainjertos. El empleo de éstos para combatir patógenos específicos (Guan et al., 2012) a los que la variedad es susceptible es un enfoque alternativo a la mejora por cruzamiento, que no requiere compatibilidad sexual ni largos programas de retrocruzamiento y selección. Además, la obtención de portainjertos híbridos permite combinar características de utilidad para afrontar distintos tipos de estrés. Ahora bien, el desarrollo de portainjertos también requiere de varias etapas que incluyen la selección/obtención de los portainjertos, su evaluación a nivel de compatibilidad con las variedades, el estudio del comportamiento agronómico y la posible influencia en la calidad de los frutos de las variedades injertadas y todo ello, en diferentes condiciones de cultivo.

En cucurbitáceas, la primera aplicación comercial del injerto se planteó con el objetivo de conseguir resistencia a *Fusarium* spp. en plantas de sandía (Miguel et al., 2004; Sakata et al., 2007). Los primeros patrones empleados fueron distintas accessiones de la calabaza del peregrino [*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl] y de calabazas pertenecientes a la especie *C. moschata* L. (Colla et al., 2017) y posteriormente, híbridos interespecíficos *C. maxima* x *C. moschata*. Los buenos resultados y efectos positivos de estos patrones fomentaron su uso, no solo en sandía, sino también, aunque en menor grado, en melón y pepino (Lee et al., 2010). Más del 90 % del cultivo de sandía se realiza con planta injertada en países como Japón, Corea o Israel y también en España (Cohen et al., 2004; Miguel et al., 2007; Colla et al., 2017). El objetivo prioritario del uso del injerto en cucurbitáceas ha sido aumentar la resistencia de las variedades comerciales a una amplia gama de enfermedades causadas por hongos presentes en el suelo que provocan en muchos casos la muerte súbita de las plantas. Actualmente tiene también interés hacer frente a nematodos y a distintos tipos de estrés abiótico.

### 1.4.1. LA TÉCNICA DEL INJERTO: METODOLOGÍAS

A pesar de que se trata de una técnica antigua, hoy se ha convertido en una actividad que exige una mano de obra altamente cualificada y procesos optimizados, para satisfacer la creciente demanda de plántulas injertadas en todo el mundo. Este hecho, ha llevado a la estandarización del proceso y la expansión de las empresas de semillas y viveros especializados en injerto. La práctica del injerto se puede resumir en cuatro pasos: 1) la selección de las especies que se usarán como patrón (portainjerto) y vástago (variedad injertada o copa), 2) la unión entre el patrón y vástago por manipulación física, 3) la cicatrización del tejido de la zona de unión y 4) la aclimatación de la planta injertada (Lee et al., 2010). Los distintos métodos pueden variar según la especie, la experiencia del agricultor, las instalaciones y maquinaria disponible, el número de plantas a injertar y el objetivo del injerto (Colla et al., 2017). Los métodos de realización de injertos se pueden clasificar en dos categorías, injerto manual o mecánico. A pesar de que los avances tecnológicos han permitido desarrollar máquinas que automatizan el proceso, el injerto manual está ampliamente extendido y continúa siendo el más usado. Los métodos más populares se observan en la siguiente imagen (Figura 7).

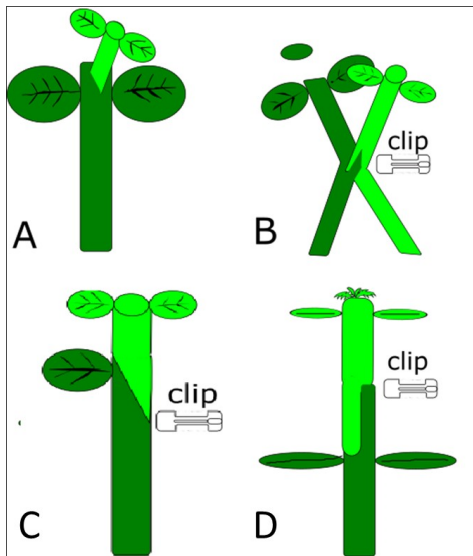


FIGURA 7 ■ Principales métodos de injerto en plantas: A) Injerto en orificio de inserción; B) injerto de aproximación; C) injerto de empalme; D) injerto de hendidura. Adaptada de Lee et al., (2010).

Estos métodos se describen a continuación con mayor detalle:

- Injerto en orificio de inserción: La zona de crecimiento (ápice) del patrón se retira con mucho cuidado, y se realiza un orificio con un palillo en un ángulo inclinado en dirección longitudinal. En el hipocótilo de la variedad se hace un corte inclinado, para tener un extremo afilado que permita una fácil inserción.
- Injerto de aproximación: Se elimina la zona de crecimiento del patrón. Se hace un corte a nivel de los hipocótilos en la variedad (hacia arriba) y patrón (hacia abajo) en un ángulo de 30-40° con relación al eje perpendicular, lo suficientemente profundo pero sin cortar completamente los hipocótilos. Se acercan entre sí y la parte cortada de la variedad se inserta en el patrón. Para mantenerlos unidos, se colocan clips especiales. Una vez que el tejido unido ha cicatrizado, se elimina el sistema radicular de la variedad, haciendo un corte a la altura del hipocótilo.
- Injerto de empalme: El ápice y el cotiledón del patrón se eliminan haciendo un corte inclinado (35° a 45°) al igual que en la zona inferior del tallo de la variedad, para que puedan unirse por medio de clips. Este es el método más común para las cucurbitáceas. En la Figura 8 se muestran imágenes que corresponden a este tipo de injerto utilizando como patrón, un híbrido comercial de calabaza (*C. maxima* x *C. moschata*) y como variedad injertada una accesión de melón (*C. melo*).
- Injerto de hendidura: También se conoce como injerto de cuña. Las plántulas del patrón se decapitan o despuntan, eliminando su porción apical o superior y se realiza un corte longitudinal hacia abajo, aproximadamente 1–1.5cm de largo y  $\frac{3}{4}$  de profundidad del diámetro del tallo. La variedad se poda a 1-3 hojas verdaderas y el extremo inferior del tallo se corta en ángulo inclinado para formar una cuña. Después de colocar la variedad en la hendidura dejada en el patrón, se coloca un clip para mantenerlo en posición hasta la cicatrización total del tejido. En el pasado, el injerto de hendidura era usado en cucurbitáceas en muchos países, pero su uso actualmente se limita a cultivos de solanáceas (Lee et al., 2010; Colla et al., 2017).



**FIGURA 8** ■ Procedimiento de injerto en melón por el método de empalme. 1) Se hace un corte en bisel (ángulo de 45°) en el hipocótilo del portainjerto eliminando el ápice de crecimiento (se deja un cotiledón y una hoja verdadera) y de la misma forma en el vástago, 2) se juntan con cuidado hasta que queden en contacto tanto el portainjerto como el vástago y 3) finalmente se coloca una pinza o clip para sostener las dos partes unidas.

En la actualidad, se dispone de muchas máquinas que realizan distintos tipos de injerto, algunas se han desarrollado en Asia y otras en Europa (Colla et al., 2017). Pero hasta la fecha la producción manual de planta injertada es la más frecuente.

## 1.5. Desarrollo de patrones/portainjertos para melón

### 1.5.1. PORTAINJERTOS DEL GÉNERO *CUCURBITA*

Los portainjertos más utilizados en cucurbitáceas pertenecen al género *Cucurbita*. A pesar de la amplia variabilidad en el género, solo unas pocas accesiones de *Cucurbita* spp. han sido probadas como portainjertos. Algunas entradas de calabaza (*C. moschata*) o calabacín (*C. pepo*) han mostrado resultados favorables como portainjertos de pepino, reduciendo los efectos del estrés salino (Liu et al., 2012; Lei et al., 2014), sin afectar la producción (Farhadi et al., 2016). Sin embargo, los estudios llevados a cabo en melón no han sido completamente favorables. Se han evaluado algunas variedades locales de *Cucurbita ficifolia* (Yarsi et al.,

2012), *C. maxima* (Trionfetti Nisini et al., 2002) o *C. moschata* (Traka-Mavrona et al., 2000; Trionfetti Nisini et al., 2002) como potenciales portainjertos. En términos generales, las bajas tasas de supervivencia, el impacto sobre el rendimiento o la calidad del fruto, han disminuido el interés de estas especies como portainjertos en el cultivo de melón.

La aparentemente baja compatibilidad entre las accesiones del género *Cucurbita* y la mayoría de los cultivares de melón ensayados, llevaron a probar cruces interespecíficos, con el propósito de combinar las características deseables de dos accesiones en un nuevo y superior genotipo, mejor adaptado al proceso de injerto y más compatible con el melón a lo largo de todo el ciclo de cultivo. El uso del doble injerto ha sido evaluado como una alternativa para superar los problemas de compatibilidad entre el melón e híbridos de calabaza (Miguel et al., 2011). Los híbridos interespecíficos que mejor resultado han dado han sido entre *C. maxima* y *C. moschata*, empleados con éxito no solo en pepino y melón, sino sobre todo en sandía (Rouphael et al., 2012; Orsini et al., 2013; Kurum et al., 2017). Los primeros híbridos comerciales de este cruzamiento se desarrollaron en países orientales (China, Japón y Corea), pero hoy todas las casas comerciales presentan en sus catálogos portainjertos de este tipo. Los híbridos de *C. maxima* x *C. moschata* proporcionan una protección no específica, pero eficiente, frente a una amplia gama de enfermedades de suelo y a algunos estreses abióticos (Colla et al., 2017). Una de las características de mayor interés es su resistencia a *Fusarium*, habiéndose comprobado un aumento de rendimiento en melones injertados en campos infestados con hongos de este género (Crinò et al., 2007; Zhou et al., 2014). Otros efectos positivos son que proporcionan tolerancia a la sequía, a través de la modificación de la regulación estomática (Orsini et al., 2013), mejoran la capacidad fotosintética en condiciones de estrés salino (Rouphael et al., 2012), e incrementan la tolerancia de las variedades de melón a niveles críticos de boro (Edelstein et al., 2005). Sin embargo, los patrones de *Cucurbita* que se utilizan actualmente, presentan limitaciones importantes, como su baja tolerancia a nematodos, al oídio y a diferentes virosis. Además, las nuevas fusariosis, causadas por especies del complejo *solani* pueden afectar también a los portainjertos de este género (González et al., 2019). Por ello, es imprescindible la búsqueda de accesiones resistentes y el desarrollo de nuevos portainjertos.

Otro aspecto a considerar es la influencia que el patrón ejerce en la calidad de los frutos de la variedad injertada. En melón este tipo de efectos se ha descrito en algunas combinaciones (Cohen et al., 2002; Leonardi et al., 2017). Una posible causa es el vigor excesivo de estos híbridos. En otros casos y debido a las diferencias tan marcadas entre los diámetros del hipocótilo del portainjerto y de la variedad, puede no haberse dado una buena conexión entre los tejidos de ambas especies, lo que provoca un flujo ineficiente de agua y minerales. Adicionalmente, las divergencias a nivel genómico entre el portainjerto y la variedad injertada (géneros *Cucumis* y *Cucurbita*), pueden favorecer mecanismos de incompatibilidad temprana o tardía, que a su vez pueden afectar el rendimiento y la calidad (Rouphael et al., 2010). En este sentido, el empleo de portainjertos pertenecientes al mismo género o especie que la variedad injertada puede ser una solución (Crinò et al., 2007). Este enfoque se ha empleado ya con éxito en sandía, utilizando patrones del género *Citrullus* (Cohen et al., 2014; Fredes et al., 2017). En este último trabajo, la calidad de frutos de sandía, incluso su perfil aromático, eran mucho más parecidos a los de las plantas sin injertar que los de las plantas injertadas en patrones de *Cucurbita*. De la misma forma, la utilización de patrones del género *Cucumis* para melón, puede ser una alternativa a los patrones de *Cucurbita*.

#### 1.5.2. EL GÉNERO *CUCUMIS* COMO RECURSO PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS PORTAINJERTOS DE MELÓN

Existe una amplia variabilidad genética dentro del género *Cucumis* lo que permite explorar un gran número de accesiones cultivadas y silvestres (Nieto et al., 2007), para la selección de aquellas con características de interés. Por un lado se puede aprovechar la diversidad intraespecífica existente en *C. melo* que podría evitar teóricamente los efectos de incompatibilidad, debido a la proximidad filogenética existente entre el patrón y la variedad injertada. Entre la variabilidad intraespecífica de mayor interés en melón se encuentran algunas variedades pertenecientes a los grupos *flexuosus*, tolerantes a la sequía, *acidulus* y *momordica*, resistentes a oídio (Pitrat, 2008; Nunes et al., 2017), *conomon*, *chinensis* o *agrestis* silvestres, tolerantes a virus y hongos del suelo, como *Monosporascus*, *Macrophomina* (Crosby, 2001; Dias et al., 2004; Roig et al., 2012; Ambrósio et al., 2015;

Castro, 2019) o *Fusarium* (Pitrat, 2008). Algunas de las entradas identificadas como resistentes se han ensayado como portainjertos en melón y comparado con híbridos de *Cucurbita*, detectándose menos impacto en los parámetros de calidad del fruto de la variedad injertada en los primeros (Fita et al., 2007b; Concurso et al., 2012) Sin embargo, dentro de la especie son escasas las resistencias efectivas frente a nuevas razas de *Fusarium* (Gómez et al., 2014) y es muy escasa la tolerancia a nematodos (Ito et al., 2014; Diniz et al., 2016). Tampoco se ha llevado a cabo una selección eficaz por resistencia a estreses abióticos, ya que las bases bioquímicas y moleculares no son totalmente conocidas y requieren estudios profundos y multidisciplinarios (Sanz-Carbonell et al., 2019).

En cuanto a la variabilidad interespecífica o intragenérica, es una buena alternativa para aumentar la probabilidad de identificar genotipos promisorios. El germoplasma silvestre del género *Cucumis* es una fuente de resistencias a estrés, resistencias poco frecuentes en el germoplasma cultivado. Muchas especies silvestres del género *Cucumis* (Figura 9) han sido descritas como resistentes a diversas enfermedades y plagas del melón (Fassuliotis, 1970; Nieto et al., 2007). Se han descrito diferentes niveles de resistencia en *C. africanus*, *C. anguria*, *C. metuliferus*, *C. prophetarum*, *C. subsericeus*, *C. myriocarpus*, *C. ficifolius*, *C. zeyheri* y *C. pustulatus* frente a *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Matsumoto et al., 2011; Liu et al., 2015).

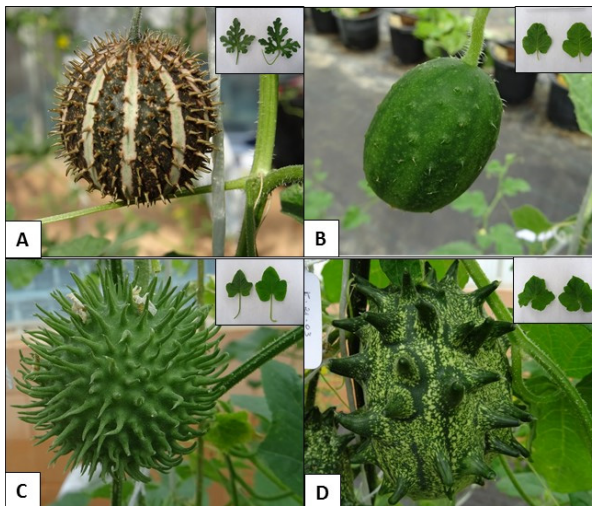


FIGURA 9 ■ Algunas especies silvestres del género *Cucumis*, A) *Cucumis myriocarpus*, B) *Cucumis ficifolius*, C) *Cucumis anguria* y D) *Cucumis metuliferus*.



Otra especie menos conocida, como *C. figareii*, además de ser resistente a este patógeno, también lo es al mildiu veloso y al *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) (Pan & More, 1996). Por otra parte, la resistencia a nematodos, tan escasa en *C. melo*, parece ser muy frecuente en las especies anteriormente citadas (Sigüenza et al., 2005; Pofu et al., 2010; Pofu et al., 2011; Liu et al., 2015).

Las barreras de cruzabilidad que separan estas especies del melón (Kroon et al., 1979; Kho et al., 1980; Singh & Yadava, 1984; Den Nijs & Visser, 1985; Matsumoto & Miyagi, 2012) impiden su empleo en programas de mejora basados en cruzamientos, pero no impiden su uso en el desarrollo de nuevos portainjertos, aunque son limitados los estudios e investigaciones al respecto. Entre los posibles inconvenientes de utilizar estas especies como portainjertos está su bajo poder germinativo, que suele ser poco homogéneo, y la presencia de hipocótilos débiles y delgados en etapas tempranas de crecimiento que dificulta la realización del injerto e incrementa la mortalidad de las plantas injertadas.

Estas limitaciones se han descrito por ejemplo para *C. ficifolius* como un potencial portainjerto de melón (Trionfetti Nisini et al., 2002). También una alta mortalidad de las plantas injertadas, debido principalmente a la diferencia en los diámetros y el desarrollo asincrónico de los hipocótilos de portainjerto y variedad, fue descrita al evaluar a *C. africanus* y *C. myriocarpus* como portainjertos para sandía (Pofu & Mashela, 2012; Pofu et al., 2013).

Otras especies de *Cucumis* que no han resultado adecuadas por su impacto en la calidad y la producción han sido *C. zeyheri*, (Trionfetti Nisini et al., 2002) y *C. anguria* (Igarashi et al., 1987).

Por el contrario, se han obtenido resultados prometedores en cuanto a resistencia a distintos patógenos (incluidos los nematodos) y un reducido impacto

sobre la calidad del frutos de melón con las especies *C. metuliferus* y *C. pustulatus* (Igarashi et al., 1987; Sigüenza et al., 2005; Liu et al., 2015; Gisbert et al., 2017).

Estos resultados incitan a desarrollar y evaluar un mayor número de portainjertos para aprovechar la variabilidad existente en las especies silvestres de *Cucumis*. En estos programas y según lo comentado, el aumento del diámetro de los hipocótilos y del vigor de las plántulas, que podría abordarse mediante la hibridación o la poliploidización, serían mejoras a tener en cuenta. También se requerirá la realización de una caracterización del impacto en cada combinación patrón-variedad incluyendo la calidad del fruto.

#### 1.5.2.1. Hibridación interespecífica en el género *Cucumis*

Hasta la fecha, no se han reportado híbridos entre melón y especies silvestres de *Cucumis* debido a la ocurrencia de complejas barreras reproductivas (Singh & Yadava, 1984), por lo que la posibilidad de introducir en el melón genes de interés a partir de estas especies por métodos convencionales parece inviable. La incompatibilidad en cruzamientos dentro de este género puede surgir del distinto número básico de cromosomas existente entre algunas especies (por ejemplo, entre el melón  $2n=24$  y el pepino  $2n=14$ ). Sin embargo, las especies silvestres del género *Cucumis* presentan, mayoritariamente, el mismo número cromosómico que el melón. A pesar de esta situación favorable, obtener descendencias viables es difícil, debido a distintos mecanismos que funcionan como barreras de cruzabilidad y que se pueden clasificar en: precigóticas (incluyendo los factores que impiden la fecundación) y postcigóticas (durante o después de la fecundación) (Zenkeler, 1999; Chen & Adelberg, 2000; Ondřej et al., 2001).

Kho et al. (1980) describieron el comportamiento reproductivo de las especies africanas de *Cucumis*, clasificándolas en tres grupos en función del comportamiento del tubo polínico en cruzamientos interespecíficos. El primero considera aquellas especies que presentan congruencia bilateral, es decir hay un alto grado de compatibilidad en los cruzamientos recíprocos de dos especies, de forma que los tubos polínicos se desarrollan

hasta llegar al ovario e incluso a los óvulos, y se pueden formar frutos con semillas. Un ejemplo es el comportamiento entre *C. dipsaceus* con *C. africanus*, o algunas entradas de *C. anguria*. El segundo grupo, se caracteriza por presentar incongruencia bilateral, que ocurre cuando los tubos polínicos en su mayoría crecen no más allá del estilo de la flor receptora. Este fenómeno se observó en la mayoría de los cruzamientos que involucraban a *C. metuliferus* y *C. melo*. El tercer patrón de cruzabilidad se denomina incongruencia unilateral. Este tipo de situación se da cuando una especie no se comporta igual cuando se emplea como parental femenino que cuando se emplea como parental masculino. En este sentido *C. prophetarum* y *C. myriocarpus* mostraron mejores aptitudes como parentales masculinos. Por el contrario, en la mayoría de los cruzamientos de *C. ficifolius* como parental femenino, se observó el desarrollo normal de los tubos polínicos hasta el óvulo, seguido del cuajado de frutos con semillas aparentemente viables. Esta característica de *C. ficifolius* podría atribuirse a su naturaleza tetraploide (Kho et al., 1980).

A pesar de los mecanismos y barreras de cruzabilidad descritas, algunos híbridos han sido obtenidos con distinto grado de éxito a partir de cruzamientos interespecíficos, observándose desde la ausencia de cuajado de fruto hasta la obtención de una descendencia híbrida viable, aunque no en todos los casos fértil (Figura 10).

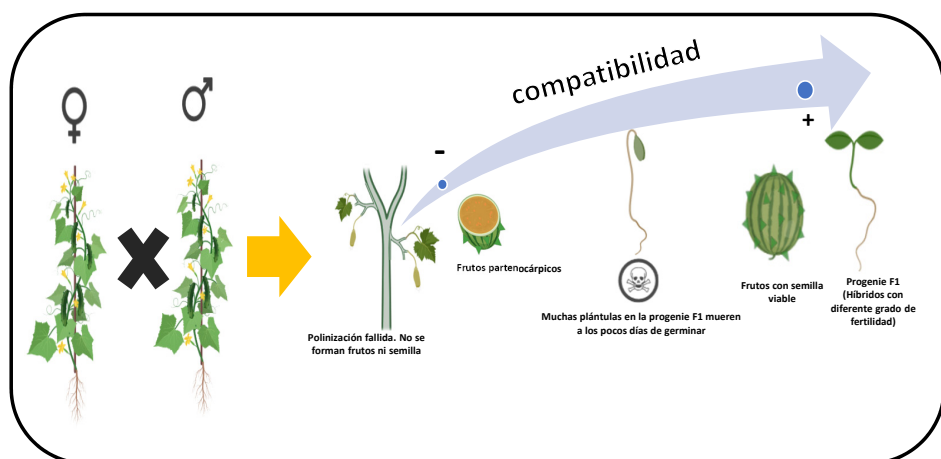


FIGURA 10 ■ Grados de compatibilidad observados en distintos tipos de cruzamientos entre diferentes especies del género *Cucumis*.

Después del trabajo de Kho et al. (1980), la investigación de Singh & Yadava (1984) permitió profundizar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas del género *Cucumis*, describiendo los caracteres morfológicos, así como el comportamiento a nivel cromosómico de descendencias híbridas. Así mismo Den Nijs & Visser (1985) partieron de los estudios realizados por Kho et al. (1980) y evaluaron el vigor y fertilidad de 27 híbridos obtenidos de distintos cruces entre *Cucumis* por medio de la caracterización del polen, producción de frutos y semillas. Posteriormente, Chen & Adelberg (2000) revisan los trabajos realizados con el objetivo de comprender las relaciones filogenéticas de dos de las especies comerciales más importantes del género *Cucumis*, *C. sativus* y *C. melo* con otras especies silvestres. Estos estudios basados en: la capacidad de cruzabilidad, morfología comparativa, emparejamiento cromosómico y variabilidad de isoenzimas, se orientaron para intentar mejorar las perspectivas de aprovechamiento de la hibridación interespecífica para la mejora del melón y el pepino. En la tabla 1 se muestra un resumen de los cruzamientos analizados en estos estudios y su viabilidad (Singh & Yadava, 1984; Den Nijs & Visser, 1985; Chen & Adelberg, 2000).

Singh & Yadava describen en 1984 la obtención de 15 híbridos, a partir de 8 parentales, e indican la existencia de un grupo de especies bastante interfértiles, cuyos híbridos presentan distintos grados de fertilidad (incluyendo *C. dipsaceus*, *C. prophetarum*, *C. anguria*, *C. myriocarpus* y *C. zeyheri*). Dentro de este grupo destacan la compatibilidad de *C. dipsaceus* como progenitor femenino. Este estudio coincide con lo indicado por Kho et al. (1980) quienes indican una buena cruzabilidad para este parental, pero contrasta con estudios posteriores (Den Nijs & Visser, 1985; Chen & Adelberg 2000), que describen que *C. dipsaceus* no presenta una buena aptitud materna al probar cruzamientos con *C. zeyheri*, *C. anguria*, *C. figarei* o *C. myriocarpus* (Tabla 1).

Tabla 1 ■ Cruzamientos directos (A) y recíprocos (B) realizados entre distintas especies del género *Cucumis* en 3 estudios clásicos considerados compatibles (C), parcialmente compatibles (PC) e incompatibles (I).

| PARENTAL FEMENINO         | PARENTAL MASCULINO     | SINGH & YADAVA (1984) A/B | DEN NIJS & VISSER (1985) A/B | CHEN AND ADELBERG (2000) A/B |
|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>C. dipsaceus</i>       | <i>C. myriocarpus</i>  | C/I*                      | I/I                          | I/I                          |
|                           | <i>C. zeyheri</i>      | C/I                       | I/C                          | I/C                          |
|                           | <i>C. prophetarum</i>  | I/C                       | -                            | -                            |
|                           | <i>C. anguria</i>      | C/I                       | I/                           | I/                           |
|                           | <i>C. figarei</i> (4x) | -**                       | I/C                          | -                            |
|                           | <i>C. figarei</i>      | -                         | -                            | I/C                          |
|                           | <i>C. melo</i>         | I/I                       | -                            | -                            |
| <i>C. myriocarpus</i>     | <i>C. zeyheri</i>      | I/C                       | I/I                          | I/I                          |
|                           | <i>C. prophetarum</i>  | C/                        | -                            | -                            |
|                           | <i>C. anguria</i>      | I/C                       | I/C                          | I/C                          |
|                           | <i>C. figarei</i>      | -                         | -                            | I/C                          |
| <i>C. zeyheri</i>         | <i>C. prophetarum</i>  | I/C                       | I/C                          | I/C                          |
|                           | <i>C. anguria</i>      | C/I                       | PC/PC                        | C/C                          |
|                           | <i>C. figarei</i> (4x) | -                         | I/C                          | -                            |
|                           | <i>C. figarei</i>      | -                         | -                            | I/C                          |
|                           | <i>C. zeyheri</i> (4x) | -                         | C/C                          | C/C                          |
|                           | <i>C. metuliferus</i>  | -                         | I/C                          | I/C                          |
| <i>C. zeyheri</i> (4x)    | <i>C. anguria</i>      | -                         | C/C                          | C/C                          |
|                           | <i>C. dipsaceus</i>    | -                         | C/                           | C/                           |
|                           | <i>C. myriocarpus</i>  | -                         | C/                           | C/                           |
| <i>C. prophetarum</i>     | Accesión CUCU 44/74    | C/I                       | -                            | -                            |
|                           | <i>C. anguria</i>      | C/C                       | C/                           | C/                           |
|                           | <i>C. melo</i>         | I/I                       | -                            | -                            |
| <i>C. anguria</i>         | <i>C. melo</i>         | I/I                       | -                            | -                            |
| <i>C. ficifolius</i> (4x) | <i>C. anguria</i>      | -                         | C/                           | -                            |
|                           | <i>C. dipsaceus</i>    | -                         | C/                           | -                            |
|                           | <i>C. figarei</i> (4x) | -                         | C/                           | -                            |
|                           | <i>C. myriocarpus</i>  | -                         | C/                           | -                            |
|                           | <i>C. zeyheri</i>      | -                         | C/                           | -                            |
|                           | <i>C. zeyheri</i> (4x) | -                         | I/                           | -                            |
| <i>C. ficifolius</i>      | <i>C. anguria</i>      | -                         | -                            | C/                           |
|                           | <i>C. dipsaceus</i>    | -                         | -                            | C/                           |
|                           | <i>C. figarei</i>      | -                         | -                            | C/                           |

TABLA 1 ■ Continuación.

| PARENTAL FEMENINO      | PARENTAL MASCULINO     | SINGH & YADAVA (1984) A/B | DEN NIJS & VISSER (1985) A/B | CHEN AND ADELBERG (2000) A/B |
|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                        | <i>C. myriocarpus</i>  | -                         | -                            | C/                           |
| <i>C. ficifolius</i>   | <i>C. zeyheri</i>      | -                         | -                            | C/                           |
|                        | <i>C. zeyheri</i> (4x) | -                         | -                            | I/                           |
| <i>C. figarei</i> (4x) | <i>C. myriocarpus</i>  | -                         | C/                           | -                            |
| <i>C. metuliferus</i>  | <i>C. melo</i>         | -                         | I/                           | I/                           |
| <i>C. sativus</i>      | <i>C. melo</i>         | -                         | -                            | I/                           |
|                        | <i>C. hystrix</i>      | -                         | -                            | I/                           |

\* La primera letra se refiere al cruce directo y la segunda letra al cruzamiento recíproco.

\*\* El guión indica que un determinado cruzamiento no se ha considerado en el estudio

Aunque los resultados de los 3 estudios no son totalmente comparables, porque algunas de las especies utilizadas pueden no estar bien clasificadas taxonómicamente o por el empleo de distintas metodologías de análisis o distintas accesiones, hay algunas conclusiones que se pueden extraer de la Tabla 1 por ser comunes a estos estudios. Por ejemplo, la dificultad de obtener una descendencia híbrida al emplear *C. myriocarpus* como parental femenino en cruzamientos con *C. dipsaceus*, *C. zeyheri* o *C. anguria* es un comportamiento recurrente en los estudios llevados a cabo, lo que confirma sin lugar a duda su alto grado de incompatibilidad. Den Nijs & Visser (1985) junto con Chen & Adelberg (2000) coinciden en que otros cruzamientos como *C. dipsaceus* x *C. zeyheri*, *C. zeyheri* x *C. metuliferus*, *C. metuliferus* x *C. melo* también son incompatibles, puesto que no se pudo obtener en ningún caso descendencia.

Por otro lado, es necesario destacar el comportamiento y la compatibilidad entre las especies de las investigaciones citadas anteriormente (Tabla 1). Los cruzamientos entre *C. prophetarum* x *C. zeyheri* y *C. prophetarum* x *C. anguria* han sido reportados como exitosos por unanimidad en diversos trabajos, dando lugar a plantas híbridas capaces de sobrevivir y desarrollarse. En el cruzamiento *C. zeyheri* y *C. anguria* aunque compatible (Tabla 1), Den Nijs & Visser (1985) evidenciaron un fenómeno de elevada mortalidad temprana en la descendencia híbrida, que no fue generalizado

al probar distintas accesiones de *C. anguria* y *C. zeyheri*. La compatibilidad de otros cruzamientos como *C. zeyheri* x *C. dipsaceus*, *C. metuliferus* x *C. zeyheri*, y *C. zeyheri* (4x) utilizado como parental materno con *C. anguria*, *C. dipsaceus* y *C. myriocarpus* ha sido validado por Den Nijs & Visser (1985) y Chen & Adelberg (2000).

En el marco de la presente tesis doctoral se han empleado 4 especies silvestres del género, *C. ficifolius*, *C. myriocarpus*, *C. anguria* y *C. metuliferus*. Por ello, a continuación, se destacan los resultados descritos para estas 4 especies.

Como se ha indicado anteriormente, el trabajo de Kho et al. (1980) ya describió la buena compatibilidad de *C. ficifolius* como parental femenino, atribuyendo la misma a su naturaleza tetraploide. Los estudios de Den Nijs & Visser (1985) y Chen & Aldeberg (2000) confirman este comportamiento al realizar cruces exitosos de *C. ficifolius* con *C. anguria*, *C. dipsaceus*, *C. figarei*, *C. myriocarpus*, y *C. zeyheri* (Tabla 1). La mayoría de los híbridos derivados de *C. ficifolius* fueron triploides, siendo en su mayoría autoestériles, y en algunos casos mostraron cuajado y formación de frutos partenocárpicos después de su autopolinización (por ejemplo, en los casos de *C. ficifolius* x *C. anguria* y *C. ficifolius* x *C. zeyheri*). En otros casos también se observaron variaciones en los niveles de ploidía, como los híbridos triploides en los cruces de *C. ficifolius* con *C. myriocarpus* y *C. dipsaceus* y los tetraploides entre *C. ficifolius* con *C. anguria* y *C. figarei*.

En relación con *C. anguria* y *C. myriocarpus*, hay que destacar que presentan una relación de incongruencia unilateral (Kho et al., 1980), por lo que el cruzamiento es posible en una dirección, pero no en la recíproca (Tabla 1). Este comportamiento fue confirmado por Singh & Yadava (1984), quien obtuvo frutos con semillas, aunque no menciona la evaluación de una progenie híbrida, mientras que Den Nijs & Visser (1985) y Chen & Adelberg (2000) indicaron la obtención de un híbrido vigoroso, fértil, con polen viable, capaz de producir frutos y semillas.

Por último, también hay un amplio consenso en el comportamiento de *C. metuliferus*. En la investigación de Kho et al. (1980) se indica que esta especie presenta incongruencia bilateral con todas las especies evaluadas en su estudio. Singh & Yadava (1984) no emplearon a *C. metuliferus* en sus cruces, pero en base a estudios morfológicos y de cruzabilidad anteriores (Deakin et al., 1971) lo clasificaron en el grupo de peor cruzabilidad con el resto de las especies. Así mismo, lo situaron evolutivamente cerca de *C. melo*, ya que se había descrito la producción de un híbrido fértil, al usarse esta última especie como progenitor femenino (Norton & Granberry, 1980; Beharav & Cohen, 1994). Den Nijs & Visser (1985) también evaluaron la capacidad de cruzabilidad de *C. metuliferus*, obteniendo un solo híbrido viable, aunque completamente estéril, al cruzarlo con *C. zeyheri*. Estos autores, al igual que Chen & Adelberg (2000), también definen a *C. metuliferus* como una especie aislada genéticamente de los *Cucumis* africanos, apoyando la clasificación hecha por Jeffrey (1980), que sitúa a *C. metuliferus* como única especie dentro del grupo separado del resto. La aplicación de la técnica de cultivo de embriones ha permitido la obtención de híbridos a partir del cruzamiento entre *C. metuliferus* x *C. anguria* (Fassuliotis & Nelson, 1984).

Como se ha descrito anteriormente, una de las principales limitaciones para usar especies silvestres de *Cucumis* como portainjertos es que proviene de una semilla pequeña en comparación a *C. melo*, que resulta en plántulas pequeñas con un hipocótilo muy fino y corto tras la germinación. Estas características limitan la capacidad de las plántulas de estas especies para soportar el injerto con una plántula más vigorosa y gruesa, como son las variedades comerciales de melón. La hibridación interespecífica puede derivar en la expresión de heterosis que incrementa el vigor, mejorando las características deseables en un portainjerto.

Aunque el objetivo de los estudios previos sobre la cruzabilidad en especies del género *Cucumis* no se ha enfocado en el desarrollo de híbridos para uso como portainjertos, sus resultados han ampliado el conocimiento del comportamiento reproductivo dentro



del género y han sentado la base para desarrollar nuevos genotipos que puedan ser aprovechados como portainjertos promisorios de melón.

#### 1.5.2.2. Poliploidización como herramienta de mejora

La duplicación del genoma es un fenómeno natural en la evolución de las plantas, que puede conducir al desarrollo de dos tipos de individuos: autopoliploides y alopoliploides. La autopoliploidía se define como la duplicación de un genoma dentro de una misma especie, lo que da como resultado un conjunto de cromosomas homólogos en la célula (AA diploide se duplica para convertirse en AAAA autotetraploide). La alopoliploidía se define como la duplicación del genoma tras la unión de dos o más genomas divergentes en un solo núcleo, por ejemplo después de la hibridación interespecífica, lo que da como resultado conjuntos de cromosomas homeólogos en la célula (AAxBB → AB→AABB) (Sattler et al., 2016; Alix et al., 2017).

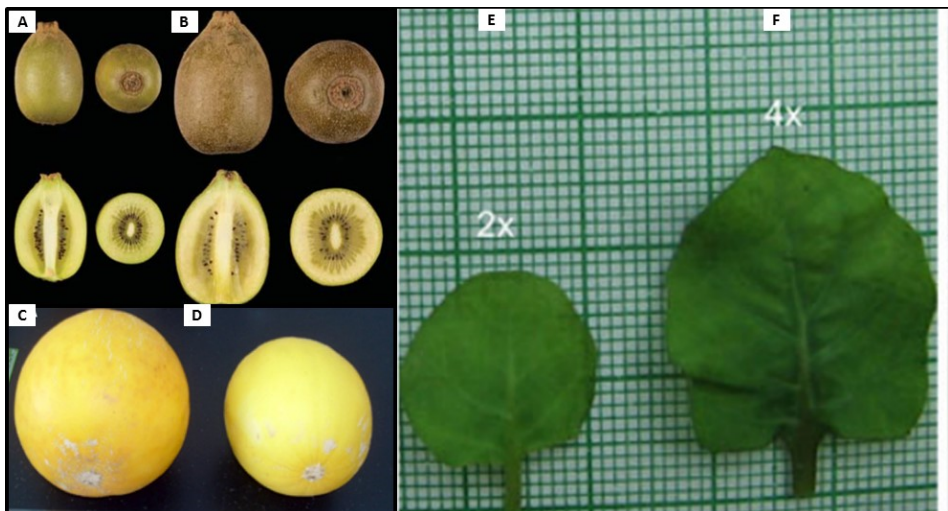
En la naturaleza los poliploides pueden originarse tanto por vía sexual mediante la fusión de gametos no reducidos, o por medio de procesos naturales de duplicación de los cromosomas y ausencia de división durante la mitosis (Ramsey & Schemske, 1998; Sattler et al., 2016). En algunas especies, los poliploides naturales y espontáneos han sido aprovechados para desarrollar líneas mejoradas (Nugent & Ray, 1992; Adelberg et al., 1995). En otras, se han puesto a punto protocolos para desarrollar poliploides sintéticos. Una de las estrategias más empleadas ha sido el uso de colchicina, un alcaloide extraído del azafrán de la pradera (*Colchicum autumnale* L.) (Blakeslee & Avery, 1937) que inhibe la formación del uso mitótico. Otras clases de agentes antimitóticos, como los herbicidas dinitroanilinas (trifluralina y orizalina) y las amidas fosfóricas (amiprofos-metilo y butamifos) también pueden inducir la poliploidía.

La inmersión de semillas, la pulverización sobre cotiledones, la aplicación de gotas sobre yemas o meristemos y los procedimientos *in vitro* han demostrado buenos resultados para duplicar el material cromosómico en algunas especies, incluido el género

*Cucumis* (Nikolova & Niemirowicz-Szczytt, 1996; Lim & Earle, 2008; Skálová et al., 2010). Tras la poliploidización, la identificación se ha realizado empleando métodos indirectos, principalmente el conteo de estomas que suelen ser de mayor tamaño y encontrarse en menor número en los poliploides o los métodos directos como el conteo de cromosomas y la cuantificación de ADN por citometría de flujo (Sattler et al., 2016).

En general, las plantas poliploides muestran un mayor vigor y un rendimiento superior a sus parientes diploides, y estas notables características han sido el objetivo de muchos programas de mejora en algunos cultivos comerciales (Jaskani et al., 2005; Yang et al., 2009; Wu et al., 2012).

Es común que las plantas poliploides muestren un mayor tamaño de sus órganos (hojas, tallos, flores, estigmas y tubérculos) en comparación con su antecesor diploide (Figura 11) (Zhang et al., 2010; Gantait et al., 2011; Wu et al., 2012; Sattler et al., 2016).



**FIGURA 11** ■ Frutos de *Actinidia chinensis* Hort16A provenientes de plantas diploides, 2x (A) y autotetraploides inducidos, 4x (B) (Wu et al., 2012); Frutos del melón M01-3 (*Cucumis melo* L.) tetraploides, 4x (C) y diploides, 2x (D) (Zhang et al., 2010); Variación del tamaño y área foliar en plantas de *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella diploides, 2x (E), y tetraploides, 4x (F) (Gantait et al., 2011).

También la poliploidización puede restaurar la fertilidad y ser aprovechada con el objetivo de superar las barreras de cruzabilidad (Skálová et al., 2010). En algunos casos se ha descrito una reducción de la tasa de crecimiento o la tendencia a florecer más tarde o durante períodos extendidos de tiempo en comparación a sus similares diploides (Gantait et al., 2011).

El efecto amortiguador (“buffer”) de la duplicación del genoma y la heterocigosidad también son otras de las características destacables en las plantas poliploides. En la naturaleza se observa que los individuos poliploides tienen ventajas adaptativas, ya que su aparición es común en latitudes y altitudes más extremas que sus antecesores diploides.

La duplicación cromosómica en plantas de *Cucumis* spp. silvestres podría resultar en el aumento de la altura y del diámetro del hipocótilo, así como el vigor y robustez del mismo, lo que permitiría tolerar mejor la variedad a injertar, facilitando la cicatrización de la herida, promoviendo el desarrollo de tejido conectivo (xilema y floema) y, en consecuencia, la recuperación del funcionamiento fisiológico normal en la nueva planta injertada. Sería interesante también evaluar si se produce algún cambio en el desarrollo y la floración así como si la duplicación en especies de este género repercute en una mayor tolerancia a estrés de tipo biótico y/o abiótico. Por otra parte, la obtención de híbridos interespecíficos entre *Cucumis* spp. está limitada por las barreras de cruzabilidad (Den Nijs & Visser, 1985; Chen et al., 1997). La poliploidización podría ayudar a superar estas limitaciones permitiendo el cruzamiento e intercambio genético entre especies aisladas (Walters & Wehner, 2002; Skálová et al., 2010) y facilitando la recuperación de la fertilidad en híbridos interespecíficos estériles derivada de algunos cruzamientos semicompatibles (Chen et al., 1998; Chen & Adelberg, 2000).

## 1.6. Impacto y efectos del injerto

### 1.6.1. INTERACCIÓN PORTAINJERTO-VARIEDAD

La selección de la combinación adecuada de patrón/variedad sigue siendo un punto clave para la aplicación comercial de esta técnica en hortalizas. En la naturaleza, el fenotipo de una planta está determinado por la interacción Genotipo (G) x Ambiente (A), pero en plantas injertadas esta relación es más compleja y se amplía a 3 factores, Patrón (P) x Vástago (V) x Ambiente (A), porque hay dos genotipos diferentes involucrados en el sistema. El éxito de la producción futura en plantas injertadas dependerá de los efectos positivos o negativos de estas interacciones, entre genotipos y con el ambiente (Albacete et al., 2015; Cantero-Navarro et al., 2016).

La interacción entre la variedad y el patrón se puede describir inicialmente como un comportamiento de compatibilidad o incompatibilidad. La interacción es compatible si existe una capacidad celular para realizar las conexiones vasculares y se completa de manera favorable el ciclo de cultivo en condiciones que el crecimiento de la planta no esté limitado. Según Aloni et al. (2010) en las plantas injertadas, la regeneración vascular se restablece mediante procesos complejos, que incluyen la diferenciación estructural del tejido parenquimatoso del xilema y floema de ambos lados de la unión del injerto. Una vez que el vástago y el patrón están en contacto, las nuevas células parenquimatosas proliferan, produciendo un tejido calloso en respuesta a la herida. Las nuevas células del cambium se diferencian, formando una conexión continua entre ambos. El xilema inicial y el floema se diferencian antes de que se establezca la unión del cambium vascular a través del puente calloso. Finalmente, la capa cambial recién formada inicia la actividad típica de formación de nuevos tejidos vasculares (Aloni et al., 2010; Colla et al., 2017). Una vez establecida la estructura vascular, la futura planta podrá regular su equilibrio homeostático y los procesos fisiológicos para un funcionamiento normal. Para alcanzar este equilibrio, un mecanismo de señalización de doble sentido raíz-ápice y ápice-raíz debe operar en una planta injertada. La comunicación entre el vástago y el patrón es

bidireccional a través del xilema y el floema (Albacete et al., 2015) e incluye intercambio de iones (como  $\text{Ca}^{2+}$ ) especies reactivas de oxígeno (ROS), fitohormonas (como auxinas y citoquininas) péptidos y ARNs de distintos tipos.

En una combinación patón-variedad comatible se inicia, según lo comentado, un funcionamiento normal de la planta injertada, aunque en la mayoría de los casos la variedad sufre algunos cambios en su desarrollo (vigor, floración, cuajado, fructificación y calidad de los frutos) en comparación a la variedad no injertada. Estos cambios son, en parte, resultado de la comunicación existente entre ambos y de la que todavía queda mucho por conocer. Estudios recientes indican que los cambios epigenéticos tienen un papel esencial en estos procesos. Estos cambios epigenéticos que se dan en el vástago como consecuencia del injerto pueden alterar la expresión génica. Se ha observado que en las plantas injertadas se produce, hipometilación genómica, que se ha asociado con incremento de vigor en el vástago injertado similar al descrito en el caso de la heterosis de los híbridos (Cerruti et al., 2019).

#### 1.6.2. EL INJERTO Y LA RESISTENCIA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO

La principal ventaja del uso del injerto en especies hortícolas ha sido la disponibilidad relativamente sencilla, rápida, y eficaz de una barrera eficiente para tolerar enfermedades complejas del suelo, cuando no se dispone de recursos genéticos o químicos para el manejo de las mismas y se dispone de portainjertos adecuados (Lee & Oda, 2003). La resistencia que proporciona el portainjerto a la variedad injertada puede explicarse por algunos mecanismos. El principal, es la resistencia (monogénica o poligénica) que el portainjerto tiene y que permite proteger a la variedad injertada; un ejemplo es la resistencia del melón al marchitamiento provocado por *Fusarium* u otros hongos, o el efecto de los nematodos, al usar patrones resistentes a estos patógenos. Por otra parte, los portainjertos suelen tener un sistema radicular más robusto, en comparación al sistema radicular original de la variedad, lo que puede favorecer la absorción de agua y minerales, potenciando los mecanismos de defensa para contrarrestar el daño del patógeno.

En el caso de los estreses de tipo abiótico, el sistema radicular y las interacciones patrón-variedad son importantes. Así, por ejemplo, la adaptación de la arquitectura radicular o el ajuste de los intercambios que se dan entre la raíz y el vástago a temperaturas subóptimas son importantes para superar las bajas temperaturas del suelo y también lo son en condiciones de estrés salino (Colla et al., 2010). También se han descrito mecanismos relacionados con la capacidad del portainjerto para regular la acumulación de iones tóxicos, disminuyendo su movimiento hacia el vástago (Rivero et al., 2003; Colla et al., 2010; Edelstein et al., 2011). Por ejemplo, en melón injertado sobre patrones de *Cucurbita* se ha descrito la reducción de la absorción de iones  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+$  por parte de las raíces (Romero et al., 1997; Edelstein et al., 2011).

El injerto también puede ayudar a la supervivencia de las plantas en condiciones de inundación. Por ejemplo, en cultivo de sandía injertada sobre *L. siceraria* en suelos inundados se ha descrito el desarrollo de raíces adventicias que permiten una mejor respiración radicular (Yetisir et al., 2006).

El rol de micromoléculas como las poliaminas, que aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes, se ha estudiado en tomate injertado como un mecanismo de respuesta a la sequía (Sánchez-Rodríguez et al., 2016).

Aunque queda mucho por esclarecer acerca de los mecanismos de acción que se dan entre el patrón y la variedad para afrontar los distintos tipos de estrés, la tolerancia/resistencia de la planta injertada se deriva de una combinación de la resistencia directa del patrón y la respuesta diferencial de la planta por el hecho de estar injertada (Colla et al., 2017).

### 1.6.3. IMPACTO DEL INJERTO SOBRE EL VIGOR Y FLORACIÓN DE LA VARIEDAD INJERTADA

La mayoría de los patrones empelados afectan en mayor o menor medida el desarrollo normal de la variedad, siendo común un mayor vigor en las plantas injertadas

respecto de las no injertadas (Aloni et al., 2010; Goldschmidt, 2014). En sandía por ejemplo, se ha asociado el mayor vigor y crecimiento con un aumento de la absorción de minerales y la actividad de las citoquininas (Yamasaki et al., 1994).

El injerto también afecta comúnmente otros procesos fisiológicos como la floración; un fenómeno que ha sido reportado ampliamente en especies de *Cucurbita*, siendo frecuente que estos portainjertos adelanten la floración en sandía (Yamasaki et al., 1994; Davis et al., 2008 a,b). En pepino se ha propuesto que la floración podría estar modulada por un factor inhibidor producido en las raíces de la calabaza (Satoh, 1996). También en este cultivo, se ha demostrado que la proteína (FT) codificada por el factor de transcripción FLOWERING LOCUS T (FT) se transporta vía floema desde el patrón a la variedad, por lo que parece tener un papel importante en el control de la floración a larga distancia y podría estar relacionado con el efecto del injerto sobre este carácter (Lin et al., 2007).

#### 1.6.4. EFECTOS NEGATIVOS DEL INJERTO: IMPACTO SOBRE LA CALIDAD DEL FRUTO

Como consecuencia del injerto se pueden modificar las características del fruto de la variedad injertada, pudiendo verse afectados parámetros de calidad externos y/o internos. La calidad es el conjunto de características de un producto que puede satisfacer las necesidades del consumidor y determinar su valor (Leonardi et al., 2017). La calidad de las frutas y/o hortalizas para consumo en fresco se determina en términos de apariencia (tamaño, forma, color, ausencia de defectos y deterioro), firmeza, textura, sabor (azúcares, ácidos y aromáticos volátiles) y compuestos relacionados con la salud (compuestos deseados: minerales, vitaminas y carotenoides), así como compuestos no deseados (metales pesados, pesticidas y nitratos). Al evaluar los impactos sobre la calidad también hay que tener en cuenta que el concepto de calidad variará si proviene de clientes consumidores, mejoradores, productores, comerciantes, o de la industria alimentaria (Leonardi et al., 2017).

Es frecuente al evaluar el impacto del injerto en la calidad de los frutos, encontrar diferencias entre combinaciones patrón-variedad e incluso para una misma combinación en diferentes ambientes. Uno de los impactos que más se reproduce en melón es la obtención de frutos de mayor tamaño y cavidad interna al emplear patrones de *Cucurbita* (Traka-Mavrona et al., 2000; Crinò et al., 2007; Verzera et al., 2014; Soteriou et al., 2016). También, como consecuencia del injerto, se ha reportado en varios trabajos la alteración de la firmeza y textura de la pulpa. Por ejemplo, se han descrito alteraciones en estos caracteres en melón tipo Galia y Ananas injertado sobre híbridos de *Cucurbita* (Soteriou et al., 2016), pero no en melón tipo Piel de Sapo (Fita et al., 2007b). De la misma forma, el empleo de *C. metuliferus* como portainjerto alteró la firmeza en melones climatéricos de tipo Galia, pero no tuvo impacto al injertar una variedad de melones no climatéricos de tipo Honey Dew (Guan et al., 2014). Las alteraciones en la firmeza de la pulpa se han asociado a la variación en la morfología y la turgencia celular y a alteraciones de las propiedades químicas y mecánicas de las paredes celulares de la fruta por el aumento de la síntesis de hormonas endógenas y por el cambio en las relaciones hídricas y el estado nutricional de la variedad injertada o vástago (Rouphael et al., 2010).

Otros cambios están relacionados con el sabor al que contribuyen los ácidos, azúcares, compuestos volátiles, entre otros. Numerosos estudios indican alteraciones en el contenido en sólidos solubles, lo que puede estar relacionado no sólo con un efecto directo del patrón, sino también con un acortamiento o alargamiento del ciclo de cultivo, debido a efectos sobre la floración o el cuajado y maduración del fruto (Trionfetti Nisini et al., 2002; Colla et al., 2006, 2010; Crinò et al., 2007; Guan et al., 2014; Verzera et al., 2014). Otro tipo de metabolitos como los carotenoides, se han visto incrementados en algunas combinaciones (Condurso et al., 2012; Verzera et al., 2014; Zhou et al., 2014) y disminuídos en otras (Verzera et al., 2014) como consecuencia del injerto. También se ha publicado que algunos híbridos comerciales de *Cucurbita* y genotipos de *Cucumis melo* indujeron un menor contenido de ésteres volátiles, asociados con aromas característicos de melón, tales como 2-metilbutanoato de etilo y butanoato de etilo,



pero niveles más altos de alcoholes y aldehídos, asociados a una menor maduración o sobremaduración (Condurso et al., 2012; Verzera et al., 2014). En cualquier caso, son necesarios más estudios y la caracterización de los perfiles metabólicos de las variedades injertadas cuando se evalúan nuevos portainjertos. La modificación del color también se ha observado en algunos casos, como en una variedad tipo cantalupo (cv. Cyrano) al injertarla en el patrón P360 (híbrido *C. maxima* x *C. moschata*).

#### 1.6.5. ESTRUCTURA DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

La presente tesis doctoral se ha estructurado en tres capítulos que se inician tras el apartado de objetivos que se muestra a continuación. En el Capítulo 1 se presentan dos trabajos realizados para evaluar la adecuación de portainjertos comerciales y experimentales (desarrollados previamente en el grupo de Mejora Genética de Cucurbitáceas y el grupo Desarrollo de Portainjertos de Hortícolas del COMAV). Estos portainjertos, pertenecientes a distintos géneros y especies, se evalúan para su potencial uso en la recuperación del cultivo de variedades tradicionales de melón, y para su uso con variedades comerciales de melón, en distintas condiciones de cultivo y situaciones de estrés.

En el Capítulo 2 se presentan tres trabajos en los que se han caracterizado dos portainjertos obtenidos previamente por los grupos anteriormente citados mediante hibridación entre especies silvestres de *Cucumis* y una accesión de *Cucumis metuliferus*. Estos portainjertos podrían ser una alternativa a los portainjertos de *Cucurbita* que se utilizan en melón. Finalmente, en el Capítulo 3 se expone un trabajo relacionado con la poliploidización con el fin de evaluar esta metodología para la mejora de portainjertos de *Cucumis* y estudiar el efecto de ésta en los materiales obtenidos.

## 1.7. Bibliografía

- ◆ Adelberg, J., Nugent, P., Rhodes, B., Zhang, X., & Skorupska, H. (1995). Fertility and Fruit Characters of Hybrid Triploid Melon. *Breeding Science*, 45(1), 37–43. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.45.37>
- ◆ Aguiar, B. de M., Vida, J. B., Tessmann, D. J., Oliveira, R. R. de, Aguiar, R. L., & Alves, T. C. A. (2012). Fungal species that cause powdery mildew in greenhouse-grown cucumber and melon in Paraná State, Brazil. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34(3), 247–252.
- ◆ Akrami, M., & Arzani, A. (2019). Inheritance of fruit yield and quality in melon (*Cucumis melo* L.) grown under field salinity stress. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43616-6>
- ◆ Akrami, M., & Arzani, A. (2018). Physiological alterations due to field salinity stress in melon (*Cucumis melo* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2657-0>
- ◆ Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Martínez-Pérez, A., Thompson, A. J., Dodd, I. C., & Pérez-Alfocea, F. (2015). Unravelling rootstock×scion interactions to improve food security. *Journal of Experimental Botany*, 66(8), 2211–2226. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv027>
- ◆ Alix, K., Gérard, P. R., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. S. P. (2017). Polyploidy and interspecific hybridization: Partners for adaptation, speciation and evolution in plants. *Annals of Botany*, 120(2), 183–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx079>
- ◆ Aloni, B., Cohen, R., Karni, L., Aktas, H., & Edelstein, M. (2010). Hormonal signaling in rootstock – scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(127), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.003>
- ◆ Althawadi, A. M., & Grace, J. (1986). Water use by the desert cucurbit *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Oecologia*, 70(3), 475–480. <https://doi.org/10.1007/BF00379514>
- ◆ Ambrósio, M. M. Q., Dantas, A. C. A., Martínez-Perez, E., Medeiros, A. C., Nunes, G. H. S., & Picó, M. B. (2015). Screening a variable germplasm collection

of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Euphytica*, 206(2), 287–300. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1452-x>

- ◆ Ansari, W. A., Atri, N., Ahmad, J., Qureshi, M. I., Singh, B., Kumar, R., Rai, V., & Pandey, S. (2019). Drought mediated physiological and molecular changes in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *PLoS ONE*, 14(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222647>
- ◆ Banihashemi, Z., & DeZeeuw, D. J. (1975). The behavior of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in the presence and absence of host plants. *Phytopathology*, 65, 1212–1217. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10015737633/en/>
- ◆ Bartels, D. (2005). Desiccation Tolerance Studied in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *Integrative and comparative biology*, 45(5), 696-701. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.696>
- ◆ Beharav, A., & Cohen, Y. (1995). Attempts to overcome the barrier of interspecific hybridization between *Cucumis melo* and *C. metuliferus*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43(2), 113-123. <https://doi.org/10.1080/07929978.1995.10676597>
- ◆ Beharav, A., & Cohen, Y. (1994). The Crossability of *Cucumis melo* and *C. metuliferus*, and Investigation of *In Vivo* Pollen Tube Growth. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 17, 97-100.
- ◆ Ben Salem, I., Correia, K. C., Boughalleb, N., Michereff, S. J., León, M., Abad-Campos, P., ... Armengol, J. (2013). *Monosporascus eutypoides*, a Cause of Root Rot and Vine Decline in Tunisia, and Evidence that *M. cannonballus* and *M. eutypoides* are Distinct Species. *Plant Disease*, 97(6), 737–743. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-12-0464-re>
- ◆ Blakeslee, A. F., & Avery, A. G. (1937). Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. *Journal of Heredity*, 28(12), 393–411. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a104294>
- ◆ Boyer, J. S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571), 443–448. <https://doi.org/10.1126/science.218.4571.443>
- ◆ Cantero-Navarro, E., Romero-Aranda, R., Fernández-Muñoz, R., Martínez-Andújar, C., Pérez-Alfocea, F., & Albacete, A. (2016). Improving agronomic water

use efficiency in tomato by rootstock-mediated hormonal regulation of leaf biomass. *Plant Science*, 251, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.03.001>

- ◆ Castro, G. (2019). *Aprovechamiento de Herramientas Genéticas y Genómicas para Desarrollo de Nuevas Poblaciones para la Mejora del Melón por resistencia a Patógenos y Calidad*. (Tesis doctoral no publicada). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/131206>
- ◆ Cerruti, E., Gisbert, C., Drost, H., Valentino, D., Portis, E., Barchi, L., Prohens, J., Lanteri, S., Comino, C., & Catoni, M. (2019). Epigenetic bases of grafting-induced vigour in eggplant. *BioRxiv*, 831719. <https://doi.org/10.1101/831719>
- ◆ Chen, J. F., & Adelberg, J. (2000). Interspecific hybridization in *Cucumis* - Progress, problems, and perspectives. *HortScience*, 35(1), 11–15.
- ◆ Chen, J. F., Adelberg, J. W., Staub, J. E., Skorupska, H. T., & Rhodes, B. B. (1998). A New Synthetic Amphidiploid in *Cucumis* from a *C. sativus* x *C. hystrix* F1 Interspecific Hybrid. In McCreight JD (Ed.), *Cucurbitaceae '98 – evaluation and enhancement of Cucurbit germplasm*. ASHS Press, Alexandria, Virginia, pp 336-339.
- ◆ Chen, J. F., Staub, J. E., Tashiro, Y., Isshiki, S., & Miyazaki, S. (1997). Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr. *Euphytica*, 96(3), 413–419. <https://doi.org/10.1023/A:1003017702385>
- ◆ Cohen, R., Elkabetz, M., & Edelstein, M. (2016). Variation in the responses of melon and watermelon to *Macrophomina phaseolina*. *Crop Protection*, 85, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.03.015>
- ◆ Cohen, R., Tyutyunik, J., Fallik, E., Oka, Y., Tadmor, Y., & Edelstein, M. (2014). Phytopathological evaluation of exotic watermelon germplasm as a basis for rootstock breeding. *Scientia Horticulturae*, 165, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.007>
- ◆ Cohen, R., Pivonia, S., Crosby, K. M., & Martyn, R. D. (2012). Advances in the Biology and Management of *Monosporascus* Vine Decline and Wilt of Melons and Other Cucurbits. In J. Janick. (Ed.), *Horticultural Reviews* 39 (pp. 77-120). New Jersey, USA: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118100592.ch2>

- ◆ Cohen, R., Burger, Y., Horev, C., Koren, A., & Edelstein, M. (2007). Introducing Grafted Cucurbits to Modern Agriculture: The Israeli Experience. *Plant Disease*, 91(8), 916–923. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-0916>
- ◆ Cohen, R., Burger, Y., & Katzir, N. (2004). Monitoring physiological races of *Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), the causal agent of powdery mildew in cucurbits: Factors affecting race identification and the importance for research and commerce. *Phytoparasitica*, 32(2), 174–183. <https://doi.org/10.1007/BF02979784>
- ◆ Cohen, R., Horev, C., Burger, Y., Shriber, S., Hershenhorn, J., Katan, J., & Edelstein, M. (2002). Horticultural and pathological aspects of Fusarium wilt management using grafted melons. *HortScience*, 37(7), 1069–1073. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.37.7.1069>
- ◆ Colla, G., Pérez-Alfocea, F., & Schwarz, D. (Eds.). (2017). *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. Wallingford, UK: CABI.
- ◆ Colla, G., Roupheal, Y., Leonardi, C., & Bie, Z. (2010). Role of grafting in vegetable crops grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.004>
- ◆ Colla, G., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Massa, D., Salerno, A., & Rea, E. (2006). Yield, fruit quality and mineral composition of grafted melon plants grown under saline conditions. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(1), 146–152. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512041>
- ◆ Conduro, C., Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Crinò, P., Paratore, A., & Romano, D. (2012). Effects of different rootstocks on aroma volatile compounds and carotenoid content of melon fruits. *Scientia Horticulturae*, 148, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.015>
- ◆ Criddle, R. S., Smith, B. N., & Hansen, L. D. (1997). A respiration based description of plant growth rate responses to temperature. *Planta*, 201(4), 441–445. <https://doi.org/10.1007/s004250050087>
- ◆ Crinò, P., Lo Bianco, C., Roupheal, Y., Colla, G., Saccardo, F., & Paratore, A. (2007). Evaluation of rootstock resistance to fusarium wilt and gummy stem blight and effect on yield and quality of a grafted “inodorus” melon. *HortScience*, 42(3), 521–525.

- ◆ Crosby, K. M. (2001). Screening *Cucumis melo* L. *agrestis* germplasm for resistance to *Monosporascus cannonballus*. *Subtropical Plant Sciences*, 53, 24–26.
- ◆ Dasgan, H. Y., Kusvuran, S., Abak, K., Leport, L., Larher, F., & Bouchereau, A. (2009). The relationship between citrulline accumulation and salt tolerance during the vegetative growth of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant, Soil and Environment*, 55(2), 51–57.
- ◆ Davis, A. R., Perkins-Veazie, P., Hassell, R., Levi, A., King, S. R., & Zhang, X. (2008a). Grafting effects on vegetable quality. *HortScience*, 43(6), 1670–1672.
- ◆ Davis, A. R., Perkins-Veazie, P., Sakata, Y., López-Galarza, S., Maroto, J. V., Lee, S. G.,...Lee, J. M. (2008b). Cucurbit grafting. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(1), 50–74. <https://doi.org/10.1080/07352680802053940>
- ◆ Deakin, J., Bohn, G. W., & Whitaker, T. W. (1971). Interspecific Hybridization in *Cucumis*. *Economu Botany*, 25(2), 195-211.
- ◆ Decker-Walters, D. S. (1999). Cucurbits, Sanskrit, and the Indo-Aryas 1. *Economic Botany*, 53(1), 98–112. <https://doi.org/10.1007/BF02860800>
- ◆ Den Nijs, A. P. M., & Visser, D. L. (1985). Relationships between African species of the genus *Cucumis* L. Estimated by the production, vigour and fertility of F1 hybrids. *Euphytica*, 34(2), 279–290. <https://doi.org/10.1007/BF00022920>
- ◆ Dhaliwal, M. S. (2008). *Handbook of Vegetable Crops*, Ludhiana, India: Kalyani Publishers.
- ◆ Dias, R. D. C. S., Picó, M. B., Espinos, A., & Nuez, F. (2004). Resistance to melon vine decline derived from *Cucumis melo* ssp. *agrestis*: Genetic analysis of root structure and root response. *Plant Breeding*, 123(1), 66–72. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00944.x>
- ◆ Diniz, G. M. M., Candido, W. dos S., Soares, R. S., Santos, L. da S., Marín, M. V., Soares, P. L. M., & Braz, L. T. (2016). Reaction of melon genotypes to *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(1), 111–115. <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4639603>
- ◆ Edelstein, M., Plaut, Z., & Ben-Hur, M. (2011). Sodium and chloride exclusion and retention by non-grafted and grafted melon and *Cucurbita* plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 177–184. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq255>

- ◆ Edelstein, M., Oka, Y., Burger, Y., Eizenberg, H., & Cohen, R. (2010). Variation in the response of cucurbits to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 58(1), 77–84. <https://doi.org/10.1560/ijps.58.1.77>
- ◆ Edelstein, M., Ben-Hur, M., Cohen, R., Burger, Y., & Ravina, I. (2005). Boron and salinity effects on grafted and non-grafted melon plants. *Plant and Soil*, 269(1–2), 273–284. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0598-4>
- ◆ Elena, K., & Pappas, A. C. (2006). Race Distribution, Vegetative Compatibility and Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Isolates in Greece. *Journal of Phytopathology*, 154(4), 250–255. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01099.x>
- ◆ Endl, J., Achigan-Dako, E. G., Pandey, A. K., Monforte, A. J., Picó, M. B., & Schaefer, H. (2018). Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. *American Journal of Botany*, 105(10), 1662–1671. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1172>
- ◆ Esteras, C., Nuez, F., & Picó, M. B. (2012). Genetic Diversity Studies in Cucurbits Using Molecular Tools. In Y. H. Wang, T. K. Behera, & C. Kole (Eds.), *Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits* (pp. 140–198). New Hampshire: Science Publishers Inc, Enfield. <https://doi.org/10.1201/b11436-6>
- ◆ FAOSTAT. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. (<http://www.fao.org/faostat/en/#data>)
- ◆ Farhadi, A., Aroei, H., Nemati, H., Salehi, R., & Giuffrida, F. (2016). The Effectiveness of Different Rootstocks for Improving Yield and Growth of Cucumber Cultivated Hydroponically in a Greenhouse. *Horticulturae*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.3390/horticulturae2010001>
- ◆ Fassuliotis, G., & Nelson, B.V. (1984). Conversion in vitro of *Cucumis metuliferus* and *C. metuliferus* x *C. anguria* embryos. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Nottingham U.K. (abstract).
- ◆ Fassuliotis, G. (1970). Resistance of *Cucumis* spp. to the Root-knot Nematode, *Meloidogyne incognita acrita*. *Journal of Nematology*, 2(2), 174–178. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322292>

- ◆ Fernández-Trujillo, J. P., Picó, M. B., Garcia-Mas, J., Álvarez, J., & Monforte, A. (2011). Breeding for Fruit Quality in Melon. In M. A. Jenks & P. Bebeli (Eds.), *Breeding for Fruit Quality* (pp. 261–278). <https://doi.org/10.1002/9780470959350.ch12>
- ◆ Fita, A., Picó, M. B., & Nuez, F. (2007a). Melon roots under stress: Melon vine decline. *Plant Stress*, *1*, 93–104.
- ◆ Fita, A., Picó, M. B., Roig, C., & Nuez, F. (2007b). Performance of *Cucumis melo* ssp. *agrestis* as a rootstock for melon. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *82*(2), 184–190. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512218>
- ◆ Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *55*(396), 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>
- ◆ Fredes, A., Roselló, S., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., Pérez-de-Castro, A., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2017). Fruit quality assessment of watermelons grafted onto citron melon rootstock. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(5), 1646–1655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7915>
- ◆ Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2011). Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *106*(3), 485–493. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9947-1>
- ◆ García-Martínez, S., Flores-León, A., Cabrera, J. A., Sifres, A., Valcárcel, J. V., Pérez de Castro, A., & Ruiz-Martínez, J. J. (2019). Selección de cultivares tradicionales de melón adecuados para cultivo ecológico en condiciones de elevada salinidad en el Parque Natural Agrario de Carrizales (Alicante). *Agrícola vergel*: (417), 43–48.
- ◆ Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., Gonzalez, V. M., ... Puigdomenech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(29), 11872–11877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>
- ◆ Garzo, E. I., Duque, M., & Fereres, A. (2004). Transmission efficiency of different non-persistent viruses infecting melon by four aphid species. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *2*(3), 369–376. <https://doi.org/10.5424/sjar/2004023-91>



- ◆ Gisbert, C., Gammoudi, N., Munera, M., Giné, A., Pocurull, M., Sorribas, F. J., & Picó, M. B. (2017). Evaluation of two potential *Cucumis* spp. resources for grafting melons. *Acta Horticulturae*, 1151, 157–162. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.25>
- ◆ Gisbert, C., Prohens, J., Raigón, M. D., Stommel, J. R., & Nuez, F. (2011). Eggplant relatives as sources of variation for developing new rootstocks: Effects of grafting on eggplant yield and fruit apparent quality and composition. *Scientia Horticulturae*, 128(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.007>
- ◆ Goldschmidt, E. E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Frontiers in Plant Science*, 5:727. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00727>
- ◆ Gómez, J., Serrano, Y., Pérez, A., Porcel, E., Gómez, R., & Aguilar, M. I. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, affecting melon in Almería Province, Spain. *Australasian Plant Disease Notes*, 9:136. <https://doi.org/10.1007/s13314-014-0136-z>
- ◆ González, V., García-Martínez, S., Ruiz, J. J., Flores-León, A., Picó, B., & Garcés-Claver, A. (2019). First report of *Neocosmospora falciformis* causing wilt and root of Muskmelon in Spain. *Plant Disease*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-2013-PDN>
- ◆ Guan, W., Zhao, X., Dickson, D. W., Mendes, M. L., & Thies, J. (2014). Root-knot Nematode Resistance , Yield , and Fruit Quality of Specialty Melons Grafted onto *Cucumis metulifer*. *HortScience*, 49(8), 1046–1051. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.8.1046>
- ◆ Guan, W., Zhao, X., Hassell, R., & Thies, J. (2012). Defense mechanisms involved in disease resistance of grafted vegetables. *HortScience*, 47(2), 164–170. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.2.164>
- ◆ Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Plant Response and Tolerance to Abiotic Oxidative Stress: Antioxidant Defense Is a Key Factor. In B. Venkateswarlu, A. K. Shanker, C. Shanker, & M. Maheswari (Eds.), *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* (pp. 261–315). Springer, Dordrecht [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0_8)

- ◆ Herman, R., & Perl-Treves, R. (2007). Characterization and inheritance of a new source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in *Cucumis melo*. *Plant disease*, 91(9), 1180-1186. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1180>
- ◆ Huang, C. H., Zong, L., Buonanno, M., Xue, X., Wang, T., & Tedeschi, A. (2012). Impact of saline water irrigation on yield and quality of melon (*Cucumis melo* cv. Huanghemi) in northwest China. *European Journal of Agronomy*, 43, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.05.008>
- ◆ Igarashi, I., Kanno, T., & Kawaide, T. (1987). Disease and pest resistance of wild *Cucumis* species and their compatibility as rootstock for muskmelon, cucumber and watermelon. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. Series A. (Japan)*, 173-185.
- ◆ Ito, L. A., Gaion, L. A., Galatti, F. S., Braz, L. T., & Santos, J. M. (2014). Resistência de porta-enxertos de cucurbitáceas a nematóides e compatibilidade da enxertia em melão . *Horticultura Brasileira* , 32(3), 297–302. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362014000300010>
- ◆ Jaskani, M. J., Kwon, S. W., & Kim, D. H. (2005). Comparative study on vegetative, reproductive and qualitative traits of seven diploid and tetraploid watermelon lines. *Euphytica*, 145(3), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1644-x>
- ◆ Jeffrey, C. (1980). A review of the Cucurbitaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 81(3), 233–247. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676.x>
- ◆ Juárez, M., Legua, P., Mengual, C. M., Kassem, M. A., Sempere, R. N., Gómez, P., ... Aranda, M. A. (2013). Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Annals of Applied Biology*, 162(3), 362–370. <https://doi.org/10.1111/aab.12029>
- ◆ Katan, J. (1999). THE METHYL BROMIDE ISSUE: PROBLEMS AND POTENTIAL SOLUTIONS. *Journal of Plant Pathology*, 81(3), 153–159. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/41998968>
- ◆ Kavas, M., Baloğlu, M. C., Akça, O., Köse, F. S., & Gökçay, D. (2013). Effect of drought stress on oxidative damage and antioxidant enzyme activity in melon seedlings. *Turkish Journal of Biology*, 37(4), 491–498. <https://doi.org/10.3906/biy-1210-55>

- ◆ Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Franken, J. (1980). Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, an investigation of in vivo pollen tube growth and seed set. *Euphytica*, 29(3), 661–672. <https://doi.org/10.1007/BF00023214>
- ◆ Kirkbride, J. (1993). *Biosystematic Monograph of the Genus Cucumis (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons*, North Carolina, USA: Parkway Publishers.
- ◆ Kousik, C. S., Levi, A., Ling, K. S., & Wechter, W. P. (2008). Potential sources of resistance to cucurbit powdery mildew in U.S. plant introductions of bottle gourd. *HortScience*, 43(5), 1359–1364. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.5.1359>
- ◆ Kramer, D. (1984). Cytological aspects of salt tolerance in higher plants. In R.C. Staples & G.H. Toeniessen (Eds.), *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for crop improvements*.(pp 3–16). New York, USA: Jhon Wiley & Sons. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10006100716/en/>
- ◆ Kroon, G. H., Custers, J. B. M., Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Vrekamp, H. Q. (1979). Interspecific hybridization in *Cucumis* (L.). I. Need for genetic variation, biosystematic relations and possibilities to overcome crossability barriers. *Euphytica*, 28(3), 723–728. <https://doi.org/10.1007/BF00038940>
- ◆ Kurt, S., Baran, B., Sari, N., & Yetisir, H. (2002). Physiologic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in the Southeastern Anatolia Region of Turkey and varietal reactions to races of the pathogen. *Phytoparasitica*, 30(4), 395–402. <https://doi.org/10.1007/BF02979687>
- ◆ Kurum, R., Çelik, İ., & Eren, A. (2017). Effects of Rootstocks on Fruit Yield and Some Quality Traits of Watermelon (*Citrullus lanatus*). *Derim*, 34(2), 91-98. <https://doi.org/10.16882/derim.2017.283012>
- ◆ Kusvuran, S. (2012). Effects of drought and salt stresses on growth, stomatal conductance, leaf water and osmotic potentials of melon genotypes (*Cucumis melo* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 7(5), 775–781. <https://doi.org/10.5897/ajar11.1783>
- ◆ Kusvuran, S., Ellialtioglu, S., Yasar, F., & Abak, K. (2007). Effects of salt stress on ion accumulation and activity of some antioxidant enzymes in melon (*Cucumis melo* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5(2), 351–354.

- ◆ Lee, J. M., Kubota, C., Tsao, S. J., Bie, Z., Hoyos Echevarria, P., Morra, L., & Oda, M. (2010). Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.003>
- ◆ Lee, J. M., & Oda, M. (2003). Grafting of Herbaceous Vegetable and Ornamental Crops. In J. Janick. (Ed.), *Horticultural Reviews* 28 (pp. 61-124). New Jersey, USA: Willey-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470650851.ch2>
- ◆ Lei, B., Huang, Y., Xie, J. J., Liu, Z. X., Zhen, A., Fan, M. L., & Bie, Z. L. (2014). Increased cucumber salt tolerance by grafting on pumpkin rootstock and after application of calcium. *Biologia Plantarum*, 58(1), 179–184. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0349-6>
- ◆ Leonardi, C., Kyriacou, M. C., Gisbert, C., Oztekin, G. B., Mourão, I., & Roupheal, Y. (2017). Quality of Grafted Vegetables. In G. Colla, F. Pérez-Alfocea & D. Schwarz (Eds), *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. (pp 216–244). Wallingford, UK: CABI
- ◆ Lim, W., & Earle, E. D. (2008). Effect of in vitro and in vivo colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(1), 115–124. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9422-9>
- ◆ Lin, M. K., Belanger, H., Lee, Y. J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K. I., Miura, E., ... Lucas, W. J. (2007). FLOWERING LOCUS T Protein May Act as the Long-Distance Florigenic Signal in the Cucurbits. *The Plant Cell*, 19(5), 1488–1506. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051920>
- ◆ Liu, B., Ren, J., Zhang, Y., An, J., Chen, M., Chen, H., ... Ren, H. (2015). A new grafted rootstock against root-knot nematode for cucumber, melon, and watermelon. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0234-5>
- ◆ Liu, Z. X., Bie, Z. L., Huang, Y., Zhen, A., Lei, B., & Zhang, H. (2012). Grafting onto *Cucurbita moschata* rootstock alleviates salt stress in cucumber plants by delaying photoinhibition. *Photosynthetica*, 50(1), 152–160. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0007-9>

- ◆ López-Gómez, M., & Verdejo-Lucas, S. (2014). Penetration and reproduction of root-knot nematodes on cucurbit species. *European Journal of Plant Pathology*, 138(4), 863–871. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0359-4>
- ◆ Louws, F. J., Rivard, C. L., & Kubota, C. (2010). Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 127–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.023>
- ◆ Martyn, R. D. (2008). Late-Season Vine Declines of Melons: Pathological, Cultural or Both? In *Phytoparasitica*, 36(4), 309-312.
- ◆ Martyn, R. D. & Miller, M. E. (1996). Monosporascus Root Rot and Vine Decline: An Emerging Disease of Melons Worldwide. *Plant Disease*, 80(7), 716–725. <https://doi.org/10.1094/pd-80-0716>
- ◆ Matsumoto, Y., & Miyagi, M. (2012). Mapping of a gene conferring alleviation of pollen–pistil incongruity found in an interspecific cross between *Cucumis anguria* L. and *Cucumis melo* L. (melon). *Scientia Horticulturae*, 146, 81–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.021>
- ◆ Matsumoto, Y., Ogawara, T., Miyagi, M., Watanabe, N., & Kuboyama, T. (2011). Response of Wild *Cucumis* Species to Inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1,2y. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80(4), 414-419. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.80.414>
- ◆ McCreight, J. D. (2017). Cultivation and Uses of Cucurbits. In R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas (Eds.), *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae* (pp. 1–12). Springer. [https://doi.org/10.1007/7397\\_2016\\_2](https://doi.org/10.1007/7397_2016_2)
- ◆ MAPA. (2019). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Informe del Consumo Alimentario en España 2018. Disponible en: [www.mapa.gob.ec](http://www.mapa.gob.ec)
- ◆ Miguel, A., Marsal, J. I., San Bautista, A., López-Galarza, S., Pascual, B. & Maroto, J. V. (2011). Double grafting as a method to solve affinity problems in “Piel de Sapo” melon cultivars. *Acta Horticulturae*, 898, 287-290. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.898.35>

- ◆ Miguel, A., De la Torre, F., Baixauli, C., Maroto, J. V., Jordá, M. C., López, M. M., & García-Jiménez, J. (2007). Injerto de Hortalizas. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesa y Alimentación. Madrid, España.
- ◆ Miguel, A., Maroto, J. V., San Bautista, A., Baixauli, C., Cebolla, V., Pascual, B. ... Guardiola, J. L. (2004). The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of *Fusarium* wilt. *Scientia Horticulturae*, *103*(1), 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.04.007>
- ◆ Munger, H. M., & Robinson, R. W. (1991). Nomenclature of *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, *14*, 43–44. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10021184087/en/>
- ◆ Nabi, R. B. S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K. P., Imran, Q. M., Mun, B. G., & Yun, B. W. (2019). Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, *161*, 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>
- ◆ Nieto, C., Piron, F., Dalmais, M., Marco, C. F., Moriones, E., Gómez-Guillamón, M. L., ... Bendahmane, A. (2007). EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon *elf4E*, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biology*, *7*: 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-34>
- ◆ Nikolova, V., & Niemirowicz-Szczytt, K. (1996). Diploidization of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Haploids By Colchicine Treatment. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *65*(3–4), 311–317.
- ◆ Norton, J. D., & Granberry, D. M. (1980). Characteristics of progeny from an interspecific cross of *Cucumis melo* with *C. metuliferus*. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, *105*(2), 174-180.
- ◆ Nugent, P. E. & Ray, D. T. (1992). Spontaneous Tetraploid Melons. *Hortscience* *27*(1), 47-50.
- ◆ Nunes, E. W. L. P., Esteras, C., Ricarte, A. O., Martínez-Perez, E., Gómez-Guillamón, M. L., Nunes, G. H. S., & Picó, M. B. (2017). Brazilian melon landraces resistant to *Podosphaera xanthii* are unique germplasm resources. *Annals of Applied Biology*, *171*(2), 214–228. <https://doi.org/10.1111/aab.12370>

- ◆ Ondřej, V., Navrátilová, B., & Lebeda, A. (2001). Determination of the Crossing Barriers in Hybridization of *Cucumis sativus* and *Cucumis melo*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 24, 1–5. <http://cuke.hort.ncsu.edu/cgc/cgc24/cgc24-1.pdf>
- ◆ Orsini, F., Sanoubar, R., Oztekin, G. B., Kappel, N., Tepecik, M., Quacquarelli, C., ... Gianquinto, G. (2013). Improved stomatal regulation and ion partitioning boosts salt tolerance in grafted melon. *Functional Plant Biology*, 40(6), 628–636. <https://doi.org/10.1071/FP12350>
- ◆ Oumouloud, A., El Otmani, M., & Álvarez, J. M. (2015). Molecular characterization of *Fom-1* gene and development of functional markers for molecular breeding of resistance to Fusarium race 2 in melon. *Euphytica*, 205, 491–501. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1420-5>
- ◆ Oumouloud, A., El-Otmani, M., Chikh-Rouhou, H., Garcés Claver, A., González Torres, R., Perl-Treves, R., & Álvarez, J. M. (2013). Breeding melon for resistance to *Fusarium* wilt: recent developments. *Euphytica* 192, 155–169 <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0904-4>
- ◆ Oumouloud, A., Mokhtari, M., Chikh-Rouhou, H., Arnedo-Andrés, M. S., González-Torres, R., & Álvarez, J. M. (2012). Characterization of the Fusarium wilt resistance *Fom-2* gene in melon. *Molecular Breeding*, 30(1), 325–334. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9622-6>
- ◆ Pan, R. S., & More, T. A. (1996). Screening of melon (*Cucumis melo* L.) germplasm for multiple disease resistance. *Euphytica*, 88(2), 125–128. <https://doi.org/10.1007/BF00032443>
- ◆ Pitrat, M. (2017). Melon Genetic Resources: Phenotypic Diversity and Horticultural Taxonomy. In R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas (Eds.), *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae* (pp. 25–60). Springer. [https://doi.org/10.1007/7397\\_2016\\_10](https://doi.org/10.1007/7397_2016_10)
- ◆ Pitrat, M. (2008). Melon. In J. Prohens, & F. Nuez (Eds.), *Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae* (pp. 283–315). New York, USA: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-49161-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-540-49161-3_9)
- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mafeo, T. P. (2013). Optimising stem diameters of watermelon cultivars and indigenous *Cucumis* species for improving

compatibility of inter-generic grafts. *Acta Horticulturae*, 1007, 807–812. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1007.96>

- ◆ Pofu, K. M., & Mashela, P. W. (2012). Improving survival of inter-generic grafts of nematode-susceptible watermelon cultivars and nematode-resistant *Cucumis* species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 62(4), 383–386. <https://doi.org/10.1080/09064710.2011.614634>
- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mphosi, M. S. (2011). Management of *Meloidogyne incognita* in nematode-susceptible watermelon cultivars using nematode-resistant *Cucumis africanus* and *Cucumis myriocarpus* rootstocks. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8790–8793. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1252>
- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mokgalong, N. M. (2010). Host-status and host-sensitivity of *Cucumis africanus* and *Cucumis myriocarpus* to *Meloidogyne incognita* race 2 under greenhouse conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 5(12), 1504–1508. <https://doi.org/10.5897/AJPP10.025>
- ◆ Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 467–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467>
- ◆ Renner, S. S., & Schaefer, H. (2017). Phylogeny and Evolution of the Cucurbitaceae. In R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas (Eds.), *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae* (pp. 13–23). Springer. [https://doi.org/10.1007/7397\\_2016\\_14](https://doi.org/10.1007/7397_2016_14)
- ◆ Ribas, F., Cabello, M. J., Moreno, M. M., & Moreno, A. (2000). Respuesta fisiológica de un cultivo de melón (*Cucumis melo* L.) a distintas dosis de riego. *Investigación Agraria: Producción u Protección Vegetales*, 15(3), 185–212.
- ◆ Ristaino, J. B., & Thomas, W. (1997). Agriculture, Methyl Bromide, and the Ozone Hole: Can We Fill the Gaps? *Plant Disease*, 81(9), 964–977. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.9.964>
- ◆ Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2003). Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 1(1), 70–74.
- ◆ Roig, C., Fita, A., Ríos, G., Hammond, J. P., Nuez, F., & Picó, M. B. (2012). Root transcriptional responses of two melon genotypes with contrasting resistance



to *Monosporascus cannonballus* (Pollack et Uecker) infection. *BMC Genomics*, 13: 601. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-601>

- ◆ Romero, L., Belakbir, A., Ragala, L., & Ruiz, J. M. (1997). Response of Plant Yield and Leaf Pigments to Saline Conditions : Effectiveness of Different Rootstocks in Melon Plants (*Cucumis melo* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 43 (4), 855-862. <https://doi.org/10.1080/00380768.1997.10414652>
- ◆ Roupshael, Y., Cardarelli, M., Rea, E., & Colla, G. (2012). Improving melon and cucumber photosynthetic activity, mineral composition, and growth performance under salinity stress by grafting onto *Cucurbita* hybrid rootstocks. *Photosynthetica*, 50(2), 180–188. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0002-1>
- ◆ Roupshael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., & Colla, G. (2010). Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.001>
- ◆ Sáez, C., Esteras, C., Martínez, C., Ferriol, M., Dhillon, N. P. S., López, C., & Picó, M. B. (2017). Resistance to tomato leaf curl New Delhi virus in melon is controlled by a major QTL located in chromosome 11. *Plant Cell Reports*, 36(10), 1571–1584. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2175-3>
- ◆ Sakata, Y., Ohara, T., & Sugiyama, M. (2007). The history and present state of the grafting of Cucurbitaceous vegetables in Japan. *Acta Horticulturae*, (731), 159–170. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.731.22>
- ◆ Sánchez-Rodríguez, E., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2016). Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. *Journal of Plant Physiology*, 190, 72–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.010>
- ◆ Sanz-Carbonell, A., Marques, M. C., Bustamante, A., Fares, M. A., Rodrigo, G., & Gomez, G. (2019). Inferring the regulatory network of the miRNA-mediated response to biotic and abiotic stress in melon. *BMC Plant Biology*, 19:78. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1679-0>

- ◆ Satoh, S. (1996). Inhibition of flowering of cucumber grafted on rooted squash stock. *Physiologia Plantarum*, 97(3), 440–444. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00501.x>
- ◆ Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- ◆ Schreuder, W., Lamprecht, S., & Holz, G. (2000). Race Determination and Vegetative Compatibility Grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* from South Africa. *Plant Disease*, 84(3), 231–234. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.231>
- ◆ Schwarz, D., Roupahel, Y., Colla, G., & Venema, J. H. (2010). Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.016>
- ◆ Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14269–14273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005338107>
- ◆ Shannon, M. C., & Grieve, C. M. (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, 78, 5–38. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00189-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00189-7)
- ◆ Sigüenza, C., Schochow, M., Turini, T., & Ploeg, A. (2005). Use of *Cucumis metuliferus* as a Rootstock for Melon to Manage *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 37(3), 276–280.
- ◆ Singh, A. K., & Yadava, K. S. (1984). An Analysis of Interspecific Hybrids and Phylogenetic Implications in *Cucumis* (*Cucurbitaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 147(3-4), 237–252. <https://doi.org/10.1007/BF00989386>
- ◆ Skálová, D., Ondřej, V., Dolealová, I., Navrátilová, B., & Lebeda, A. (2010). Polyploidization Facilitates Biotechnological *In Vitro* Techniques in the Genus *Cucumis*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 475432. <https://doi.org/10.1155/2010/475432>

- ◆ Soteriou, G. A., Papayiannis, L. C., & Kyriacou, M. C. (2016). Indexing melon physiological decline to fruit quality and vine morphometric parameters. *Scientia Horticulturae*, 203, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.032>
- ◆ Szabó, Z., Gyulai, G., Humphreys, M., Horváth, L., Bittsánszky, A., Lágler, R., & Heszky, L. (2005). Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica*, 146(1), 87–94. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-5685-y>
- ◆ Thies, J. A., Ariss, J. J., Hassell, R. L., Olson, S., Kousik, C. S., & Levi, A. (2010). Grafting for Management of Southern Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita*, in Watermelon. *Plant Disease*, 94(10), 1195–1199. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-09-0640>
- ◆ Traka-Mavrona, E., Koutsika-Sotiriou, M., & Pritsa, T. (2000). Response of squash (*Cucurbita* spp.) as rootstock for melon (*Cucumis melo* L.). *Scientia Horticulturae*, 83(3–4), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00088-6)
- ◆ Trionfetti Nisini, P., Colla, G., Granati, E., Temperini, O., Crinò, P., & Saccardo, F. (2002). Rootstock resistance to fusarium wilt and effect on fruit yield and quality of two muskmelon cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93(3–4), 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00335-1)
- ◆ Vakalounakis, D. J., Klironomou, E., & Papadakis, A. (1994). Species spectrum, host range and distribution of powdery mildews on *Cucurbitaceae* in Crete. *Plant Pathology*, 43(5), 813–818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb01625.x>
- ◆ Verdejo-Lucas, S., Cortada, L., Sorribas, F. J., & Ornat, C. (2009). Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of *Mi* resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathology*, 58(5), 990–998. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02089.x>
- ◆ Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Condurso, C., Crinò, P., Romano, D., ... Paratore, A. (2014). Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* var. *inodorus* H. Jacq.) in relation to different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 169, 118–124.

- ◆ Walters, S. A., & Wehner, T. C. (2002). Incompatibility in diploid and tetraploid crosses of *Cucumis sativus* and *Cucumis metuliferus*. *Euphytica*, 128(3), 371–374. <https://doi.org/10.1023/A:1021212815590>
- ◆ Walters, T. W. (1989). Historical overview on domesticated plants in China with special emphasis on the *Cucurbitaceae*. *Economic Botany*, 43(3), 297–313. <https://doi.org/10.1007/BF02858729>
- ◆ Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- ◆ Wu, J. H., Ross Ferguson, A., Murray, B. G., Jia, Y., Datson, P. M., & Zhang, J. (2012). Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany*, 109(1), 169–179. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr256>
- ◆ Yamasaki, A., Yamashita, M., & Furuya, S. (1994). Mineral Concentrations and Cytokinin Activity in the Xylem Exudate of Grafted Watermelons as Affected by Rootstocks and Crop Load. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 62(4), 817–826.
- ◆ Yang, W., Liu, D., Li, J., Zhang, L., Wei, H., Hu, X., ... Zou, Y. (2009). Synthetic hexaploid wheat and its utilization for wheat genetic improvement in China. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(9), 539–546. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60145-9](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60145-9)
- ◆ Yarsi, G., Sari, N., & Yetisir, H. (2012). Effect of Different Rootstocks on the Yield and Quality of Grafted Melon Plants. *Acta horticulturae*. 936, 411–416. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.936.54>
- ◆ Yetisir, H., Çaliskan, M. E., Soylu, S., & Sakar, M. (2006). Some physiological and growth responses of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai] grafted onto *Lagenaria siceraria* to flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 58(1–3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.010>
- ◆ Yonny, M. E., Rodríguez Torresi, A., Cuyamendous, C., Réversat, G., Oger, C., Galano, J.-M., ... Nazareno, M. A. (2016). Thermal Stress in Melon Plants:

Phytosteranes and Phytofurans as Oxidative Stress Biomarkers and the Effect of Antioxidant Supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(44), 8296–8304. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03011>

- ◆ Zenkteler, M. (1999). In vitro pollination of excised ovaries. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 41, 31–38.
- ◆ Zhang, Y. P., He, J., Yang, S. J., & Chen, Y. Y. (2014). Exogenous 24-epibrassinolide ameliorates high temperature-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Cucumis melo*. *Biologia Plantarum*, 58(2), 311–318. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0395-8>
- ◆ Zhang, W., Hao, H., Ma, L., Zhao, C., & Yu, X. (2010). Tetraploid muskmelon alters morphological characteristics and improves fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.038>
- ◆ Zhou, X., Wu, Y., Chen, S., Chen, Y., Zhang, W., Sun, X., & Zhao, Y. (2014). Using *Cucurbita* Rootstocks to Reduce Fusarium Wilt Incidence and Increase Fruit Yield and Carotenoid Content in Oriental Melons. *HortScience*, 49(11), 1365–1369. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.11.1365>

## OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN



## Objetivos y Justificación

El sector productivo hortofrutícola cuenta con recursos y herramientas limitadas para hacer frente a los nuevos desafíos (económicos y técnicos) que exige actualmente el cultivo del melón, muy demandado a nivel mundial.

Las pérdidas causadas por enfermedades, plagas y condiciones ambientales desfavorables son cada vez más difíciles de combatir por medio del manejo agronómico convencional, debido en gran parte a la mala calidad de suelos y agua y a la retirada de productos fitosanitarios por su impacto ambiental.

El uso del injerto se ha ido extendiendo en las hortalizas por proporcionar beneficios y soluciones frente a problemas generados por factores bióticos y abióticos a corto plazo. Sin embargo, todavía es escaso en melón, donde los patrones de *Cucurbita* no han resultado tan adecuados como para el injerto de sandía. El uso de portainjertos es ventajoso respecto a la mejora de cada variedad, ya que un portainjerto puede combinar distintas resistencias y además ser utilizado con distintas variedades. Es una técnica que puede servir para la recuperación de variedades tradicionales, de gran calidad pero muy susceptibles a distintos tipos de estrés, y para el cultivo de variedades comerciales. Ahora bien, esta metodología exige de la consecución de portainjertos resistentes que sean compatibles con distintas variedades y que no modifiquen de manera negativa la calidad de los frutos. En este contexto se plantean los siguientes objetivos en los que se utilizarán patrones comerciales y otros experimentales desarrollados previamente a esta Tesis por los grupos de Mejora Genética de Cucurbitáceas y Desarrollo de Portainjertos de Hortalizas del COMAV:

1. Evaluar distintos patrones experimentales y comerciales de los géneros *Cucurbita* y *Cucumis* para el injerto de variedades tradicionales y comerciales de melón en distintas condiciones de cultivo, estudiando el impacto de los mismos sobre el desarrollo de la planta y la calidad externa e interna de los frutos.



2. Evaluar dos portainjertos experimentales resultantes de hibridaciones de germoplasma silvestre del género *Cucumis*.
3. Obtener plantas poliploides de los portainjertos de *Cucumis* para evaluar esta metodología como herramienta de mejora de éstos y para estudiar los efectos de la poliploidización.

---

CAPÍTULOS



## CAPÍTULO 1

---

# Evaluación de portainjertos para el cultivo de melón



## Capítulo 1

### Evaluación de portainjertos para el cultivo de melón

#### 1.1. Uso de portainjertos para la recuperación de variedades tradicionales

Gisbert., C., **Cáceres, A.**, Perpiñá, G., Bernat, G., Pérez-de-Castro, A., & Picó, M. B. (2016). El injerto como técnica para la recuperación de variedades tradicionales: el “Meló d’Or d’Ontinyent”, un caso de estudio. *Phytoma*, 282, 40-47.

Este trabajo se ha publicado en la revista de divulgación Phytoma, una revista profesional especializada en la sanidad de los cultivos, cuyos contenidos técnico-científicos tienen como objetivo divulgar los trabajos de investigación y experiencia práctica realizados en distintas disciplinas: mejora genética, entomología, patología, malherbología, etc. y su relación con los agrosistemas y medio ambiente.

El trabajo se enmarca en el proyecto AGL2014-53398-C2-2-R APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS Y CULTURALES PARA LA MEJORA DE LAS RESISTENCIAS Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN MELON Y SANDIA financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (cofinanciado con fondos FEDER) y de la colaboración del grupo de Mejora Genética de Cucurbitáceas con el grupo de Investigación de Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la UPV (dirigido por J. Armengol). Mi participación ha sido financiada por parte del Gobierno de la República del Ecuador por medio de una beca de la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

## EL INJERTO COMO TÉCNICA PARA LA RECUPERACIÓN DE VARIEDADES TRADICIONALES: EL 'MELÓ D'OR' D'ONTINYENT', UN CASO DE ESTUDIO

CARMINA GISBERT<sup>1</sup>, ANDRÉS CÁCERES<sup>1</sup>, GORKA PERPIÑA<sup>1</sup>, GERARDO BERNAT<sup>1</sup>, ANA PÉREZ-DE-CASTRO<sup>1</sup>,

JOSEP ARMENGOL<sup>2</sup> Y MARIA BELÉN PICÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana.

<sup>2</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universitat Politècnica de València.

La utilización del injerto para hacer frente a patógenos presentes en el suelo es una práctica común en sandía que ha ido extendiéndose a otros cultivos hortícolas desde la prohibición del uso del bromuro de metilo para la desinfestación de suelos. El colapso, provocado por el hongo *Monosporascus cannonballus*, es ya un problema de primer orden en muchas zonas de cultivo de melón y sandía a nivel mundial, viéndose también afectadas, distintas zonas de cultivo del Mediterráneo en España. Entre las variedades cultivadas, las tradicionales muestran mayor vulnerabilidad porque han sido seleccionadas por sus propiedades organolépticas y no en base a resistencias. La utilización de la técnica del injerto en este tipo de variedades podría ser una buena alternativa para su cultivo. Sin embargo, en melón, la utilización de planta injertada todavía no es habitual, fundamentalmente porque los patrones de *Cucurbita* que se emplean en sandía alteran la calidad del fruto, aconsejándose el desarrollo de patrones del mismo género o incluso especie, para evitar este problema. El Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universitat Politècnica de València ha desarrollado patrones altamente resistentes a *M. cannonballus*. En este trabajo se ha determinado la utilidad de uno de estos patrones (un híbrido intraespecífico de *Cucumis melo*) para el cultivo de melón tradicional y melón comercial de tipo 'Piel de Sapo' realizando el cultivo en una parcela en la que se detectaron problemas de colapso. Los resultados obtenidos demuestran tanto la utilidad del injerto para el cultivo de la variedad tradicional 'Meló d'Or', como la adecuación del patrón utilizado que, además de presentar resistencia, no ha influenciado negativamente la calidad de los frutos obteniéndose, tanto para el melón tradicional como para el comercial, frutos de buen calibre y calidad.

## PALABRAS CLAVE

Melón (*Cucumis melo* L.) ■ *Monosporascus cannonballus* ■ Colapso ■ Calidad

## ANTECEDENTES

La técnica del injerto permite generar plantas con la parte aérea de una variedad o especie y la raíz de otra. De esta forma, es posible cultivar variedades sensibles sobre patrones resistentes o tolerantes a patógenos del suelo, por ejemplo, hongos y nematodos, y a estreses de tipo abiótico, como salinidad, sequía y temperatura extremas. En España, el uso del injerto en plantas hortícolas se inició en la década de los 90 en una especie perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas, la sandía (*Citrullus lannatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), con el fin de combatir problemas causados por hongos, fundamentalmente la Fusariosis vascular. Para ello, se utilizaron como patrones híbridos de dos especies de calabaza (*Cucurbita maxima* Duchesne x *Cucurbita moschata* Duchesne) resistentes al hongo causante de la enfermedad. La utilización del injerto se extendió rápidamente a otros cultivos de la familia de las Solanáceas, como el tomate, y paulatinamente a otros cultivos de interés.

En la actualidad, en la familia de las Cucurbitáceas el injerto es de uso generalizado en sandía. Para este cultivo se emplean fundamentalmente, como se ha indicado, híbridos de *Cucurbita*, aunque en países orientales también es muy frecuente el uso de patrones pertenecientes al género *Lagenaria*, de la misma familia. Se han puesto a punto diferentes metodologías para realizar la unión de la variedad y el patrón, cuyo uso depende, entre otros factores, de la compatibilidad entre ambos. Una descripción de las mismas en distintas especies hortícolas de interés la podemos encontrar en De Miguel (1997). Además de aumentar el rendimiento de la planta en condiciones de estrés de suelo, es muy importante que los patrones utilizados no afecten negativamente a la calidad de los frutos. El efecto negativo sobre la calidad del fruto suele ser mayor cuanto mayor es la distancia genética entre el patrón y la variedad. Por ejemplo, estudios recientes indican que el empleo de patrones del género *Cucurbita* altera más la calidad



del fruto de sandía que el uso de nuevos patrones experimentales pertenecientes al género *Citrullus* (Fredes et al., 2016).

En melón (*Cucumis melo* L.), el cultivo de la familia de las Cucurbitáceas de mayor importancia económica en España (con más de 850.000 toneladas producidas y más de 400.000 exportadas), el uso del injerto todavía no se ha difundido. Esta situación tan diferente a la de la sandía se explica, entre otros factores, por el mayor efecto negativo sobre la calidad del fruto de melón que tienen los patrones habitualmente empleados en sandía (Rouphael et al., 2010). Por ello, para extender el empleo del injerto en este cultivo es necesario desarrollar nuevos patrones que no alteren la calidad del fruto, o que causen un efecto mínimo sobre la misma, lo que puede conseguirse a partir del empleo de patrones del mismo género o incluso de la misma especie.

Desde la prohibición del bromuro de metilo, un desinfectante de suelo muy efectivo, el interés por el uso del injerto en melón se ha incrementado. La falta de tratamientos y el incremento a escala global de la temperatura están aumentando los problemas de ‘colapso’ o ‘muerte súbita’ del melón. Este síndrome está causado fundamentalmente por el hongo *Monosporascus cannonballus* (Pollack y Uecker), que aunque afecta a más especies es especialmente dañino en cultivos de melón. En campos con un elevado nivel de infestación de este patógeno se observa el marchitamiento de las plantas hacia la mitad del cultivo, consecuencia de la pudrición del cuello y las raíces. Las plantas dañadas no finalizan el cultivo o lo hacen con muy bajos rendimientos y con frutos que no se desarrollan con normalidad y no alcanzan calidad comercial en la mayoría de los casos. La utilización de patrones que muestren resistencia o tolerancia a este patógeno es de gran interés para hacer frente a estos problemas emergentes.

El colapso causado por *M. cannonballus* representa ya un problema de primer orden en muchas zonas productoras de melón al aire libre, como Brasil, Israel, Egipto o Túnez. En nuestras zonas de cultivo del Mediterráneo muchos suelos están infestados (Beltrán et al., 2007, 2008). Si las variedades empleadas tienen cierto nivel de tolerancia,

con niveles bajos o medios de infestación, es posible finalizar el cultivo con éxito. Sin embargo, la repetición del cultivo con variedades con bajo nivel de tolerancia en las que el hongo puede reproducirse abundantemente puede llevar al incremento de los niveles del patógeno en el suelo, convirtiéndolo en no apto para el cultivo del melón. Esta situación ha llevado al abandono del cultivo en algunas zonas afectadas, reduciéndose la superficie cultivada y ha afectado también a algunas variedades localmente muy apreciadas como el ‘Meló d’Or d’Ontinyent’, un melón de tipo amarillo de alta calidad.

Las variedades tradicionales son especialmente sensibles a las enfermedades de suelo puesto que no han sufrido los procesos de mejora que se han llevado a cabo en las variedades comerciales, habitualmente más vigorosas y con resistencias a distintos tipos de estrés biótico o abiótico. De hecho, el cultivo del ‘Meló d’Or d’Ontinyent’ se ve amenazado por la ocurrencia de colapso en campos infestados. La introducción de resistencias mediante programas de retrocruzamiento, como los llevados a cabo en las variedades comerciales, que puedan arrastrar características desfavorables de los fondos genéticos exóticos empleados como donantes, y el empleo del injerto con patrones de otros géneros, que puedan alterar su calidad, no son opciones válidas para la recuperación de su cultivo, basado en el mantenimiento de la calidad del mismo. Es por ello una buena alternativa la utilización de patrones resistentes que no afecten a la calidad de los frutos.

Los grupos de investigación ‘Desarrollo de patrones para plantas hortícolas’ y ‘Mejora de Cucurbitáceas’ del COMAV han desarrollado patrones de interés para el injerto de distintos cultivos hortícolas a partir de la combinación de materiales seleccionados o mejorados por su resistencia y/o adaptación a distintos tipos de estrés (Gisbert et al., 2011; Cáceres et al., 2016; Fredes et al., 2016; Sánchez-Torres et al., 2016). En este trabajo, se compara el comportamiento del ‘Meló d’Or d’Ontinyent’ injertado sobre un patrón experimental perteneciente a la especie *C. melo* (derivado de un cruzamiento entre una entrada de la variedad *chinesis* y otra de la variedad *inodorus*) con resistencia a *M. cannonballus*, injertado sobre un patrón comercial de la misma especie (sin resistencia a este patógeno), autoinjertado, y no injertado,

cultivado en un campo con historial del colapso causado por *M. cannonballus*. Aparte del comportamiento frente a la enfermedad, se evalúa el efecto del patrón sobre la calidad del fruto. La respuesta de la variedad tradicional de melón amarillo se compara con la respuesta, en las mismas condiciones, de un cultivar comercial de tipo ‘Piel de Sapo’ injertado sobre los mismos patrones.

#### *La variedad tradicional ‘Meló d’Or d’Ontinyent’*

El ‘Meló d’Or’ es una variedad autóctona de la ciudad valenciana de Ontinyent, de piel amarilla, carne compacta de color blanco y unas características organolépticas muy apreciadas. Este melón también se conoce en la zona como ‘melón de todo el año’ porque puede conservarse durante varios meses colgado en un lugar fresco y seco. El ‘Meló d’Or’ se cultiva desde hace más de 700 años en la zona. Según consta en el archivo municipal de la localidad, ya se referencia en 1424, llegándose a exportar a Francia e Inglaterra. Un estudio realizado por el grupo de Mejora de Cucurbitáceas del COMAV, utilizando marcadores moleculares tipo SNPs, demostró que este tipo de melón difiere a nivel molecular de otras variedades de melón Amarillo, procedentes de diversas provincias españolas de la Comunidad Murciana y Andalucía, así como de otros melones de este tipo de distintos países del norte de África.

Desde que en el año 2012 se creó la marca de calidad ‘Meló d’Or’ para activar la recuperación de esta variedad, considerada en aquel momento en peligro de extinción, ha sido utilizada en reconocidas cocinas como en las de los chefs Carme Ruscalleda del Restaurante Sant Pau de Barcelona o Bernd Knoller, del restaurante Riff de Valencia (Levante, 18.09.2013). Los problemas causados por patógenos de suelo, que han ido en aumento en la última década, suponen una nueva limitación para su cultivo, cuya recuperación es de gran interés para incrementar la oferta de productos de calidad e impedir la extinción de un cultivo tradicional asociado con el paisaje y la idiosincrasia de la zona.

## CULTIVO DE 'MELÓ D'OR' INJERTADO Y NO INJERTADO EN SUELOS CON PROBLEMAS DE COLAPSO

*Descripción del ensayo*

Se llevó a cabo un ensayo en el que comparamos plantas no injertadas de la variedad tradicional 'Meló d'Or' (MO) con plantas injertadas sobre el patrón resistente a *M. cannonballus* UPV-PRMc, desarrollado en nuestro grupo (PRMc-MO), plantas injertadas sobre un patrón comercial de melón (64-376RZ de Rijk Zwaan) (PC-MO) y plantas autoinjertadas, es decir aquellas en las que se ha utilizado como variedad y patrón 'Meló d'Or' (MO-MO). Se evaluaron 16 plantas de cada tratamiento distribuidas en cuatro bloques. En el ensayo se incluyeron como controles 16 plantas de los mismos cuatro tratamientos, pero empleando como copa la variedad comercial de melón tipo 'Piel de Sapo' cv. 'Finura' (Rijk Zwaan), no injertada (PS), autoinjertada (PS-PS), e injertada sobre los mismos patrones de melón, el experimental con resistencia a *M. cannonballus* (PRMc-PS) y el comercial (PC-PS). Estas plantas se distribuyeron también en 4 bloques de forma aleatoria en la parcela.

El injerto realizado fue de tipo púa, transplantando las plantas a suelo tras el prendimiento de las mismas y el desarrollo de 3-4 hojas verdaderas. Las plantas se trasplantaron la segunda semana de Mayo de 2016 en una parcela de cultivo al aire libre del término municipal de Picassent (propiedad de la empresa Rijk Zwaan).

En esta parcela se observó colapso en la anualidad anterior. El manejo del cultivo se llevó a cabo realizando las prácticas habituales empleadas en la zona para el cultivo de melón.

Durante el cultivo se asignó un índice de vigor a cada planta (de 0, planta muerta, a 5, muy vigorosa). Al final del mismo, se extrajeron las raíces (4 por combinación) asignándose a cada raíz un índice de dificultad de extracción (de 0, sin dificultad, a 5 muy difícil de extraer). Tras la extracción y lavado de las raíces se les asignó un índice de daños (de 0, sin lesiones, a 5, podredumbres, necrosis y presencia de peritecios del hongo *M. cannonballus*) y un índice de ramificación (0, raíz muy poco ramificada, a 5, raíz con

mucha ramificación lateral). También se analizó la calidad de los frutos maduros de cada uno de los tratamientos, tomándose cuatro frutos por bloque (16 por tratamiento). Las características analizadas por fruto fueron parámetros de calidad externa (peso, dimensiones del fruto, dureza de la piel) e internas (anchura de la cavidad y del mesocarpio, dureza, °Brix, pH y color de la pulpa). Para la medida del color se empleó un colorímetro con la escala de Hunter: (a) valor del verde al rojo; (b) valor del amarillo al azul y (L) luminosidad.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) empleando el programa Statgraphics Centurion XVI. Se utilizó el test LSD ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación de las medias. Los análisis de los tratamientos con las dos variedades ('Meló d'Or' y 'Finura') se realizaron de forma independiente.

## RESULTADOS

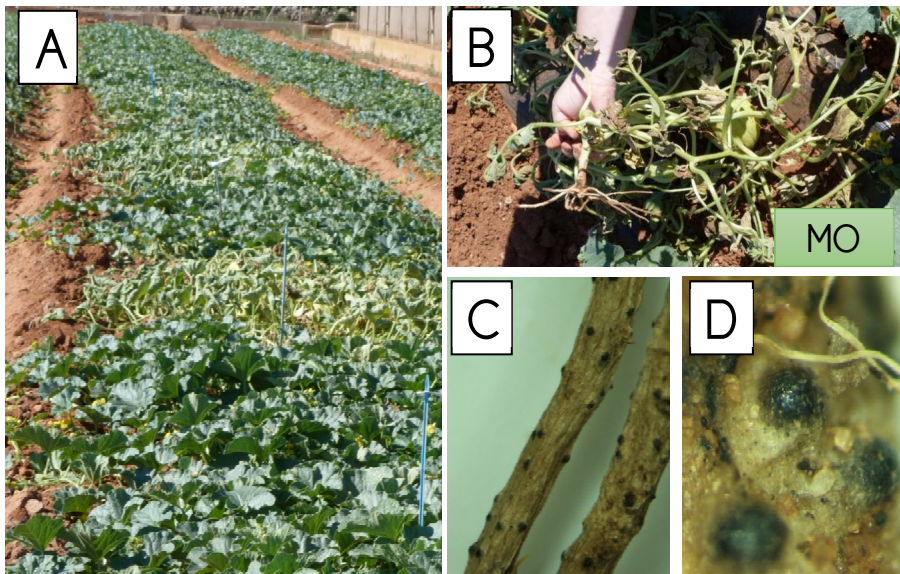
Todas las plantas injertadas y no injertadas mostraron un vigor medio-alto (índices entre 2,6 y 4) desde el inicio del cultivo hasta el mes y medio después del trasplante (Tabla 1), momento en el que empezaron a observarse síntomas de marchitamiento en algunos bloques que se correspondían con las plantas no injertadas y autoinjertadas de la variedad tradicional 'Meló d'Or' (MO y MO-MO) (Figura 1 A). Con el fin de comprobar si estos síntomas de marchitez eran debidos a la presencia en el suelo de *M. cannonballus*, se extrajeron las raíces de las plantas afectadas (que presentaron nula resistencia a la extracción, puntuada como 0), llevándose a cabo reaislamientos fúngicos que confirmaron la presencia masiva de *M. cannonballus*. En la Figura 1 B, C y D se muestra una de las raíces infectadas con *M. cannonballus* (puntuada con daño 5) y los peritecios donde se forman las esporas de este hongo. Los síntomas de marchitamiento fueron acuciándose con el tiempo, provocando la marchitez total de las plantas (Tabla 1 y Figura 2 A). Al final del cultivo, las plantas de 'Meló d'Or' injertadas sobre el patrón comercial (PC-MO) también mostraron inicio de marchitez (Figura 2 B), lo que no se observó en las plantas injertadas en UPV-PRMc (Figura 2 C). La extracción de raíces de las plantas tras la cosecha de los frutos (Figura 2 D-F) indicó la presencia de síntomas ligeros de infección

en las raíces del patrón PC (Figura 2 E), menos severa que la observada en las raíces de la variedad tradicional (dificultad de extracción de 1,5 y nivel de daño 2) (Tabla 1).

**TABLA 1** ■ Promedios de los índices de vigor de planta y calidad de las raíces anotados al final del cultivo en una escala de 0-5. Vigor (0= planta muerta; 5=planta muy vigorosa); Dificultad de extracción (0=sin dificultad; 5= muy difícil de extraer); Síntomas (0=no se detectan visualmente lesiones fúngicas; 5= raíz muy dañada con podredumbres, necrosis, raíces rotas y/o presencia de peritecios); Ramificación (0= raíces muy poco ramificadas, 5= raíces con mucha ramificación lateral).

| COMBINACIÓN | VIGOR     |           |           | ÍNDICE DE DIFICULTAD DE EXTRACCIÓN | ÍNDICE DE DAÑOS | ÍNDICE DE RAMIFICACIÓN |
|-------------|-----------|-----------|-----------|------------------------------------|-----------------|------------------------|
|             | 10 DÍAS   | 30 DÍAS   | 60 DÍAS   |                                    |                 |                        |
| MO          | 2,6 ± 0,2 | 3,1 ± 0,2 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0                          | 5,0 ± 0,0       | 0,0 ± 0,0              |
| MO-MO       | 2,7 ± 0,1 | 3,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0                          | 5,0 ± 0,0       | 0,0 ± 0,0              |
| PC-MO       | 3,4 ± 0,1 | 3,7 ± 0,3 | 2,0 ± 0,4 | 1,5 ± 0,3                          | 2,0 ± 0,0       | 1,5 ± 0,4              |
| PRMc-MO     | 3,5 ± 0,3 | 3,6 ± 0,1 | 3,7 ± 0,6 | 4,2 ± 0,5                          | 0,0 ± 0,0       | 4,7 ± 0,2              |
| PS          | 2,7 ± 0,1 | 3,2 ± 0,1 | 3,0 ± 0,0 | 2,7 ± 0,2                          | 0,7 ± 0,5       | 3,0 ± 0,0              |
| PS-PS       | 3,2 ± 0,3 | 3,7 ± 0,3 | 4,0 ± 0,0 | 3,0 ± 0,5                          | 0,5 ± 0,2       | 3,0 ± 0,0              |
| PC-PS       | 3,8 ± 0,1 | 3,9 ± 0,1 | 3,5 ± 0,3 | 2,7 ± 0,2                          | 0,5 ± 0,2       | 3,5 ± 0,5              |
| PRMc-MPS    | 3,9 ± 0,1 | 4,0 ± 0,0 | 3,5 ± 0,3 | 5,0 ± 0,0                          | 0,0 ± 0,0       | 5,0 ± 0,0              |

Valores promedio de cuatro evaluaciones por combinación ± Error estándar



**FIGURA 1** ■ A. Aspecto de una de las filas del campo de cultivo en el que se observa el decaimiento de algunos bloques de plantas que se corresponden con la variedad 'Meló d'Or' no injertadas (MO) o autoinjertadas (MO-MO). B. Extracción de raíces para la visualización de síntomas asociados a patógenos presentes en el suelo en una planta MO. C y D. Detalle de peritecios de *Monosporascus cannonballus* (3x y 5x) observados en las raíces.

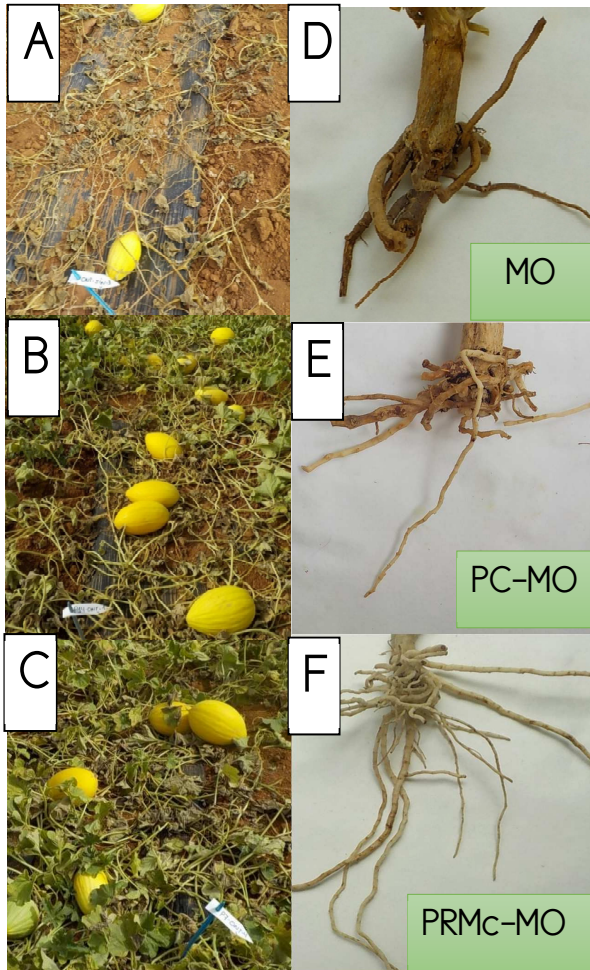


FIGURA 2 ■ Aspecto de las plantas de la variedad tradicional 'Meló d'Or' no injertadas (A) e injertadas en el patrón comercial (B) y en el patrón experimental con resistencia a *Monosporascus cannonballus* (C) al final del cultivo. Detalle de raíces extraídas de una planta de cada combinación tras la cosecha de los frutos (D, E y F).

En cuanto a las plantas del cv. comercial 'Finura', en todos los tratamientos se observó un menor efecto de la infección por *M. cannonballus*. De hecho, aunque el vigor de las plantas no injertadas (PS) fue menor (índice de vigor de 2,7 a 3,2), no se observaron diferencias entre las autoinjertadas (PS-PS) y las injertadas en los dos patrones (PC-PS y PRMc-PS) (índices de vigor de 3,2 a 4). Sin embargo, al extraer las raíces sí se observaron diferencias, las no injertadas, las autoinjertadas y las injertadas sobre el PC se extrajeron con menor dificultad (índices de extracción entre 2,7 y 3) que las injertadas sobre el patrón resistente a *M. cannonballus* (índice promedio de 5), detectándose síntomas de infección en algunas raíces (puntuados entre 0,5 y 0,7) y un menor desarrollo radicular en comparación con las injertadas en UPV-PRMc (Tabla 1).

Este estudio confirma la imposibilidad de cultivar la variedad tradicional en un suelo altamente infestado con *M. cannonballus*. A diferencia de lo observado con el melón tradicional, el cv. comercial sí finalizó el cultivo, lo que indica una mayor susceptibilidad del primero. Las variedades tradicionales son generalmente muy sensibles a patógenos porque su selección a lo largo del tiempo no se ha realizado en base a características de resistencia. Así mismo, los resultados indican que el empleo del injerto es una herramienta para poder concluir con éxito el cultivo del ‘Meló d’Or’ en campos infestados. Los dos patrones empleados fueron de utilidad, ya que han sido mejorados por resistencia a estrés y permiten finalizar con éxito el cultivo, aunque las raíces de mejor calidad fueron las del patrón experimental con resistencia a *M. cannonballus* (UPV-PRMc) que, como era esperable, no mostraron ningún síntoma de infección, y eran largas y muy ramificadas, permitiendo una mejor exploración del suelo. Por otra parte, es interesante el empleo de material resistente que contribuye a limitar la reproducción del patógeno.

El análisis de calidad de los frutos cosechados en cada una de las combinaciones se muestra en las Tablas 2 y 3. Puesto que las plantas autoinjertadas y no injertadas de ‘Meló d’Or’ no finalizaron el cultivo, los frutos obtenidos mostraron un tamaño reducido (de aproximadamente 800 g a 1,1 Kg) y no llegaron a obtener un nivel de dulzor comercial ( $^{\circ}\text{Brix} < 8,3$ ) (Tabla 2; Figura 3). Salvo la dureza de la piel del fruto, todos los parámetros evaluados en estos frutos difirieron respecto de los frutos obtenidos en plantas injertadas en PC y UPV-PRMc, que si alcanzaron tamaño comercial. Con ambos patrones los frutos de la variedad tradicional injertada mostraron un peso en el rango de 2-2,2 kg y alrededor de los 14  $^{\circ}\text{Brix}$  en promedio, valores indicativos de frutos con buen calibre y dulzor. Los frutos obtenidos en plantas injertadas en ambos patrones fueron similares, salvo en que los frutos de las plantas injertadas en UPV-PRMc fueron algo más alargados y presentaron una pulpa más consistente y de mayor luminosidad, este último parámetro se correspondería con un color más blanco de la carne. Estos resultados indican que el ‘Meló d’Or’ injertado sobre patrones de melón produce frutos de calidad con características comerciales adecuadas en campos infestados con *M. cannonballus*.



TABLA 2 ■ Análisis de calidad en frutos de la variedad tradicional 'Meló d'Or'.

| COMBINACIÓN | PESO (g) | LARGO (cm) | ANCHO (cm) | DUREZA PIEL | ANCHO DE PIEL (mm) | ANCHO DE CAVIDAD (mm) | ANCHO DE PULPA (mm) | DUREZA PULPA | °Brix            | pH    | a      | b      | L      |
|-------------|----------|------------|------------|-------------|--------------------|-----------------------|---------------------|--------------|------------------|-------|--------|--------|--------|
| MO          | 1099,3 b | 197,0 b    | 113,9 b    | 13,0 a      | 5,6 b              | 59,7 <sup>a</sup>     | 19,6 a              | 3,9 c        | 8,3b             | 6,0 b | -8,4 a | 18,0 b | 66,6 c |
| MO-MO       | 809,3 a  | 179,6 a    | 103,7 a    | 12,9 a      | 5,1 ab             | 54,9 ab               | 18,6 a              | 4,0 c        | 6,7 <sup>a</sup> | 6,0 b | -8,0 a | 17,6 b | 71,8 d |
| PC-MO       | 2016,8 c | 218,75 c   | 145,2c     | 13,0 a      | 4,8 ab             | 62,2 b                | 34,8 b              | 0,7 a        | 13,9c            | 5,6 a | -4,0 b | 11,6 a | 57,9 a |
| PRMc-MO     | 2198,5 c | 233,94 d   | 146,1 c    | 13,0 a      | 4,7 a              | 62,9 b                | 33,8 b              | 1,3 b        | 14,4c            | 5,6 a | -4,2 b | 12,2 a | 62,9 b |

Letras diferentes en una columna indican diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0,05$  según el test LSD. a, b y L son los parámetros de color de la escala de Hunter.

TABLA 3 ■ Análisis de calidad en frutos de la variedad comercial de tipo Piel de sapo cv. 'Finura'.

| COMBINACIÓN | PESO (g)  | LARGO (cm) | ANCHO (cm) | DUREZA PIEL | ANCHO DE PIEL (mm) | ANCHO DE CAVIDAD (mm) | ANCHO DE PULPA (mm) | DUREZA PULPA | °Brix  | pH     | a       | b      | L       |
|-------------|-----------|------------|------------|-------------|--------------------|-----------------------|---------------------|--------------|--------|--------|---------|--------|---------|
| PS          | 2502,3 a  | 227,4 ab   | 153,1 a    | 13 a        | 5,1 a              | 57,6 a                | 37,1 a              | 2,0 a        | 11,9 a | 5,7 a  | -2,6 ab | 9,4 a  | 63,6 ab |
| PS-PS       | 2578,2 ab | 215,6 a    | 153,2 a    | 13 a        | 5,4 a              | 57,7 a                | 38,9 ab             | 2,4 a        | 12,1 a | 5,7 a  | -2,5 b  | 9,2 a  | 63,3 a  |
| PC-PS       | 2806,5 b  | 241,4 b    | 157,1 a    | 13 a        | 5,4 a              | 60,3 ab               | 44,3 b              | 2,6 a        | 12,5 a | 6,1 b  | -2,9 a  | 11,6 b | 68,3 c  |
| PRMc-PS     | 2726,2 ab | 233,7 ab   | 158,6 a    | 13 a        | 5,7 a              | 66,4 b                | 37,6 a              | 2,1 a        | 12,2 a | 5,8 ab | -2,3 b  | 9,1 a  | 66,9 bc |

Letras diferentes en una columna indican diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0,05$  según el test LSD. a, b y L son los parámetros de color de la escala de Hunter.

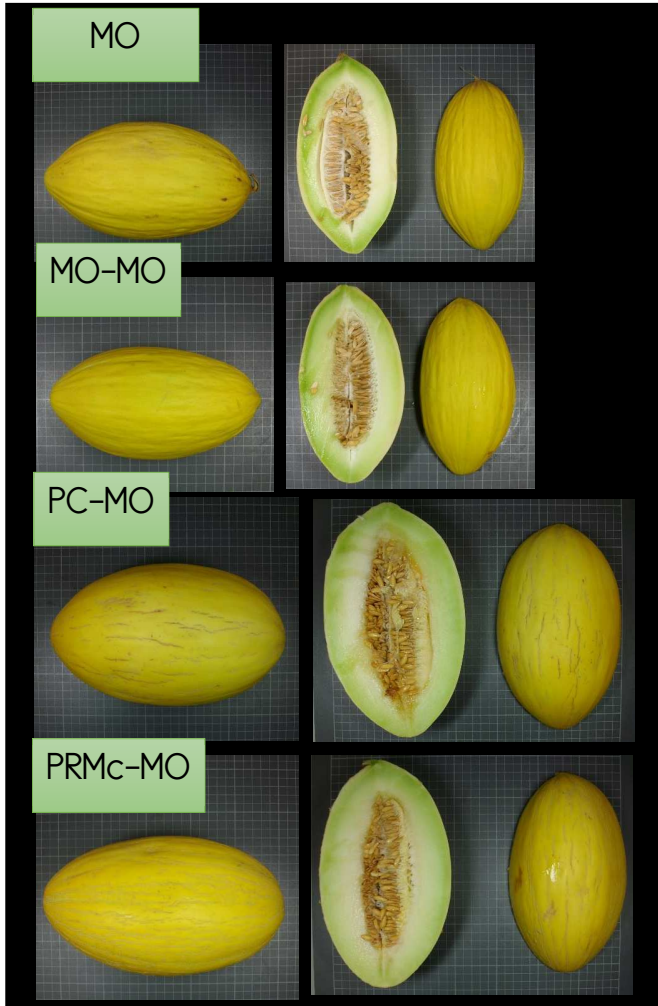


FIGURA 3 ■ Detalle de uno de los frutos de 'Meló d'Or' obtenidos de las combinaciones: plantas no injertadas (MO), injertadas utilizando como patrón 'Meló d'Or' (MO-MO), injertadas en el patrón comercial (PC-MO) e injertadas en el patrón experimental (PRMc-MO).

Los frutos del cultivar comercial de tipo 'Piel de Sapo' cosechados en plantas sin injertar y autoinjertadas no diferían para la mayoría de los caracteres de los frutos injertados en ambos patrones de melón (Tabla 3; Figura 4), a excepción de un mayor diámetro de la cavidad de la combinación PRMc-PS, que no estuvo acompañada de un menor espesor de la pulpa, y un cierto cambio en el matiz de color de la pulpa (con una tonalidad algo más crema) en la combinación PC-PS. Por lo tanto, el efecto del injerto sobre la calidad de los frutos fue similar a lo observado en la variedad tradicional.

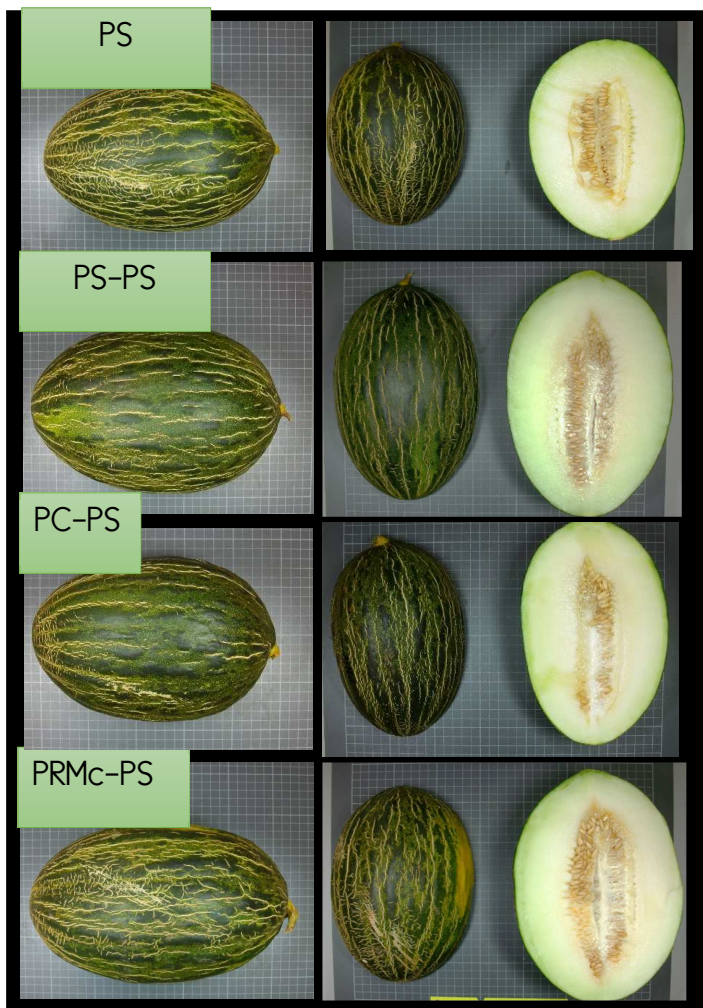


FIGURA 4 ■ Detalle de uno de los frutos de melón tipo 'Piel de Sapo' (cv. 'Finura') obtenidos de las combinaciones: plantas no injertadas (PS), autoinjertadas (PS-PS), injertadas en el patrón comercial (PC-PS) e injertadas utilizando el patrón experimental (PRMc-MPs).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se ha puesto de manifiesto la susceptibilidad de la variedad 'Meló d'Or' al hongo *M. cannonballus* y la imposibilidad de su cultivo en suelos con problemas de colapso con un nivel de infección media donde, la variedad comercial mejorada sin resistencia específica a *M. cannonballus*, sí ha podido finalizar el cultivo.

También se ha comprobado la eficacia de la técnica del injerto para recuperar el cultivo de variedades tradicionales, ya que ninguna planta no injertada o autoinjertada llegó a producir frutos de calidad comercial y, por el contrario, si lo hicieron todas las injertadas.

Se ha demostrado la utilidad de los patrones de melón PC y UPV-PRMc. Las plantas injertadas en estos patrones no se vieron afectadas por el colapso y produjeron frutos de calibre y calidad comercial, sin observarse modificaciones que afectasen negativamente la calidad de los frutos, tanto en frutos de la variedad tradicional 'Meló d'Or', como en melón 'Piel de Sapo' (cv. 'Finura'). Por lo tanto, se dispone de patrones útiles para el injerto de melón, en los dos tipos de variedades.

Aunque ambos patrones resultan en frutos de tamaño y dulzor comercial, el hecho de que el patrón resistente a *M. cannonballus* UPV-PRMc presente raíces más sanas y libres de daños, podría proporcionarle mejores posibilidades en suelos con altos niveles de infección y contribuiría a limitar el incremento del nivel del patógeno en el suelo.

Los resultados obtenidos indican que el injerto es una buena alternativa para el cultivo del 'Meló d'Or', ya que la mejora genética de la variedad utilizando el cruzamiento con variedades resistentes está descartada, puesto que modificaría los parámetros de calidad que las hacen tan apreciadas.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se enmarca en la línea de investigación para el desarrollo de nuevos portainjertos, que llevamos a cabo en el Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universitat Politècnica de València y en concreto en el marco de un proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad para superar estrés biótico y abiótico en melón, iniciado en 2015 (Referencia AGL2014-53398-C2-2-R, Cofinanciado con fondos FEDER).

## BIBLIOGRAFÍA

- ◆ De Miguel, A. (1997). *Injerto de Hortalizas*. Valencia, España: Federico Doménech S.A.
- ◆ Beltrán, R., Vicent, A., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2008). Comparative Epidemiology of *Monosporascus* Root Rot and Vine Decline in Muskmelon, Watermelon, and Grafted Watermelon Crops. *Plant Disease*, 92(1), 158-163. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0158>
- ◆ Beltrán, R., Vicent, A., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2007). Quantification of *Monosporascus cannonballus* Ascospores in Muskmelon Fields in Eastern Spain. *Journal of Phytopathology* 155(4), 248-250. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01215.x>
- ◆ Cáceres, A., Ferriol, M., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2016). Use of Wild *Cucumis* as Potential New Rootstocks for Melons. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XI<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae* (pp. 300-304), Varsovia, Polonia.
- ◆ Fredes, A., Roselló, S., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., Pérez-de-Castro, A., Gisbert, C., & Picó M. B. (2016). Fruit quality assessment of watermelons grafted onto citron melon rootstock. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1646–1655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7915>
- ◆ Gisbert, C., Prohens, J., Raigón, M. D., Stommel, J., & Nuez, F. (2011). Eggplant relatives as sources of variation for new rootstocks: effects of grafting on yield and fruit apparent quality and composition. *Scientia Horticulturae* 128(1), 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.007>
- ◆ Roupael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., & Colla, G. (2010). Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae* 127(2), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.001>
- ◆ Sánchez-Torres, P., Raigón, M. D., Gammoudi, N., & Gisbert, C. (2016). Effects of grafting combinations on the nutritional composition of pepper fruit. *Fruits*, 71(4), 249–256. <https://doi.org/10.1051/fruits/2016014>

1.2. Evaluación de portainjertos comerciales y experimentales de *Cucurbita* spp y *Cucumis* spp. para el cultivo de melón de tipo Piel de Sapo.

Estos ensayos se realizaron en varias fincas experimentales en Valencia. Han sido dirigidos por la Dra. Belén Picó, IP del grupo de Mejora de Cucurbitáceas del COMAV y han colaborado Gorka Perpiñá y el grupo de Cultivo In Vitro y Desarrollo de Portainjertos (Dra. Carmina Gisbert) y la Unidad Mixta de Investigación UJI/UPV en Mejora de la Calidad Agroalimentaria (Dr. Jaime Cebolla, Dr. Salvador Roselló, Dra. Mercedes Valcárcel y Dr. Raúl Martí). El trabajo está en preparación para enviarlo a una revista científica de impacto.

Este trabajo se enmarca en el proyecto AGL2014-53398-C2-2-R APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS Y CULTURALES PARA LA MEJORA DE LAS RESISTENCIAS Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN MELON Y SANDIA financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (cofinanciado con fondos FEDER) con apoyo de los proyectos AGL2017-85563-C2-1-R de Feder/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades–Agencia Estatal de Investigación, y proyecto para Grupos de Excelencia PROMETEO 2017/078 “Selección de Variedades Tradicionales y Desarrollo de Nuevas Variedades de Cucurbitáceas Adaptadas a la Producción Ecológica”, financiado por la Conselleria de Educació, Investigació, Cultura i Esport. La participación de Andrés Cáceres ha sido financiada por parte del Gobierno de la República del Ecuador por medio de una beca de la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

Author’s contribution: BP and CG conceived, leded the study and drafted the manuscript with the collaboration of AC. BP and CG provided the starting material. AC and GP were responsible of planting materials and of the agronomic evaluation with contribution of CG and BP. JC, SR, MV and RM analized metabolites in fruits and contributed to the statistical analysis, and JC reviewed and edited the manuscript. All the authors aproved the final version of the manuscript.

IMPACTO DE PORTAINJERTOS DE *CUCURBITA* Y *CUCUMIS* SOBRE EL DESARROLLO Y  
LA CALIDAD DEL FRUTO DE MELÓN PIEL DE SAPO (*CUCUMIS MELO* L. SUBSP. *MELO* GRUPO *IBERICUS*)

INTRODUCCIÓN

El melón (*Cucumis melo* L.) pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, una de las familias de plantas más grandes y diversas, con un papel esencial en la alimentación humana (McCreigh, 2017). Se trata de un cultivo de gran impacto económico a nivel mundial, cuya demanda se ha incrementado, no así la superficie cosechada que se ha reducido de 1 061.000 a 1 047.000 hectáreas en los últimos cinco años. El rendimiento de cultivo a nivel mundial también ha aumentado de 23 a 26 toneladas por hectárea en 2010 y 2018 respectivamente (FAOSTAT, 2020). La producción mundial en 2018 alcanzó los 27 millones de toneladas (FAOSTAT, 2020), siendo China el principal país productor (12 millones de toneladas) y encontrándose España entre los diez países con mayor producción y rendimiento. Nuestro país es el mayor productor y exportador de Europa.

El mercado de las frutas y hortalizas genera importantes recursos para la economía de muchos países y por tanto los agricultores y empresas relacionadas con esta actividad asumen riesgos considerables para producir vegetales y frutas de alta calidad con costos de producción competitivos. Como otras especies cultivadas bajo un sistema intensivo, el cultivo de melón es altamente dependiente de la aplicación de grandes cantidades de insumos, agua, abonos y pesticidas, para conseguir una producción rentable. Cuando alguno de estos requerimientos no se cumple, distintos tipos de estrés biótico o abiótico pueden causar dramáticas reducciones en la cosecha. Esta realidad, sumada a otros factores ambientales y sociales, como los efectos del cambio climático en la agricultura y la demanda social de alimentos sanos obtenidos de forma sostenible, está motivando un cambio en los sistemas de producción convencionales, siendo necesario el desarrollo de nuevas herramientas para conseguir una rentabilidad adecuada con menos insumos.

El injerto puede ser una alternativa ya que se considera una estrategia adecuada para el manejo integrado de plagas y enfermedades (Louws et al., 2010; Kumar & Sanket, 2017), confiriendo tolerancia a estreses bióticos, pero también es una estrategia útil para incrementar la tolerancia a estreses abióticos, como las temperaturas extremas, la sequía o el exceso de sales en el suelo o agua de riego (Schwarz et al., 2010; Mohsenian & Roosta, 2015; Liu et al., 2016; Penella et al., 2017).

El injerto es una técnica antigua, usada comúnmente en especies leñosas, siendo su aprovechamiento en especies hortícolas a nivel comercial más reciente (Lee et al., 2010; Huang et al., 2015). Se practica en algunos de los cultivos más importantes de la familia de las Solanáceas [tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.)] y de las Cucurbitáceas [sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum e Nakai) y pepino (*Cucumis sativus* L.)] (Colla et al., 2017). El empleo de plantas injertadas de melón no ha tenido tanta aceptación como en el caso de la sandía o el pepino. No hay un consenso sobre los beneficios potenciales del injerto de melón debido a los resultados variables y a la existencia de información inconsistente (Edelstein et al., 2017).

Los resultados contradictorios obtenidos en trabajos diversos, han demostrado que la selección del portainjerto y de las combinaciones patrón-copa juega un papel esencial en el éxito de la planta injertada. Los patrones disponibles deben no solo ser compatibles con la variedad a injertar, sino proveerla de características de interés. Los patrones de *Cucurbita*, fundamentalmente los híbridos de *Cucurbita maxima* x Duchesne x *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir, cuyo uso está ampliamente difundido por su vigor y resistencias en sandía, parecen no ser tan adecuados en melón al influir en grados variables sobre la calidad de los frutos (Gisbert et al., 2016; Leonardi et al., 2017; Kyriacou et al., 2018). Por otra parte, estos híbridos no son resistentes a nematodos, y los problemas que causan estos patógenos se están viendo incrementados desde la prohibición del uso del bromuro de metilo. Esto ha conducido a los mejoradores a trabajar en el diseño de una nueva generación de portainjertos para melón, para lo cual se están evaluando distintas fuentes. Por un lado, el género *Cucurbita* es muy amplio y



hasta la fecha solo se ha explotado una pequeña parte de la variación del mismo (Paris, 2016). Aparte de las principales especies cultivadas, *C. pepo*, *C. maxima* y *C. moschata*, existe un gran número de especies silvestres con características de interés en cuanto a resistencia a estrés. Por otro lado, se puede aprovechar la diversidad existente dentro del género *Cucumis* y de la especie *C. melo* (Picó et al., 2016). El género *Cucumis* es una fuente de nuevos materiales promisorios, ya que especies como *Cucumis ficifolius* A. Rich, *Cucumis anguria* L., *C. myriocarpus* Naudin, *C. africanus* L.f., *C. pustulatus* Naudin ex Hook.f. o *Cucumis metuliferus* E. Mey. ex Naudin han sido identificadas como resistentes a *Fusarium* y a *Meloidogyne incognita* (Trionfetti Nisini et al., 2002; Matsumoto et al., 2011; Pofu et al., 2011; Matsumoto & Miyagi, 2012; Liu et al., 2015), resistencias difíciles de encontrar dentro de la especie *Cucumis melo*. Algunos estudios han evaluado patrones potenciales desarrollados a partir de algunas de estas especies, siendo *C. metuliferus* una de las más utilizadas (Trionfetti Nisini et al., 2002; Sigüenza et al., 2005; Liu et al., 2015; Gisbert et al., 2017; Expósito et al., 2018), pero hasta el momento este tipo de patrones no se han difundido. Además, en la mayoría de los casos el efecto de los mismos se ha estudiado con melones comerciales climatéricos de tipo cantalupo, o con otros melones comerciales, y no hay estudios detallados de su efecto sobre melones de tipo Piel de Sapo.

En el presente trabajo, se evalúa el potencial como portainjertos de melón de patrones experimentales y comerciales híbridos de distintas especies de *Cucurbita* y de *Cucumis*. Los patrones experimentales se desarrollaron previamente tras años de investigación en el grupo de Mejora de Cucurbitáceas del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana (COMAV). Se ha estudiado su efecto sobre el desarrollo de la planta, la floración, la producción y calidad del fruto de un melón tipo ‘Piel de Sapo’, la variedad más importante en el mercado español. La evaluación del impacto de los portainjertos sobre la calidad se complementa con un detallado estudio metabólico de azúcares, ácidos orgánicos y aromas, lo que proporciona una visión integral de las ventajas e inconvenientes del empleo de cada tipo de patrón para el cultivo de este tipo de melón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material Vegetal*

Los experimentos se llevaron a cabo durante 3 años de cultivo en dos localidades diferentes. Los dos primeros años, el cultivo se realizó durante la época de verano en la finca experimental de la empresa Rijk Zwaan (RZ) en Picassent (latitud 39°18'18,60"N longitud 0°26'52"O, 30 m.s.n.m) Valencia. El tercer ensayo se llevó a cabo en la misma época y condiciones similares de cultivo en una finca situada en Meliana (latitud 39° 31'22"N longitud 0°21'33"O, 15 m.s.n.m). Las semillas de los portainjertos y la variedad se pusieron a germinar bajo condiciones controladas en los viveros de la empresa "LA SALA", Murcia, quienes llevaron a cabo el injerto con la metodología de pua. Una vez hubo prendido el injerto y cuando las plantas injertadas mostraron dos hojas verdaderas completamente desarrolladas, fueron trasplantadas a los campos correspondientes. La variedad injertada fue todos los años la variedad comercial 'Finura' (RZ) de *C. melo* subsp. *melo* grupo *ibericus* tipo Piel de Sapo, utilizándose como patrones diversos híbridos intra o interespecíficos de los géneros *Cucurbita* o *Cucumis*. La Tabla 1 muestra las características de los patrones empleados cada año (se fueron descartando algunos de un año para otro según los resultados obtenidos). En los ensayos se emplearon como controles plantas de la variedad de Piel de Sapo autoinjertadas (SG) o no injertadas (NG).

### *Evaluación de campo*

En todos los casos se empleó un diseño de campo completamente al azar con cuatro bloques (4 plantas por bloque) por cada combinación patrón/variedad. Durante el ciclo de cultivo se registraron las siguientes variables: 1) Índice de Vigor (IV), puntuado visualmente en cada bloque en una escala de 0 a 4 (0 planta muerta o poco desarrollada–4 planta muy vigorosa); 2) Número total de flores en todas las plantas de cada bloque a los 10 días del transplante (10 DDT). Este parámetro fue muy laborioso de tomar, por lo que solo se tomó el primer año. El segundo y tercer año la floración se estimó visualmente mediante un Índice de Floración (IF), tomado a 30 y 40 DDT en 2016 y 2017 por bloque, en una escala de 0 a 3 (0 no hay flores–3 floración abundante); 3) Se permitió el cuajado de frutos por polinización libre mediada por insectos, contabilizándose el número de frutos totales por bloque y calculándose el promedio (NFT). En el

Tabla 1 ■ Portainjertos utilizados en los distintos ensayos de campo de Picassent 2015 y 2016, y Meliana 2017 (Valencia-España).

| CÓDIGO  | PARENTALES Y CARACTERÍSTICAS   | AÑO 1 | AÑO 2 | AÑO 3 |
|---|--|-------|-------|-------|
| <b>PORTAINJERTOS DE <i>CUCURBITA</i> SPP.</b> |  |       |       |       |
| Ma x Mo EF                                    | F1 ( <i>C. maxima</i> VAV1860 x <i>C. moschata</i> PI 550689).<br>Parentales con buena cruzabilidad y de floración abundante y temprana.   | x     | x     |       |
| Mo x Mo NL EF                                 | F1 ( <i>C. moschata</i> Nigerian Local x <i>C. moschata</i> PI 550689).<br>Parental multiresistente a virus y hongos, pero de floración tardía x Parental de floración abundante y temprana.   | x     | x     |       |
| Pe x Pe ZS                                    | F1 ( <i>C. pepo</i> subespecie <i>pepo</i> MU-CU-16 x <i>C. pepo</i> subespecie <i>ovifera</i> UPV196).<br>Parental Zucchini x Parental Scallop.   | x     | x     |       |
| Ma x Ec                                       | F1 ( <i>C. maxima</i> AFR-CU-1 x <i>C. ecuadorensis</i> PI 432442).<br>Parental compatible sexualmente con la especie silvestre <i>C. ecuadorensis</i> x Parental multiresistente a virus y hongos.  | x     | x     |       |
| Ma x Mo CO                                    | F1 ( <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i> ) RZ COBALT<br>Portainjerto híbrido <i>Cucurbita</i> comercial  | x     | x     | x     |
| <b>PORTAINJERTOS DE <i>CUCUMIS</i> SPP.</b>   |  |       |       |       |
| Met   | <i>C. metuliferus</i> BGV 11135<br>Parental resistente a nematodos y fusarium  | x     | x     | x     |
| Me x Ag                                       | F1 ( <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> grupo <i>ibericus</i> Piel de Sapo x <i>C. melo</i> subsp. <i>agrestis</i> grupo <i>chinensis</i> PAT81)<br>Parental Piel de Sapo x Parental resistente a <i>Monosporascus cannonballus</i> y con buena estructura de raíz. | x     | x     | x     |
| Me x Me SP                                    | F1 ( <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> x <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> ) RZ Sphinx tipo <i>cantalupensis</i> .<br>Portainjerto híbrido subespecie <i>melo</i> x subespecie <i>melo</i> comercial.  |       | x     | x     |
| Fi x An                                       | F1 ( <i>C. ficifolius</i> BGV12786 x <i>C. anguria</i> BGV 12795).<br>Parentales silvestres de <i>Cucumis</i> compatibles sexualmente y con resistencias múltiples a virus, hongos y nematodos   |       | x     | x     |
| Fi x My                                       | F1 ( <i>C. ficifolius</i> BGV12786 x <i>C. myriocarpus</i> BGV8535).<br>Parentales silvestres de <i>Cucumis</i> compatibles sexualmente y con resistencias múltiples a virus, hongos y nematodos.  |       | x     | x     |
| <b>CONTROLES</b>                              |  |       |       |       |
| NG-<br>No injertado                           | <i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i> grupo <i>ibericus</i> F1 Finura RZ comercial no injertada.  | x     | x     | x     |
| SG -<br>Autoinjertado                         | <i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i> grupo <i>ibericus</i> F1 Finura RZ comercial autoinjertada.   | x     | x     |       |

\*Las entradas PI fueron cedidas por el Banco de germoplasma USDA-NPGS, las VAV por el N.I. Vavilov All Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), las BGV, MU, AFR, Nigerian local y Pat 81 fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma del COMAV. Todas las entradas se fijaron por autofecundación en el COMAV y se almacenó la semilla en el Banco de germoplasma.

ensayo de 2015 el NFT se evaluó a 40 DDT, en 2016 a los 20, 30 y 40 DDT, y en 2017, debido a que las condiciones ambientales y el manejo retrasaron el ciclo del cultivo, se registró a los 40, 50, 60 y 70 DDT. Además de contar el número de frutos cuajados durante el cultivo al final del mismo se evaluó la producción total pesando los frutos recogidos. Los criterios para la recolección de los frutos de melón fueron: 1) Apariencia externa del fruto (cambio de color de fondo de un verde intenso a un verde oscuro mate, con tonos amarillos y cafés); 2) Incremento notable de los pequeños agrietamientos en la corteza, conocidos como escriturado; 3) Tiempo entre el transplante y maduración (mínimo 70 días); 4) Marchitamiento de la primera hoja sobre el fruto. En 2015, a los 60 DDT se obtuvo el peso total de un máximo de 8 frutos de tamaño comercial por bloque (un máximo de 32 por combinación), que fueron los empleados en la caracterización de frutos descrita posteriormente. En 2016 y en 2017, a los 60 y 80 DDT, respectivamente, se pesaron en campo todos los frutos cuajados para obtener la producción total por tratamiento. Se descartaron los de peso inferior a 1000 g, ° Brix por debajo de 10 y aquellos sobremaduros (dureza mesocarpio < 2) para obtener la producción comercial. La caracterización por calidad se llevó a cabo con todos los frutos recogidos en 2015, un máximo de 8 por bloque (32 por combinación), en una selección de 4 frutos por bloque (16 por combinación) seleccionados entre los de valor comercial en 2016 y en 8 frutos por bloque (32 por combinación) seleccionados entre los de valor comercial en 2017.

#### *Cosecha y parámetros de calidad*

Los frutos cosechados seleccionados por su calidad comercial, según lo indicado anteriormente, fueron transportados al laboratorio de Mejora de Cucurbitáceas del COMAV-UPV para caracterizar su calidad externa e interna. Para cada fruto, se evaluó el peso (g), el largo y ancho del fruto (mm), el ancho de la cavidad seminal (mm), el espesor del mesocarpio y corteza (mm), la dureza del mesocarpio y corteza ( $\text{kg cm}^{-2}$ ) (medido con un penetrómetro digital (8 mm) FHT-803<sup>®</sup>, Melrose, MA, USA), los sólidos solubles totales (cuantificados usando un refractómetro digital, Atago<sup>®</sup>, Tokyo, Japan), el pH (medido con papel indicador pH 1–14, Merck, Darmstadt, Germany) y el color del mesocarpio (medido con un colorímetro, Minolta CR-400, Ramsey, NJ, USA, usando los parámetros de color L, a y b). De cada fruto caracterizado, se obtuvo una sección transversal de 10 cm, centrada en el plano ecuatorial. Se descartaron las

semillas y la corteza y aproximadamente 2 cm del mesocarpio colindante. La sección del mesocarpio resultante se homogenizó (KRUPS KB720, Groupe Seb Iberica, Barcelona, Spain) y congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis. Con estas muestras se llevaron a cabo los análisis de azúcares y ácidos y de compuestos volátiles que se describen a continuación.

#### *Análisis de azúcares y ácidos*

Se determinó el contenido de los ácidos cítrico y málico y de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa. Para ello, se empleó el método descrito por Cebolla-Cornejo et al. (2012), basado en electroforesis capilar zonal, con un equipo de electroforesis capilar Agilent 7100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y el programa informático de control y análisis Agilent ChemStation software Revision B.04.03. Para las separaciones se empleó capilar de sílice fundida (Polymicro technologies, Phoenix, AZ, EE.UU.) con  $50\ \mu\text{m}$  de diámetro interno,  $363\ \mu\text{m}$  de diámetro externo, 67 cm de longitud total y 60 cm de longitud efectiva. Antes del primer uso, el capilar se acondicionó con sucesivos lavados a 20 psi (137,895 Pa) y  $50^{\circ}\text{C}$ : NaOH 1N durante 5 min, NaOH 0,1N durante 5 min, agua ultrapura durante 10 min. Posteriormente, se realizó un lavado a 20 psi y  $20^{\circ}\text{C}$  con tampón de separación durante 30 min. Las muestras se descongelaron en oscuridad y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se diluyó en una proporción 1:20 con agua ultrapura y la solución resultante se filtró a través de filtros de jeringa de acetato de celulosa de  $0,2\ \mu\text{m}$ . Cada muestra se analizó por duplicado. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: inyección de muestra por inyección hidrodinámica durante 10 segundos a 0,5 psi (3,44738 Pa); separación a voltaje constante de -25 KV y  $20^{\circ}\text{C}$  (tampón de separación compuesto por 20 mM de ácido 2,6-piridín dicarboxílico (PDC) y 0,1% de bromuro de hexadimetrina (HDM), con pH ajustado a 12,1 con NaOH 1N) y detección a 214 nm. El capilar se lavó entre cada inyección con una solución de SDS 60 mM durante 3 min, agua ultrapura durante 1 min y posteriormente con tampón de separación a 20 psi durante 2 min.

#### *Análisis de compuestos volátiles*

Para la extracción y análisis de volátiles se siguió el protocolo descrito por Fredes et al. (2016). La extracción se realizó empleando un dispositivo de purga y trampa

desarrollado al efecto (Beltran et al., 2006; Sales et al., 2017) para atrapar los volátiles en el espacio de cabeza, empleando cartuchos SPE comerciales (500 mg) como trampa. Antes del análisis, los cartuchos se acondicionaron con 5 mL de dietil eter (Et<sub>2</sub>O), seguido de 5 mL de n-hexano. Al final, se realizó un secado al vacío durante 10 minutos. La muestra para análisis se descongeló a temperatura ambiente y se pesaron 30 g que fueron introducidos en un matraz Erlenmeyer de 150 mL cerrado y con dos tubos de conexión. El tubo de entrada se conectó a una fuente de nitrógeno seco (N<sub>2</sub>) y el tubo de salida a la trampa. La extracción se llevó a cabo en agitación, con una temperatura de 40°C durante 49 min, con un flujo de nitrógeno de 1,6 L min<sup>-1</sup>. Cada cartucho se eluyó tras la extracción con 5 mL de Et<sub>2</sub>O /hexano (1:1, v/v), seguido de 5 mL de Et<sub>2</sub>O. El extracto se evaporó en un flujo suave de nitrógeno a 35°C, hasta un volumen final de 0,5 mL. El extracto resultante se separó en dos alícuotas y se mantuvo en congelación hasta el análisis.

Los volátiles presentes en la muestra se analizaron mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. Para ello, se utilizó un cromatógrafo Varian CP-3800 acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones (MS) Saturn 4000 (Varian). Para la separación se usó una columna capilar de 30 m×0.25 mm Supelcowax 10 de 0.25 µm de grosor, usando helio a flujo constante 1 mL min<sup>-1</sup> como gas portador. El programa de temperatura fue el siguiente: 40°C durante 5 min, ascenso a 160°C (4 °C min<sup>-1</sup>), ascenso a 250 °C (30°C min<sup>-1</sup>), etapa isotérmica final de 1 min. Se inyectó 1 µL de muestra (temperatura del puerto de inyección: 220°C), empleando un automuestreador Varian 8400. Las medidas de MS se realizaron en modo de escaneo completo (m/z rango de escaneo: 50 – 200 Da) utilizando ionización electrónica (70 eV) en modo positivo y configuración de ionización externa. Las temperaturas empleadas en las interfases GC-MS, trampa de iones y colector fueron 275°C, 190°C y 60°C, respectivamente. Para la identificación, se estudiaron los índices de retención (Tabla 2) usando soluciones estándar con n-alcenos (C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>) y siguiendo la fórmula de Kovats (1958). La cuantificación se realizó con calibración externa de patrones, empleando las áreas de pico para los iones de cuantificación seleccionados (Q) para cada compuesto. En aquellos casos en los que fue necesario obtener extractos diluidos se empleó una dilución en n-hexano.



TABLA 2 ■ Continuación.

| COMPUESTO                   | NÚMERO CAS | MW  | RT (MIN) | RI (SÚPERCOVAX 10) | QUANTION (M/Z) | LINEARITY RANGE (NG ML <sup>-1</sup> ) | r2    | DESCRIPCIÓN DEL AROMA                     |
|-----------------------------|------------|-----|----------|--------------------|----------------|--|-------|---|
| 2.6 (E)-2-Heptenal          | 18829-55-5 | 112 | 16.00    | 1235               | 83             | 42 – 2118                              | 1.000 | apple; fatty; green; green; spicy         |
| 2.7 (E)-2-Octenal           | 2548-87-0  | 126 | 19.05    | 1343               | 55             | 33 – 833                               | 0.999 | fatty; green; herbaceous                  |
| 2.8 (Z)-6-Nonenal           | 2277-19-2  | 140 | 19.75    | 1366               | 81             | 61 – 12260                             | 0.988 | cucumber; green; melon; waxy              |
| 2.9 (E)-2-Nonenal           | 18829-56-6 | 140 | 22.43    | 1450               | 81             | 49 – 9780                              | 0.982 | fatty; citrus                             |
| 2.10 (E)-2-Methyl-2-butenal | 497-03-0   | 84  | 7.32     | 1010               | 84             | 175 – 6998                             | 0.999 | green; fruity                             |
| 2.11 (E,E)-2,4-Heptadienal  | 4313-03-5  | 110 | 21.17    | 1408               | 81             | 22 – 2203                              | 1.000 |   |
| 2.12 (E,Z)-2,6-Nonadienal   | 557-48-2   | 138 | 23.95    | 1501               | 70             | 95 – 9460                              | 0.996 | cucumber; fatty; green; vegetable; violet |
| 2.13 (E,E)-2,4-Decadienal   | 25152-84-5 | 152 | 30.30    | 1727               | 81             | 22 – 2180                              | 0.996 | fatty; meaty; citrus                      |
| 2.14 Benzaldehyde           | 100-52-7   | 106 | 21.97    | 1436               | 105            | 26 – 2613                              | 1.000 |   |
| 2.15 Phenylacetaldehyde     | 122-78-1   | 120 | 25.59    | 1559               | 91             | 23 – 2260                              | 0.941 | chocolate; green; honey; hyacinth         |
| ESTERS                      |            |     |          |                    |                |  |       |   |
| 3.1 2-Methyl propyl acetate | 110-19-0   | 116 | 4.67     | 926                | 43             | 111 – 2765                             | 1.000 | apple; banana; ethereal; fruity; sweet    |
| 3.2 Butyl acetate           | 123-86-4   | 116 | 6.51     | 985                | 43             | 105 – 2616                             | 0.999 |   |
| 3.3 Octyl acetate           | 112-14-1   | 172 | 20.60    | 1391               | 43             | 58 – 2913                              | 1.000 | floral; fruity; sweet                     |
| 3.4 Benzyl acetate          | 140-11-4   | 150 | 28.04    | 1646               | 108            | 13 – 1250                              | 1.000 | fruity; floral; sweet                     |
| 3.5 Phenylethyl acetate     | 103-45-7   | 164 | 30.38    | 1734               | 104            | 25 – 2452                              | 1.000 | honey; floral; rose; sweet                |
| 3.6 Ethyl butanoate         | 105-54-4   | 116 | 5.94     | 947                | 71             | 265 – 2648                             | 1.000 | ethereal; fruity; pineapple; sweet        |
| 3.7 Ethyl-2-methyl butyrate | 7452-79-1  | 130 | 5.80     | 963                | 57             | 44 – 2173                              | 0.995 | apple; green                              |



TABLA 2 ■ Continuación.

| COMPUESTO | NÚMERO CAS              | MW  | RT (MIN) | RI (SUFELCO WAX 10) | QUAN ION (M/Z) | LINEARITY RANGE (NG ML <sup>-1</sup> ) | r <sup>2</sup> | DESCRIPCIÓN DEL AROMA       |
|-----------|-------------------------|-----|----------|---------------------|----------------|--|----------------|-----------------------------|
| KETONES   |                         |     |          |                     |                |  |                |                             |
| 4.1       | 6-Methyl-5-hepten-2-one | 126 | 15.99    | 1251                | 109            | 21 – 4260                              | 0.999          | apple; musty; fruity        |
| 4.2       | Geranylacetone          | 194 | 31.44    | 1773                | 43             | 44 – 4345                              | 0.997          | fresh; green; floral; rose  |
| 4.3       | Beta-Ionone             | 192 | 33.49    | 1856                | 177            | 24 – 2363                              | 0.999          | berry; floral; woody; sweet |

<sup>1</sup>Source: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

### *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos fueron analizados con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, E.E.U.U). Los efectos del injerto sobre los distintos parámetros estudiados, incluyendo la acumulación de azúcares y ácidos se analizaron mediante un t- test, comparando las medias de cada tratamiento con la media control, la media de los frutos de las plantas no injertadas (NG). En el caso de los volátiles, el efecto del injerto se estudió mediante análisis multivariante. Para ello, se analizaron los datos mediante MANOVA Biplot. En la representación gráfica del biplot se incluyeron círculos de Bonferroni para representar los intervalos de confianza ( $\alpha = 0.05$ ). La proyección de los círculos sobre el vector de cada variable permite aproximar una estima de la significación de las diferencias, si las proyecciones de dos tratamientos no se solapan. Para realizar este análisis se utilizó el software libre Multibiplot, licenciado por Vicente-Villardón (2015).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Efecto de los patrones sobre el desarrollo de la planta, la floración, cuajado y rendimiento comercial*

Las Figuras 1 y 2 muestran el efecto de los diferentes patrones en el desarrollo de las plantas de la variedad injertada de melón Piel de Sapo 'Finura'. El autoinjerto (SG) no alteró el vigor de la variedad en comparación con las plantas no injertadas (NG) los dos primeros años, no observándose diferencias significativas en el vigor de las plantas durante todo el ciclo de cultivo. El tercer año se utilizó sólo NG de control.

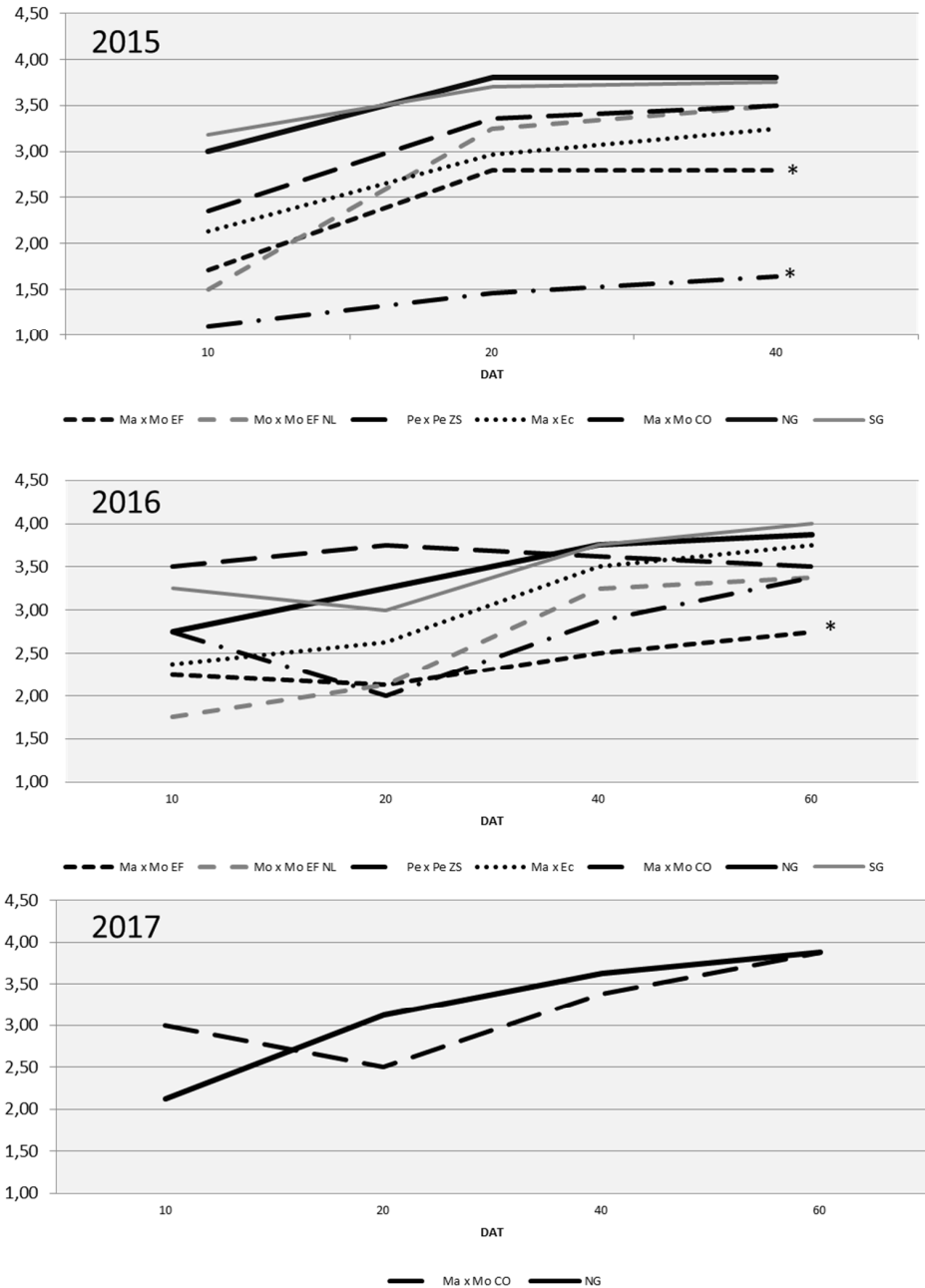
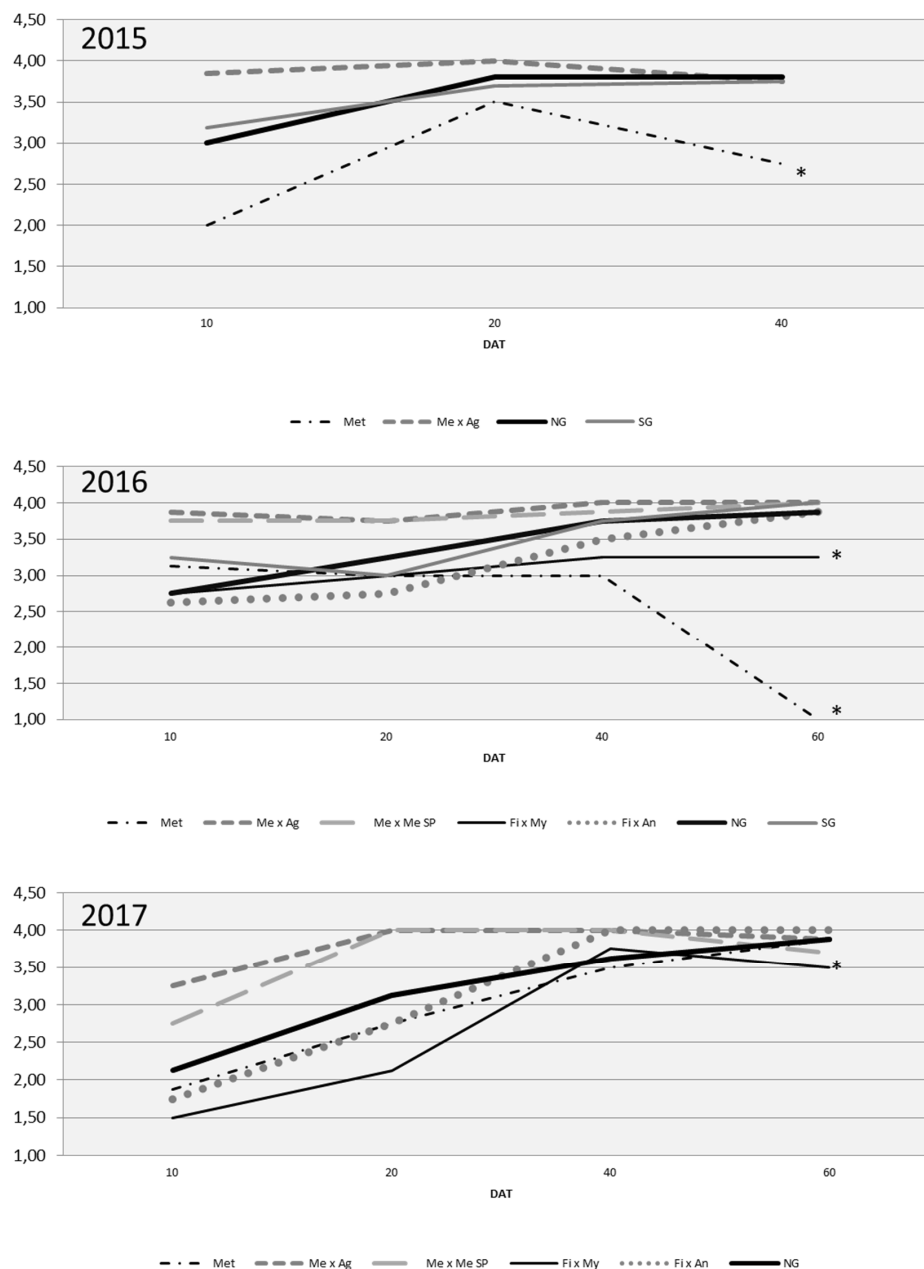


FIGURA 1 ■ Evolución del índice de vigor (IV), en los 3 años evaluados, de plantas de melón de tipo Piel de Sapo variedad 'Finura' injertadas sobre 4 patrones híbridos de *Cucurbita* spp. experimentales Ma x Mo EF, Mo x Mo NL EF, Pe x Pe ZS, Ma x Ec, el patrón comercial Ma x Mo CO, en comparación con plantas autoinjertadas (SG) y no injertadas (NG). Los asteriscos indican diferencias significativas en el vigor con respecto a NG en la última fecha evaluada.



**FIGURA 2** ■ Evolución del índice de vigor (IV), los 3 años evaluados, de plantas de melón tipo Piel de Sapo variedad 'F1 Finura' injertadas sobre 4 patrones experimentales de *Cucumis* spp, Met (*C. meluliferus*), Me x Ag (*C. melo* subsp *melo* grupo ibericus, PS, x *C. melo* subsp *agrestis* grupo chinensis, Pat 81), Fi x My (*C. ficifolius* x *C. myriocarpus*) y Fi x An (*C. ficifolius* x *C. anguria*) y el patrón comercial Me x Me SP (*Cucumis melo* subsp *melo* x *C. melo* subsp *melo* grupo cantalupensis) en comparación con plantas autoinjertadas (SG) y no injertadas (NG). Los asteriscos indican diferencias significativas en el vigor con respecto a NG en la última fecha evaluada.

En los dos años en los que se probaron diversos patrones de *Cucurbita*, se observó un retraso en el desarrollo temprano de las plantas para la mayoría de los patrones, siendo este efecto menor en el patrón comercial Ma x Mo CO, que se comportó de forma similar al control NG, tanto en 2016 como en 2017 (Figuras 1, 3). El patrón comercial ha sido seleccionado por su vigor, que se manifiesta desde el principio en las plantas injertadas, mientras que el resto de patrones se han seleccionado por otros motivos (floración temprana o resistencia a enfermedades), pero son menos vigorosos, observándose un menor vigor de las plántulas al inicio del ciclo. A pesar de este retraso en el desarrollo, la mayoría de plantas se desarrollaron adecuadamente y al llegar a la etapa de cuajado y desarrollo de fruto (entre 40 y 60 días tras el transplante), su vigor fue similar al de las plantas no injertadas (Figuras 1, 3). De forma consistente, los portainjertos experimentales híbridos de *C. moschata* Mo x Mo NL EF, y de *C. maxima* x *C. ecuadorensis*, Ma x Ec, se comportaron de forma similar al híbrido comercial Ma x Mo CO, aunque con menor vigor en el inicio del cultivo. Esta reducción del vigor, sin embargo, no conllevó un retraso significativo de la floración ni del cuajado en el caso del patrón Ma x Ec, cuya producción no difirió del patrón comercial Ma x Mo CO, ni de las plantas de melón no injertadas (Tabla 3, 4, 5). Sin embargo, el patrón Mo x Mo NL EF mostró resultados dispares en los dos años evaluados, con una floración y cuajados retrasados y una producción inferior a los anteriores en 2015.

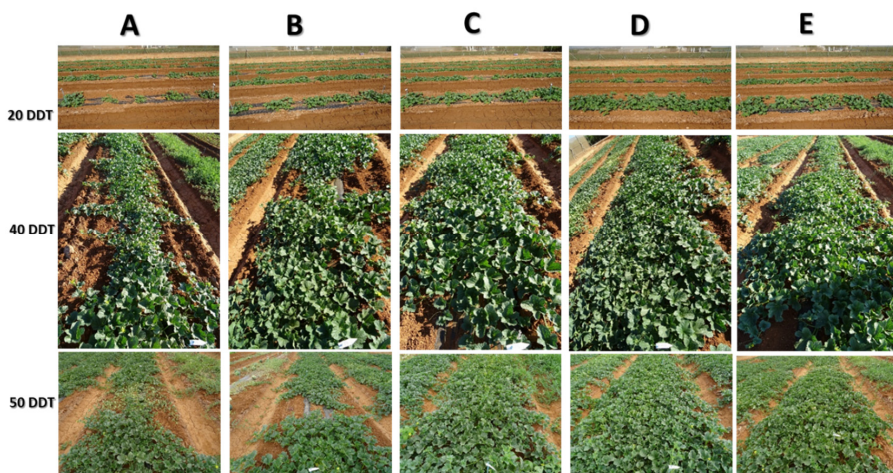


FIGURA 3 ■ Desarrollo vegetativo de plantas de melón tipo Piel de Sapo de la variedad 'F1 Finura' a 20, 40 y 50 DDT (días después del transplante) injertado sobre patrones híbridos de *Cucurbita* A) Ma x Mo EF, B) Pe x Pe ZS, C) Ma x Ec, D) Ma x Mo CO, y plantas de melón E) NG (no injertado) como control en 2016.

**TABLA 3** ■ Efecto del portainjerto sobre la floración de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura. Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado (NG).

| PATRÓN        | 2015                       | 2016                            | 2017                         |
|---------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|
|               | Nº TOTAL FLORES (10 DDT) * | ÍNDICE DE FLORACIÓN (30 DDT) ** | ÍNDICE DE FLORACIÓN (40 DDT) |
| Ma x Mo EF    | 11.5 *                     | 1.5 *                           | ne                           |
| Mo x Mo NL EF | 4.25 *                     | 2.30                            | ne                           |
| Pe x Pe ZS    | 6.5 *                      | 1.75                            | ne                           |
| Ma x Ec       | 20.8                       | 1.75                            | ne                           |
| Ma x Mo CO    | 38.3                       | 1.5 *                           | 3.0                          |
| Met           | 32.3                       | 2.00                            | 2.8                          |
| Me x Ag       | 46.0                       | 1.80                            | 3.0                          |
| Me x Me SP    | ne                         | 1.0 *                           | 2.5                          |
| Fi x My       | ne                         | 1.80                            | 3.0                          |
| Fi x An       | ne                         | 1.80                            | 3.0                          |
| NG            | 31.5                       | 2.50                            | 2.3                          |
| SG            | 38.0                       | 1.80                            | ne                           |

\*En 2015 se contó el número de flores femeninas y masculinas en las 4 plantas de cada bloque y se calculó la media de los 4 bloques.

\*\*En 2016 y 2017 se asignó a cada bloque un índice de floración, de 0 a 3, y se calculó la media de los 4 bloques.

**TABLA 4** ■ Efecto del portainjerto sobre el cuajado del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura. Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado.

| AÑO<br>PATRÓN | 2015          | 2016        | 2016        | 2016        | 2017        | 2017         | 2017         | 2017         |
|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
|               | NFT * (40DDT) | NFT (20DDT) | NFT (30DDT) | NFT (40DDT) | NFT (40DDT) | NFT (50 DDT) | NFT (60 DDT) | NFT (70 DDT) |
| Ma x Mo EF    | 10.0          | 3.3         | 7.0         | 9.5 *       | ne          | ne           | ne           | ne           |
| Mo x Mo NL EF | 3.0 *         | 1.0         | 6.5         | 9.5 *       | ne          | ne           | ne           | ne           |
| Pe x Pe ZS    | 6.0 *         | 1.3         | 7.0         | 10.0 *      | ne          | ne           | ne           | ne           |
| Ma x Ec       | 7.5           | 1.3         | 8.0         | 11.0        | ne          | ne           | ne           | ne           |
| Ma x Mo CO    | 13.5          | 4.5         | 9.8         | 14.5        | 1.3         | 4.8          | 11.3 *       | 14.0 *       |
| Met           | 11.0          | 3.3 *       | 7.8         | 10.0 *      | 0.0         | 4.8          | 16.0         | 20.5         |
| Me x Ag       | 8.8           | 2.5         | 10.3        | 14.0        | 1.0         | 5.5          | 13.8         | 18.0         |
| Me x Me SP    | ne            | 4.3 *       | 9.5         | 14.0        | 0.8         | 3.25 *       | 16.3         | 20.3         |
| Fi x My       | ne            | 1.5         | 10.8        | 16.8        | 0.0         | 6.3          | 16.5         | 19.8 *       |
| Fi x An       | ne            | 1.0         | 9.0         | 13.8        | 0.3         | 5.5          | 18.5         | 25.0         |
| NG            | 11.3          | 1.0         | 9.3         | 17.5        | 0.0         | 5.0          | 19.5         | 24.8         |
| SG            | 10            | 1.80        | 7.8         | 14.3        | ne          | ne           | ne           | ne           |

\*Se contó el número de frutos cuajados por polinización libre en las cuatro plantas de cada bloque y se calculó la media de los 4 bloques.

TABLA 5 ■ Efecto del portainjerto sobre la producción de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura.

| PATRÓN           | 2015<br>(60 DDT) |                 | 2016<br>(60 DDT) |            |                      | 2017<br>(80 DDT) |            |                   |
|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------|----------------------|------------------|------------|-------------------|
|                  | Nº<br>FRUTOS*    | PESO<br>TOTAL** | Nº<br>FRUTOS     | PESO TOTAL | PESO<br>COMERCIAL*** | Nº<br>FRUTOS*    | PESO TOTAL | PESO<br>COMERCIAL |
| Ma x Mo EF       | 32               | 73 258          | 39               | 83 210     | 81 378               | ne               | ne         | ne                |
| Mo x Mo NL<br>EF | 8                | 15 313          | 50               | 115 067    | 107 549              | ne               | ne         | ne                |
| Pe x Pe ZS       | 27               | 57 947          | 44               | 103 950    | 92 731               | ne               | ne         | ne                |
| Ma x Ec          | 31               | 60 090          | 43               | 95 848     | 94 049               | ne               | ne         | ne                |
| Ma x Mo CO       | 32               | 64 489          | 42               | 107 808    | 107 808              | 127              | 289 327    | 276 509           |
| Met              | 27               | 46 906          | 35               | 63 272     | 50 279               | 159              | 294 487    | 277 987           |
| Me x Ag          | 30               | 70 646          | 62               | 134 047    | 120 816              | 146              | 323 054    | 318 165           |
| Me x Me SP       | ne               | ne              | 52               | 111 672    | 107 448              | 101              | 186 672    | 182 960           |
| Fi x My          | ne               | ne              | 51               | 100 962    | 99 304               | 136              | 264 329    | 257 629           |
| Fi x An          | ne               | ne              | 50               | 102 077    | 91 633               | 169              | 327 305    | 314 114           |
| NG               | 32               | 75 544          | 68               | 138 517    | 129 332              | 165              | 320 632    | 314 750           |
| SG               | 31               | 77 382          | 52               | 116 867    | 111 099              | ne               | ne         | ne                |

\*Se indica el número de frutos recogidos y pesados al final del ciclo de cultivo en cada caso. El primer año no se recogieron todos los frutos, sino solo un máximo de 8 de tamaño comercial por bloque (un máximo de 32 por combinación), el segundo y el tercer año se recogieron y pesaron todos los frutos de cada bloque \*\* (producción total-g) y a continuación se descartaron por peso de fruto (< 1000 g), ° Brix (< 10 °) y sobremaduración (dureza mesocarpio < 2), pesándose los restantes \*\*\* (producción comercial-g).

Con los portainjertos experimentales híbridos de *C. maxima* x *C. moschata*, Ma x Mo EF, y de *C. pepo*, Pe x Pe ZS, se obtuvieron plantas menos vigorosas en los dos años evaluados (Figuras 1, 3). Este retraso en el desarrollo resultó en un retraso significativo en la floración y cuajado de frutos en las plantas injertadas sobre ambos patrones (Tabla 3, 4). Además, se vió afectada la producción, siendo estos dos patrones los que resultaron en producciones comerciales más bajas en comparación al resto de patrones de *Cucurbita* (Tabla 5). Por lo tanto, los resultados indican que dos de los patrones experimentales, obtenidos utilizando híbridos distintos a los habitualmente empleados de *C. maxima* x *C. moschata* pueden ser una alternativa en términos de compatibilidad y desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de melón de tipo Piel de Sapo.

El comportamiento de los patrones de *Cucumis* fue distinto al de los de *Cucurbita*, no observándose el retraso temprano en el desarrollo y llegando a equiparar al de las plantas no injertadas en el momento de la floración y cuajado de frutos (Figuras 2, 4). Las plantas injertadas sobre el patrón experimental híbrido de *C. melo* subsp. *melo* x subsp. *agrestis*, Me x Ag, y sobre el patrón comercial híbrido de *C. melo* subsp. *melo* x subsp. *melo*, Me x Me SP, se comportaron de forma similar en los 3 años evaluados, resultando en plantas tanto o más vigorosas que las no injertadas al principio del ciclo e igualmente vigorosas en el momento del cuajado. De la misma forma, no se observó un retraso en la floración ni en el cuajado de los frutos en comparación con las plantas no injertadas (Tabla 3, 4). La producción total y comercial recogida sobre las plantas injertadas en estos patrones fue similar a la de las plantas no injertadas o autoinjertadas (Tabla 5).

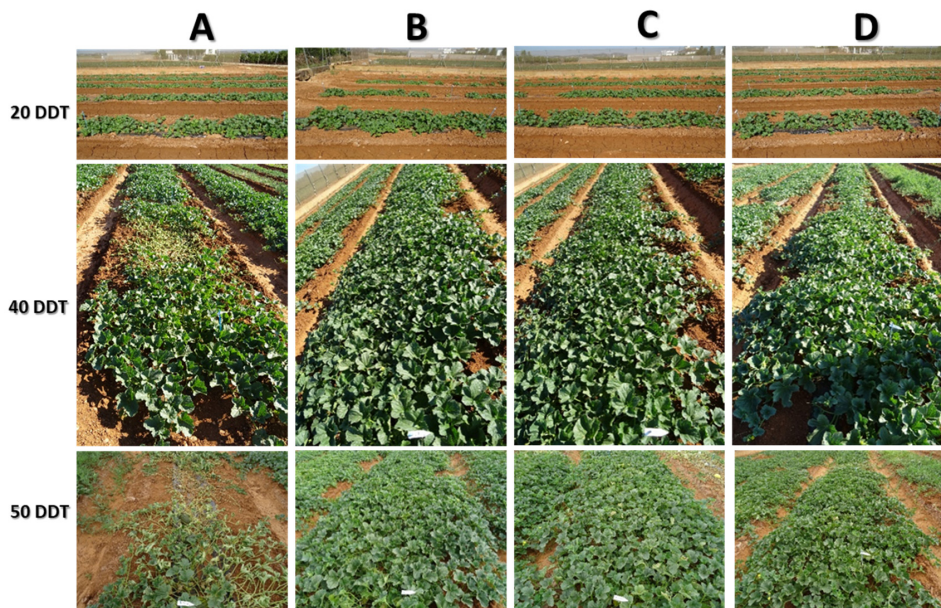


FIGURA 4 ■ Desarrollo vegetativo de la variedad híbrida F1 Finura de *Cucumis melo* subsp. *melo* grupo *inodorus* a 20, 40 y 50 DDT (días después del transplante) injertado sobre patrones de *Cucumis* spp. A) Me, B) Me x Ag, C) Me x Me SP, y plantas de melón D) NG (no injertado) como control en 2016.



En relación con los patrones derivados de especies silvestres, los dos híbridos Fi x An y Fi x My, se comportaron de forma similar los dos años evaluados, con un desarrollo similar al del control no injertado, aunque menor en el caso de Fi x My, que resultó en plantas significativamente menos vigorosas en el momento de la floración y cuajado de los frutos (Figuras 2, 4). De hecho, la producción de las plantas injertadas sobre este patrón fue en 2017 la menor en comparación con la de las plantas injertadas en los patrones de *Cucumis* evaluados (Tabla 5).

Los resultados del patrón de melón silvestre *C. metuliferus*, Met, fueron variables en los distintos años. Fue el patrón con plantas menos vigorosas a lo largo de todo el ciclo de cultivo en 2015, sufrió un colapso generalizado en el momento del cuajado y desarrollo de los frutos (entre los 40 y 60 días tras el transplante) en 2016 y, aunque mostró un retraso en el desarrollo temprano el tercer año, su comportamiento resultó similar al de las plantas no injertadas al final del ciclo de cultivo (Figuras 2, 4). El colapso fisiológico se observó únicamente en *C. metuliferus* en 2016 y debido al mismo sufrió una reducción a la mitad de la producción en comparación con el resto de los patrones, ya que la mayoría de las plantas murieron antes de finalizar el desarrollo de los frutos (Tabla 5). Este efecto puede ser debido al diferente desarrollo del patrón y la variedad, ya que al analizar las raíces y el sistema vascular, no se observó ninguna causa biótica para este colapso. En la Figura 5 se muestra la unión injerto-patrón. En general, se observa que la parte del patrón está más desarrollada que la de la variedad en todos los patrones de *Cucurbita*, en los patrones de *Cucumis* Me x Me y Me x Ag el desarrollo de patrón y variedad es similar, mientras que en los patrones silvestres, la variedad de Piel de Sapo se desarrolla más que el patrón, siendo este efecto mucho más acentuado en el patrón Met. Este desigual desarrollo puede conducir al colapso en condiciones de estrés y cuando la planta se encuentra en el momento de máximas necesidades hídricas y nutricionales como es el desarrollo final y la maduración de los frutos. Sin embargo, incluso con el mismo cultivar puede no aparecer en otras condiciones de cultivo. Así, por ejemplo, en un estudio anterior, se evaluó esta misma accesión de *C. metuliferus* con esta misma variedad, pero en cultivo hidropónico en túnel (Expósito et al., 2018) y no se observó

colapso, aunque si el desarrollo diferencial de variedad y patrón en la zona de la unión del injerto. El hecho de aportar agua de forma continuada en el cultivo hidropónico puede ser la causa por la que el colapso no aparece, en contraste con el riego a manta que se practicó en el ensayo de 2016. Además, el colapso también puede verse más acentuado por el tipo de variedad injertada. De hecho, este mismo patrón se empleó en ensayos anteriores (Gisbert et al., 2017), injertando una variedad de tipo cantalupo Charentais, menos vigorosa que la de Piel de Sapo que no provocó el colapso fisiológico.

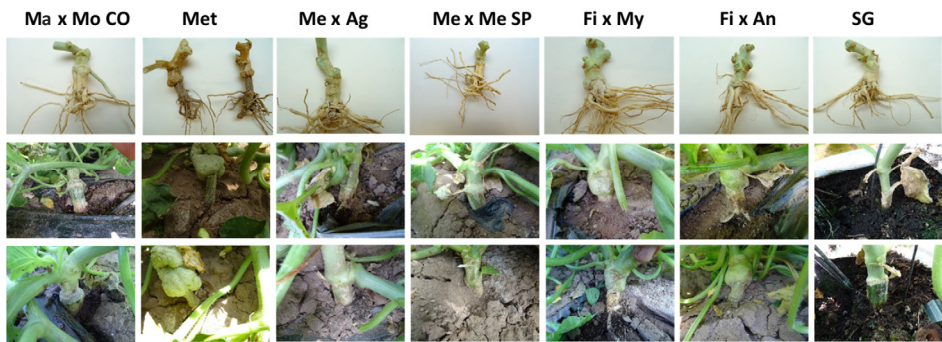


FIGURA 5 ■ Detalle de la unión injerto-patrón de plantas injertadas de la variedad F1 Finura sobre distintos patrones de calabaza y melón en comparación con la variedad autoinjertada (SG). Primera fila 2016, segunda y tercera 2017.

Por lo tanto, en cuanto a los patrones ensayados de *Cucumis*, los de *Cucumis melo* fueron los que presentaron un desarrollo de las plantas y una producción más parecida al control no injertado, y entre los silvestres, el híbrido Fi x An fue el que mostró un comportamiento más parecido a los patrones de melón, resultando el híbrido Fi x My en plantas algo menos vigorosas y productivas y siendo *C. metuliferus* el que mostró un patrón de comportamiento más desigual. Los resultados con *C. metuliferus* posiblemente son consecuencia del diferente desarrollo de esta especie silvestre en comparación con la variedad Piel de Sapo, mucho más vigorosa, además de la influencia de las condiciones de cultivo. Estos datos refuerzan la utilidad de la estrategia de incrementar el vigor de los patrones silvestres mediante la producción de híbridos interespecíficos.

### *Impacto sobre la calidad del fruto*

Las tablas 6, 7 y 8 muestran la caracterización de los frutos de la variedad Finura en los 3 años de ensayo. Como ocurrió con el desarrollo de las plantas, la floración y cuajado, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de calidad entre los frutos de las plantas NG y SG, lo que descarta que el injerto en si mismo sea el causante de los cambios observados. Sin embargo, alguno de los patrones si que tuvo efecto sobre la calidad del fruto. En 2015, hubo una previsión de lluvias torrenciales que obligó a recoger los frutos antes de tiempo. Aunque la mayoría de ellos ya habían alcanzado tamaño comercial, no habían mostrado su máximo potencial y las condiciones de maduración no eran las óptimas. De hecho, los grados brix variaron entre 8,57 (frutos desarrollado en el patrón de *Cucurbita* Pe x Pe ZS) y 10,42 (frutos desarrollados en el patrón de melón Me x Ag). La recolección anticipada de los frutos antes de llegar al punto de maduración óptimo, que tuvo que realizarse por condiciones meteorológicas adversas, reflejó valores atípicos de estas variables para este tipo de melón en nuestras condiciones de cultivo. Aun así, los frutos se caracterizaron, observándose diferencias en el peso y la forma del fruto en los producidos sobre algunos patrones de *Cucurbita* (Mo x Mo NL EF, Pe x Pe ZS, Ma x Ec y Ma x Mo CO) y sobre el patrón de *C. metuliferus*. En general, estos patrones resultaron en frutos algo más pequeños y en algunos casos de formas más redondeadas (Tabla 6). Puesto que los frutos no estaban totalmente maduros, esta diferencia de tamaños puede estar asociada a un retraso en el desarrollo y maduración de los frutos en estos patrones, consistentes con el retraso observado en el desarrollo de las plantas y, en algunos casos, en la floración y cuajado de los frutos, descrito anteriormente.

En 2016, el ensayo pudo finalizarse con éxito y los melones se recogieron en su punto adecuado de desarrollo y maduración (Grados Brix entre 10,89, patrón Met, y 13,59, patrón Ma x Mo CO) (Tabla 7). El efecto de reducción del tamaño del fruto observado en 2015 no se observó este año, en el que los frutos pudieron desarrollarse en su totalidad. De hecho, lo que se observó fue un claro incremento en el tamaño del fruto en prácticamente todos los patrones empleados de *Cucurbita* que desarrollaron frutos de mayor peso, todos ellos, a excepción de Ma x Ec, mostrando un incremento significativo de la anchura de la cavidad (Tabla 7; Figura Suplementaria 1). En general, los frutos recogidos en los patrones de *Cucurbita* fueron de formas más redondeadas.

Tabla 6 ■ Efecto del portainjerto sobre distintos parámetros asociados a la calidad del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2015). Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado.

| PATRÓN        | PESO (g)* | LARGO (MM) | ANCHO (MM) | FORMA (L/A) | ANCHO PIEL (MM) | ANCHO CARNE (MM) | ANCHO CAVIDAD (MM) | DUREZA CARNE | DUREZA PIEL | BRIX  | pH   | HI    | a     | b    |
|---------------|-----------|------------|------------|-------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------|-------------|-------|------|-------|-------|------|
| Ma x Mo EF    | 2334.60   | 222.53     | 151.67     | 1.47        | 5.39            | 35.91            | 67.76              | 3.88         | 12.79       | 9.83  | 5.35 | 68.33 | -1.59 | 8.84 |
| Mo x Mo NL EF | 1914.13*  | 202.13*    | 142.38     | 1.43        | 5.51            | 32.35*           | 67.30              | 4.50         | 12.84       | 9.49  | 5.38 | 69.44 | -1.51 | 8.91 |
| Pe x Pe ZS    | 2154.15   | 212.96*    | 149.35     | 1.43        | 5.51            | 34.10            | 69.84              | 3.74         | 12.87       | 8.57* | 5.40 | 68.39 | -2.01 | 9.3  |
| Ma x Ec       | 1938.39*  | 204.35*    | 139.48*    | 1.47        | 5.15            | 32.35*           | 64.84              | 4.34         | 12.65       | 9.09  | 5.27 | 68.17 | -1.77 | 9.12 |
| Ma x Mo CO    | 2035.93*  | 206.00*    | 150.67     | 1.38*       | 5.28            | 33.24*           | 67.72              | 4.39         | 12.82       | 9.79  | 5.27 | 68.64 | -1.84 | 8.87 |
| Met           | 1737.26*  | 196.96*    | 138.89*    | 1.42*       | 4.88            | 31.17*           | 67.07              | 4.29         | 12.86       | 9.11  | 5.33 | 69.24 | -1.89 | 9.28 |
| Me x Ag       | 2384.78   | 229.52     | 148.81     | 1.54        | 5.16            | 34.49            | 68.60              | 4.41         | 12.89       | 10.42 | 5.57 | 69.51 | -1.65 | 8.79 |
| Me x Me SP    | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne    | ne   | ne    | ne    | ne   |
| Fi x My       | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne    | ne   | ne    | ne    | ne   |
| Fi x An       | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne    | ne   | ne    | ne    | ne   |
| NG            | 2384.83   | 227.53     | 153.40     | 1.49        | 5.09            | 36.66            | 68.38              | 4.07         | 12.67       | 9.82  | 5.35 | 67.96 | -1.73 | 9.03 |
| SG            | 2496.19   | 226.26     | 154.52     | 1.47        | 5.62            | 35.48            | 71.99              | 4.29         | 12.79       | 10.49 | 5.35 | 69.80 | -1.69 | 9.20 |

\* Las variables de calidad de fruto son la media de un total de 32 frutos, 8 frutos por cada bloque, y un total de 4 bloques por cada combinación patrón-variedad.

**TABLA 7** ■ Efecto del portainjerto sobre distintos parámetros asociados a la calidad del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2016). Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado.

| PATRÓN       | PESO (g)* | LARGO (mm) | ANCHO (mm) | FORMA (L/A) | ANCHO PIEL (mm) | ANCHO CARNE (mm) | ANCHO CAVIDAD (mm) | DUREZA CARNE | DUREZA PIEL | Brix   | pH    | HI     | a      | b      |
|--------------|-----------|------------|------------|-------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------|-------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Ma x Mo EF   | 2702.69*  | 221.94     | 164.38*    | 1.35*       | 4.73            | 36.93            | 68.66*             | 1.99         | 13.00       | 12.44  | 5.97  | 68.56* | -2.40  | 9.52   |
| Mo x Mo NLEF | 2587.88   | 224.13     | 158.13     | 1.42*       | 4.33*           | 37.70            | 65.00*             | 2.24         | 13.00       | 11.53  | 5.59  | 68.23* | -2.02  | 9.44   |
| Pe x Pe ZS   | 2853.88*  | 234.63     | 163.44*    | 1.44        | 4.85            | 37.67            | 66.09*             | 1.83         | 13.00       | 11.16  | 5.38* | 65.91  | -2.36  | 9.17   |
| Ma x Ec      | 2687.06   | 230.00     | 157.50     | 1.46        | 5.65            | 39.44            | 61.59              | 1.72*        | 13.00       | 12.33  | 5.44  | 66.07  | -2.11* | 9.03   |
| Ma x Mo CO   | 2960.15*  | 237.13     | 162.81*    | 1.46        | 4.62            | 35.61            | 72.21*             | 2.24         | 13.00       | 13.59* | 5.97  | 64.99  | -1.87* | 9.26   |
| Met          | 2204.50   | 224.00     | 146.63     | 1.53        | 5.97*           | 31.95*           | 64.4*              | 2.08         | 13.00       | 10.89  | 5.78  | 66.66  | -2.36  | 9.64   |
| Me x Ag      | 2726.25*  | 233.69     | 158.63     | 1.47        | 5.74            | 37.57            | 66.39*             | 2.04         | 13.00       | 12.21  | 5.84  | 66.96* | -2.31  | 9.09   |
| Me x Me SP   | 2806.5*   | 241.38*    | 157.06     | 1.54        | 5.42            | 41.17            | 60.32              | 2.60         | 13.00       | 12.56  | 6.09* | 68.3*  | -2.89  | 11.56* |
| Fi x My      | 2351.94   | 224.50     | 146.31*    | 1.53        | 5.46            | 36.58            | 55.79              | 2.48         | 13.00       | 12.41  | 5.50  | 66.11  | -2.67  | 9.75   |
| Fi x An      | 2513.56   | 233.94     | 151.75     | 1.54        | 4.68            | 36.59            | 64.7*              | 3.26*        | 13.00       | 11.23  | 5.59  | 66.81  | -2.57  | 9.24   |
| NG           | 2502.27   | 227.44     | 153.06     | 1.49        | 5.13            | 39.01            | 57.63              | 2.15         | 13.00       | 11.93  | 5.75  | 63.65  | -2.63  | 9.42   |
| SG           | 2578.25   | 228.19     | 153.19     | 1.49        | 5.44            | 38.92            | 57.74              | 2.41         | 13.00       | 12.13  | 5.78  | 63.30  | -2.48  | 9.23   |

\* Las variables de calidad de fruto son la media de un total de 16 frutos, 4 frutos por cada bloque, y un total de 4 bloques por cada combinación patrón-variedad.

Tabla 8 ■ Efecto del portainjerto sobre distintos parámetros asociados a la calidad del fruto de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2017). Los asteriscos indican diferencias significativas de la media respecto a la media del cultivar no injertado.

| PATRÓN       | PESO (g)* | LARGO (MM) | ANCHO (MM) | FORMA (L/A) | ANCHO PIEL (MM) | ANCHO CARNE (MM) | ANCHO CAVIDAD (MM) | DUREZA CARNE | DUREZA PIEL | BRIX   | pH   | HI     | a     | b    |
|--------------|-----------|------------|------------|-------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------|-------------|--------|------|--------|-------|------|
| Ma x Mo EF   | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne     | ne   | ne     | ne    | ne   |
| Mo x Mo NLEF | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne     | ne   | ne     | ne    | ne   |
| Pe x Pe ZS   | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne     | ne   | ne     | ne    | ne   |
| Ma x Ec      | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne     | ne   | ne     | ne    | ne   |
| Ma x Mo CO   | 2484.44*  | 218.19     | 157.25*    | 1.39*       | 4.98            | 37.40            | 70.61*             | 2.51         | 12.90       | 14.15  | 5.92 | 64.79  | -2.44 | 8.91 |
| Met          | 2097.83   | 205.49     | 145.60     | 1.42        | 4.69            | 35.34            | 62.94              | 2.97         | 12.95       | 14.00  | 5.87 | 63.81  | -2.90 | 9.60 |
| Me x Ag      | 2627.17*  | 218.80     | 159.74*    | 1.39        | 4.96            | 36.87            | 72.38*             | 2.91         | 13.00       | 14.46  | 5.90 | 66.13* | -2.43 | 8.93 |
| Me x Me SP   | 2178.88   | 207.97     | 148.65     | 1.42        | 4.58            | 36.80            | 63.39              | 3.11         | 13.00       | 14.39  | 5.91 | 63.67  | -2.44 | 9.32 |
| Fi x My      | 2179.89   | 207.00     | 149.66     | 1.39        | 4.57            | 35.02*           | 67.12*             | 2.95         | 13.00       | 14.63  | 5.99 | 64.52  | -2.70 | 9.64 |
| Fi x An      | 2285.68   | 214.94     | 149.38     | 1.45        | 4.69            | 44.30            | 66.21*             | 2.55         | 13.00       | 15.46* | 5.96 | 63.15  | -2.12 | 9.07 |
| NG           | 2166.39   | 211.59     | 146.13     | 1.46        | 4.73            | 37.34            | 59.40              | 2.83         | 13.00       | 14.62  | 5.89 | 62.76  | -2.40 | 9.42 |
| SG           | ne        | ne         | ne         | ne          | ne              | ne               | ne                 | ne           | ne          | ne     | ne   | ne     | ne    | ne   |

\* Las variables de calidad de fruto son la media de un total de 32 frutos, 8 frutos por cada bloque, y un total de 4 bloques por cada combinación patrón-variedad.

Entre los patrones de *Cucumis* fueron los de melón los que resultaron en un mayor incremento del tamaño del fruto, frente a los silvestres, que desarrollaron frutos similares a NG y SG. En Me x Ag y Fi x An se observaron incrementos significativos del ancho de la cavidad seminal, aunque en todos los casos los efectos fueron menos pronunciados que los causados por los patrones de *Cucurbita* (Tabla 7; Figura Suplementaria 1). Este efecto se repitió en el ensayo de 2017 (Tabla 8; Figura Suplementaria 1), cuando el patrón comercial empleado como control (*Cucurbita* Ma x Mo Co) fue el que resultó en frutos de mayor tamaño, forma más redondeada y mayor anchura de la cavidad, con respecto a los patrones de *Cucumis*, entre éstos también fue consistente el aumento de tamaño en el patrón Me x Ag, mientras que entre los silvestres, fue el patrón Met el que resultó en los frutos más pequeños que los híbridos, siendo consistente la tendencia de Fi x My a desarrollar frutos de menor tamaño que los de las plantas injertadas en Fi x An. En ninguno de los dos años se observó un impacto negativo del portainjerto sobre el contenido en sólidos solubles, salvo en el patrón Met, que sufrió colapso fisiológico en 2016 y resultó en frutos significativamente menos dulces

Por lo tanto, nuestros estudios, realizados durante varios años en distintas condiciones de cultivo, detectan tendencias claras, pese a que existen algunos efectos variables de año a año, entre las que destacan el aumento del tamaño del fruto y, en menor medida, la alteración a formas más redondeadas, efectos que suelen ser más importantes en los patrones del género *Cucurbita*. (Figura suplementaria 1). El incremento del tamaño del fruto en melón como consecuencia del injerto se ha descrito también en otros trabajos. Por ejemplo, Verzera et al. (2014), obtuvieron frutos del cv. Inca (tipo inodorus) con un 10 % más de peso al injertar sobre los patrones interespecíficos de calabaza RZ841 y Polifemo. Sin embargo, se considera que tanto el aumento del fruto como la modificación de la forma no se producen de forma generalizada sino debido a interacciones específicas patrón-variedad (Kyriacou et al., 2018). En nuestro trabajo, estos efectos se han observado en cinco de los diez patrones evaluados, principalmente en los híbridos de *Cucurbita*. Todos los patrones experimentales de calabaza ensayados tuvieron un impacto similar al patrón comercial empleado de control, Ma x Mo CO,

pero no superior al mismo, resultando en frutos con características comerciales similares. Teniendo en cuenta conjuntamente el impacto en el desarrollo de la planta y la calidad del fruto, Ma x Ec presenta un comportamiento menos errático que el resto, pudiendo ser este híbrido de *C. maxima* x *C. ecuadorensis* una alternativa novedosa al híbrido *C. maxima* x *C. moschata* en el desarrollo de patrones para melón.

Sin duda el resultado de mayor interés es que de forma consistente los patrones de *Cucumis* causan un menor impacto en el tamaño y la forma del fruto, tanto los patrones de *C. melo* como los de especies silvestres del género *Cucumis*. Únicamente dos especies de este género, *C. metuliferus* (Trionfetti Nisini et al., 2002; Sigüenza et al., 2005; Kokalis-Burelle & Roskopf, 2011; Guan et al., 2014; Gisbert et al., 2017; Expósito et al., 2018) y *Cucumis pustulatus* Naudin Ex Hook. F. (Liu et al., 2015) han sido utilizados como patrones de melón. El interés de ambos radica principalmente en su resistencia a nematodos.

Los resultados obtenidos con *C. metuliferus* en este trabajo han mostrado que, en condiciones de campo, las combinaciones con *C. metuliferus* pueden sufrir colapso fisiológico ante determinadas variedades y condiciones de manejo del cultivo. Si bien, en la anualidad donde se pudieron colectar los frutos en estadio óptimo y no se observó colapso, las características de calidad fueron similares a las de las plantas no injertadas como habíamos observado con esta accesión de *C. metuliferus* en otros trabajos en condiciones de cultivo de invernadero y con variedades injertadas de tipo charentais (Gisbert et al., 2017; Expósito et al., 2018). En algunos trabajos donde se han utilizado otras accesiones de *C. metuliferus* si se ha reportado algún efecto negativo en la calidad de los frutos, como una reducción en la firmeza de la pulpa (Guan et al., 2014), aunque sólo en una de las dos variedades injertadas, y frutos con un menor contenido en sólidos solubles (Trionfetti Nisini et al., 2002).



En cuanto a los patrones híbridos derivados de los cruzamientos de *C. ficifolius* con *C. anguria* y *C. myriocarpus*, no se observó tanto impacto en el desarrollo de las plantas ni en la calidad del fruto. Se trata pues de patrones de gran interés ya que como en *C. metuliferus*, se ha encontrado resistencia a nematodos y a *Fusarium* en *C. ficifolius* y *C. anguria* (Trionfetti Nisini et al., 2002; Matsumoto, 2012; Matsumoto & Miyagi, 2012; Liu et al., 2015). En la presente tesis doctoral se incluyen trabajos adicionales de caracterización de estos patrones en el capítulo 2.

### *Impacto del injerto en el perfil metabólico*

#### *Azúcares y ácidos*

Para profundizar en el estudio del impacto del injerto sobre la calidad del fruto, se analizó el contenido en azúcares y ácidos de los frutos recolectados cada año (Tablas 9, 10, 11). A pesar de que los frutos no estaban en las mejores condiciones de calidad en el ensayo de 2015, se realizó también este año el análisis metabólico. En cuanto al perfil de ácidos, se analizó el contenido en los ácidos málico y cítrico, los dos más importantes que se encuentran en la pulpa del melón, no habiendo diferencias entre NG y SG. El contenido en ácido málico fue más variable que el de ácido cítrico. Por una parte, se incrementó con la maduración de los frutos, siendo el contenido muy bajo en los frutos inmaduros de 2015 y entre 3 y 4 veces superior en 2016 y 2017, respectivamente, coincidiendo con un mayor nivel de azúcares en los frutos. El contenido en ácido cítrico también fue inferior en 2015, aunque no sufrió un incremento tan importante como el del ácido málico, siendo similar en 2016 y 2017. No se observaron diferencias significativas en el contenido de los ácidos en la mayoría de los casos. Entre los patrones de calabaza fue el patrón Ma x Ec el que produjo frutos con menor contenido en ácidos, lo que puede ser una característica de este genotipo por su parental silvestre *C. ecuadorensis*. De hecho, estudios previos indican distinto contenido de ácido málico en distintas especies de *Cucurbita* (Nawirska-Olszańska et al., 2014). Entre los patrones de *Cucumis*, *C. metuliferus* fue el que produjo frutos con menor cantidad de ácido málico en 2016, cuando ocurrió el colapso y algunos frutos no llegaron a madurar correctamente. Posiblemente, este efecto esté relacionado con el menor grado de maduración de estos frutos, ya que en 2017 los frutos injertados

**TABLA 9** ■ Efecto del portainjerto sobre el contenido en ácidos orgánicos y azúcares de los frutos de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo F1 Finura (ensayo 2015). Se indica la media y el error estándar en cada caso.

| PATRÓN        | ACIDO* MÁLICO<br>G KG <sup>-1</sup> | ACIDO CÍTRICO<br>G KG <sup>-1</sup> | FRUCTOSA<br>G KG <sup>-1</sup> | GLUCOSA<br>G KG <sup>-1</sup> | SACAROSA<br>G KG <sup>-1</sup> | TOTAL AZÚCARES<br>G KG <sup>-1</sup> | EQUIVALENTES DE<br>SACAROSA<br>G KG <sup>-1</sup> |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| Ma x Mo EF    | 0.13±0.01                           | 2.27±0.23                           | 7.26±0.56                      | 7.57±0.44                     | 9.45±0.93                      | 24.28±2.94                           | 27.62±2.8   |
| Mo x Mo NL EF | 0.18±0.06                           | 2.30±0.18                           | 6.94±0.01                      | 7.98±0.66                     | 8.48±0.84                      | 23.4±3.64                            | 26.39±4.13  |
| Pe x Pe ZS    | 0.13±0.01                           | 2.20±0.10                           | 7.32±0.67                      | 8.48±0.38                     | 6.85±0.23                      | 22.66±1.41                           | 25.79±1.51  |
| Ma x Ec       | 0.10±0.01                           | 2.39±0.15                           | 6.78±0.78                      | 8.25±0.53                     | 8.98±0.94                      | 24.01±1.8                            | 26.81±1.94  |
| Ma x Mo CO    | 0.14±0.02                           | 2.50±0.14                           | 6.50±0.62                      | 7.73±0.50                     | 9.47±0.75                      | 23.7±2.15                            | 26.44±2.25  |
| Met           | 0.10±0.01                           | 2.34±0.21                           | 6.25±0.75                      | 7.94±0.58                     | 7.20±0.04                      | 21.38±1.62                           | 23.88±1.86  |
| Me x Ag       | 0.17±0.02                           | 2.56±0.18                           | 6.51±0.67                      | 7.60±0.44                     | 11.10±2.42                     | 24.47±2.23                           | 27.24±2.24  |
| SG            | 0.13±0.02                           | 2.50±0.19                           | 5.92±0.62                      | 7.65±0.54                     | 13.80±2.48                     | 27.37±2.75                           | 29.7±2.94   |
| NG            | 0.11±0.01                           | 2.31±0.18                           | 5.48±0.46                      | 6.99±0.59                     | 10.17±1.95                     | 22.64±2.18                           | 24.82±2.18  |

\* Se analizó un total de 8 frutos por cada combinación de patrón-variedad.

**TABLA 10** ■ Efecto del portainjerto sobre el contenido en ácidos orgánicos y azúcares de los frutos de la variedad injertada, el melón *Piel de Sapo F1 Finura* (ensayo 2016). Se indica la media y el error estándar en cada caso.

| PATRÓN        | ACIDO* MÁLICO<br>G KG <sup>-1</sup> | ACIDO CÍTRICO<br>G KG <sup>-1</sup> | FRUCTOSA<br>G KG <sup>-1</sup> | GLUCOSA<br>G KG <sup>-1</sup> | SACAROSA<br>G KG <sup>-1</sup> | TOTAL AZÚCARES<br>G KG <sup>-1</sup> | EQUIVALENTES DE<br>SACAROSA<br>G KG <sup>-1</sup> |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| Ma x Mo EF    | 0.29±0.02                           | 3.60±0.17                           | 20.90±1.00                     | 21.19±0.73                    | 34.86±2.53                     | 76.96±2.86                           | 86.71±3.16  |
| Mo x Mo NL EF | 0.32±0.02                           | 3.72±0.18                           | 22.92±1.27                     | 23.85±1.08                    | 31.54±2.46                     | 78.31±4.29                           | 88.85±4.87  |
| Pe x Pe ZS    | 0.32±0.04                           | 3.63±0.27                           | 20.31±1.73                     | 21.65±1.53                    | 28.36±3.30                     | 70.33±5.67                           | 79.53±6.43  |
| Ma x Ec       | 0.24±0.03                           | 2.96±0.29                           | 18.59±2.02                     | 18.26±2.05                    | 30.19±3.33                     | 67.04±7.20                           | 75.86±8.12  |
| Ma x Mo CO    | 0.27±0.02                           | 3.37±0.27                           | 19.70±1.44                     | 21.5±1.53                     | 35.63±3.29                     | 76.39±5.50                           | 85.30±6.07  |
| Met           | 0.20±0.02                           | 3.22±0.21                           | 23.16±1.28                     | 24.45±1.23                    | 26.77±4.51                     | 74.39±5.00                           | 84.94±5.38  |
| Fi x My       | 0.24±0.02                           | 3.46±0.23                           | 21.91±1.89                     | 22.02±1.84                    | 32.21±2.70                     | 76.14±6.16                           | 86.41±7.03  |
| Fi x An       | 0.29±0.03                           | 3.88±0.29                           | 19.16±0.75                     | 20.20±0.80                    | 34.45±2.10                     | 75.81±2.96                           | 84.55±3.23  |
| Me x Ag       | 0.30±0.03                           | 3.63±0.33                           | 18.98±1.25                     | 19.27±1.21                    | 34.09±3.87                     | 72.34±5.70                           | 81.19±6.18  |
| Me x Me SP    | 0.23±0.03                           | 3.00±0.32                           | 17.45±1.70                     | 18.09±1.81                    | 33.78±3.51                     | 69.32±6.81                           | 77.36±7.57  |
| SG            | 0.27±0.03                           | 3.76±0.35                           | 21.39±1.84                     | 22.0±71.70                    | 35.13±3.27                     | 78.58±5.83                           | 88.46±6.57  |
| NG            | 0.27±0.02                           | 3.66±0.15                           | 22.74±1.25                     | 23.35±1.19                    | 34.81±2.52                     | 80.67±3.61                           | 91.04±4.04  |

\* Se analizó un total de 8 frutos por cada combinación de patrón-variedad.

Tabla 11 ■ Efecto del portainjerto sobre el contenido en ácidos orgánicos y azúcares de los frutos de la variedad injertada, el melón Piel de Sapo FI Finura (ensayo 2017). Se indica la media y el error estándar en cada caso.

| PATRÓN     | ACIDO* MÁLICO<br>G KG <sup>-1</sup> | ACIDO CÍTRICO<br>G KG <sup>-1</sup> | FRUCTOSA<br>G KG <sup>-1</sup> | GLUCOSA<br>G KG <sup>-1</sup> | SACAROSA<br>G KG <sup>-1</sup> | TOTAL AZÚCARES<br>G KG <sup>-1</sup> | EQUIVALENTES DE<br>SACAROSA<br>G KG <sup>-1</sup> |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| Ma x Mo CO | 0.39±0.04                           | 3.62±0.16                           | 14.92±0.94                     | 16.09±0.68                    | 54.30±2.78                     | 85.32±3.12                           | 92.03±3.44  |
| Met        | 0.44±0.07                           | 3.42±0.15                           | 16.45±1.06                     | 17.60±0.77                    | 51.26±3.80                     | 85.31±4.72                           | 92.74±5.14  |
| Fi x My    | 0.38±0.01                           | 3.90±0.19                           | 15.60±0.79                     | 16.83±0.81                    | 59.62±3.37                     | 92.05±4.48                           | 99.06±4.78  |
| Fi x An    | 0.47±0.04                           | 3.89±0.18                           | 13.69±0.67                     | 15.27±0.64                    | 55.36±2.96                     | 84.32±3.74                           | 90.34±4.01  |
| Me x Ag    | 0.41±0.02                           | 3.48±0.15                           | 14.58±0.56                     | 16.43±0.39                    | 55.11±2.66                     | 86.12±2.85                           | 92.49±3.08  |
| Me x Me SP | 0.51±0.06                           | 3.45±0.11                           | 14.67±0.85                     | 16.52±0.75                    | 51.07±2.76                     | 82.26±3.44                           | 88.67±3.70  |
| NG         | 0.38±0.02                           | 3.65±0.13                           | 15.63±1.05                     | 16.81±0.81                    | 54.83±3.22                     | 87.27±3.83                           | 94.30±4.17  |

\* Se analizó un total de 8 frutos por cada combinación de patrón-variedad.

sobre el patrón Met, maduraron con normalidad y presentaron una acidez similar a la del resto de patrones de *Cucumis*. Entre los dos patrones derivados de la especie *C. ficifolius* de forma consistente Fi x My resultó en frutos de menor contenido en ácido málico que Fi x An. Los trabajos bibliográficos realizados con melón evalúan la acidez total, no habiéndose reportado cambios significativos como consecuencia del injerto (Kyriakou et al., 2018).

En relación con los azúcares, se evaluó el contenido en los 3 azúcares que determinan el dulzor del melón, glucosa, fructosa y sacarosa. El contenido en los 3 azúcares fue muy bajo en 2015 porque como se ha comentado se recogieron los frutos antes de su maduración completa. Las distintas condiciones climatológicas y de manejo del cultivo también resultaron en un mayor contenido en azúcares de los frutos recogidos en 2017 en comparación con los de 2016. De nuevo, no se observaron diferencias en el contenido en azúcares entre NG y SG, pero sí entre los frutos recogidos sobre distintos patrones. Los patrones Pe x Pe y Ma x Ec produjeron frutos con menor contenido total de azúcares, derivado de un menor contenido en sacarosa, con respecto a NG y al resto de patrones de calabazas. Los patrones de *Cucumis* no afectaron de forma importante al contenido en azúcares, aunque de forma consistente el patrón comercial Me x Me SP produjo frutos con un contenido total de azúcares ligeramente inferior al resto, y los frutos recogidos en plantas injertadas sobre el patrón Met, a pesar de que presentaron un contenido similar al resto en azúcares totales, sus concentraciones de glucosa y fructosa fueron superiores al resto, siendo inferior la de sacarosa. Este efecto, que podría estar asociado a la falta de maduración de los frutos en 2016, debido al colapso fisiológico, también se mantiene en 2017, cuando las plantas injertadas sobre este patrón se desarrollaron adecuadamente y los frutos maduraron con normalidad. La disminución en el contenido en sólidos solubles es un efecto común en plantas injertadas (Liu et al., 2010), pero no se ha observado con frecuencia en los trabajos de injerto de melón, aunque como se ha comentado anteriormente Trionfetti Nisini et al. (2002) reportan un menor contenido en sólidos solubles en melones injertados en *C. metuliferus*. Tampoco es frecuente que se aumente su contenido, aunque se ha descrito este efecto en algunos

trabajos empleando melones del grupo inodorus, como Honeydew y del grupo cantalupo, como Galia (Verzera et al., 2014; Soteriou et al., 2016). Nuestros resultados indican la ocurrencia de un cierto impacto sobre el contenido en ácidos y azúcares, diferencial entre patrones y no muy acusado, más dependiente del grado de maduración de los frutos que de la interacción patrón-variedad en sí.

La combinación de dulzor y acidez es esencial para el mantenimiento del sabor en los frutos de melón, cualquier alteración de estos parámetros puede tener consecuencias favorables o desfavorables sobre la calidad (Burger et al., 2003). El hecho de que la mayoría de los patrones no alteren el contenido en azúcares y ácidos orgánicos es positivo para el mantenimiento del sabor del melón Piel de Sapo injertado. Es necesario determinar cómo la reducción del contenido en ácido málico y el contenido o perfil de azúcares, observada en algunos patrones, puede alterar la percepción del sabor por parte del consumidor.

#### *Impacto del injerto sobre el perfil aromático*

Los años 2016 y 2017, cuando los frutos alcanzaron un punto óptimo de maduración, además del perfil metabólico de azúcares y ácidos se evaluó el perfil de compuestos volátiles. Aunque el melón de tipo Piel de Sapo no es climatérico y no presenta aroma externo, el mesocarpio (pulpa) es ligeramente aromático, dando lugar a frutos con un aroma característico valorado por los consumidores. Numerosos estudios previos analizan el aroma de la pulpa del melón (Obando-Ulloa et al., 2010; Bernillon et al., 2013; Gonda et al., 2016, 2018; Esteras et al., 2018), encontrando grandes diferencias entre los melones de maduración climatérica y no climatérica. El melón Piel de Sapo es un modelo de melón de maduración no climatérica, cuyo aroma se caracteriza por su riqueza en alcoholes y aldehídos y su bajo contenido en ésteres, que por otra parte son los compuestos que caracterizan el aroma de los melones climatéricos.

En los análisis llevados a cabo en 2016 se detectaron un total de 21 compuestos, de los cuales 8 fueron alcoholes, 11 fueron aldehídos y 2 fueron ésteres (Tablas 12, 13).

En los análisis de 2017, dado que se empleó una metodología de mayor sensibilidad, se amplió el número de alcoholes a 11 (detectándose el 1-Octanol, el 1 Decanol y el 2 feniletanol), se mantuvo el número de aldehídos (aunque en lugar de 1 –Octanal, se detectó (E)-2-metil-2-butenal), pero sobretodo se incrementó el número de ésteres detectados (detectándose además de los del año 2016, 2–Metilpropil acetato, Butil acetato, Bencil acetato, fenil-etil acetato) (Tabla 14). Esto es importante puesto que los ésteres son los compuestos más relacionados con el aroma a melón de los melones más aromáticos, normalmente melones de maduración climatérica.

En nuestro estudio, el aroma de la pulpa del melón Piel de Sapo no injertado se caracterizó por el contenido en alcohol, destacando el (Z)-3-nonen-1-ol, relacionado con olor a fresco y melón verde, y en aldehídos, destacando el contenido en hexanal, nonanal, (Z)-6-nonenal, (E)-2-nonenal y (E, Z)-2,6-nonadienal, relacionados con olor a herbáceo, fresco, verde, melón, a pepino o a melón honeydew. Los contenidos en ésteres fueron menores, según lo esperado, destacando el contenido en Etil butanoato y Etil-2-metil butirato, relacionados con aroma frutal, dulce, de manzana, piña o melón cantalupo (Tablas 12, 13, 14). El MANOVA Biplot mostrado en la Figura 6 A indica el efecto de los patrones de *Cucurbita* sobre el patrón de aromas del melón Piel de Sapo. La primera componente explica un 41,6% de la variación encontrada y la segunda un 19,56%. En general, los patrones de calabaza alteraron el patrón de volátiles del melón Piel de Sapo más que el patrón de melón Me x Ag. Es destacable que el menor efecto de estos patrones lo tuvo el patrón comercial Ma x Mo CO. Posiblemente, este patrón ha sido seleccionado entre muchos probados por la empresa por tener un efecto mínimo en el melón injertado y eso de forma indirecta lleva a un mantenimiento en el perfil de aromas. De hecho, este patrón modificó el perfil de aromas menos que el autoinjerto (SG). Al comparar los perfiles de los frutos de Piel de Sapo no injertado (NG) o autoinjertado (SG) analizados en 2016, se observó un incremento en el contenido de compuestos volátiles, fundamentalmente en aquellos alcoholes y aldehídos más importantes en este tipo de melón, manteniéndose en general las proporciones de los mismos (Tabla 12). El ligero efecto observado en el patrón Ma x Mo Co se tradujo

Tabla 12 ■ Compuestos volátiles detectados en pulpa de melones de la variedad F1 Finura Piel de Sapo recogidos sobre plantas injertadas en distintos patrones de *Cucurbita* en comparación con NG y SG (año 2016). Las características de cada compuesto están más detalladas en la Tabla 2.

| COMPUESTOS              | #    | M <sub>A</sub> x M <sub>O</sub> EF | M <sub>O</sub> x M <sub>O</sub> NL EF | P <sub>E</sub> x P <sub>E</sub> ZS | M <sub>A</sub> x E <sub>C</sub> | M <sub>A</sub> x M <sub>O</sub> CO | M <sub>E</sub> x A <sub>G</sub> | SG     | NG     |
|-------------------------|------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------|--------|
| 1-Pentanol              | 1.1  | 3.16*                              | 3.93                                  | 3.27                               | 2.30                            | 2.67                               | 3.23                            | 2.75   | 2.68   |
| 1-Hexanol               | 1.2  | 6.02                               | 9.83                                  | 5.66                               | 4.35                            | 5.88                               | 6.50                            | 4.09   | 5.64   |
| 1-Nonanol               | 1.4  | 26.33                              | 30.21                                 | 11.13                              | 11.43                           | 15.46                              | 23.14                           | 15.23  | 15.90  |
| (Z)-3-Hexen-1-ol        | 1.6  | 10.24                              | 12.51                                 | 10.02                              | 12.54                           | 14.04                              | 13.44                           | 12.71  | 9.29   |
| (Z)-3-Nonen-1-ol        | 1.7  | 95.72                              | 96.10                                 | 77.51                              | 116.65                          | 84.50                              | 120.26                          | 134.79 | 111.31 |
| (Z)-6-Nonen-1-ol        | 1.8  | 27.25                              | 28.82                                 | 7.62                               | 8.18                            | 12.85                              | 22.98                           | 13.20  | 13.89  |
| (E,Z)-2,6-Nonadien-1-ol | 1.9  | 10.25                              | 6.18                                  | 6.09                               | 6.15                            | 4.50                               | 11.03                           | 10.26  | 5.35   |
| Benzyl Alcohol          | 1.10 | 11.88                              | 9.54                                  | 5.70                               | 6.19                            | 9.98                               | 11.88                           | 8.37   | 7.84   |
| Hexanal                 | 2.1  | 21.10                              | 18.83                                 | 23.56                              | 20.73                           | 25.86                              | 25.97                           | 26.72  | 22.12  |
| Heptanal                | 2.2  | 2.16                               | 2.17                                  | 2.48                               | 1.83                            | 2.56                               | 2.65                            | 2.58   | 2.30   |
| Octanal                 | 2.3  | 2.49                               | 2.36                                  | 2.81                               | 2.09                            | 2.52                               | 2.75                            | 2.69   | 2.53   |
| Nonanal                 | 2.4  | 35.05                              | 23.77                                 | 32.93                              | 35.43                           | 35.85                              | 40.80                           | 44.91  | 37.86  |
| (E)-2-Heptenal          | 2.6  | 1.99                               | 2.19                                  | 3.00                               | 1.94                            | 2.09                               | 2.43                            | 2.82   | 2.37   |
| (Z)-6-Nonenal           | 2.8  | 55.75                              | 40.27                                 | 44.69                              | 45.76                           | 51.83                              | 58.96                           | 59.38  | 53.31  |
| (E)-2-Nonenal           | 2.9  | 6.30                               | 4.01                                  | 11.73                              | 7.56                            | 5.99                               | 9.28                            | 9.92   | 7.05   |
| (E,E)-2,4-Hepadienal    | 2.11 | 2.97                               | 2.75                                  | 5.31                               | 2.98                            | 3.73                               | 3.33                            | 3.61   | 3.08   |
| (E,Z)-2,6-Nonadienal    | 2.12 | 30.22                              | 14.06                                 | 56.20                              | 38.79                           | 26.65                              | 40.93                           | 44.47  | 31.70  |
| Benzaldehyde            | 2.14 | 2.17                               | 1.98                                  | 2.19                               | 2.11                            | 2.38                               | 3.25                            | 2.35   | 3.83   |
| Phenylacetaldehyde      | 2.15 | 0.72                               | 0.61                                  | 0.66                               | 0.55                            | 0.93                               | 1.12                            | 0.90   | 0.67   |
| Ethyl butanoate         | 3.6  | 7.96                               | 7.75                                  | 7.81                               | 6.82                            | 6.83                               | 8.83                            | 8.60   | 8.37   |
| Ethyl-2-methyl butyrate | 3.7  | 24.20                              | 20.07                                 | 18.99                              | 15.96                           | 16.98                              | 20.53                           | 19.07  | 17.51  |

\*Los valores indican el promedio de ocho frutos seleccionados por cada combinación patrón-variedad.



Tabla 13 ■ Compuestos volátiles detectados en pulpa de melones de la variedad F1 Finura Piel de Sapo recogidos sobre plantas injertadas en distintos patrones de *Cucumis* en comparación con NG y SG y con el patrón de *Cucurbita* Ma x Mo CO (año 2016). Las características de cada compuesto están más detalladas en la Tabla 2.

| COMPUESTOS              | #    | MA x Mo CO | MET   | Fi x My | Fi x AN | ME x AG | ME x ME SPHNX | SG     | NG     |
|-------------------------|------|------------|-------|---------|---------|---------|---------------|--------|--------|
| 1-Pentanol              | 1.1  | 2.67*      | 2.49  | 2.24    | 3.28    | 3.23    | 2.62          | 2.75   | 2.68   |
| 1-Hexanol               | 1.2  | 5.88       | 7.27  | 6.36    | 6.56    | 6.50    | 8.08          | 4.09   | 5.64   |
| 1-Nonanol               | 1.4  | 15.46      | 20.22 | 18.62   | 19.66   | 23.14   | 22.58         | 15.23  | 15.90  |
| (Z)-3-Hexen-1-ol        | 1.6  | 14.04      | 11.96 | 14.03   | 7.89    | 13.44   | 9.54          | 12.71  | 9.29   |
| (Z)-3-Nonen-1-ol        | 1.7  | 84.50      | 81.37 | 126.39  | 66.89   | 120.26  | 104.70        | 134.79 | 111.31 |
| (Z)-6-Nonen-1-ol        | 1.8  | 12.85      | 14.05 | 12.59   | 16.76   | 22.98   | 22.15         | 13.20  | 13.89  |
| (E,Z)-2,6-Nonadien-1-ol | 1.9  | 4.50       | 8.60  | 7.69    | 9.69    | 11.03   | 5.54          | 10.26  | 5.35   |
| Benzyl Alcohol          | 1.10 | 9.98       | 5.22  | 7.79    | 5.61    | 11.88   | 8.29          | 8.37   | 7.84   |
| Hexanal                 | 2.1  | 25.86      | 28.43 | 31.49   | 20.24   | 25.97   | 14.96         | 26.72  | 22.12  |
| Heptanal                | 2.2  | 2.56       | 1.78  | 2.63    | 1.59    | 2.65    | 1.71          | 2.58   | 2.30   |
| Octanal                 | 2.3  | 2.52       | 1.93  | 2.61    | 2.08    | 2.75    | 1.79          | 2.69   | 2.53   |
| Nonanal                 | 2.4  | 35.85      | 35.93 | 51.02   | 30.45   | 40.80   | 19.72         | 44.91  | 37.86  |
| (E)-2-Heptenal          | 2.6  | 2.09       | 2.20  | 2.53    | 2.34    | 2.43    | 1.66          | 2.82   | 2.37   |
| (Z)-6-Nonenal           | 2.8  | 51.83      | 50.27 | 70.70   | 44.47   | 58.96   | 29.04         | 59.38  | 53.31  |
| (E)-2-Nonenal           | 2.9  | 5.99       | 7.88  | 10.35   | 11.65   | 9.28    | 2.89          | 9.92   | 7.05   |
| (E,E)-2,4-Heptadienal   | 2.11 | 3.73       | 4.07  | 3.76    | 3.39    | 3.33    | 2.00          | 3.61   | 3.08   |
| (E,Z)-2,6-Nonadienal    | 2.12 | 26.65      | 31.95 | 46.89   | 44.90   | 40.93   | 8.21          | 44.47  | 31.70  |
| Benzaldehyde            | 2.14 | 2.38       | 1.63  | 2.85    | 1.58    | 3.25    | 2.27          | 2.35   | 3.83   |
| Phenylacetaldehyde      | 2.15 | 0.93       | 1.10  | 1.18    | 0.53    | 1.12    | 0.73          | 0.90   | 0.67   |
| Ethyl butanoate         | 3.6  | 6.83       | 8.37  | 7.75    | 8.40    | 8.83    | 7.12          | 8.60   | 8.37   |
| Ethyl-2-methyl butyrate | 3.7  | 16.98      | 19.15 | 22.89   | 17.25   | 20.53   | 19.30         | 19.07  | 17.51  |

\*Los valores indican el promedio de ocho frutos seleccionados por cada combinación patrón-variedad.

fundamentalmente en un descenso en el contenido del principal alcohol, (Z)-3-nonen-1-ol (Tablas 12, 14). La menor cantidad de este alcohol fue una característica de los frutos recogidos en plantas injertadas sobre patrones de calabaza, a excepción de los recogidos sobre el patrón Ma x Ec, encontrándose la mayor reducción en el patrón Pe x Pe ZS (Tabla 12). Este descenso también fue observado previamente por Verzera et al. (2014), cuando estudio el efecto de distintos patrones híbridos de *C. maxima* x *C. moschata* sobre el aroma del melon Honey Dew, perteneciente también al grupo de melones no climatéricos. En nuestro trabajo determinamos que este efecto se observa también en un patrón híbrido de la especie *C. pepo*, pero no es tan acusado en un híbrido con la especie silvestre *C. ecuadorensis*. Como este es un compuesto clave en el aroma del Melón Piel de Sapo, será necesario ver como este descenso afecta a la percepción del aroma por parte de los consumidores. Los patrones de *Cucurbita* que mayor efecto causaron sobre el aroma del melón Piel de Sapo fueron Ma x Mo EF y Mo x Mo NL EF. Los frutos recogidos en plantas injertadas sobre estos patrones destacaron por su elevado contenido en alcoholes como el 1 nonanol y el (Z)-6-nonen-1-ol. Cabe destacar que este último compuesto se relaciona con aroma a calabaza, y en un trabajo previo en el que se analizó el impacto de los patrones de *Cucurbita* sobre el aroma de la sandía (*Citrullus lannatus*) se observó también un incremento en este compuesto en los frutos de plantas injertadas sobre patrón de *Cucurbita* frente a los injertados sobre patrón de *Citrullus* (Verzera et al., 2014; Fredes et al., 2017). El hecho de que estos dos patrones tengan un parental común de *C. moschata* (PI 550689) distinto al del patrón comercial puede estar indicando un efecto de la variedad, pero además el hecho de que el efecto sobre el incremento de este alcohol sea mayor en Mo x Mo NL EF, híbrido entre *C. moschata* x *C. moschata*, que en Ma x Mo EF, híbrido entre *C. maxima* x *C. moschata*, (Figura 6 A; Tabla 12), también sugeriría un efecto de la especie *C. moschata*. En cualquier caso, será necesario determinar si estas alteraciones causan un efecto real sobre la percepción del aroma por parte de los consumidores.

El efecto de los patrones de *Cucumis* sobre el patrón de aromas del melón Piel de Sapo fue inferior al de los patrones de *Cucurbita* (Tablas 13, 14). En las Figuras 6 B

Tabla 14 ■ Compuestos volátiles detectados en pulpa de melones de la variedad F1 Finura Piel de Sapo recogidos sobre plantas injertadas en distintos patrones de *Cucumis* en comparación con NG y SG y con el patrón de *Cucurbita* Ma x Mo CO (año 2017). Las características de cada compuesto están más detalladas en la Tabla 2.

| COMPUESTOS              | #    | MA x Mo CO | MET   | Fix My | Fix An | ME x ME SPHNX | ME x AG | NG    |
|-------------------------|------|------------|-------|--------|--------|---------------|---------|-------|
| 1-Pentanol              | 1.1  | 2.64*      | 2.19  | 2.26   | 2.36   | 1.92          | 2.23    | 2.64  |
| 1-Hexanol               | 1.2  | 8.59       | 11.29 | 13.24  | 13.98  | 9.63          | 8.74    | 13.66 |
| 1-Octanol               | 1.3  | 1.21       | 1.30  | 1.54   | 0.94   | 0.96          | 0.74    | 0.83  |
| 1-Nonanol               | 1.4  | 8.61       | 8.24  | 17.28  | 13.19  | 18.56         | 8.58    | 12.08 |
| 1-Decanol               | 1.5  | 0.06       | 0.39  | 0.63   | 0.20   | 0.37          | 0.96    | 0.00  |
| (Z)-3-Hexen-1-ol        | 1.6  | 14.63      | 11.23 | 17.28  | 15.40  | 13.19         | 8.97    | 13.68 |
| (Z)-3-Nonen-1-ol        | 1.7  | 60.59      | 55.51 | 97.45  | 71.00  | 95.43         | 60.67   | 83.13 |
| (Z)-6-Nonen-1-ol        | 1.8  | 7.09       | 9.42  | 25.53  | 19.25  | 24.15         | 9.13    | 13.57 |
| (E,Z)-2,6-Nonadien-1-ol | 1.9  | 1.02       | 1.20  | 2.18   | 1.96   | 3.47          | 1.65    | 2.38  |
| Benzyl Alcohol          | 1.10 | 4.44       | 3.41  | 3.01   | 4.88   | 3.28          | 2.57    | 2.95  |
| 2-phenylethanol         | 1.11 | 2.49       | 1.46  | 1.44   | 2.05   | 1.15          | 1.13    | 1.24  |
| Hexanal                 | 2.1  | 24.45      | 12.92 | 15.37  | 12.80  | 12.61         | 12.58   | 14.24 |
| Heptanal                | 2.2  | 2.99       | 1.65  | 2.18   | 1.42   | 1.98          | 1.63    | 1.86  |
| Nonanal                 | 2.4  | 15.47      | 11.12 | 9.68   | 8.94   | 13.09         | 10.14   | 11.58 |
| (E)-2-Heptenal          | 2.6  | 0.41       | 1.01  | 0.25   | 0.27   | 0.39          | 0.67    | 0.98  |
| (Z)-6-Nonenal           | 2.8  | 15.27      | 8.58  | 10.76  | 8.17   | 17.70         | 10.18   | 11.31 |
| (E)-2-Nonenal           | 2.9  | 3.60       | 3.98  | 0.49   | 1.91   | 1.61          | 2.72    | 2.07  |
| (E)-2-methyl-2-butenal  | 2.10 | 4.40       | 2.93  | 2.80   | 2.90   | 2.82          | 2.99    | 3.94  |
| (E,E)-2,4-Heptadienal   | 2.11 | 2.15       | 1.52  | 2.05   | 2.00   | 1.76          | 1.13    | 1.89  |
| (E,Z)-2,6-Nonadienal    | 2.12 | 9.85       | 11.87 | 2.85   | 5.85   | 7.20          | 10.33   | 8.46  |
| (E,E)-2,4-Decadienal    | 2.13 | 0.25       | 0.12  | 0.05   | 0.22   | 0.09          | 0.06    | 0.18  |
| Benzaldehyde            | 2.14 | 6.23       | 3.76  | 3.93   | 4.22   | 4.10          | 3.31    | 4.98  |

TABLA 14 ■ Continuación.

| COMPUESTOS              | #    | MA X Mo CO | MET   | FIX My | FIX AN | ME X ME SPHIX | ME X AG | NG   |
|-------------------------|------|------------|-------|--------|--------|---------------|---------|------|
| Phenylacetaldehyde      | 2.15 | 6.41       | 1.67  | 2.59   | 2.42   | 1.34          | 1.14    | 0.17 |
| 2-Methyl propyl acetate | 3.1  | 5.34       | 23.02 | 6.89   | 7.50   | 2.87          | 3.39    | 5.14 |
| Butyl acetate           | 3.2  | 1.05       | 3.43  | 1.06   | 0.97   | 0.25          | 0.62    | 1.14 |
| Benzyl acetate          | 3.4  | 1.22       | 12.94 | 0.93   | 3.17   | 1.06          | 2.25    | 1.76 |
| Phenylethyl acetate     | 3.5  | 0.34       | 0.50  | 0.04   | 0.40   | 0.10          | 0.31    | 0.10 |
| Ethyl butanoate         | 3.6  | 4.27       | 6.51  | 5.56   | 3.70   | 4.42          | 4.56    | 7.15 |
| Ethyl-2-methyl butyrate | 3.7  | 1.49       | 2.08  | 0.03   | 1.22   | 0.98          | 0.33    | 0.00 |
| Geranylacetone          | 4.2  | 1.01       | 1.07  | 1.30   | 0.85   | 0.73          | 1.51    | 0.98 |

\*Los valores indican el promedio de ocho frutos seleccionados por cada combinación patrón-variedad.

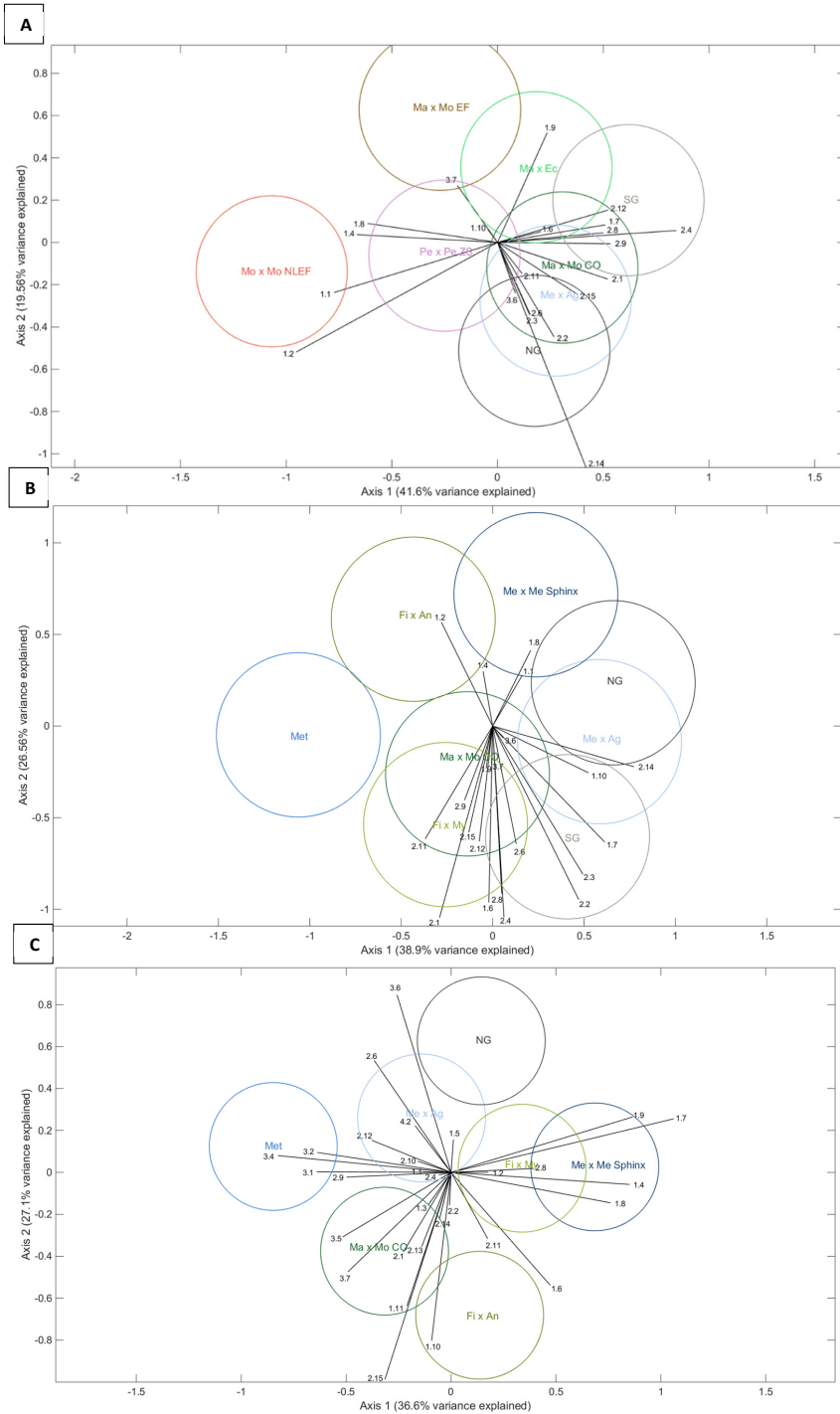


FIGURA 6 ■ Representación del análisis MANOVA realizado con los compuestos volátiles analizados en la pulpa de la variedad F1 Finura Piel de Sapo no injertados (NG) y autoinjertados (SG), e injertados sobre distintos

y C se muestra el efecto de estos patrones en los dos años analizados, incluyendo como control al patrón comercial Ma x Mo Co (la primera componente explica un 38,9% y un 36,6% de la variación encontrada y la segunda un 26,56% y un 27,1%, en el año 2016 y 2017, respectivamente). Consistentemente los dos años el patrón de melón Me x Ag fue el que menos efecto tuvo sobre el aroma del fruto, siendo claramente inferior al efecto del otro patrón de melón Me x Me SP, que destacó por su mayor contenido en algunos alcoholes y menor en algunos aldehídos. Este efecto de reducción de algunos aldehídos importantes como el nonanal, el (Z)-6-nonenal y el (E, Z)-2,6-nonadienal (Tabla 13) por algunos portainjertos de melón en melones Honeydew ya fue descrito por Verzera et al. (2014), aunque en nuestro caso no fue un efecto consistente los dos años. Esto podría ser un efecto de las distintas variedades de melón empleadas para la generación de los patrones híbridos. De hecho, el híbrido Me x Ag se obtuvo cruzando una variedad de Piel de Sapo (no climatérica) con un melón de la subespecie *agrestis* (grupo *chinensis*) también no climatérico, aunque algo más aromático que el melón Piel de Sapo (Esteras et al., 2018), mientras que el patrón Me x Me SP se obtuvo cruzando dos melones de tipo cantalupo (climatéricos), lo que puede ser la causa del efecto sobre el aroma de Piel de Sapo. Sin embargo, los melones climatéricos se caracterizan por un patrón de volátiles con altos contenido en ésteres, pero en nuestros estudios no se observa un incremento en el contenido en ésteres del aroma de los frutos de Piel de Sapo injertado en Me x Me SP. De los 3 patrones derivados de especies silvestres, el mayor efecto se observó en los frutos recogidos sobre el patrón de la especie *C. metuliferus*. En el año 2016 este era un efecto

---

patrones de *Cucurbita* y *Cucumis*. A. Se representa el efecto de los patrones de *Cucurbita* Ma x Mo EF, Mo x Mo NL EF, Pe x Pe ZS, Ma x Ec, Ma x Mo CO, empleando como referencia el patrón de *Cucumis melo* Me x Ag, con respecto al control SG y NG (año 2016). B. Se representa el efecto de los patrones de *Cucumis* Met, Me x Ag, Me x Me SP, Fi x My y Fi x An, empleando como referencia el patrón de *Cucurbita* Ma x Mo CO, con respecto al control SG y NG (año 2016). C. Se representa el efecto de los patrones de *Cucumis* Met, Me x Ag, Me x Me SP, Fi x My y Fi x An, empleando como referencia el patrón de *Cucurbita* Ma x Mo CO, con respecto al control SG y NG (año 2017). Compuestos (se detallan en la Tabla 2): 1.1 = 1-Pentanol, 1.2 = 1-Hexanol, 1.3 = 1-Octanol, 1.4 = 1-Nonanol, 1.5 = 1-Decanol, 1.6 = (Z)-3-hexen-1-ol, 1.7 = (Z)-3-Nonen-1-ol, 1.8 = (Z)-6-Nonen-1-ol, 1.9 = (E,Z)-2,6-Nonadien-1-ol, 1.10 = Benzyl Alcohol, 1.11 = 2-Phenylethanol, 2.1 = Hexanal, 2.2 = Heptanal, 2.3 = Octanal, 2.4 = Nonanal, 2.5 = Decanal, 2.6 = (E)-2-Heptenal, 2.7 = (E)-2-Octenal, 2.8 = (Z)-6-Nonenal, 2.9 = (E)-2-Nonenal, 2.10 = (E)-2-Methyl-2-butenal, 2.11 = (E,E)-2,4-Heptadienal, 2.12 = (E,Z)-2,6-Nonadienal, 2.13 = (E,E)-2,4-Decadienal, 2.14 = Benzaldehyde, 2.15 = Phenylacetaldehyde, 3.1 = 2-Methyl propyl acetate, 3.2 = Butyl acetate, 3.3 = Octyl acetate, 3.4 = Benzyl acetate, 3.5 = Phenylethyl acetate, 3.6 = Ethyl butanoate, 3.7 = Ethyl-2-methyl butyrate, 4.1 = 6-Methyl-5-hepten-2-one, 4.2 = Geranylacetone, 4.3 = Beta-Ionone.

esperado, puesto que debido al colapso fisiológico los frutos sobre este patrón presentaron un retraso en la maduración, pero incluso en 2017 cuando estos frutos maduraron con normalidad, el efecto sobre el aroma fue mayor que el de los dos híbridos Fi x My y Fi x An, con un efecto más parecido al de los patrones de melón. Por lo tanto, nuestros resultados indican que, en general, los patrones de *Cucumis* tienen menos efecto sobre el vigor, la producción, la calidad externa y la calidad interna del fruto que los patrones de *Cucurbita* y que cuanto más cercano filogenéticamente es el patrón a la variedad menos efecto tiene sobre la misma, como se manifiesta en el reducido efecto del patrón Me x Ag, desarrollado en un cruce con melón Piel de Sapo. En cualquier caso, y a pesar de los efectos observados ninguno de los patrones, salvo Met en el caso de colapso, causó alteraciones importantes que llevaran a frutos de calidad no comercial. Entre los patrones de *Cucurbita* merece la pena destacar el híbrido Ma x Ec, dado que el parental *C. ecuadorensis* aporta características de resistencia a estrés biótico y abiótico que no están presentes en las especies cultivadas que se suelen emplear como portainjertos (Andres & Robinson, 2002; Paris, 2016). Entre los patrones de melón, el patrón Me x Ag es el que menos efecto tiene sobre el desarrollo y la calidad de los frutos por lo que se trata de un patrón experimental con buenas perspectivas (Fita et al., 2007). Sin embargo, este patrón, que es resistente a *Monosporascus cannonballus* y presenta un sistema radicular vigoroso que le puede proporcionar tolerancia a factores de estrés biótico (Gisbert et al., 2016) tiene poca o nula resistencia a *Fusarium* o nematodos por lo que no será de utilidad en campos afectados por estos patógenos. Entre los patrones silvestres, los híbridos Fi x My y Fi x An resultan también de potencial interés, pues generan un menor impacto que los patrones de *Cucurbita* sobre la calidad del fruto y presentan resistencias que no suelen encontrarse en la especie *C. melo*.

## BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Andres, T.C & Robinson, R.W. (2002). *Cucurbita ecuadorensis*, an ancient semi-domesticated with multiple disease resistance and tolerance to some adverse growing conditions. In D. N. Maynard (Ed.), *Cucurbitaceae 2002* (pp. 95–99), Alexandria: ASHS Press.
- ◆ Beltran, J., Serrano, E., López, F. J., Peruga, A., Valcarcel, M., & Rosello, S. (2006). Comparison of two quantitative GC–MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *385*(7), 1255-1264. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0410-9>
- ◆ Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., ... Moing, A. (2013). Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment. *Metabolomics*, *9*, 57-77. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0429-1>
- ◆ Burger, Y., Sa'ar, U., Distelfeld, A., Katzir, N., Yeselson, Y., Shen, S., & Schaffer, A. A. (2003). Development of Sweet Melon (*Cucumis melo*) Genotypes Combining High Sucrose and Organic Acid Content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *128*(4), 537-540.
- ◆ Cebolla-Cornejo, J., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J. M., Roselló, S., & Nuez, F. (2012). High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis*, *33*(15), 2416-2423. <https://doi.org/10.1002/elps.201100640>
- ◆ Colla, G., Pérez-Alfocea, F. & Schwarz, D. (Eds.). (2017). *Vegetable grafting: Principles and practices*. Wallingford, UK:CABI.
- ◆ Edelstein, M., Cohen, R., Gur, A., Elkabetz, M., Pivonia, S., Grosch, R., ... Schwarz, D. (2017). Performance of interspecific *Cucurbita* rootstocks compared to their parental lines. *Scientia horticulturae*, *216*, 45-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.031>
- ◆ Esteras, C., Rambla, J. L., Sánchez, G., López-Gresa, M. P., González-Mas, M. C., Fernández-Trujillo, J. P. ... Picó, M. B. (2018). Fruit flesh volatile and



carotenoid profile analysis within the *Cucumis melo* L. species reveals unexploited variability for future genetic breeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(10), 3915–3925. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8909>

- ◆ Expósito, A., Munera, M., Giné, A., López-Gómez, M., Cáceres, A., Picó, M. B., ... Sorribas, F. J. (2018). *Cucumis metuliferus* is resistant to root-knot nematode *Mi1.2* gene (a)virulent isolates and a promising melon rootstock. *Plant Pathology*, 67(5), 1161–1167. <https://doi.org/10.1111/ppa.12815>
- ◆ FAOSTAT. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. (<http://www.fao.org/faostat/en/#data>)
- ◆ Fita, A., Pico, B., Roig, C., & Nuez, F. (2007). Performance of *Cucumis melo* ssp. *agrestis* as a rootstock for melon. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(2), 184–190. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512218>
- ◆ Fredes, A., Roselló, S., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., Pérez-de-Castro, A., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2017). Fruit quality assessment of watermelons grafted onto citron melon rootstock. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1646–1655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7915>.
- ◆ Fredes, A., Sales, C., Barreda, M., Valcárcel, M., Roselló, S., & Beltrán, J. (2016). Quantification of prominent volatile compounds responsible for muskmelon and watermelon aroma by purge and trap extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry determination. *Food Chemistry*, 190, 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.011>
- ◆ Gisbert, C., Gammoudi, N., Munera, M., Giné, A., Pocurull, M., Sorribas, F. J., & Picó, M. B. (2017). Evaluation of two potential *Cucumis* spp. resources for grafting melons. *Acta Horticulturae*, 1151, 157–162. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.25>
- ◆ Gisbert, C., Cáceres, A., Perpiñá, G., Bernat, G., Pérez-de-Castro, A., & Picó, M. B. (2016). El injerto como técnica para la recuperación de variedades tradicionales Ontinyent. *Phytoma*, 282, 40–47.
- ◆ Gonda, I., Davidovich-Rikanati, R., Bar, E., Lev, S., Jhirad, P., Meshulam, Y., ... Lewinsohn, E. (2018). Differential metabolism of L-phenylalanine in the

formation of aromatic volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Phytochemistry*, 148, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.12.018>

- ◆ Gonda, I., Burger, Y., Schaffer, A. A., Ibdah, M., Tadmor, Y., Katzir, N., ... Lewinsohn, E. (2016). Biosynthesis and perception of melon aroma. In: D. Havkin-Frenkel, & N. Dudai (Eds). *Biotechnology in flavor production* (pp. 281-305). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118354056.ch11>
- ◆ Guan, W., Zhao, X., Dickson, D. W., Mendes, M. L., & Thies, J. (2014). Root-knot nematode resistance, yield, and fruit quality of specialty melons grafted onto *Cucumis metulifer*. *HortScience*, 49(8), 1046-1051.
- ◆ Huang, Y., Kong, Q. S., Chen, F., & Bie, Z. L. (2015). The History, Current Status and Future Prospects of Vegetable Grafting in China. *Acta Horticulturae*, 1086, 31-39. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1086.2>
- ◆ Kokallis-Burelle, N., & Roskopf, E. N. (2011). Microplot Evaluation of Rootstocks for Control of *Meloidogyne incognita* on Grafted Tomato, Muskmelon, and Watermelon. *Journal of Nematology*, 43 (3-4), 166-171.
- ◆ Kovats, V. E. (1958). Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41(7), 1915-1932. <https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>
- ◆ Kumar, A.B. & Sanket, K. (2017). Grafting of Vegetable Crops as a Tool to Improve Yield and Tolerance Against Diseases-A review. *International Journal of Agriculture Sciences*, 9(13), 4050-4056
- ◆ Kyriacou, M. C., Leskovar, D. I., Colla, G., & Roupael, Y. (2018). Watermelon and melon fruit quality: The genotypic and agro-environmental factors implicated. *Scientia Horticulturae*, 234, 393-408. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.032>
- ◆ Lee, J. M., Kubota, C., Tsao, S. J., Bie, Z., Echevarria, P. H., Morra, L., & Oda, M. (2010). Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 93-105.

- ◆ Leonardi, C., Kyriacou, M. C., Gisbert, C., Oztekin, G. B., Mourão, I., & Roupshael, Y. (2017). Quality of Grafted Vegetables. In G. Colla, F. Pérez-Alfocea & D. Schwarz (Eds), *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. (pp 216–244). Wallingford, UK:CABI
- ◆ Liu, S., Li, H., Lv, X., Ahammed, G. J., Xia, X., Zhou, J., ... Zhou, Y. (2016). Grafting cucumber onto luffa improves drought tolerance by increasing ABA biosynthesis and sensitivity. *Scientific reports*, 6, 20212. <https://doi.org/10.1038/srep20212>
- ◆ Liu, B., Ren, J., Zhang, Y., An, J., Chen, M., Chen, H., ... Ren, H. (2015). A new grafted rootstock against root-knot nematode for cucumber, melon, and watermelon. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 251-259. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0234-5>
- ◆ Liu, Y., Li, T., Qi, H., Li, J., & Yin, X. (2010). Effects of grafting on carbohydrate accumulation and sugar-metabolic enzyme activities in muskmelon. *African Journal of Biotechnology*, 9(1), 25-35.
- ◆ Louws, F. J., Rivard, C. L., & Kubota, C. H. (2010). Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Scientia Horticulturae*, 127, 127-146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.023>
- ◆ McCreight, J. D. (2017). Cultivation and Uses of Cucurbits. In R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas (Eds.), *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae* (pp. 1–12). Springer. [https://doi.org/10.1007/7397\\_2016\\_2](https://doi.org/10.1007/7397_2016_2)
- ◆ Matsumoto, Y. (2012). Evaluation of *Cucumis ficifolius* A.Rich. Accessions for Resistance to Fusarium wilt. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(3), 470-476.
- ◆ Matsumoto, Y., & Miyagi, M. (2012). Mapping of a gene conferring alleviation of pollen–pistil incongruity found in an interspecific cross between *Cucumis anguria* L. and *Cucumis melo* L. (melon). *Scientia Horticulturae*, 146, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.021>
- ◆ Matsumoto, Y., Ogawara, T., Miyagi, M., Watanabe, N., & Kuboyama, T. (2011). Response of Wild *Cucumis* Species to Inoculation with *Fusarium oxysporum*

f. sp. *melonis* Race 1,2y. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80(4), 414-419. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.80.414>

- ◆ Mohsenian, Y. & Roosta, H. R. (2015). Effects of Grafting on Alkali Stress in Tomato Plants: Datura Rootstock Improve Alkalinity Tolerance of Tomato Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 38(1), 51-72. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.920370>
- ◆ Nawirska-Olszańska, A., Biesiada, A., Sokół-Łętowska, A., & Kucharska, A. Z. (2014). Characteristics of organic acids in the fruit of different pumpkin species. *Food chemistry*, 148, 415-419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.080>
- ◆ Obando-Ulloa, J. M., Ruiz, J., Monforte, A. J., & Fernández-Trujillo, J. P. (2010). Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.). *Food chemistry*, 118(3), 815-822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.068>
- ◆ Penella, C., Nebauer, S. G., López-Galarza, S., Quiñones, A., San Bautista, A., & Calatayud, Á. (2017). Grafting pepper onto tolerant rootstocks: An environmental-friendly technique overcome water and salt stress. *Scientia horticulturae*, 226, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.020>
- ◆ Paris, H. S. (2016). Genetic Resources of Pumpkins and Squash, *Cucurbita* spp. In R. Grumet, N. Katzir y J. García-Mas (eds.), *Genetics and genomics of the Cucurbitaceae* (pp. 111–154), Springer International Publishing AG 2016
- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mphosi, M. S. (2011). Management of *Meloidogyne incognita* in nematode susceptible watermelon cultivars using nematode resistant *Cucumis africanus* and *Cucumis myriocarpus* rootstocks. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8790-8793. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1252>
- ◆ Picó, M. B., Thompson, A. J., Gisbert, C., Yetişir, H., & Bebeli, P. J. (2016). Genetic Resources for Rootstock Breeding. In G. Colla, F. Pérez-Alfocea, & D. Schwarz (Eds.), *Vegetable Grafting: Principles and Practices* (pp. 22–69), Wallingford, UK: CABI.
- ◆ Sales, C., Cervera, M. I., Gil, R., Portolés, T., Pitarch, E., & Beltran, J. (2017). Quality classification of Spanish olive oils by untargeted gas chromatography coupled to hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric

pressure chemical ionization and metabolomics-based statistical approach. *Food chemistry*, 216, 365-373. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.033>

- ◆ Schwarz, D., Roupshael, Y., Colla, G., & Venema, J. H. (2010). Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.016>
- ◆ Sigüenza, C., Schochow, M., Turini, T., & Ploeg, A. (2005). Use of *Cucumis metuliferus* as a Rootstock for Melon to Manage *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 37(3), 276–280.
- ◆ Soteriou, G. A., Papayiannis, L. C., & Kyriacou, M. C. (2016). Indexing melon physiological decline to fruit quality and vine morphometric parameters. *Scientia Horticulturae*, 203, 207–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.032>
- ◆ Trionfetti Nisini, P., Colla, G., Granati, E., Temperini, O., Crino, P., & Saccardo, F. (2002). Rootstock resistance to fusarium wilt and effect on fruit yield and quality of two muskmelon cultivars. *Scientia Horticulturae*. 93(3-4): 281-288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00335-1)
- ◆ Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Condurso, C., Crinò, P., Romano, D., ... Paratore, A. (2014). Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* var. *inodorus* H. Jacq.) in relation to different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 169, 118-124.
- ◆ Vicente-Villardón, J. L. (2015). MULTIBILOT: A package for Multivariate Analysis using Biplots. Departamento de Estadística. Univ. Salamanca. <http://biplot.usal.es/ClassicalBiplot/index.html>

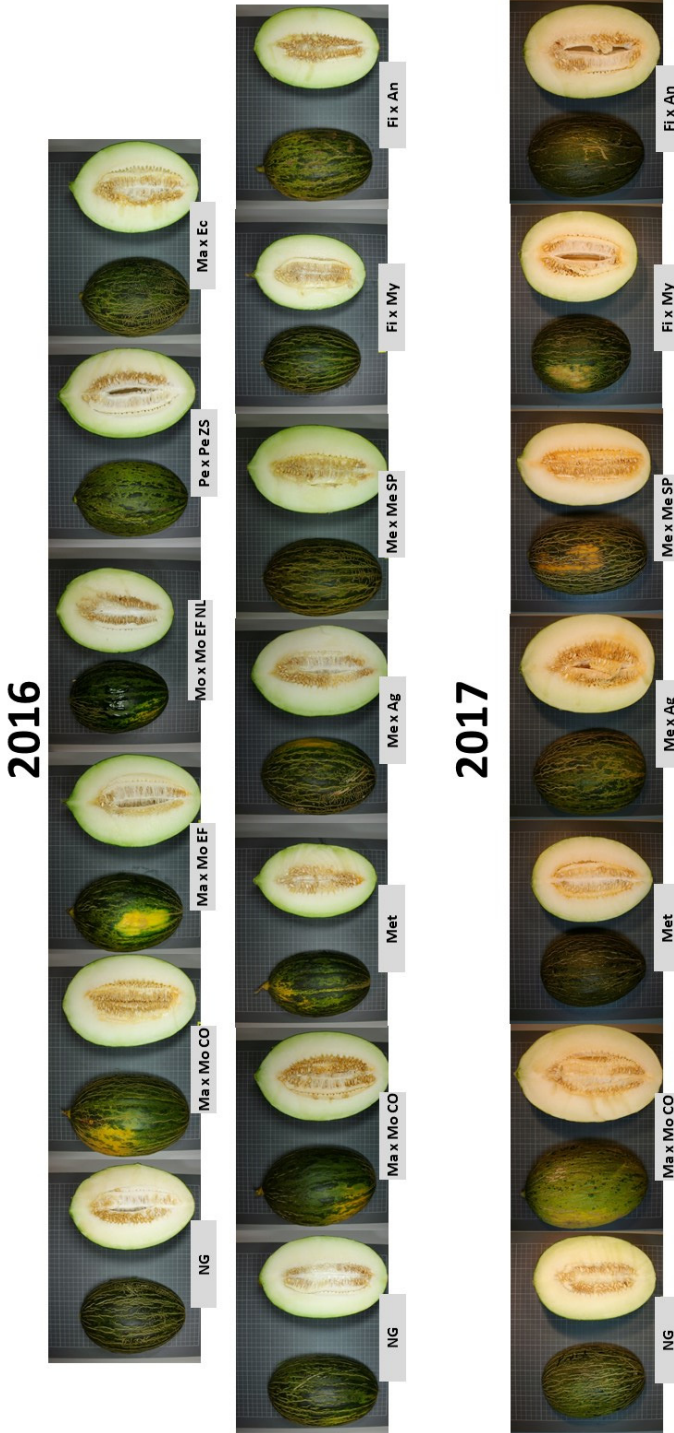


FIGURA SUPLEMENTARIA 1 ■ Frutos de la variedad F1 Finura recogidos en plantas injertadas sobre distintos patrones de calabaza y melón en comparación con la variedad no injertada (NG). Se muestran frutos de los ensayos de 2016 y 2017.



## CAPÍTULO 2

---

Caracterización de  
germoplasma de *Cucumis* para  
su potencial utilidad como  
portainjerto de melón





## Capítulo 2

### Caracterización de germoplasma de *Cucumis* para su potencial utilidad como portainjerto de melón

#### 2.1. Caracterización de especies silvestres e híbridos de *Cucumis* spp.

**Cáceres, A.,** Picó, M. B. & Gisbert, C. (2016). Germination of Wild *Cucumis* Species and Interspecific Hybrids. In E. U. Kozik & H. S. Paris (Eds.) *XI th EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 227-230), Warsaw, Poland.

En este capítulo se presentan tres trabajos relacionados con la caracterización de nuevos portainjertos de melón: una accesión de *Cucumis metuliferus* y dos híbridos interespecíficos de *Cucumis* (Fi x An y Fi x My) previamente obtenidos por el grupo de Mejora de Cucurbitáceas y el de Cultivo *in vitro* y Desarrollo de Patrones de Hortícolas. En este primer trabajo se evalúa su capacidad de germinación, muy importante para poder utilizarlos como portainjertos. Este trabajo se publicó como artículo completo en el libro de PROCEEDINGS OF CUCURBITACEAE 2016 que recoge las actas del Congreso Internacional The XIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics & Breeding

El trabajo realizado se enmarca en el proyecto AGL2014-53398-C2-2-R APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS Y CULTURALES PARA LA MEJORA DE LAS RESISTENCIAS Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN MELON Y SANDIA financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (cofinanciado con fondos FEDER), con apoyo del proyecto PHBP14/00021 financiado por la Dirección de Política Universitaria del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España. En este trabajo, además de los grupos mencionados anteriormente, participó la Dra. Ferriol del Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV). Mi participación ha sido financiada por parte del Gobierno de la República del Ecuador por medio de una beca de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

GERMINATION OF WILD *CUCUMIS* SPECIES AND INTERSPECIFIC HYBRIDSANDRÉS CÁCERES<sup>\*1</sup>, BELÉN PICO<sup>1</sup>, CARMINA GISBERT<sup>1</sup><sup>1</sup> *Institute for the Conservation and Breeding of Agricultural Biodiversity (COMAV),**Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera, s/n. Valencia 46002. Spain*

## ABSTRACT

Orthodox seeds may present differences in germination due to possible dormancy, low viability or loss of viability during conservation conditions, or aging. In the context of grafting, poor germination is a limiting factor. In this work, we have evaluated different conditions that include standard conditions, stratification and *in vitro* culture in order to obtain high and uniform germination rates in accessions of *C. metuliferus*, *C. anguria*, *C. ficifolius* and *C. myriocarpus* as well as in interspecific hybrids obtained using *C. ficifolius* as female parent. Development of new rootstocks of the genus *Cucumis* is of great interest because variable scion performance, including the occurrence of negative impacts on fruit quality, is observed when the common interspecific *Cucurbita* rootstocks are used for grafting melon. Germination rates varied among species and treatments. Germination was observed in all treatments with the exception of seeds from the interspecific hybrid *C. ficifolius* x *C. metuliferus* with poor embryo development. For the rest of genotypes, the best treatments include a pretreatment at 4°C for 10 days previously to sow in substrate. With these conditions maximum germination rates were obtained as soon as 10 days of sowing. In general, better germination rates are obtained in the hybrids in comparison with their corresponding parents, supporting the use of interspecific *Cucumis* hybrids to improve grafting efficiency.

## KEYWORDS

Rootstocks ■ Grafting ■ Incompatibility ■ Stratification

## INTRODUCTION

The use of grafting is a common practice to face with soil-borne diseases and other soil-stressful conditions. This practice has been commonly used in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivation. Its use has spread more recently to other Cucurbitaceae and Solanaceae crops, such as melon (*Cucumis melo* L.), cucumber (*Cucumis sativus* L.), eggplant (*Solanum melongena* L.) or pepper (*Capsicum annumm* L.).

The most common commercial rootstocks for Cucurbitaceae crops are *Cucurbita* interspecific hybrids (*C. moschata* Duchesne x *C. maxima* Duchesne) and some accessions of *Lagenaria siceraria* Standl (bottle gourd). Both types of rootstocks confer resistance to most of the soil-borne fungi affecting watermelon and melon (King et al., 2010). However, due to the susceptibility of these rootstocks to root-knot nematodes (RKN, *Meloidogyne* spp.) (Ozarslandan et al., 2011) and, to their negative impact on fruit quality, that has been observed in some rootstock-scion combinations (Rouphael et al., 2010), there is an urgent need to develop new rootstocks able to face with RKN and with reduced or no impact on fruit quality.

Different wild species of the *Cucumis* genus have been reported as unexploited sources of resistance to soil pathogens like nematodes (Sigüenza et al., 2005) or *Fusarium* spp. (Trionfetti Nisini et al., 2002). Accessions of these species with a high level of resistance could be a good alternative to the current rootstocks. However, their success as new rootstocks depends on having good compatibility with different scions, facility in the realization of the graft and a low or no negative impact on fruit quality.

One of our research lines is focused on the development of new rootstocks for melon crop, useful in programs for the management of soil-borne pathogens and with different scions. In this context, we have evaluated as new rootstocks one hybrid between a commercial melon (*Cucumis melo* subspecies *melo* var *inodorus* market class Piel de Sapo)

and one exotic accession (*Cucumis melo* subspecies *agrestis* var. *chinensis* accession Pat 81), resistant to *Monosporascus* vine decline, and one accession of *Cucumis metuliferus* E. Mey. ex Naud., highly resistant to RKN (Gisbert et al., 2016). Additionally, and despite the difficulty, we have generated three interspecific *Cucumis* hybrids *C. ficifolius* A. Rich x *C. anguria* L., *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* Naudin and *C. ficifolius* x *C. metuliferus* that are also under evaluation (Cáceres et al., 2016). Interspecific hybridization is a strategy to improve vigor and hypocotyl diameter of seedlings to facilitate the management of the plants during grafting as well as to combine resistance to soil pathogens that may favor field performance.

The first step for the generation of grafted plants is the production of rootstock and scion seedlings suitable for grafting. In this process, two essential parameters are the percentages of germination and the time needed to develop plantlets with uniform hypocotyls that facilitate the join. Orthodox seeds may present differences in germination due to dormancy or loss of viability during conservation conditions, or aging. Thus it is important to evaluate the germination of accessions or hybrids previously to be tested as putative rootstocks. For instance, in *Solanum torvum* Sw., a RKN resistant eggplant rootstock, it is difficult to get a rapid and homogeneous seed germination, which limits its use as rootstock (Ginoux & Laterrot, 1991).

In this work, we have evaluated different germination conditions that include standard conditions, cold stratification and *in vitro* culture, in order to get knowledge about the germination ability of a promising *C. metuliferus* accession and three interspecific *Cucumis* hybrids, and their respective *Cucumis* parents, as a first step to validate their use as new rootstocks for melons.

## MATERIALS & METHODS

Seeds of *C. anguria*, *C. metuliferus*, *C. myriocarpus* and *C. ficifolius* (accessions BGV 12795; BGV11135; BGV8535 and BGV12786; held at the genebank of COMAV-

UPV) as well as of the three interspecific hybrids generated by crossing them, always using *C. ficifolius* as female parental, were used for testing germination ability. Plants derived from the seeds initially conserved at the COMAV-UPV Genebank were transplanted to the greenhouse and selfed or crossed to obtain the seed used in the present study. The seeds, collected in the summer of 2015, were conserved at room temperature till the germination assay.

All seeds were carefully opened in an extreme of the seed coat and disinfested by immersion for 10 min in a solution of 25% commercial bleach (40 g L<sup>-1</sup> active chlorine), being then washed twice with sterile deionized water for 5 min before sowing that was performed in substrate or *in vitro* culture (in Petri dishes containing as nutrient medium Murashige and Skoog salts, including vitamins, 2% sucrose and 0.7% plant agar, DUCHEFA, the Netherlands). The pHs of the media were adjusted to 5.8 before sterilization at 121°C for 20 min. Cultures were incubated in a growth chamber at 26°C ±2°C under 2 days in dark and a 16h photoperiod for the rest of culture. Cool white light provided by Sylvania cool white F37T8/CW fluorescent lamps (90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) were used.

For both germination strategies (substrate and *in vitro* culture), seeds were cultured directly or after a period of incubation at 4°C (stored in the fridge) for 10 days (cold stratification). Additionally, in the substrate assay, incubation at 37°C for 2 days of non-stratified seeds or after stratification at 4°C was also tested. Then, a total of 6 treatments were compared for each genotype: T1 (*in vitro*); T2 (4°C+*in vitro*); T3 (substrate); T4 (4°C+substrate); T5 (37°C+ substrate; our standard lab protocol) and T6 (4°C+37°C+substrate). Ten seeds per treatment with two repetitions per treatment and genotype were sown. Seed germination was noted every 5 days from 5 to 20 days after sowing (DAS). ANOVA was carried to evaluate the effect of genotype and treatment in early and final germination (5 and 20 DAS). *Cucumis myriocarpus* is excluded of this analysis because we have no data for T6.

## RESULTS

Germination was observed for all genotypes in all treatments with the exception of the interspecific hybrid *C. ficifolius* x *C. metuliferus* (F<sub>x</sub>M) for which no germination was obtained in any of the treatments (Figure 1). Maximum rates of germination were found as soon as 10 days after sowing in the rest of genotypes in all the treatments (data non shown). Percentages of 100% germination were obtained only in treatments with cold stratification: in T4 (for *C. ficifolius* and *C. metuliferus*), T6 (for *C. anguria*, and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (F<sub>x</sub>My)) and T2 (for *C. ficifolius* x *C. anguria* (F<sub>x</sub>A)). The maximum germination rate for *C. myriocarpus* was 85.7%, achieved in T4.

The ANOVA analysis supported the existence of a significant effect of genotype for early (at 5 DAS) germination (P value: 0.0001) and of the treatment for both, early (0.0038) and final germination (0.0001) (at 5 and 20 DAS). A low, but significant genotype x treatment interaction (0.0420) was observed, only at 5 DAS.

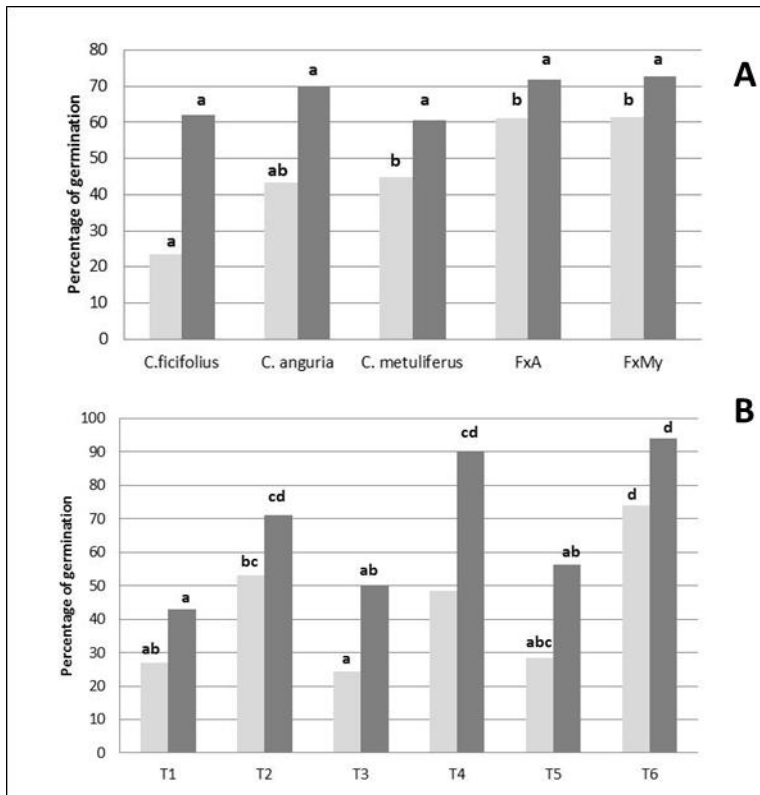
Figure 1 shows the percentage of germination at 5 days and 20 days averaged per genotype (Figure 1A) and per treatment (Figure 1B). Both hybrids (F<sub>x</sub>A and F<sub>x</sub>My) showed the highest percentages of early germination (around for both the 60%), significantly higher than that observed in at least one of their parents. Conversely, the percentage of germination at 20 days did not significantly differ among genotypes (Figure 1 A).

A positive effect of cold stratification (seed incubation at 4°C for 10 days) on germination was observed for all the genotypes, in both, substrate and *in vitro* culture procedures (Figure 1 B). This increase of the percentage of germination in stratified seeds was clearly observed at early and late germination.

For example, in *in vitro* treatments, the percentage of early and late germination in 4°C treated-seeds was nearly twice the obtained in seeds directly cultured: 53 vs. 27% at 5 days and, 71% vs. 43% at 20 days (Figure 1B). This positive effect of cold stratification was

general, occurring in most genotypes, with the exception of *C. metuliferus*, the only genotype that did not improve, even decrease, germination under the cold treatment (data not shown).

For the substrate treatments, the cold incubation also caused a two-fold increase in the germination percentage (from 24 to 49% at 5 days and from 50 to 90% at 20 days), observed in all genotypes. Whereas the incubation at 37°C itself did not improve significantly germination (24 vs. 28% and 50 vs. 56%, for T3 and T5 at 5 and 20 DAS respectively) the combined treatment of 10 DAS at 4°C and 2 days of incubation at 37°C followed by a direct sowing under standard conditions gave the highest germination average (Figure 1B).



**FIGURE 1** ■ Percentage of germination for genotypes (A) and treatments (B) noted after 5 and 20 days of culture (grey and dark grey, respectively). A. Genotypes: *C. ficifolius*; *C. anguria*; *C. metuliferus*; *C. ficifolius* x *C. anguria* (CxA); *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (CxMy). B: T1 (sowing in Petri dishes: in vitro culture), T2 (stratification at 4°C for 10 days and in vitro culture), T3 (sowing directly in substrate); T4 (stratification 4°C for 10 days and sowing in substrate); T5 (incubation for 2 days at 37°C and sowing in substrate); T6 (stratification at 4°C for 10 days, 2 days incubation at 37°C and sowing in substrate).



## DISCUSSION

In order to test the germination ability in a promising rootstock (*C. metuliferus* accession BGV11135) and three interspecific *Cucumis* hybrids (putative rootstocks), and their respective *Cucumis* parents, we compared different treatments that include germination in substrate and in *in vitro* culture. The latter has been used for germinating mature or immature seeds and for embryo rescue in different species (Dolce et al., 2011; Gisbert et al., 2011; Díez et al., 2014). Given the difficulty in obtaining successful crosses among *Cucumis* species (Deakin et al., 1971; Fassuliotis 1977; Singh & Yadava 1984; Beharav & Choen, 1995), we consider of interest to include *in vitro* culture in our treatments.

Germination was obtained in all the tested genotypes and treatments with the exception of FxM, despite its seeds had similar aspect and embedded water like those of the rest of genotypes. At the end of the assay a sample of seeds was completely opened and, in a high percentage of seeds, embryos were not found. Therefore, *C. ficifolius* was much more incompatible to *C. metuliferus* than to the other two *Cucumis* species. This result was in agreement with that obtained by Kho et al. (1980) that found unseeded fruit in a cross FxM and seeded fruits in a cross FxA. Contrarily to reported in this work, we also obtained seeded fruit in the cross FxMy. Probably, differences in the accessions of the species involved and/or in the environmental conditions explain this result.

The best germination percentages for most of the genotypes assayed were obtained in treatments T4 and T6, both including cold stratification at 4°C for 10 days, followed or not by two days incubation at 37°C. Seed stratification has been used to induce or increase seed germination (Tezuka et al., 2013; Eckberg et al., 2015). Using these conditions, we were able to double the percentage of germination, reached a 100% in most genotypes from 10 days after sowing. This result is important to obtain grafted plants as a uniform germination is needed to increase grafting efficiency.

The most responding genotype to *in vitro* culture was FxA that showed 100% of germination in T2 similarly to the percentage obtained in T6. Changes that occurred after imbibition which are regulated by temperature, light conditions, and plant hormones (Weitbrecht et al., 2011) in addition to genotype, could explain this differential response to *in vitro* culture.

In conclusion stratifying seeds at 4°C gives fast and uniform germination rates for the promising rootstock *C. metuliferus* BGV 11135 and two of three hybrids that we will evaluate as rootstocks (FxA and FxMy). The higher percentage of germination found in the hybrids compared to their parentals confirm the advantage of using interspecific hybrids instead of single *Cucumis* genotypes for grafting purposes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank to the project funded by the Ministerio de Economía y Competitividad AGL2014-53398-C2-2-R (jointly funded by FEDER), and, to the project PHBP14/00021 funded by la Dirección de la Política Universitaria del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain.

#### LITERATURE CITED

- ◆ Beharav, A. & Choen, Y. (1995). Attempts to overcome the barrier of interspecific hybridization between *Cucumis melo* and *C. metuliferus*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43(2): 113–123. <https://doi.org/10.1080/07929978.1995.10676597>
- ◆ Cáceres, A., Ferriol, M., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2016). Use of Wild *Cucumis* as Potential New Rootstocks for Melons. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 300-304), Warsaw, Poland.
- ◆ Deakin, J. R., Bohn, G., & Whitaker, T. W. (1971). Interspecific Hybridization in *Cucumis*. *Economic Botany*, 25(2), 195-211.

- ◆ Díez, M. J., Gisbert, C., Campos, G., & Pérez de Castro, A. (2014). Obtención de materiales derivados de *Solanum peruvianum* PI126944 mediante cultivo *in vitro* de semillas inmaduras. *Actas de Horticultura*, 69, 157-158.
- ◆ Dolce, N. R., Mroginski, L. A., & Hebe, Y. (2011). Enhanced Seed Germination of *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) through In Vitro Culture of CutPyrenes. *HortScience*, 46(2), 278-281. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.2.278>
- ◆ Eckberg, J. O., Casler, M. D., Johnson, G. A., Seefeldt, L. L., Blaedow, K. E., & Shaw, R. G. (2015). Switchgrass Population and Cold-Moist Stratification Mediate Germination. *Crop Science*, 55(6), 2746-2752. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.02.0124>
- ◆ Fassuliotis, G. (1977). Self fertilization of *Cucumis metuliferus* Naud. and its cross compatibility with *Cucumis melo* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102, 336-339.
- ◆ Gisbert, C., Gammoudi, N., Munera, M., Giné, A., Pocurull, M., Sorribas, F. J., & Picó, M. B. (2016). Evaluation of two potential *Cucumis* spp. resources for grafting melons. *Acta Horticulturae* (in press).
- ◆ Gisbert, C., Prohens, J., & Nuez, F. (2011). Treatments for Improving Seed Germination in Eggplant and Related Species. *Acta Horticulturae*, 898, 45-51. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.898.4>
- ◆ Ginoux, G., & Laterrot, H. (1991). Greffage de l'aubergine: reflexions sur le choix du portegreffe. *PHM Revue Horticole*, 321, 49-54.
- ◆ Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Franken, J. (1980). Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, an investigation of in vivo pollen tube growth and seed set. *Euphytica*, 29(3), 661-672. <https://doi.org/10.1007/BF00023214>
- ◆ King, S. R., Davis, A. R., Zhang, X., & Crosby, K. (2010). Genetics, breeding and selection of rootstocks for Solanaceae and Cucurbitaceae. *Scientia Horticulturae* 127(2), 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.001>
- ◆ Özarslandan, A., Söğüt, M. A., Yetisir, H., & Elekçioğlu, I. H. (2011). Screening of bottle gourds (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley) genotypes with

rootstock potential for watermelon production for resistance against *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood and *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood. *Turkish Journal of Entomology*, 35(4), 687-697.

- ◆ Roupshael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., & Colla, G. (2010). Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.001>
- ◆ Sigüenza, C., Schochow, M., Turini, T., & Ploeg, A. (2005). Use of *Cucumis metuliferus* as a Rootstock for Melon to Manage *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 37(3), 276–280.
- ◆ Singh, A. K., & Yadava, K. S. (1984). Cytogenetics of *Cucumis* L. IV. Comparative study of natural and induced polyploids. *Cytologia*, 49(1), 183-192. <https://doi.org/10.1508/cytologia.49.183>
- ◆ Tezuka, T., Yokoyama, H., Tanaka, H., Shiozaki, S., & Oda, M. (2013). Factors Affecting Seed Germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. *Hortscience*, 48(3), 352-356. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.3.352>
- ◆ Trionfetti Nisini, P., Colla, G., Granati, E., Temperini, O., Crinò, P., & Saccardo, F. (2002). Rootstock resistance to fusarium wilt and effect on fruit yield and quality of two muskmelon cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93(3–4), 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00335-1)
- ◆ Weitbrecht, K., Müller, K., & Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3289-3309. <https://doi.org/10.1093/jxb/err030>

## 2.2. Caracterización de un híbrido de *Cucumis* como potencial portainjerto para melón.

**Cáceres, A.,** Ferriol, M., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2016). Use of Wild *Cucumis* as Potential New Rootstocks for Melons. In E. U. Kozik & H. S. Paris (Eds.). *XI th EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 300-304), Warsaw, Poland.

En este segundo trabajo se obtiene de nuevo semilla y se estudia la compatibilidad con otras accesiones de *Cucumis*, iniciándose la caracterización a nivel morfológico y de resistencia del híbrido Fi x An. Este trabajo se publicó como artículo completo en el libro de PROCEEDINGS OF CUCURBITACEAE 2016 que recoge las actas del Congreso Internacional The XIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics & Breeding

El trabajo realizado se enmarca en el proyecto AGL2014-53398-C2-2-R APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS Y CULTURALES PARA LA MEJORA DE LAS RESISTENCIAS Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN MELON Y SANDIA financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (cofinanciado con fondos FEDER), con apoyo del proyecto PHBP14/00021 financiado por la Dirección de Política Universitaria del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España. En este trabajo, además de los grupos mencionados anteriormente, participó la Dra. Ferriol del Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV). Mi participación ha sido financiada por parte del Gobierno de la República del Ecuador por medio de una beca de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

## USE OF WILD CUCUMIS AS POTENTIAL NEW ROOTSTOCKS FOR MELONS

ANDRÉS CÁCERES\*<sup>1</sup>, MARÍA FERRIOL<sup>2</sup>, CARMINA GISBERT<sup>1</sup> AND BELEN PICO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for the Conservation and Breeding of Agricultural Biodiversity (COMAV), Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera, s/n. Valencia 46002, Spain. e-mail: mpicosi@btc.upv.es

<sup>2</sup> Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM-UPV), Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera, s/n. Valencia 46002, Spain

## ABSTRACT

Grafting is a common practice in Cucurbits. However, in melon, the use of common commercial rootstocks of the *Cucurbita* genus is hampered by the occurrence of negative impacts on fruit quality. The genus *Cucumis* is a variable resource of new rootstocks. However, wild *Cucumis* species are difficult to handle in grafting assays due to their thin hypocotyls. One way of increasing hypocotyl diameter is performing interspecific crosses. Interspecific hybrids have also the advantage of combining resistances coming from the two parents. There exist severe crossability barriers within the genus, but some hybrid combinations are viable. We have successfully obtained interspecific hybrids between *C. ficifolius* and *C. anguria*. Their hybrid nature has been proved according to taxonomic traits. These hybrids are more vigorous and have higher germination rates in different conditions than the corresponding parentals. These interspecific hybrids are being characterized for resistance to biotic stresses. Also, its grafting compatibility has been assayed as a first step to validate its potential as new rootstocks for melon.

## KEYWORDS

Hybrids ■ Rootstock ■ Resistance ■ *Cucumis* ■ Melon

## INTRODUCTION

Grafting is a cultural practice used to avoid soil stress. Intensive agriculture and global warming are increasing soil biotic and abiotic problems, such as fungal diseases, nematodes drought, salinity and extreme temperatures. Grafting was used in Cucurbits for the first time in Asia, but nowadays is a very common technique spread worldwide (King et al., 2008). It is routinely used in watermelon to increase yields even under *Fusarium* wilt pressure. This crop is grafted onto various rootstock species, but the most common are interspecific hybrids between *Cucurbita maxima* Duchesne and *Cucurbita moschata* Duchesne (Davis et al., 2008). These hybrids have two main shortcomings, they are not resistant to nematodes and often cause negative impacts on fruit quality (Cohen et al., 2014; Soteriou et al., 2014).

In melon (*Cucumis melo* L.), the use of grafting has been delayed, but is becoming necessary with the increase of soil borne problems. The *C. maxima* x *C. moschata* hybrids have been the most common rootstock choice, even when the negative impact of these hybrids on melon quality is more significant than the effect on watermelons (variable rind netting, reduced sugar content, altered flesh color, aroma, etc.) (Rouphael et al., 2010; Gisbert et al., 2016). The assessment of new germplasm that provide a wider range of resistances without decreasing quality is a new challenge for grafting technology in melon crop.

One of the best alternatives to the *Cucurbita* hybrids is the use of intrageneric or intraspecific variability. This strategy is being useful in watermelon, using *Citrullus* germplasm (Cohen et al., 2014). Within *Cucumis melo* there are few resources resistant to soil stress. However, useful resistances have been identified in other species within the *Cucumis* genus. For example, *C. metuliferus* E.Mey.ex Naud and *C. pustulatus* Naudin ex Hook.f. are resistant to nematodes (Sigüenza et al., 2005; Liu et al., 2015). Also *C. metuliferus*, *C. ficifolius* A.Rich and *C. anguria* L were reported as resistant to *Fusarium* wilt and *Meloydogine incognita* (Trionfetti Nisini et al., 2002; Matsumoto, 2012; Liu et al., 2015).

These wild *Cucumis* spp. resources could be an alternative to *Cucurbita* hybrids as rootstocks for melon crop. However, they develop small seedlings with very thin hypocotyls. Size differences with the melon scions could difficult the grafting process. Interspecific hybridization could be a strategy to improve hypocotyl vigor and diameter of wild *Cucumis* and at the same time of getting combined resistances to soil stresses. Attempts to obtain *Cucumis* interspecific hybrids have been done, but strong reproductive barriers exist in most combinations, although they can be overcome in some specific crosses (Kho et al., 1980; Weng, 2010; Matsumoto et al., 2012). In this paper we generate some interspecific crosses between selected accessions of wild *Cucumis* and started their validation as new rootstocks for melon.

## MATERIALS & METHODS

### *Interspecific crosses*

The assays were conducted in greenhouses at COMAV-UPV (Universitat Politècnica de València). During the spring-summer season five plants of each of the following wild *Cucumis* species were grown in the greenhouse: *C. metuliferus*, *C. ficifolius*, *C. myriocarpus* Naudin, *C. zeyheri* Sond. and *C. anguria*. All cross combinations were assayed to produce interspecific hybrids, using each species as male and female parent. Fruit set was recorded after pollination and fruits were collected when mature. Seeds were extracted from fruits and cleaned. Germination rate was registered for all genotypes.

The hybrid *C. ficifolius* x *C. anguria* (F x A) was the one for which we obtained the highest number of seeds and on which we focused the phenotypic characterization, the study of the grafting ability and the evaluation of resistance to pathogens.

### *Phenotypic characterization of F1 hybrids*

Seeds of the F x A hybrid and their corresponding parents were germinated in Petri dishes and then sown in plastic pots (6 x 6 cm) with substrate and vermiculite (2:1) in the greenhouse. Hypocotyl length and diameter, plant length and number of



true leaves were measured in five plants per genotype. Also botanical identification keys were used to confirm the hybrid nature of the characterized plants (Kirkbride, 1993; Schaefer, 2007). We focused on the most discriminant characters between both parents, such as the presence of aculei in the stems of *C. ficifolius*, while stems of *C. anguria* are only hispidulous, and the ratio between the length of the hyaline part of the aculei of the ovary and the length of the opaque part, which is less than one in *C. anguria* (especially for var. *longaculeatus* J.H. Kirkbride, to which the plants used here as parents belong), and more than one in *C. ficifolius*.

#### *Grafting assay*

Charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* Naud.) was grafted onto the F x A hybrid to determine its grafting compatibility and value as a rootstock. Grafting was performed at two states of development of scion and rootstocks: a) early stage: using young rootstock seedlings with developed cotyledons and scion seedlings just after germination; (2) mature stage: using rootstock plants with five true leaves and scion seedlings with developed cotyledons. For both procedures grafting was performed above the cotyledon using the cleft method.

#### *Resistance to pathogens*

F1 F x A hybrids and parentals were tested for resistance to the *Fusarium* wilt (using a culture of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race 1, 2 for artificial inoculation). The resistance to fungal strain was evaluated at 30 days after inoculation (DAI). Also the level of resistance/susceptibility against important viruses was assessed through an artificial inoculation assay. Watermelon Mosaic Virus (WMV), Zucchini Mosaic Virus (ZYMV) and Tomato leaf curl New Delhi Virus (ToLCNDV) were inoculated and visual evaluation was performed after 30 DAI (López et al., 2015).

## RESULTS &amp; DISCUSSION

*Interspecific crosses*

The use of wild *Cucumis* species in melon breeding has been hampered by the occurrence of severe reproductive barriers (Walters & Wehner 2002; Sebastian et al., 2010; Matsumoto et al., 2012). However, crosses between some of these wild species are viable (Chen & Adelberg, 2000). We report fruit set from the following crosses: *C. ficifolius* x *C. anguria* (F x A), *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (F x My) and *C. ficifolius* x *C. metuliferus* (F x M), always using *C. ficifolius* as female parent. The germination rate was variable in the three different hybrids. High germination rates were obtained from seeds of F x A and F x My, and the parental species *C. ficifolius*, *C. myriocarpus*, *C. anguria*, whereas no germination was observed in F x M seeds (Caceres et al., 2016). These seeds were analyzed in detail and they presented no or poor embryo formation (Figure 1). Singh and Yadava (1984) grouped *C. ficifolius*, *C. anguria* and *C. myriocarpus* in the same compatibility group, whereas *C. metuliferus* was classified in a different group, less compatible with the others. Consistently with this classification and with our results, Kho et al. (1980) obtained seeded and unseeded fruits from *C. ficifolius* x *C. anguria* and *C. ficifolius* x *C. metuliferus*, respectively. These authors did not obtain fruit set in *C. ficifolius* x *C. myriocarpus*. The discrepancies with the results of the cross involving *C. myriocarpus* could be explained by the variability of the different accessions.

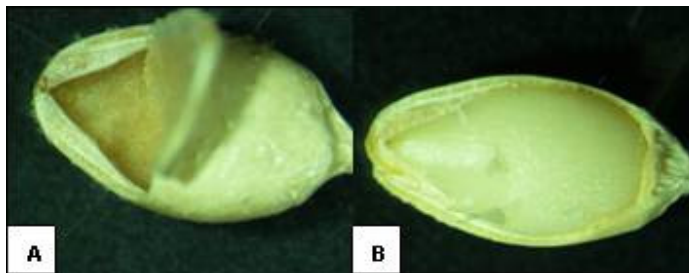


FIGURE 1 ■ Empty seed from the hybrid *C. ficifolius* x *C. metuliferus* (A) Viable embryo from the hybrid *C. ficifolius* x *C. anguria* (B).

### Characterization of the hybrid *C. ficifolius* x *C. anguria*

The cross F x A was the most compatible, from which a highest number of seeds and the highest germination rate was observed, and then we focused on the characterization on this hybrid.

### Taxonomic characterization of the F x A hybrid

Taxonomic traits, such as the presence of aculei in stems and petioles, the ratio between the hyaline and opaque parts of aculei of ovaries, and shape of ovaries were evaluated in the F x A hybrid and in their corresponding parentals. Leaf size and shape were not evaluated as they appeared to be polymorphic, as was also indicated in the identification keys (Kirkbride, 1993). This characterization showed that the F x A hybrids were morphologically intermediate in the most discriminant characters between parentals, as showed in Figure 2. This supports the hybrid nature of these intermediate individuals.



FIGURE 2 ■ Taxonomic characters of *C. anguria*, *C. ficifolius* and their hybrids *C. ficifolius* x *C. anguria* (F x A). Top: Presence of simple hairs in the stems of *C. anguria*, while F x A and *C. ficifolius* have aculei. Middle: Shape and presence of aculei in ovaries of both parentals and the intermediate F x A. Bottom: detail of aculei. The blue bar represents the hyaline part and the red bar the opaque part.

### Germination, seedling and plant growth

A good germination ratio is one required property for using the F x A hybrid as a rootstock. Few reports have studied germination in wild *Cucumis*, but some describe problems in germination efficiency and uniformity with *C. myriocarpus* and *C. metuliferus* (Benzioni et al., 1991; Mafeo, 2014). In our study the germination rate of F x A hybrid was higher than that of the corresponding parentals, 96.3%, versus 89.4% and 93.8%, in F x A, *C. ficifolius* and *C. anguria*, respectively (Cáceres et al., 2016). This effect is likely explained by genotype interactions and hybrid vigor.

Other traits, such as the hypocotyl length and diameter are traits that can affect grafting successful. An adequate diameter facilitates the rootstock/scion union and a tall hypocotyl avoids the penetration of soil in the join union. Figure 3 shows the hypocotyl length and diameter of F x A and the corresponding parentals, measured at 20 days after germination. Significant differences are found between the three genotypes, but the most vigorous is the parental *C. anguria*, having the hybrid better characteristics than the *C. ficifolius* parental. This result was observed at the very early seedling stage, but the growth of the plants was followed till the adult stage. Figure 4 shows the number of leaves and the plants length from 15 days till 60 days after transplanting. Despite *C. anguria* had a better early growth; late growth was more vigorous in *C. ficifolius* and more in the interspecific hybrid, mainly at the end of the assay.

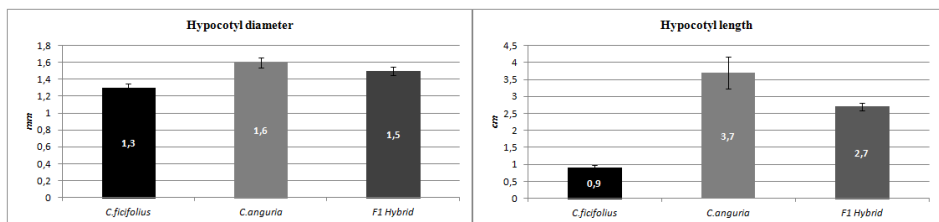


FIGURE 3 ■ Hypocotyls diameter (left) and length (right), means and standard errors measured in *C. ficifolius*, *C. anguria* and their corresponding hybrid (FxA), 20 days after germination.

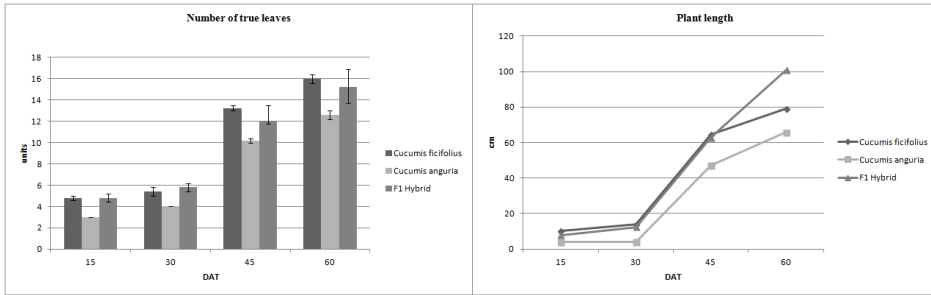


FIGURE 4 ■ True leaves (left) and plant length (right) measured in *C. ficifolius*, *C. anguria* and F1 hybrid (FxA) from 15 to 60 days after transplanting.

Good rootstock/scion union was obtained when grafted melon into F x A at the two developmental stages (early and mature), however only plants grafted at the mature stage developed properly. In the first procedure, the development of the scion (melon) was faster than that of the rootstock and collapsed the rootstock (Figure 5 A). Plants grafted at the mature stage were transplanted to a greenhouse to study their agronomical behavior compared to ungrafted and self-grafted plants (Figure 5 B and C).

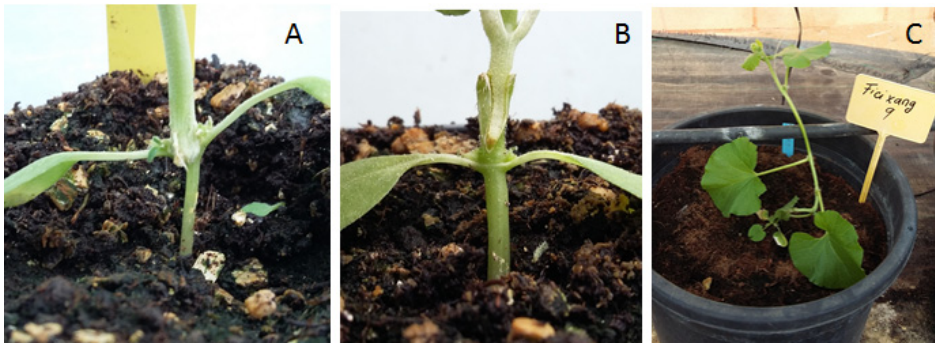


FIGURE 5 ■ Plants of *C. melo* var. *cantalupensis* grafted onto F x A at 10 days of grafting by the cleft procedure using early grafting (A) or mature grafting (B). The second ones were transplanted for evaluation under greenhouse conditions (C).

*Resistance to pathogens*

As reported previously *C. ficifolius* has been proved to be resistant to *F. oxysporum* 1, 2 (Matsumoto et al., 2011). In our assay, plants from *C. ficifolius*, *C. anguria* and from the F x A F1 hybrid did not show symptoms of *Fusarium* wilt at 30 DPI, whereas the melon control was completely death at this time. All genotypes assayed, the parents and the F1, showed mild symptoms of the different virus ZYMV, WMV and ToLCNDV, whereas the melon control showed severe symptoms of the three virus. The viral presence was confirmed by western blot and PCR in all the assayed genotypes (López et al., 2015).

In conclusion we have obtained hybrids between *C. ficifolius* x *C. anguria* and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* that could be useful as rootstocks of melon. These hybrids are unexploited materials that could be also useful in breeding programs. The characterization of these hybrids was initiated with F x A, confirming its hybrid nature. F x A showed an early growth better than *C. ficifolius* and a late growth better than *C. anguria*. Its high germination rates, good compatibility with melon after grafting, and resistance to pathogens make this hybrid a promising rootstock for melon.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank to the project funded by the Ministerio de Economía y Competitividad AGL2014-53398-C2-2-R (jointly funded by FEDER), and, to the project PHBP14/00021 funded by la Dirección de Política Universitaria del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain.

## LITERATURE CITED

- ◆ Benzioni, A., Mendlinger, S., & Ventura, M. (1991). Effect of Sowing Dates, Temperatures on Germination, Flowering, and Yield of *Cucumis metuliferus*. *HortScience*, 26(8), 1051-1053. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.26.8.1051>

- ◆ Cáceres, A., Picó, M. B., & Gisbert, C. (2016). Germination of Wild *Cucumis* Species and Interspecific Hybrids. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 227-230), Warsaw, Poland.
- ◆ Chen, J. F., & Adelberg, J. (2000). Interspecific hybridization in *Cucumis*: Progress, problems, and perspectives. *HortScience*, 35(1), 11-15.
- ◆ Cohen, R., Tyutyunik, J., Fallik, E., Oka, Y., Tadmor, Y., & Edelstein, M. (2014). Phytopathological evaluation of exotic watermelon germplasm as a basis for rootstock breeding. *Scientia Horticulturae* 165, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.007>
- ◆ Davis, A. R., Perkins-Veazie, P., Sakata, Y., López-Galarza, S., Maroto, J. V., Lee, S. G., ... Lee, J. M. (2008). Cucurbit grafting. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(1), 50–74. <https://doi.org/10.1080/07352680802053940>
- ◆ Gisbert, C., Gammoudi, N., Munera, M., Giné, A., Pocurull, M., Sorribas, F. J., & Picó, M. B. (2016). Evaluation of two potential *Cucumis* spp. resources for grafting melons. *Acta Horticulturae* (in press).
- ◆ Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Franken, J. (1980). Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, an investigation of in vivo pollen tube growth and seed set. *Euphytica*, 29(3), 661–672. <https://doi.org/10.1007/BF00023214>
- ◆ King, S., Davis, A., Liu, W., & Levi, A. (2008). Grafting for Disease Resistance. *HortScience*, 43(6), 1673-1676. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.6.1673>
- ◆ Kirkbride, J. (1993). *Biosystematic Monograph of the Genus Cucumis (Cucurbitaceae); botanical identification of cucumbers and melons*. North Carolina, USA: Parkway Publishers.
- ◆ Liu, B., Ren, J., Zhang, Y., An, J., Chen, M., Chen, H., ... Ren, H. (2015). A new grafted rootstock against root-knot nematode for cucumber, melon, and watermelon. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0234-5>

- ◆ López, C., Ferriol, M., & Picó, M. B. (2015). Mechanical transmission of *Tomato leafcurl New Delhi virus* to cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in *Cucumis melo*. *Euphytica*, 204(3), 679-691. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1371-x>
- ◆ Mafeo, T. P. (2014). Pre-sowing temperature treatment effect on emergence of *Cucumis myriocarpus* seedling. *African Journal of Agricultural Research*, 9(26), 2028-2030. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1300>
- ◆ Matsumoto, Y. (2012). Evaluation of *Cucumis ficifolius* A.Rich. Accessions for Resistance to Fusarium Wilt. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(3), 470-476. <https://doi.org/10.9734/AJEA/2012/1421>
- ◆ Matsumoto, Y., Miyagi, M., Watanabe, N., & Kuboyama, T. (2012). Temperature-dependent enhancement of pollen tube growth observed in interspecific crosses between wild *Cucumis* spp. and melon (*C. melo* L.). *Scientia Horticulturae*, 138, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.016>
- ◆ Matsumoto, Y., Ogawara, T., Miyagi, M., Watanabe, N., & Kuboyama, T. (2011). Response of Wild *Cucumis* Species to Inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1,2y. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80(4), 414-419. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.80.414>
- ◆ Rouphael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., & Colla, G. (2010). Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.001>
- ◆ Schaefer, H. (2007). *Cucumis* (*Cucurbitaceae*) must include *Cucumella*, *Dicoelospermum*, *Mukia*, *Myrmecosicyos*, and *Oreosyce*: a recircumscription based on nuclear and plastid DNA data. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 52(1), 165-177. <https://doi.org/10.3767/000651907X612427>
- ◆ Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14269-14273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005338107>



- ◆ Sigüenza, C., Schochow, M., Turini, T., & Ploeg, A. (2005). Use of *Cucumis metuliferus* as a Rootstock for Melon to Manage *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 37(3), 276–280.
- ◆ Singh, A. K., & Yadava, K. S. (1984). An Analysis of Interspecific Hybrids and Phylogenetic Implications in *Cucumis* (*Cucurbitaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 147(3-4), 237–252. <https://doi.org/10.1007/BF00989386>
- ◆ Soteriou, G. A., Kyriacou, M. C., Siomos, A. S., & Gerasopoulos, D. (2014). Evolution of watermelon fruit physicochemical and phytochemical composition during ripening as affected by grafting. *Food Chemistry*, 165, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.120>
- ◆ Trionfetti Nisini, P., Colla, G., Granati, E., Temperini, O., Crinò, P., & Saccardo, F. (2002). Rootstock resistance to fusarium wilt and effect on fruit yield and quality of two muskmelon cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93(3–4), 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00335-1)
- ◆ Walters, S. A. & Wehner, T. C. (2002). Incompatibility in diploid and tetraploid crosses of *Cucumis sativus* and *Cucumis metuliferus*. *Euphytica*, 128(3), 371–374. <https://doi.org/10.1023/A:1021212815590>
- ◆ Weng, Y. (2010). Genetic Diversity among *Cucumis metuliferus* Populations Revealed by Cucumber Microsatellites. *HortScience*, 45(2), 214-219. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.2.214>

### 2.3. Desarrollo de híbridos interespecíficos como portainjertos de melón

**Cáceres, A.,** Perpiña, G., Ferriol, M., Picó, B., & Gisbert, C. (2017). New *Cucumis* rootstocks for melon: 'UPV-FA' and 'UPV-FMy'. *HortScience*, 52(5), 792-797. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11791-17>

En este tercer trabajo se describe la caracterización de los portainjertos Fi x An y Fi x My en cuanto a resistencias, morfología y comportamiento como portainjertos de melón. Este trabajo se publicó en la revista científica HORTSCIENCE. Esta revista la edita la American Society of Horticultural Science y publica trabajos originales de investigación relacionados con distintos campos de la horticultura. Esta publicación utiliza la revisión por pares y está indexada en Journal Citation Reports en el segundo cuartil.

El trabajo realizado se enmarca en el proyecto AGL2014-53398-C2-2-R APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS Y CULTURALES PARA LA MEJORA DE LAS RESISTENCIAS Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN MELON Y SANDIA financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (cofinanciado con fondos FEDER), con apoyo del proyecto PHBP14/00021 financiado por la Dirección de Política Universitaria del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España. En este trabajo, además de los grupos mencionados anteriormente, participó la Dra. Ferriol del Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV). Mi participación ha sido financiada por parte del Gobierno de la República del Ecuador por medio de una beca de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

## NEW *CUCUMIS* ROOTSTOCKS FOR MELON: 'UPV-FA' AND 'UPV-FMY'

ANDRÉS CÁCERES<sup>1</sup>, GORKA PERPIÑA<sup>1</sup>, MARÍA FERRIOL<sup>2</sup>, BELEN PICO<sup>3</sup> AND CARMINA GISBERT<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain

<sup>2</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM-Universitat Politècnica de València)

<sup>3</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain

### ADDITIONAL INDEX WORDS

*Cucumis anguria* ■ *Cucumis myriocarpus* ■ *Cucumis ficifolius* ■ grafting

Grafting plants onto resistant rootstocks is a cultural practice spread worldwide to cope with biotic and abiotic stresses, such as fungal diseases, nematodes, drought, salinity and extreme temperatures. For Cucurbitaceae crops, the most common rootstocks are interspecific hybrids between *Cucurbita maxima* Duchesne and *Cucurbita moschata* Duchesne (Davis et al., 2008). Besides their tolerance to biotic and abiotic stresses, hybrid *Cucurbita* rootstocks are preferred because they show good emergence performance and develop long and thick hypocotyls that facilitate grafting. These hybrids have however some important shortcomings. Their excess of vigor can cause a delay in the flowering and ripening processes in grafted plants (Soteriou et al., 2016), they are not resistant to nematodes (Özarlandan et al., 2011; Cohen et al., 2014) and often have negative impacts on fruit quality (Rouphael et al., 2010; Soteriou et al., 2014; Guan et al., 2015). These effects on quality are dependent on the rootstock-scion interactions. In melon (*Cucumis melo* L.), for example, an increase of fruit size and seed cavity (Verzera et al., 2014), or modifications of flesh firmness (Colla et al., 2006; Zhao et al., 2011) as a result of grafting are common. Flesh color variations (Colla et al., 2006), vitescence

(Jang et al., 2014), and changes on pH and soluble solids content (Colla et al., 2006; Verzera et al., 2014) have also been reported.

In part due to these quality problems, grafting is less common in melon than in watermelon (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Mansf.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). However, in recent years, the withdrawal of methyl bromide (a broad spectrum pesticide highly efficient against soil borne pathogens), and the increment of global temperature, have been favoring the spread of nematodes and fungi highly damaging for melons, such as *Fusarium* spp., *Monosporascus* spp., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich and *Podosphaera xanthii* (Castagne) Braun & Shishkoff. The global warming has also a negative impact on soil salinization and drought. Consequently, the use of grafted melon plants has gained increased attention. The use of rootstocks belonging to the same species/genus as the scions could minimize the quality problems observed when using *Cucurbita* hybrids as rootstocks. Even though some promising melon accessions have been selected and used to develop *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *melonis* (Leach & Currence) Snyder & Hans spp. and *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker resistant rootstocks (Condurso et al., 2012; Verzera et al., 2014; Fredes et al., 2017), the assessment of new germplasm that may provide a wider range of resistances without decreasing fruit quality is a new challenge for melon grafting.

Apart from intraspecific variation, intrageneric variation can also be exploited in melon grafting. The genus *Cucumis* includes a large number of African, Asian, and Australian wild species (Singh & Yadava, 1984; Den Nijs & Visser, 1985; Renner et al., 2007; Sebastian et al., 2010). Strong reproductive barriers prevent the use of these resources for melon breeding (Chen & Adelberg, 2000), but the genus is potentially a good source of new rootstocks. Resistance to nematodes and to soil borne and aerial fungi have been reported in some *Cucumis* species. To date, two species have been assayed as rootstocks: *Cucumis metuliferus* Naudin (Trionfetti Nisini et al., 2002; Sigüenza et al., 2005; Kokalis-Burelle & Rosskopf, 2011; Guan et al., 2014; Gisbert et al., 2017) and *Cucumis pustulatus* Naudin ex Hook.f. (Liu et al., 2015). Despite their effectiveness in

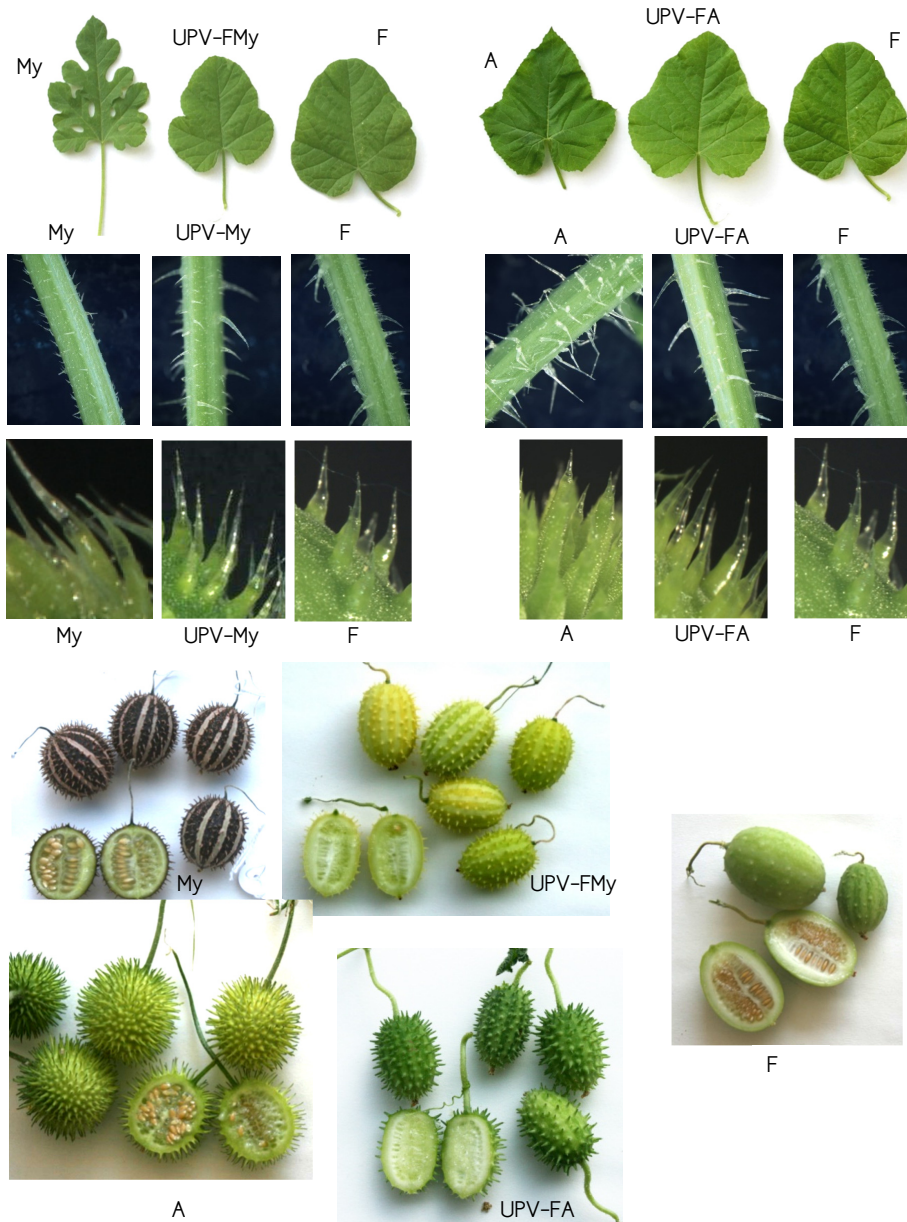
the management of soil pathogens, lower soluble solids content and softer flesh have been observed in fruits from plants grafted onto *C. metuliferus* (Trionfetti Nisini et al., 2002; Guan et al., 2014). Other *Cucumis* species useful as sources of resistance to nematodes and/or *Fusarium* spp. are *C. ficifolius* A.Rich., *C. zeyheri* Sond., *C. africanus* L.f., *C. anguria* L., and *C. myriocarpus* Naudin (Den Nijs & Custers, 1990; Trionfetti Nisini et al., 2002). One of the main difficulties when using these wild species is the reduced size and vigor of the seedlings. Differences in hypocotyl diameters between the rootstock and the scion at the grafting union, either at the time of grafting or later during the development of the grafted plants (Pofu & Mashela, 2012; Pofu et al., 2013), can result in physiological collapse of melon plants under field conditions. Vigor of wild rootstocks can be increased by using interspecific hybrids, which have the additional advantage of combining resistances or other suitable traits from both parental lines. Although hybridization between different *Cucumis* species is extremely difficult, some successful crosses are possible (Kho et al., 1980; Walters & Wehner, 2002; Matsumoto et al., 2012), especially between some wild related African species, which are phylogenetically relatively close (Den Nijs & Visser, 1985; Sebastian et al., 2010).

The research groups of “Cucurbits” and “Grafting Breeding” at COMAV-UPV (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana-Universitat Politècnica de Valencia) are working together in the development and characterization of new experimental rootstocks for cucurbit crops (Gisbert et al., 2016; Fredes et al., 2017). Germplasm characterization and crossability studies have been performed within the *Cucumis* genus in order to generate vigorous rootstocks suitable for melon. Two new interspecific *Cucumis* hybrids with good characteristics to be used as melon rootstocks have been developed: ‘UPV-FA’ (*C. ficifolius* × *C. anguria*) and ‘UPV-FMy’ (*C. ficifolius* × *C. myriocarpus*). Both hybrids have good compatibility with cultivars of the two main melon market classes (Cantaloupe and Piel de Sapo), are resistant to some of the main fungi that are pathogenic to melon, and do not negatively modify melon fruit quality.

## ORIGIN

The two new interspecific hybrids 'UPV-FA' and 'UPV-FMy' were obtained by crossing three wild African species, *Cucumis ficifolius* (F) (accession BGV012786) as female parent and the two other wild species as male parents: *Cucumis anguria* var. *longipes* (A) (accession BGV12795) and *Cucumis myriocarpus* (My) (accession BGV008535). The three accessions were held at the COMAV's Genebank. Hybridizations were conducted in a greenhouse at the UPV, under controlled conditions during the spring-summer season of 2015. Direct and reciprocal crosses were performed in all cross combinations, but fruit set was only obtained using *C. ficifolius* as female parent. Results are in accordance with previous studies, reporting that these three species are in the same compatibility group (Singh & Yadava, 1984), and with the occurrence of some form of unilateral incongruity between *C. ficifolius* and other African species such as *C. anguria*, *C. myriocarpus*, *C. zeyheri*, *C. dipsaceus* Ehrenb. ex Spach., and *C. figarei* A.Rich. (Den Nijs & Visser, 1985). The fruit set percentage was around 70% in both hybrids, quite similar to the value of 80% found in the self-pollinations of the parentals. Also, the average number ( $\pm$  standard error) of viable seeds per fruit found in the hybrid fruits ( $227.3 \pm 9.9$  and  $132.7 \pm 17.1$  for 'UPV- FMy' and 'UPV-FA', respectively) was similar or even higher than the number found in fruits derived from selfings ( $164.3 \pm 32.8$ ,  $64.3 \pm 14.5$ , and  $129.3 \pm 5.2$  for F, My, and A). The germination capacity of the hybrid seeds was tested under different experimental conditions, reaching 100% in treatments with cold stratification (Cáceres et al., 2016a). The hybrid seeds germinated earlier in comparison to their respective parentals (Cáceres et al., 2016a). Hypocotyl diameters were measured in the germinated seedlings at 21 days after sowing. The diameters of 'UPV-FMy' ( $0.28 \pm 0.0062$  cm) and 'UPV-FA' ( $0.25 \pm 0.0075$  cm) were higher than those of the wild parents ( $0.22 \pm 0.0068$ ,  $0.24 \pm 0.0033$ ,  $0.24 \pm 0.0061$  cm for F, My, and A, respectively). Seedlings were transplanted to the greenhouse and the hybrid nature was confirmed using discriminant taxonomic traits between the parentals, such as the presence of *aculei* in stems and petioles, the ratio between the hyaline and opaque parts of *aculei* of ovaries, and the shape of ovaries and fruits (Kirkbride, 1993). Intermediate

phenotypes between those of the parents were observed for these characters, which support their hybrid nature (Figure 1; Cáceres et al., 2016b).



**FIGURE 1** ■ Discriminant morphological characters among *Cucumis ficifolius* (F), *C. anguria* (A), *C. myriocarpus* (My), and their hybrids 'UPV-FMy' and 'UPV-FA'. From top to bottom: leaves, stems, aculei from ovaries with an inferior opaque part and a superior hyaline part, and fruits. The morphology was evaluated on greenhouse growing plants.

The good cross compatibility of these two interspecific crosses, along with the higher germination rates and wider hypocotyls found in the hybrids compared to their parents, confirm the advantage of using interspecific hybrids instead of single wild *Cucumis* genotypes for grafting purposes.

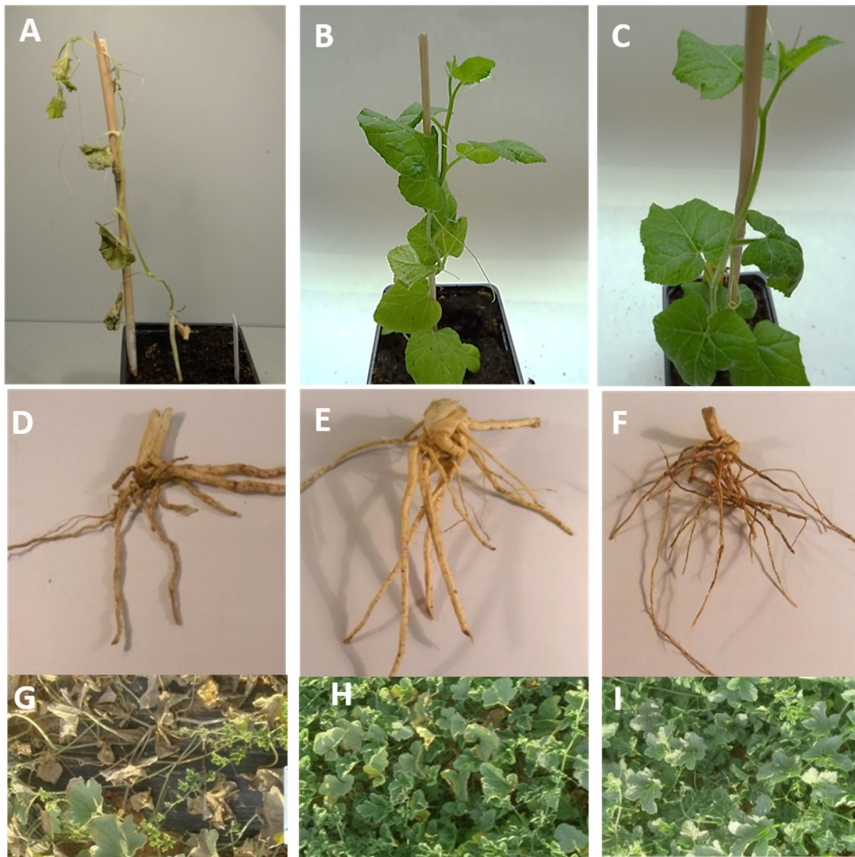
#### RESPONSES TO BIOTIC AND ABIOTIC STRESS

Wild *Cucumis* species have been reported to possess resistance to several fungal diseases (Thomas & More, 1990; Matsumoto et al., 2011). Among these diseases, *Fusarium* wilt, caused by *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, is one of the most severe for melons worldwide. Both hybrids and their respective parents were confirmed as resistant to *Fusarium* wilt by artificial inoculation of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 that was performed in a growth chamber following the protocol described by Perchepeid and Pitrat (2004). At 20 days after inoculation, plants of 'UPV-FA' and 'UPV-FMy' showed no symptoms of infection, whereas wilting of leaves and browning of the stem was observed in 50% of melon cantaloupe plants (*C. melo* var. *cantalupensis* Naudin), used as susceptible control. All cantaloupe plants finally died (Figure 2 A-C), whereas 'UPV-FA' and 'UPV-FMy' plants continued to grow, remaining symptomless at the end of the assay (40 days). These results are in agreement with those of previous reports that describe resistance to several races of *F. oxysporum* in *C. ficifolius*, *C. myriocarpus* and *C. anguria* (Liu et al., 2015).

Other soilborne pathogens with increasing economic importance for melon cultivation are nematodes (mainly *Meloidogyne* spp.) and the fungus *Monosporascus cannonballus*, responsible for the melon vine decline disease (Pivonia et al., 2010). Nematode resistance has been described in some *C. anguria* accessions (Den Nijs & Custers, 1990) and nematicide activity was also reported in *C. myriocarpus* fruit extracts (Mashela et al., 2008). Nematode resistance in 'UPV-FMy' and 'UPV-FA' is under evaluation. Both hybrids were included in a screening assay for evaluating their response to *M. cannonballus* in a naturally infested field. In comparison with the Piel de Sapo 'Piñonet' cultivar used as susceptible control, both hybrids showed different levels of



tolerance, having moderate to mild root damage and no wilted plants. Roots of each genotype extracted from the infested field are shown in Figure 2 (D-F). ‘UPV-FMy’ was moderately resistant (with a root damage score of  $3 \pm 0.50$ , in a scale of: 0 no symptoms, to 5 roots severely affected by the fungus), whereas ‘UPV-FA’ was highly resistant (root score  $1 \pm 0$ ). Roots of both hybrids had also a more vigorous and branched root structure than the ‘Piñonet’ cultivar. In this field assay, the response to powdery mildew was also observed in both, rootstocks and scion plants. The ‘Piñonet’ cultivar was highly susceptible (symptom score of  $4 \pm 0.23$ ), whereas ‘UPV-FMy’ and ‘UPV-FA’ were highly ( $0.2 \pm 0.31$ ) and moderately ( $1.02 \pm 0.31$ ) resistant (Figure 2 E-G).



**FIGURE 2** ■ Response of the two hybrids, ‘UPV-FA’ and ‘UPV-FMy’, compared with a melon susceptible control against *Fusarium oxysporum* f sp. *melonis*: plants of cantaloupe (A), ‘UPV-FA’ (B) and ‘UPV-FMy’ (C); against *Monosporascus cannonballus*: roots extracted from naturally infested soil of cv. ‘Piñonet Piel de Sapo’ (D), ‘UPV-FA’ (E) and ‘UPV-FMy’ (F); against powdery mildew: plants cultivated in and open field of cv. ‘Piñonet Piel de Sapo’ (G), ‘UPV-FA’ (H) and ‘UPV-FMy’ (I).

The two new putative rootstocks were also evaluated against osmotic stress using clones from plants maintained *in vitro*. These clones were grown on media BM (4.4 mg.L<sup>-1</sup> Murashige and Skoog salts, including vitamins, 2% sucrose, and 0.75% plant agar), containing sorbitol at three different concentrations: 0, 0.05, 0.1, and 0.2 M. The addition of compounds such as sorbitol to culture medium reduces the water potential so it is harder for plants to uptake water, simulating water deficient conditions in soil (Verslues et al., 2006). The Piel de Sapo 'Piñonet' cultivar showed great growth inhibition in a previous assay in medium with sorbitol after 45 days of culture (the fresh weight of plants was reduced a 49% and a 92% in media with sorbitol at 0.05 and 0.1M, respectively). *Cucumis metuliferus*, which is another wild species used as putative rootstock for melon (Trionfetti Nisini et al., 2002; Sigüenza et al., 2005; Kokalis-Burelle & Roskopf, 2011; Guan et al., 2014; Gisbert et al., 2017) was also included in the assay conducted to evaluate 'UPV-FMy' and 'UPV-FA'. Differences in vine growth and rooting inhibition were observed after 30 and 45 days (Table 1). After these periods, plant fresh and dry weight were noted. Root characteristics (length, number of tips and root diameter) were measured using the WhinRhizo's software. At the lowest sorbitol concentration (0.05 M), vine growth and root development were inhibited in *C. metuliferus* after 30 days of culture, whereas both hybrids 'UPV-FMy' and 'UPV-FA' only showed a mild vine growth inhibition. This behavior was maintained after 45 days of culture, even at the intermediate sorbitol concentration (0.1 M) (Table 1). Rooting was not observed in any genotype in culture medium with 0.2 M sorbitol. This result was expected as no growth was also observed in other works using this very high concentration (Claeys et al., 2014). Of the two hybrids, 'UPV-FA' was more tolerant than 'UPV-FMy' (Table 1), with sorbitol causing less root length and branching reduction. A good root development is an important trait for putative rootstocks

TABLE 1 ■ Plant fresh and dry weight and root parameters of 'UPV-FA', 'UPV-My' and *C. metuliferus* after 45 days of culture on BM medium with sorbitol (0, 0.05, 0.1 and 0.2M).

| ROOTSTOCK <sup>z</sup> | SORBITOL (M) | PLANT FRESH WEIGHT (G) <sup>z</sup> | PLANT DRY WEIGHT (G) <sup>z</sup> | ROOT <sup>y</sup> LENGTH (MM) <sup>z</sup> | TIPS <sup>y</sup> NUMBER <sup>z</sup> | ROOT DIAMETER <sup>y</sup> (MM) <sup>z</sup> |
|------------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| 'UPV-FA'               | 0            | 1.05 a <sup>x</sup>                 | 0.069 a                           | 68.43 ab                                   | 169.86 ab                             | 0.36 b                                       |
|                        | 0.05         | 0.94 ab<br>(-10.3%) <sup>w</sup>    | 0.061 ab<br>(-11.9%)              | 91.10 a<br>(+33.1%)                        | 220.28 a<br>(+29.7%)                  | 0.36 b<br>(-0.08%)                           |
|                        | 0.1          | 0.50 d<br>(-52.2%)                  | 0.04 c<br>(-41.8%)                | 58.32 bc<br>(-14.8%)                       | 168.43 ab<br>(-0.8%)                  | 0.37 ab<br>(3.1%)                            |
|                        | 0.2          | 0.04 f<br>(-96.0%)                  | 0.008 e<br>(-88.3%)               | -  | -                                     | -  |
| 'UPV-FMy'              | 0            | 0.89 abc                            | 0.071 a                           | 58.91 bc                                   | 131.86 bc                             | 0.34 b                                       |
|                        | 0.05         | 0.74 c<br>(-17.2%)                  | 0.055 b<br>(-22.2%)               | 73.11 ab<br>(+24.1%)                       | 195.07 ab<br>(+47.9%)                 | 0.36 ab<br>(+8.0%)                           |
|                        | 0.1          | 0.30 e<br>(-64.2%)                  | 0.027 d<br>(-62.1%)               | 34.62 d<br>(-41.2%)                        | 78.26 cd<br>(-40.7%)                  | 0.33 b<br>(-2.5%)                            |
|                        | 0.2          | 0.04 f<br>(-95.1%)                  | 0.006 e<br>(-92.2%)               | -  | -                                     | -  |
| <i>C. metuliferus</i>  | 0            | 0.80 bc                             | 0.059 ab                          | 41.34 cd                                   | 97.92 cd                              | 0.41 a                                       |
|                        | 0.05         | 0.29 e<br>(-63.9%)                  | 0.023 d<br>(-60.6%)               | 19.20 de<br>(-53.6%)                       | 41.75 de<br>(-57.4%)                  | 0.38 ab<br>(-9.0%)                           |
|                        | 0.1          | 0.06 f<br>(-92.9%)                  | 0.007 e<br>(-88.8%)               | 3.35 e<br>(-91.9%)                         | 11.0 e<br>(-88.8%)                    | 0.32 b<br>(-21.6%)                           |
|                        | 0.2          | 0.02 f<br>(-97.7%)                  | 0.003 e<br>(-95.0%)               | -  | -                                     | -  |

<sup>z</sup> N=15 plants for each treatment (Rootstock and Sorbitol concentration). <sup>y</sup> Root parameters were measured with the program Win Rhizo<sup>s</sup>.

<sup>x</sup> Different letters in the same column indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>w</sup> The percentage of reduction or increase in relation to values obtained on media with 0M sorbitol are shown in brackets (negative symbol was added to indicate reduction compared to the control and positive symbol to indicate increase).

## PERFORMANCE AS ROOTSTOCKS

The performance of 'UPV-FA' and 'UPV-FMy' as rootstocks was evaluated with two different melon scions. A first evaluation was performed in a greenhouse under hydroponic conditions, using a cantaloupe Charentais as scion. Plants were grafted using the cleft procedure (Lee et al., 2010) and high rates of success were obtained (>90%). The responses of cantaloupe plants grafted onto 'UPV-FA' and 'UPV-FMy' were compared with cantaloupe non-grafted plants. Similar vine growth was observed in grafted and non-grafted plants. Grafting onto 'UPV-FA' and 'UPV-FMy' did not delay female flowering or fruit ripening, and did not alter the number of flowers and fruit set. On average, the first female flower opened from 35.3 to 37.3 days after transplanting and fruits needed from 40.0 to 41.3 days after pollination to reach full maturity. In order to evaluate the impact of grafting on fruit quality, fruits were characterized for the following traits: weight (g), length and width (cm), shape (length/width), cavity width (cm), rind and flesh firmness ( $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) (measured with a digital Penetrometer (8 mm) FHT-803<sup>®</sup>, Melrose, MA), total soluble solids (quantified through a digital Refractometer Atago<sup>®</sup>, Tokyo, Japan), pH (measured with pH-indicator paper pH1-14 Merck, Darmstadt, Germany) and flesh color (measured with a colorimeter, Minolta CR-400, New Jersey, USA, using the color parameters Hunter L, a and b). No significant differences were found in any of these traits between fruits from plants grafted onto 'UPV-FA' and fruits from non-grafted plants (Table 2). The fruits from plants grafted onto 'UPV-FMy' only differed from those of non-grafted plants in the fruit shape, being slightly more flattened, in the sugars content ( $^{\circ}\text{Brix}$  13.3 *versus* 12.3) and in the flesh color (significantly higher value of the parameter *a* that measures color from red to green) (Table 2, Figure 3). Therefore, quality parameters were not modified or only slightly positively modified by these rootstocks, which did not cause negative impact on commercial traits.

TABLE 2 ■ Characteristics of cantaloupe melon fruits harvested from non-grafted plants (NG) and plants grafted onto the experimental hybrids 'UPV-FMy' (*C. ficifolius* x *C. myriocarpus*) and 'UPV-FA' (*C. ficifolius* x *C. anguria*).

|                                       | NON-GRAFTED NG      | GRAFTED ONTO<br>'UPV-FMy' | GRAFTED ONTO<br>'UPV-FA' |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| Number of fruit/plant <sup>z</sup>    | 3.60 a <sup>y</sup> | 3.80 a                    | 3.85 a                   |
| Fruit weight (g)                      | 727.08 a            | 688.64 a                  | 659.90 a                 |
| Fruit length FL (cm)                  | 10.56 a             | 10.29 a                   | 10.39 a                  |
| Fruit width FW (cm)                   | 11.28 a             | 11.23 a                   | 10.97 a                  |
| Fruit shape (FL/FW)                   | 0.94 b              | 0.92 a                    | 0.95 b                   |
| Cavity width (cm)                     | 5.14 a              | 4.99 a                    | 4.96 a                   |
| Rind firmness (kg.cm <sup>-2</sup> )  | 12.30 a             | 12.76 a                   | 12.72 a                  |
| Flesh firmness (kg.cm <sup>-2</sup> ) | 2.77 a              | 2.77 a                    | 2.78 a                   |
| Total Soluble Solids (°Brix)          | 12.33 a             | 13.32 b                   | 12.34 a                  |
| pH                                    | 6.14 a              | 6.29 a                    | 6.21 a                   |
| Hunter L                              | 53.95 a             | 53.83 a                   | 53.38 a                  |
| Hunter a                              | 11.36 a             | 12.16 b                   | 11.24 a                  |
| Hunter b                              | 22.10 a             | 22.92 a                   | 22.15 a                  |

<sup>z</sup> The total number of fruit collected in each combination was: 50 for 'UPV-FA'; 38 for 'UPV-FMy' and 36 for cv. 'Charentais'. All were analyzed for quality.

<sup>y</sup> Different letters in the same line indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test ( $P \leq 0.05$ ).

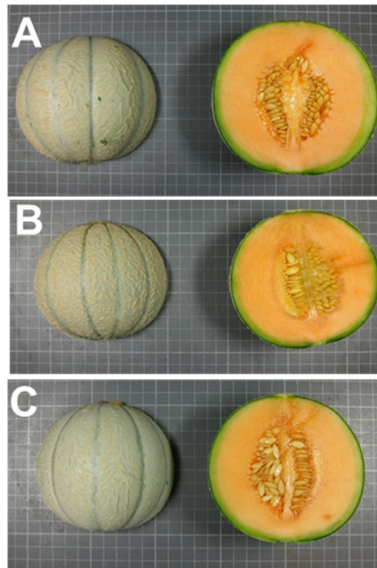


FIGURE 3 ■ Fruit of cantaloupe melons cv. Vedrantais (Charentais type) from ungrafted plants (A) and plants grafted onto 'UPV-FMy' (B) and 'UPV-FA' (C).

A second evaluation of the experimental hybrids 'UPV-FA' and 'UPV-FMy' was performed under field conditions using the commercial melon 'Finura' (Rijk ZWaan) (*C. melo* var. *inodorus* H.Jacq. market class 'Piel de Sapo') as scion. In this assay, both experimental rootstocks were also compared with a commercial rootstock of melon (64-376RZ, Rijk Zwaan) and one *C. maxima* x *C. moschata* rootstock (the commercial hybrid Cobalt, Rijk Zwaan). Additionally, non-grafted and self-grafted plants of 'Finura' were used as controls. All grafted plants were produced by a commercial nursery "Viveros la Sala" (San Pedro del Pinatar, Spain) and were transplanted to an experimental field located in Picassent (Valencia, Spain). Plant vigor was evaluated during the growing period (at 10, 30 and 60 days after transplanting DAT) in a scale of 0 (very low), 1 (low), 2 (intermediate), 3 (high) and 4 (very high), and the appearance of the first female flowers was recorded. Both commercial rootstocks, 'Cobalt' and '64-376 RZ', conferred high early vigor, similar to the self-grafted melons (average scores,  $\pm$  standard error, at 10 DAT from  $3.25 \pm 0.32$  to  $3.75 \pm 0.14$ ), which was associated to an earlier appearance of the first female flower; whereas the two interspecific hybrids resulted in less vigorous plants, similar to the non-grafted melons (scores from  $2.63 \pm 0.24$  to  $2.75 \pm 0.14$ ). However, no significant differences in plant vigor were found among rootstocks at 30 and 60 DAT (scores ranging from  $3.25 \pm 0.25$  to  $4 \pm 0$  in plants grafted on the different rootstocks). In fact, at 60 DAT, when most fruits were considered to have reached the commercial ripening stage, the average number of fruits and marketable yield per plant was similar in all the combinations (3.04 fruit.plant and 6.74 Kg.plant<sup>-1</sup> in average).

Similarly to the previous assay with cantaloupe melons, fruit quality traits (including rind and flesh thickness) were measured in 16 representative fruits per combination (four of each plot). External quality traits, such as fruit shape and rind thickness, were similar in fruits of cv. 'Finura' harvested in plants grafted onto the two interspecific *Cucumis* hybrids ('UPV-FMy' and 'UPV-FA') and onto the commercial melon rootstock '64-376 RZ' (Table 3). No differences in fruit size and shape were found among melons developed on these *Cucumis* rootstocks and those developed on non-grafted and self-grafted plants, whereas the *Cucurbita* hybrid 'Cobalt' resulted

**TABLE 3** ■ Marketable yield and quality traits of melon fruits cv. 'Finura' (Piel de Sapo) harvested from non-grafted plants (NG), self-grafted plants (SG) and plants grafted onto the experimental *Cucurbita* (*C. maxima* x *C. moschata*) hybrid F1, the commercial *Cucurbita* hybrid Cobalt, the commercial *Cucumis melo* rootstock 64-376RZ, and two new experimental *Cucumis* F1: 'UPV-FMy' (*C. ficifolius* x *C. myriocarpus*) and 'UPV-FA' (*C. ficifolius* x *C. anguria*).

|                                       | NON-GRAFTED<br>NG  | SELF-GRAFTED<br>SG | GRAFTED ONTO<br><i>CUCURBITA</i><br>F1 COBALT | GRAFTED ONTO<br><i>CUCUMIS</i><br>64-376RZ | GRAFTED ONTO<br><i>CUCUMIS</i><br>'UPV-FMY' | GRAFTED ONTO<br><i>CUCUMIS</i><br>'UPV-FA' |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|---|--|---|--|
| Marketable fruit yield /plot (kg)     | 32.33 <sup>a</sup> | 27.78 a            | 26.95 a                                       | 26.86 a                                    | 24.83 a                                     | 22.91 a                                    |
| Fruit weight (g) <sup>γ</sup>         | 2502.27 ab         | 2578.25 ab         | 2960.15 c                                     | 2806.50 bc                                 | 2351.94 a                                   | 2513.56 ab                                 |
| Fruit length FL (cm)                  | 22.74 a            | 22.82 ab           | 23.71 ab                                      | 24.14 b                                    | 22.45 a                                     | 23.39 abc                                  |
| Fruit width FW (cm)                   | 15.31 ab           | 15.32 ab           | 16.28 c                                       | 15.71 bc                                   | 14.63 a                                     | 15.18 ab                                   |
| Fruit shape (FL/FW)                   | 1.49 ab            | 1.49 ab            | 1.46 a  | 1.54 b                                     | 1.53 b                                      | 1.54 b                                     |
| Rind thickness (mm)                   | 5.13 ab            | 5.44 b             | 4.62 a  | 5.42 b                                     | 5.46 b                                      | 4.68 ab                                    |
| Flesh thickness (cm)                  | 37.13 ab           | 38.92 ab           | 35.61 a                                       | 41.17 b                                    | 36.58a b                                    | 36.59 ab                                   |
| Cavity width (cm)                     | 5.76 a             | 5.77 a             | 7.22 c  | 6.03 ab                                    | 5.57 a                                      | 6.47 b                                     |
| Rind firmness (kg.cm <sup>-2</sup> )  | 13                 | 13                 | 13  | 13   | 13  | 13   |
| Flesh firmness (kg.cm <sup>-2</sup> ) | 2.15 a             | 2.41 a             | 2.24 a  | 2.60 a                                     | 2.48 a                                      | 3.26 b                                     |
| Total Soluble Solids (°Brix)          | 11.93 ab           | 12.13 ab           | 13.59 c                                       | 12.56 b                                    | 12.41 b                                     | 11.23 a                                    |
| pH                                    | 5.75 ab            | 5.78 ab            | 5.97 bc                                       | 6.09 c                                     | 5.50 a                                      | 5.59 a                                     |
| Hunter L                              | 63.65 a            | 63.30 a            | 64.99 ab                                      | 68.30 b                                    | 66.11 ab                                    | 66.81 ab                                   |
| Hunter a                              | -2.63 a            | -2.48 a            | -1.86 b                                       | -2.88 a                                    | -2.67 a                                     | -2.57 a                                    |
| Hunter b                              | 9.42 a             | 9.23 a             | 9.26 a  | 11.56 b                                    | 9.75 a                                      | 9.24 a                                     |

<sup>z</sup> Different letters in the same row indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>γ</sup> Average weight for the sixteen fruit per treatment (4 fruit/plot) used for quality characterization.

in significantly larger fruits (average,  $\pm$  standard error, fruit weight  $2960 \pm 168.15$  g versus  $2502 \pm 60.94$  g and  $2578 \pm 100.30$  g in non-grafted and self-grafted melons respectively) with a wider seed cavity ( $7.22 \pm 2.25$  cm versus  $5.76 \pm 1.71$  and  $5.77 \pm 2.67$  cm) (Table 3). These effects are commonly observed when *Cucurbita* hybrids are used for grafting melon or watermelon (Colla et al., 2006; Verzera et al., 2014). The 'UPV-FA' rootstocks also caused a slight increase of fruit seed cavity ( $6.47 \pm 2.35$  cm). Figure 4 shows fruits from the different rootstocks in which the higher fruit size and seed cavity can be appreciated.



FIGURE 4 ■ Fruit of Piel de sapo melons cv. Finura from ungrafted plants (A) and plants grafted onto *C. maxima* x *C. moschata* hybrid Cobalt (B), the *Cucumis melo* 64-376RZ (C) 'UPV-FMy' (D) and 'UPV-FA' (E).

Regarding flesh properties, we found significantly firmer flesh in fruits from 'UPV-FA' ( $3.26 \pm 0.19$  versus  $2.15 \pm 0.16$  and  $2.41 \pm 0.26$  in non-grafted and self-grafted plants respectively) and flesh with significantly higher Brix degree in those fruits from the *Cucurbita* rootstocks ( $13.59 \pm 0.28$  versus  $11.93 \pm 0.45$  and  $12.13 \pm 0.39$  Brix) (Table 3). These two effects do not affect negatively fruit quality. An effect on flesh color was also observed in fruits derived from the commercial *Cucurbita* and melon rootstocks. The former showed a significantly higher value of the *a* parameter ( $-1.87 \pm 0.26$ ), which means less greenish flesh, and the latter caused a significant increase of the *b* parameter value ( $11.56 \pm 0.63$ ), which means a more yellowish flesh. The wild *Cucumis* hybrids did not alter flesh color in comparison to fruits of non-grafted and self-grafted plants ( $-2.57 \pm 0.19$  to  $-2.67 \pm 0.12$  and  $9.24 \pm 0.32$  to  $9.75 \pm 0.22$  for the *a* and *b* parameter values respectively in all combinations).



## USE

The results obtained in the characterization of ‘UPV-FA’ and ‘UPV-FMy’ indicated that both hybrids can be used as melon rootstocks. The good cross compatibility between the parents facilitates hybrid seed generation, and the high germination rates along with the wider hypocotyls will be essential for grafting management. Their resistance/tolerance to *F. oxysporum* and *M. cannonballus* and their good agronomical performance with two commonly used melon scions, make both hybrids comparable to other rootstocks used for grafting melon. In comparison with *Cucurbita* commercial rootstocks, ‘UPV-FA’ and ‘UPV-FMy’ have less early vigor and do not anticipate female flowering. However, no differences in vigor and fruit set are found at the end of the growing cycle. These *Cucumis* hybrids do not cause fruit size increase and only ‘UPV-FA’ slightly increased cavity thickness, both effects commonly observed with *Cucurbita* hybrids rootstocks. An additional value of these rootstocks is their good tolerance to osmotic stress, especially in ‘UPV-FA’. Also their tolerance to powdery mildew can facilitate their management during rootstock seed production, and as it has been reported in other crops, contribute to improve the scion response to this disease.

## LITERATURE CITED

- ◆ Cáceres, A., Picó, M. B., & Gisbert, C. (2016a). Germination of Wild *Cucumis* Species and Interspecific Hybrids. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XI<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 227-230), Warsaw, Poland.
- ◆ Cáceres, A., Ferriol, M., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2016b). Use of Wild *Cucumis* as Potential New Rootstocks for Melons. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XI<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 300-304), Warsaw, Poland.
- ◆ Chen, J. F., & Adelberg, J. (2000). Interspecific hybridization in *Cucumis* - Progress, problems, and perspectives. *HortScience*, 35(1), 11–15.

- ◆ Claeys, H., Van Landeghem, S. Dubois, M. Maleux, K., & Inzé, D. (2014). What is stress? Dose-Response Effects in Commonly Used in Vitro Stress Assays. *Plant Physiology*, 165(2), 519-527. <https://doi.org/10.1104/pp.113.234641>
- ◆ Cohen, R., Tyutyunik, J., Fallik, E., Oka, Y., Tadmor, Y., & Edelstein, M. (2014). Phytopathological evaluation of exotic watermelon germplasm as a basis for rootstock breeding. *Scientia Horticulturae*, 165, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.007>
- ◆ Colla, G., Roupael, Y., Cardarelli, M., Massa, D., Salerno, A., & Rea, E. (2006). Yield, fruit quality and mineral composition of grafted melon plants grown under saline conditions. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(1), 146–152. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512041>
- ◆ Condurso, C., Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Crinò, P., Paratore, A., & Romano, D. (2012). Effects of different rootstocks on aroma volatile compounds and carotenoid content of melon fruits. *Scientia horticulturae*, 148, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.015>
- ◆ Davis, A. R., Perkins-Veazie, P., Hassell, R., Levi, A., King, S. R., & Zhang, X. (2008). Grafting effects on vegetable quality. *HortScience*, 43(6), 1670–1672.
- ◆ Den Nijs, A. P. M., & Custers, J. B. M. (1990). Introducing resistances into cucumbers by interspecific hybridization. In: D. M. Bates, R.W. Robinson & C. Jeffrey (Eds.). *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae* (pp. 382-396). London, UK: Cornell University Press.
- ◆ Den Nijs, A. P. M., & Visser, D. L. (1985). Relationships between African species of the genus *Cucumis* L. Estimated by the production, vigour and fertility of F1 hybrids. *Euphytica*, 34(2), 279–290. <https://doi.org/10.1007/BF00022920>
- ◆ Fredes, A., Roselló, S., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., Pérez-de-Castro, A., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2017). Fruit quality assessment of watermelons grafted onto citron melon rootstock. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1646–1655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7915>.
- ◆ Gisbert, C., Gammoudi, N., Munera, M., Giné, A., Pocurull, M., Sorribas, F. J., & Picó, M. B. (2017). Evaluation of two potential *Cucumis* spp. resources

for grafting melons. *Acta Horticulturae*, 1151, 157–162. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.25>.

- ◆ Gisbert, C., Cáceres, A., Perpiñá, G., Bernat, G., Pérez-de-Castro, A., & Picó, M. B. (2016). El injerto como técnica para la recuperación de variedades tradicionales: “el meló d’Or de Ontinyent”, un caso de estudio. *Phytoma*, 282, 40–47.
- ◆ Guan, W., Zhao, X., & Huber, D. J. (2015). Grafting with an Interspecific Hybrid Squash Rootstock Accelerated Fruit Development and Impaired Fruit Quality of Galia Melon. *HortScience*, 50(12), 1833–1836. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.12.1833>.
- ◆ Guan, W., Zhao, X., Dickson, D. W., Mendes, M. L., & Thies, J. (2014). Root-knot Nematode Resistance , Yield , and Fruit Quality of Specialty Melons Grafted onto *Cucumis metulifer*. *HortScience*, 49(8), 1046–1051. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.8.1046>.
- ◆ Jang, Y., Huh, Y.C., Park, D.K., Mun, B., Lee, S., & Um, Y. (2014). Greenhouse Evaluation of Melon Rootstock Resistance to *Monosporascus* Root Rot and Vine Decline as Well as of Yield and Fruit Quality in Grafted “Inodorus” Melons. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 32(5), 614–622. <https://dx.doi.org/10.7235/hort.2014.14065>
- ◆ Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Franken, J. (1980). Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, an investigation of in vivo pollen tube growth and seed set. *Euphytica*, 29(3), 661–672. <https://doi.org/10.1007/BF00023214>
- ◆ Kirkbride, J. (1993). *Biosystematic Monograph of the Genus Cucumis (Cucurbitaceae); botanical identification of cucumbers and melons*. North Carolina, USA: Parkway Publishers.
- ◆ Kokalis-Burelle, N., & Roskopf, E. N. (2011). Microplot Evaluation of Rootstocks for Control of *Meloidogyne incognita* on Grafted Tomato, Muskmelon, and Watermelon. *Journal of Nematology*, 43(3–4), 166–171.
- ◆ Lee, J. M., Kubota, C., Tsao, S. J., Bie, Z., Echevarria, P. H., Morra, L., & Oda, M. (2010). Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 93–105.

- ◆ Liu, B., Ren, J., Zhang, Y., An, J., Chen, M., Chen, H., ... Ren, H. (2015). A new grafted rootstock against root-knot nematode for cucumber, melon, and watermelon. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0234-5>
- ◆ Mashela P. W., Shimelis, H. A., & Mudau, F. N. (2008). Comparison of the Efficacy of Ground Wild Cucumber Fruits, Aldicarb and Fenamiphos on Suppression of *Meloidogyne incognita* on Tomato. *Journal of Phytopathology*, 156(5), 264-267. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01353.x>
- ◆ Matsumoto, Y., Miyagi, M., Watanabe, N., & Kuboyama, T. (2012). Temperature-dependent enhancement of pollen tube growth observed in interspecific crosses between wild *Cucumis* spp. and melon (*C. melo* L.). *Scientia Horticulturae*, 138, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.016>
- ◆ Matsumoto, Y., Ogawara, T., Miyagi, M., Watanabe, N., & Kuboyama, T. (2011). Response of Wild *Cucumis* Species to Inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1,2y. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80(4), 414–419. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.80.414>
- ◆ Özarıslandan, A., Söğüt, M. A., Yetisir, H., & Elekçiođlu, I. H. (2011). Screening of bottle gourds (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley) genotypes with rootstock potential for watermelon production for resistance against *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood and *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood. *Turkish Journal of Entomology*, 35(4), 687-697.
- ◆ Percepied, L., & Pitrat, M. (2004). Polygenic Inheritance of Partial Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1.2 in Melon. *Phytopathology*, 94(12), 1331-1336. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.12.1331>
- ◆ Pivonia, S., Gerstl, Z., Maduel, A., Levita, R., & Cohen, R. (2010). Management of *Monosporascus* sudden wilt of melon by soil application of fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 201-209. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9644-7>
- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mafeo, T. P. (2013). Optimising stem diameters of watermelon cultivars and indigenous *Cucumis* species for improving

compatibility of inter-generic grafts. *Acta Horticulturae*, 1007, 807-812. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1007.96>

- ◆ Pofu, K. M., & Mashela, P. W. (2012). Improving survival of inter-generic grafts of nematode-susceptible watermelon cultivars and nematode-resistant *Cucumis* species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 62(4), 383-386. <https://doi.org/10.1080/09064710.2011.614634>
- ◆ Renner, S. S., Schaefer, H., & Kocyan, A. (2007). Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*, 7, 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-58>
- ◆ Roupael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., & Colla, G. (2010). Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.001>
- ◆ Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14269–14273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005338107>
- ◆ Sigüenza, C., Schochow, M., Turini, T., & Ploeg, A. (2005). Use of *Cucumis metuliferus* as a Rootstock for Melon to Manage *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 37(3), 276–280.
- ◆ Singh, A. K., & Yadava, K. S. (1984). An analysis of interspecific hybrids and phylogenetic implications in *Cucumis* (Cucurbitaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 147(3-4), 237–252. <https://doi.org/10.1007/BF00989386>
- ◆ Soteriou, G. A., Papayiannis, L. C., & Kyriacou, M. C. (2016). Indexing melon physiological decline to fruit quality and vine morphometric parameters. *Scientia horticulturae*, 203, 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.032>
- ◆ Soteriou, G. A., Kyriacou, M. C., Siomos, A. S., & Gerasopoulos, D. (2014). Evolution of watermelon fruit physicochemical and phytochemical composition

during ripening as affected by grafting. *Food Chemistry*, 165, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.120>

- ◆ Thomas, P., & More, T. A. (1990). Screening wild *Cucumis* sp. in the field and with artificial inoculation against *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 13, 18–19.
- ◆ Trionfetti Nisini, P., Colla, G., Granati, E., Temperini, O., Crinò, P., & Saccardo, F. (2002). Rootstock resistance to fusarium wilt and effect on fruit yield and quality of two muskmelon cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93(3–4), 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00335-1)
- ◆ Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- ◆ Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Condurso, C., Crinò, P., Romano, D., ... Paratore, A. (2014). Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L . subsp . *melo* var . *inodorus* H . Jacq .) in relation to different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 169, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.008>
- ◆ Walters, S. A., & Wehner, T. C. (2002). Incompatibility in diploid and tetraploid crosses of *Cucumis sativus* and *Cucumis metuliferus*. *Euphytica*, 128(3), 371–374. <https://doi.org/10.1023/A:1021212815590>
- ◆ Zhao, X., Guo, Y., Huber, D. J., & Lee, J. (2011). Grafting effects on postharvest ripening and quality of 1-methylcyclopropene-treated muskmelon fruit. *Scientia Horticulturae*, 130(3), 581-587. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.010>



## CAPÍTULO 3

---

# Poliploidización como herramienta de mejora en portainjertos





## Capítulo 3

### Poliploidización como herramienta de mejora en portainjertos

#### 3.1. Desarrollo de alopoliploides para su uso como portainjertos de melón

El presente trabajo se está preparando para su envío a BMC Plant Biology e incluye la obtención de alopoliploides  $6n$  derivados de los híbridos  $3n$  entre la especie tetraploide *Cucumis ficifolius* y dos especies diploides *C. anguria* y *C. myriocarpus*. Se caracteriza el grado de ploidía de las especies parentales y de los híbridos interespecíficos UPV-FA y UPV-FMy, describiéndose distintas estrategias para la diploidización de los híbridos. Se caracterizan, así mismo, los híbridos poliploides según distintos parámetros relacionados con su utilidad como portainjertos. Además, se profundiza en los mecanismos genéticos que contribuyen a la recuperación de la fertilidad tras la poliploidización.

Los trabajos se realizaron por el grupo de Mejora de Cucurbitáceas del COMAV y el grupo de cultivo *in vitro* y desarrollo de portainjertos del COMAV, en estrecha colaboración con C. Romero del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, de la UPV, y María Ferriol, del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la UPV. El trabajo realizado es consecuencia de la participación del grupo de investigación en los proyectos AGL2014-53398-C2-2-R/AGL2017-85563-C2-1-R de Feder/ Ministerio de Economía y Competitividad/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades–Agencia Estatal de Investigación, y proyecto para Grupos de Excelencia Prometeo 2017/078 “Selección de Variedades Tradicionales y Desarrollo de Nuevas Variedades de Cucurbitáceas Adaptadas a la Producción Ecológica”, financiado por la Conselleria de Educació, Investigació, Cultura i Esport. La participación de Andrés Cáceres ha sido financiada por parte del Gobierno de la República del Ecuador por medio de una beca de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt).

Author's contribution: CG and BP conceived, leaded the study and write the manuscript. AC was responsible of planting materials and contribute most to the experiments to characterize allopolyploids and progenies with the help of MF. CG analyzed pollen viability, and the ploidy level of plants with contributions of CR. BP and CR analyzed the GBS results. All authors read and approved the final manuscript.

CHARACTERIZATION OF ALLOPOLYPLOID PLANTS FROM TWO INTERSPECIFIC  
*CUCUMIS* HYBRIDS (UPV-FA AND UPV-FMY) USEFUL AS MELON ROOTSTOCKS

INTRODUCTION

Grafting is useful to face biotic and abiotic stresses if adequate rootstocks are available (Colla et al., 2017). The interest in the development of new rootstocks for melon (*Cucumis melo* L.) has increased since the removal of methyl bromide, because nematodes and other soil-borne pathogens have become an increasing problem in this crop. Also changes in climate increase the severity of abiotic stress scenarios (salinity, suboptimal temperatures, drought, or flooding) and enhance the spread of soil pathogens to new areas and hosts. For example, melon vine declines associated to fungal species of the *Fusarium solani* complex are being reported in cucurbit hosts, including melon (Gonzalez et al., 2019), where traditionally *Fusarium* wilt has been associated to the presence of different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Other fungi, such as *Macrophomina phaseolina*, responsible of the charcoal rot is being associated with melon root more often than expected in temperate areas.

The interspecific hybrids *Cucurbita maxima* Duchesne x *Cucurbita moschata* Duchesne have been very useful for grafting cucurbits, mainly watermelon and to a lesser extent melon (Davis et al., 2008; King et al., 2010; Kyriacou et al., 2017). However, they are not resistant to nematodes, their response to the species of the *Fusarium solani* complex needs to be evaluated, and in some rootstocks-scion combinations, they may cause negative impact in fruit quality (Fredes et al., 2017; Leonardi et al., 2017; Kyriacou et al., 2018). These limitations are the reasons why new rootstocks are in study to be applied when the interspecific *Cucurbita* hybrids are not adequate.

The genus *Cucumis* includes, apart from the two major commercial vegetable crops, melon and cucumber (*Cucumis sativus* L.), many wild species of African, Asian or Australian origin (Singh & Yadava, 1984; Renner et al., 2007; Sebastian et al., 2010)

which represent a broad genetic variation (intraspecific and interspecific) that could be very useful in breeding programs. However, the strong reproductive barriers between wild and cultivated species have limited the use of these wild resources (Kirkbride, 1993; Chen & Adelberg, 2000; Matsumoto et al., 2012). This sexual incompatibility does not hamper the use of the *Cucumis* genus as source of new rootstocks. Some of these species have been tested for their ability to be used as rootstocks for melon, such as the nematode resistant species *Cucumis metuliferus* Naudin (Sigüenza et al., 2005; Kokalis-Burelle & Roskopf, 2011; Guan et al., 2014; Expósito et al., 2018) and *Cucumis pustulatus* Naudin ex Hook.f. (Liu et al., 2015). Also, some successful hybridizations have been reported (Kroon et al., 1979; Kho et al., 1980; Den Nijs & Visser, 1985; Chen & Adelberg, 2000). The COMAV's groups of cucurbits breeding and grafting obtained two new interspecific hybrids by crossing *Cucumis ficifolius* A. Rich. (as female parent) with *Cucumis anguria* L. (UPV-FA) and *Cucumis myriocarpus* Naudin (UPV-FMy). Both hybrids have tolerance or resistance to several soil-borne pathogens and display good performance as melon rootstocks (Cáceres et al., 2017; Gisbert et al., 2019). Despite these represent good alternatives compared to *Cucurbita* rootstocks, the *Cucumis* species develop seedlings with less size and vigour. Differences in hypocotyl diameters between the rootstock and the melon scion can difficult the grafting procedure and produce sometimes physiological collapse, at grafting time or later under field conditions (Pofu & Mashela, 2012; Pofu et al., 2013). Increasing the hypocotyl diameter would facilitate the grafting procedure. The development of polyploid plants can be a useful strategy to achieve this goal. The use of antimitotic agents like colchicine, which inhibits the formation of spindle fibers and temporarily arrests mitosis at the anaphase stage, can generate: autopolyploids (when duplicating a genome within the same species) or allopolyploids (when derived from hybrids between different species). Breeders have exploited polyploidization in addition to generate bigger phenotypes (Wu et al., 2012; Sattler et al., 2016) to rescue fertility (Chen et al., 2003; Contreras et al., 2007; Khan et al., 2013), to overcome crossing barriers that prevent the genetic exchange between two isolated species with different ploidy levels as it is the case of *C. sativus* and wild *Cucumis* (Walters & Wehner, 2002; Chen et al., 2004). However, novel gene combinations and/or aberrant meiotic behavior may destabilize the karyotype and variants can be also produced

(Gaeta & Pires, 2010). The alteration of gene expression patterns, genome restructuring post-polyploidization and other changes has been also described (Soltis et al., 2015).

In this work, we describe the polyploidization procedure, using different strategies, of the interspecific *Cucumis* hybrids UPV-FA and UPV-FMy to generate allopolyploids. The effects of polyploidization on plant development and fruit set were studied in the allopolyploid plants and their progenies. The putative improving of seedlings' hypocotyl diameter and the performance of allopolyploids as rootstocks were also evaluated. A Genotyping by Sequencing (GBS) strategy was used to genotype the obtained allopolyploids. Candidate genes responsible for observed changes in the reproductive behavior are reported.

## MATERIAL AND METHODS

### *Generation of allopolyploid plants*

Colchicine (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) was applied to: (1) seeds obtained in crosses *C. ficifolius* x *C. anguria* (UPV-FA) and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (UPV-FMy), (2) shoots of UPV-FA and UPV-FMy plants cultivated *in vitro* and (3) F<sub>1</sub> hybrid plants growing under greenhouse conditions. After treatments, ploidy levels of plantlets were measured by flow cytometry as described in Gisbert (2010) after 30 and 60 days. Previously, the ploidy level was confirmed in the hybrids UPV-FA and UPV-FMy and in their parents (*C. ficifolius*, *C. anguria* and *C. myriocarpus*). The different treatments were as follows:

#### **1. Immersion in colchicine of pre-germinated seeds and germination in soil substrate**

Twenty seeds from F<sub>1</sub> fruits obtained in crosses *C. ficifolius* x *C. anguria* and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* were pre-germinated using the methodology described by Cáceres et al. (2016). Briefly, seeds were carefully opened, and the coat removed, disinfected with bleach (20%) and stored at 4 °C for 10 days. After this period, they were incubated at 37°C for 48 hours. Pre-germinated seeds were submerged for 8 hours

in a colchicine solution (0.5% p/v) as described in Walters and Wehner (2002) and then they were sown and cultured in plastic pots (5x5x7 cm) in a growth chamber at 26°C ± 2°C under a photoperiod of 16/8 h (light/dark). In all the assays, colchicine was dissolved in a small quantity of DMSO and the corresponding volume of distilled water. Cool white light was provided by Sylvania cool White F37T8/CW fluorescent lamps (90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

## 2. Colchicine treatment of *in vitro* seedlings

Seeds obtained in crosses *C. ficifolius* x *C. anguria* and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* were disinfected and cultured in MS medium (MS: Murashige and Skoog salts including vitamins, 2% sucrose, and 0.7% plant agar). Plantlets were micropropagated and used as source of nodes. The following treatments were compared: a) nodes were cultured directly in MS containing colchicine at 0.1% p/v (Medium MSC01); b) nodes were immersed in a colchicine solution at 0.1% p/v for 2h (1h in agitation at 200 rpm) and then placed on MSC01 medium and; c) nodes were immersed for 2h in (p/v) colchicine solution at 0.1% (1h in agitation at 200 rpm) and then cultured in MS (without antimetabolic agent). Ten to 12 nodes per genotype were used in each treatment. Explants were maintained in a growth chamber at 26°C ± 2°C under a photoperiod of 16/8 h (light/dark). After 30 and 45 days of culture, percentages of survival, root index (scale 0=no root to 3=good developed root), plant height and number of leaves were measured.

## 3. Colchicine treatment to plants growing in a greenhouse

The protocol of Lim and Earle (2008) was followed. When plants of UPV-FA and UPV-FMy hybrids reached 20 cm height, the apical bud and lateral top buds were immersed into a volume of 600 ml of a colchicine solution (0.5% p/v) for 12 hours. After this period, plant tissues were washed with distilled water. Eight plants of each hybrid were treated. Seven days after the treatments (dat), leaves samples were analyzed by flow cytometry. Sixty days after, ploidy level was analyzed again to determine the stability in chromosome duplication.

### *Characterization of allopolyploid plants*

Plants with a DNA content equivalent to a 6n ploidy level were cultured in a greenhouse. The 3n hybrids UPV-FA and UPV-FMy and their corresponding parentals *C. ficifolius* (4n), *C. myriocarpus* (2n), and *C. anguria* (2n) were also cultured for comparison. Morphological traits and flowering were visually assessed during the whole crop cycle. Self-pollinations were made under controlled conditions when male and female flowers were present; unopened female flowers were closed with paper bags previously to pollination in order to avoid pollination by foreign pollen. Four to five male flowers were selected to transfer their pollen (brush-pollination method) to fully open female flowers. Flowers of *C. ficifolius* plants were also cross-pollinated with *C. anguria* and *C. myriocarpus* to obtain the corresponding hybrids. Self-pollinations from UPV-FA and UPV-FMy were not able because the abortion of male flowers (these two hybrids are male sterile). Every individual crossing or self-pollination was identified and protected with a bag. Pollen from male flowers was also collected to determine its viability using a tetrazolium test (dehydrogenase activity) and to assess its ability to germinate under *in vitro* conditions (Shivanna & Rangaswamy, 1992; Gisbert & Picó, 2014). Approximately after 60 days after culture, every set of fruits were harvested and the number of seeds per fruit were counted, weighted and evaluated for germination ability like in Cáceres et al. (2016).

### *Characterization of allopolyploid F<sub>2</sub> progenies*

Thirty seeds derived from fruits obtained by self-pollinating the allopolyploids UPV-FA (6n) and UPV-FMy (6n) were used to evaluate the allopolyploid progeny F<sub>2</sub>, referred as allo-UPV-FA-s and allo-UPV-FMy-s. Thirty seeds of the F<sub>1</sub> hybrids UPV-FA (3n) and UPV-FMy (3n), and from the parental genotypes *C. ficifolius*, *C. myriocarpus* and *C. anguria* were used as controls. Size of seeds and germination ability were registered. Hypocotyl diameter was measured during the first 21 days post-sowing (dps). Ploidy level was verified at 30 dps to confirm the duplication of chromosome set in a random sample of plants. Then, 26 plants of allo-UPV-FA-s, 29 plants of allo-UPV-FMy-s, and 5 plants of UPV-FA and UPV-FMy were transplanted to a greenhouse and used to evaluate

plant growth in adult stages. Stem diameter, plant height, number of male and female opened flowers and leaf dimensions were registered in adult plants of each genotype and controlled self-pollination was carry out in every plant. Ripe fruit of each plant were harvested and weighted. A germination test was carried out to verify the seed viability of these progeny,  $F_3$ , selecting one fruit from every self-pollinated plants of allo-UPV-FA-s and allo-UPV-FMy-s.

#### *Evaluation of allopolyploids progenies as potential rootstock*

Grafting was carried out using the cleft procedure. Muskmelon var. *cantalupensis* (Charentais type) and *C. melo* var. *inodorus* (Piel de Sapo type) were used as scion for the following rootstocks: UPV-FA, UPV-FMy, allo-UPV-FA-s, allo-UPV-FMy-s, one commercial *Cucurbita* hybrid ‘Cobalt’ (Rijk Zwaan) and the *C. melo* hybrid (*C. melo* Piel de Sapo x *C. melo* PAT81) named ‘Me x Ag’. Self-grafted and non-grafted plants were used as controls. All grafted plants were produced by a commercial nursery. Five grafted plants per combination were transplanted to a greenhouse at UPV-COMAV and cultured under hydroponic conditions. Plant height and scion diameter were measured in plants to determine putative interactions between rootstock/scion. The flowering date was noted in each plant.

A maximum of two fruits per plant were obtained using hand pollination, and characterized for the following traits: weight (g), length and width (cm), rind, flesh and cavity thickness (mm), rind and flesh firmness ( $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) (measured with a digital Penetrometer (8 mm) FHT-803<sup>®</sup>, Melrose, MA), total soluble solids (quantified through a digital Refractometer Atago<sup>®</sup>, Tokyo, Japan), pH (measured with pH-indicator paper pH1-14 Merck, Darmstadt, Germany) and flesh color (measured with a colorimeter, Minolta CR-400, New Jersey, USA, using the color parameters Hunter L, a and b).

#### *DNA extraction and GBS (Genotyping by Sequencing)*

Genomic DNA from the three parental *C. ficifolius*, *C. anguria* and *C. myriocarpus* and their corresponding  $F_1$ , UPV-FA (3n) and UPV-FMy (3n), and allopolyploid hybrids



UPV-FA (6n) and UPV-FMy (6n), 2 plants each, was isolated from young leaves with DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). The GBS was performed by LGC Genomics GmbH (Germany) following Elshire et al. (2011). Briefly, DNA was digested with the restriction enzyme *ApeKI*, barcoded libraries were prepared by accession, and sequenced using the HiSeq 2000 Illumina platform (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). SNPs were extracted using TASSEL-GBS Discovery/Production pipeline (<https://bitbucket.org/tasseladmin/tassel-5-source/wiki/Tassel5GBSv2Pipeline>). Only SNPs, not indels, with a minimum of six reads-depth were retained. Chromosomal position of SNPs on the physical map were deduced from the melon reference genome (assembly v.6.3.1; at <http://www.melonomics.net>) (García-Mas et al., 2012; Argyris et al., 2015). SNPs were designated by chromosome number and position.

## RESULTS

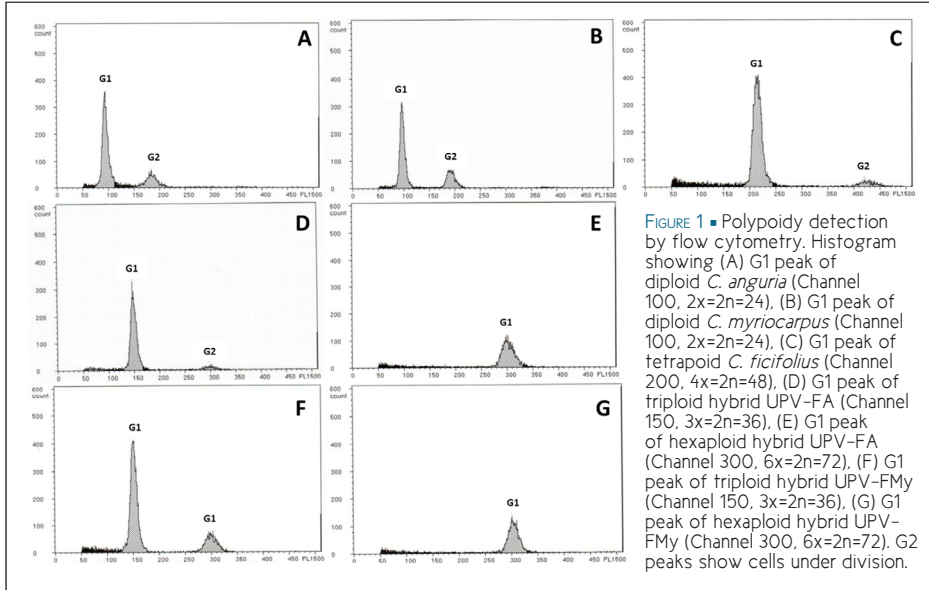
### *Generation of allopolyploid plants*

The ploidy level of the parents *C. anguria* (2n), *C. myriocarpus* (2n) and *C. ficifolius* (4n) and their corresponding hybrids UPV-FA (3n) and UPV-FMy (3n) was confirmed. Also, the ploidy histograms were obtained for plants regenerated after colchicine treatments (Figure 1). Allopolyploids (6n) were only obtained for both hybrids (UPV-FA and UPV-FMy) from pre-germinated-treated seeds (after immersion in colchicine at 0.5% for 8h) (Table 1), and higher rates of polyploidization were found in UPV-FA compared to UPV-FMy (25% vs 5%). Toxicity of colchicine was observed: 35% and 60% of seed from crosses UPV-FA and UPV-FMy, respectively were unable to grow after being treated with colchicine. Nodes from *in vitro* plants grown in medium with the antimitotic agent were unable to develop. From *in vitro* plants, hexaploids were only obtained in UPV-FMy (14.3%) when nodes were immersed for 2h in a colchicine solution at 0.1% and then transferred to MS. The application of colchicine in the apex or in lateral top buds did not result in stable hexaploidization (Table 1). Histograms of Figure 1 show the characteristic peaks of the fluorescence, correlating with the DNA content for 2n, 3n, 4n and 6n plants after analyzing by flow cytometry.

TABLE 1 ■ Generation of UPV-FA and UPV-FMy polyploid plants.

| METHODS  | GENOTYPE | TREATMENT  | RESULTS OF FLOW CYTOMETRY |      |             |           |      |              |
|--|----------|--|---------------------------|------|-------------|-----------|------|--------------|
|  |          |  | AT 30 DAT                 |      |             | AT 60 DAT |      |              |
|  |          |  | 3N%                       | 6N%  | MXOFLOIDS % | 3N%       | 6N%  | MXOFLOIDS %* |
| 1. Seeds pre-germinated treated with colchicine and sown in soil substrate                     | UPV-FA   | Immersion in Colchicine 0.5% for 8h              | nd                        | nd   | nd          | 40        | 25   | 0            |
|  | UPV-FMy  | Immersion in Colchicine 0.5% for 8h              | nd                        | nd   | nd          | 35        | 5    | 0            |
|  | UPV-FA   | a) Direct cultivation on MS with colchicine 0.1% | 0                         | 0    | 0           | 0         | 0    | 0            |
|  | UPV-FMy  |  | 0                         | 0    | 0           | 0         | 0    | 0            |
| 2. Nodes from in vitro plants treated or not and cultured on medium with or without colchicine | UPV-FA   | b) Immersion in colchicine 0.1% for 2h           | 38                        | 0    | 0           | 38        | 0    | 0            |
|  | UPV-FMy  | and culture on MS                                | 0                         | 14.3 | 0           | 0         | 14.3 | 0            |
|  | UPV-FA   | c) Immersion in colchicine 0.1% for 2h           | 0                         | 0    | 0           | 0         | 0    | 0            |
|  | UPV-FMy  | and culture on MS with colchicine                | 0                         | 0    | 0           | 0         | 0    | 0            |
| 3. Apex of plants cultured in a greenhouse treated with colchicine                             | UPV-FA   | Immersion in colchicine 0.1% for 12 h            | 50                        | 50   | 0           | 100       | 0    | 0            |
|  | UPV-FMy  | Immersion in colchicine 0.1% for 12 h            | 50                        | 50   | 0           | 66.7      | 0    | 33.3         |

\*Missing values to complete 100% of treated samples (data not shown) represent seeds, nodes or dead plants due to colchicine toxicity.

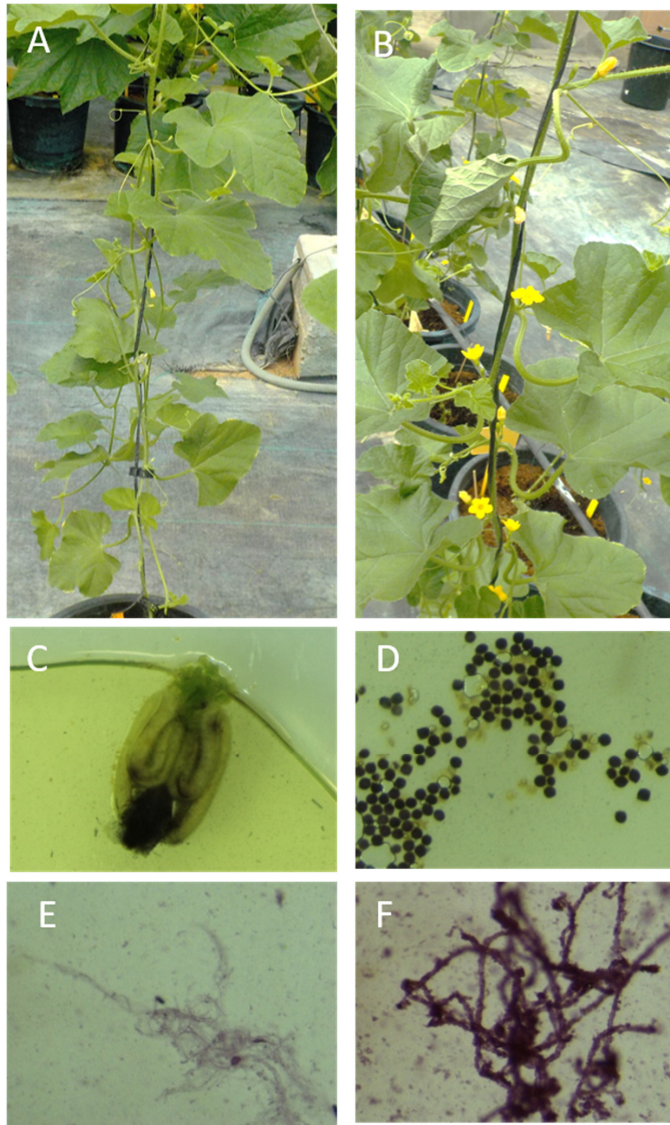


### Characterization of allopolyploid plants

Growth of the obtained  $6n$  allopolyploid plants (allo-UPV-FA and allo-UPV-FMy) was assessed under greenhouse culture conditions and visually compared to that of the  $F_1$   $3n$  plants (UPV-FA and UPV-FMy). Allopolyploids grew slower in comparison with the corresponding  $3n$  plants and, apparently, have bigger leaves. Forty days post-transplanting (dpt), male flowers were not observed in any of the triploids whereas fertile male flowers were present in all the allopolyploids (Figure 2 A, B). After 90 dpt, few male flowers were observed in two plants of the triploid UPV-FA, but any of them were fertile (Figure 2 C, E). In contrast, nearly the 95% of pollen was viable in allopolyploids (Figure 2 D, F).

Self-pollination was not possible in any of the triploid hybrids due to male sterility, whereas fruit were set in all allopolyploid plants after selfing, indicating that hexaploidization had rescued fertility of male flowers. Higher rates of fruit set were obtained in allo-UPV-FMy compared to allo-UPV-FA (70% versus 15.31%). The number of seeds per fruit was also higher in the first (95.86 versus 22.7). In average, the number of seeds per fruit in the hexaploids was lower than the obtained in fruit

from crosses *C. ficifolius* x *C. anguria* (UPV-FA) and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (UPV-FMy), and from parentals selfings (Table 2). Seeds from fruit obtained by selfing from hexaploids were larger and heavier seeds than those from F<sub>1</sub> crosses that gave triploid plants (Figure 3A-D). Seeds of allo-UPV-FA were bigger than those of allo-UPV-FMy.



**FIGURE 2** ■ Male sterility of triploid plants and male fertility of allopolyploids. (A) UPV-FA (3n) at 40 days post-transplanting (dpt). (B) allo-UPV-FA (6n) at 40 (dpt). (C) Male flower developed after 90 dpt in a UPV-FA (3n) plant. (D) Pollen from a plant allo-UPV-FA (6n) stained with tetrazolium. (E) Pollen from a flower developed after 90 dpt in a UPV-FA (3n) plant incubated in germination medium. (F) Pollen from a plant allo-UPV-FA (6n) germinated *in vitro*.

TABLE 2 ■ Number of seeds per fruit, seed weight and germination ability of allo-UPV-FA (6n) and allo-UPV-FMy (6n), plants resulting from crosses *C. ficifolius* x *C. anguria* (UPV-FA, 3n) and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (UPV-FMy, 3n) and plants derived from the corresponding parentals by selfing.

| GENOTYPE  | N° SEED/FRUIT <sup>b</sup> | WEIGHT OF 10 SEEDS (G) <sup>c</sup> | GERMINATION (%) <sup>c</sup> |
|---|----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| allo-UPV-FA   | 22.7 ± 2.53 a <sup>a</sup> | 0.187 ± 0.006 e                     | 86.67 ± 3.3 a                |
| allo-UPV-FMy  | 95.86 ± 12.63 bc           | 0.167 ± 0.001 d                     | 96.67 ± 3.3 ab               |
| <i>C. ficifolius</i> x <i>C. anguria</i><br>(UPV-FA)      | 225.273 ± 12.47 d          | 0.130 ± 0.001 c                     | 100.0 ± 0 b                  |
| <i>C. ficifolius</i> x <i>C. myriocarpus</i><br>(UPV-FMy) | 195 ± 14.11 d              | 0.132 ± 0.001 c                     | 100.0 ± 0 b                  |
| <i>C. ficifolius</i>                                      | 200.308 ± 21.02 d          | 0.120 ± 0.001 b                     | 100.0 ± 0 b                  |
| <i>C. myriocarpus</i>                                     | 88.88 ± 6.53 b             | 0.091 ± 0.001 a                     | 86.67 ± 8.8 a                |
| <i>C. anguria</i>   | 132 ± 10.13 c              | 0.114 ± 0.0004 b                    | 86.67 ± 3.3 a                |

<sup>a</sup> Different letters within a column indicate statistical differences between genotypes according to Fisher's Least Significant Difference ( $P \leq 0.05$ ). <sup>b</sup> Data are means ± SE of 10 to 29 fruits for each genotype. <sup>c</sup> Data are means ± SE from 3 replicates (total of 30 seeds) for each genotype.

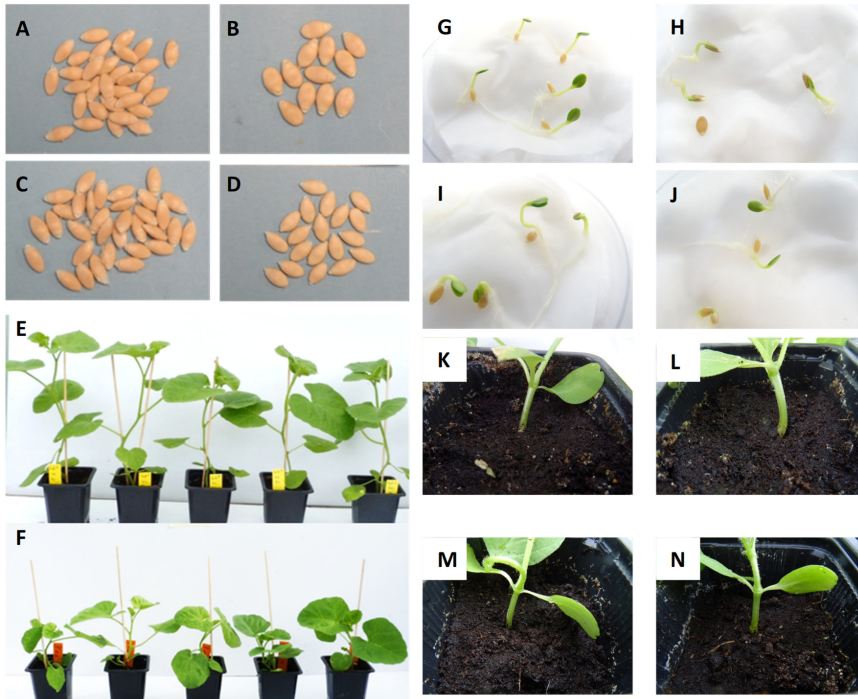


FIGURE 3 ■ Seeds from which derived the triploid hybrids (A,G) UPV-FA (3n), (C,I) UPV-FMy (3n) and seeds of fruit from hexaploid plants-(B,H) allo-UPV-FA (6n), (D,J) allo-UPV-FMy (6n). Juvenile plants of (E) allo-UPV-FA-s (6n) and (F) allo-UPV-FMy-s (6n). Hypocotyl comparison between triploid F1 hybrids (K) UPV-FA (3n), (M) UPV-FMy (3n) and their allopolyploids counterparts (L) allo-UPV-FA-s (6n) and (N) allo-UPV-FMy-s (6n).

### *Characterization allopolyploid progenies*

Self-offspring of hexaploid plants (allo-UPV-FA-s and allo-UPV-FMy-s) were characterized. Allopolyploid plantlets displayed higher hypocotyl diameters than the triploids F<sub>1</sub> and parentals at 7- and 14 dps. Later, at 21 dps diameters in allo-UPV-FA-s and UPV-FA were similar whereas allo-UPV-FMy-s plantlets still had higher values than UPV-FMy (Table 3, Figure 3). No differences in stem diameters between allopolyploid progenies and their respective parentals were found. As occurred in the allo-UPV-FA (6n) and allo-UPV-FMy (6n), their progenies grew slower than the triploids UPV-FA and UPV-FMy F<sub>1</sub> hybrids. Therefore, 3n plants were taller at different developmental stages (Table 3).

Around 20 dpt, allopolyploid progenies (allo-UPV-FA-s and allo-UPV-FMy-s) developed male flowers, whereas their corresponding triploid counterparts (UPV-FA and UPV-FMy) did not, consistently with the previous results. Female flowers appeared later in allopolyploids compared to the triploid hybrids. Interestingly, three-fold female flowers were produced in UPV-FA compared to allo-UPV-FA-s polyploid plants at 40 dpt whereas no differences were observed between UPV-FMy and allo-UPV-FMy-s (Table 3). Regarding morphology, leaves of allopolyploids were shorter and with less pronounced leaf indentations than UPV-FA and UPV-FMy (Table 3, Figure 4)

Most plants of the F<sub>2</sub> progenies exhibited homogeneous growth and similar features, in both families, and were able to set fruit. The percentage of self-pollination in allo-UPV-FMy-s plants was in average 87.59 %, higher than that noted for allo-UPV-FA-s (69.9 %). Fruits from polyploid plants were, in average, smaller, more spherical, lighter and spinier than those obtained from the interspecific crosses that get UPV-FA and UPV-FMy (Figure 4). Again, the number of seeds per fruit was lower in those fruit from allo-UPV-FA-s *vs* that obtained in allo-UPV-FMy-s plants (31.35 *vs* 70.96). The weight of a sample of 10 seeds, gave similar values for both progenies (0.19 in allo-UPV-FA-s *versus* 0.17 in allo-UPV-FMy-s).

TABLE 3 ■ Morphological and reproductive traits (Hypocotyl diameter, stem diameter, plant height, number of male and female flowers and leaf morphological traits) measured from 7 to 21 days post-sowing (dps) and 20 to 40 days post-transplanting (dpt) in allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n) and their respective parentals.

| GENOTYPE   | Ø HYPOCOTYL DIAMETER(MM) <sup>b</sup> |         |         |         |          | Ø STEM DIAMETER (MM) <sup>c</sup>     |           |          |           |         | PLANT HEIGHT (CM) <sup>f</sup> |        |             |            |                         |
|--|---------------------------------------|---------|---------|---------|----------|---------------------------------------|-----------|----------|-----------|---------|--------------------------------|--------|-------------|------------|-------------------------|
|  | 7 DPS                                 | 14 DPS  | 21 DPS  | 20 DPT  | 30 DPT   | 40 DPT                                | 20 DPT    | 30 DPT   | 40 DPT    | 20 DPT  | 30 DPT                         | 40 DPT | 20 DPT      | 30 DPT     | 40 DPT                  |
| allo-UPV-FA-s  | 1.47 e <sup>a</sup>                   | 1.87 c  | 3.11 e  | 4.58 c  | 5.24 d   | 6.62 b                                | 130 c     | 209.04 c | 261.25 cd |         |                                |        |             |            |                         |
| allo-UPV-FMy-s   | 1.47 e                                | 1.72 b  | 2.59 cd | 3.91 b  | 4.84 bc  | 6.36 b                                | 84.10 b   | 156.86 b | 199.51 b  |         |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. ficifolius</i> x <i>C. anguria</i> (UPV-FA)      | 1.26 b                                | 1.57 a  | 2.69 d  | 4.16 bc | 5.64 d   | 6.325 b                               | 161 d     | 267.5 d  | 337 e     |         |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. ficifolius</i> x <i>C. myriocarpus</i> (UPV-FMy) | 1.21 a                                | 1.48 a  | 2.43 bc | 3.73 ab | 5.15 bcd | 6.35 b                                | 117.5 c   | 213 c    | 279.67 d  |         |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. ficifolius</i>                                   | 1.21 ab                               | 1.50 a  | 2.07 a  | 3.18 a  | 3.98 a   | 5.29 a                                | 112.25 c  | 183.5 bc | 223.5 bc  |         |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. myriocarpus</i>                                  | 1.32 c                                | 1.54 a  | 2.25 ab | 4.36 bc | 4.41 ab  | 5.31 a                                | 23.5 a    | 62 a     | 121.5 a   |         |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. anguria</i>                                      | 1.39 d                                | 1.60 ab | 2.80 d  | 4.68 c  | 5.34 d   | 6.36 b                                | 146.75 cd | 278.5 d  | 361 e     |         |                                |        |             |            |                         |
| GENOTYPE   | NUMBER OF MALE FLOWERS <sup>c</sup>   |         |         |         |          | NUMBER OF FEMALE FLOWERS <sup>c</sup> |           |          |           |         | LEAF MORPHOLOGY <sup>d</sup>   |        |             |            |                         |
|  | 20 DPT                                | 30 DPT  | 40 DPT  | 20 DPT  | 30 DPT   | 40 DPT                                | 20 DPT    | 30 DPT   | 40 DPT    | 20 DPT  | 30 DPT                         | 40 DPT | LENGTH (MM) | WIDTH (MM) | AREA (CM <sup>2</sup> ) |
| allo-UPV-FA-s  | 1.12 b                                | 1.54 ab | 7.69 cd | 0.64 ab | 0.46 ab  | 3.5 a                                 | 65.11 a   | 85.94 a  | 53.28 ab  | 1.61 ab |                                |        |             |            |                         |
| allo-UPV-FMy-s   | 0.45 a                                | 1.24 ab | 3.86 bc | 0 a     | 0.38 a   | 4.03 ab                               | 69.38 ab  | 93.56 a  | 56.74 b   | 1.78 b  |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. ficifolius</i> x <i>C. anguria</i> (UPV-FA)      | 0 a                                   | 0 a     | 0.5 ab  | 2.5 c   | 1.5 bc   | 13 c                                  | 78.46 cd  | 90.32 a  | 59.27 bc  | 1.41 ab |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. ficifolius</i> x <i>C. myriocarpus</i> (UPV-FMy) | 0 a                                   | 0 a     | 0 a     | 1.33 bc | 2 c      | 6.33 b                                | 86.16 de  | 93.97 ab | 55.86 b   | 1.43 ab |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. ficifolius</i>                                   | 0.5 ab                                | 1 ab    | 3.5 abc | 0.5 ab  | 0.5 ab   | 1.5 a                                 | 71.29 abc | 84.57 a  | 52.22 ab  | 1.34 ab |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. myriocarpus</i>                                  | 6 c                                   | 3.5 c   | 1 ab    | 0 a     | 0 a      | 2 a                                   | 75.50 bc  | 92.17 a  | 41.17 a   | 1.23 a  |                                |        |             |            |                         |
| <i>C. anguria</i>                                      | 1 ab                                  | 2.5 bc  | 11 d    | 0.5 ab  | 2.5 c    | 4.5 ab                                | 87.41 e   | 106.13 b | 72.49 c   | 1.63 ab |                                |        |             |            |                         |

<sup>a</sup> Different letters within a column indicate statistical differences between genotypes according to Fisher's Least Significant Difference ( $P \leq 0.05$ ). <sup>b</sup> Data are means of 30 plants during 21 days post sowing (dps). <sup>c</sup> Data are means of 30 plants for allo-UPV-FA-s (6n) and allo-UPV-FMy-s(6n) and 5 plants for the rest of genotypes along 40 days post transplanting (dpt) <sup>d</sup> Data are means n=6.

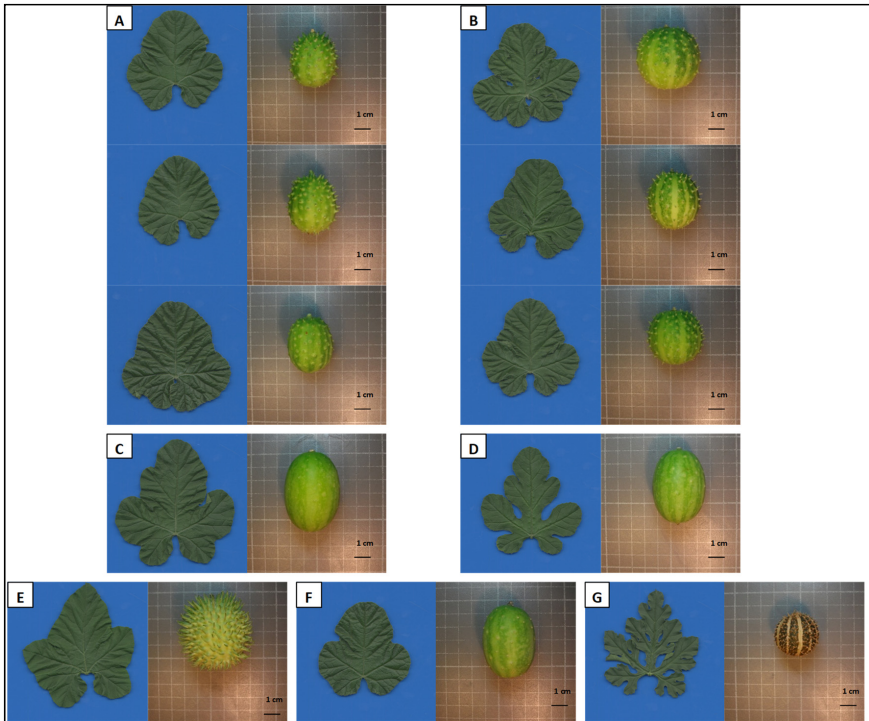


FIGURE 4 ■ Leaf and fruit morphology on (A) allo-UPV-FA-s (6n), (B) allo-UPV-FMy-s (6n) (C) UPV-FA (3n), (D) UPV-FMy (3n) plants and the parental genotypes (E) *C. anguria*, (F) *C. ficifolius* and (G) *C. myriocarpus*.

#### *Evaluation of the allopolyploid progenies as rootstock for melon*

Good grafting union was obtained with both scions (*C. melo* var. *cantalupensis* and *C. melo* var. *inodorus*) in all assayed combinations. In general, the early development of grafted plants was faster than that of the non grafted (Table 4). Differences in flowering time were observed between grafted and self-grafted plants for male flowering, delayed in grafted plants, being the piñonet scion grafted onto allo-UPV-FA-s the most late-flowering (Table 4). Regarding fruit quality, no important effects were observed in external quality when comparing grafted and non grafted plants (Table 5). For internal quality traits lower brix was found in Charentais fruits grafted onto Cobalt and Me x Ag, although fruit were still in the range of commercial quality (Table 6). Some changes in fruit color were also observed. For example, Charentais fruit from plants grafted onto allo-UPV-FMy-s which had higher a values, and therefore, fruits with more intense flesh color (Table 6).



TABLE 4 ■ Evaluation of plant height (cm.) up to 65 days post-transplanting (dpt) in Charentais and Pignonet plants grafted onto experimental rootstocks: allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n), Me x Ag, and 'Cobalt' (Commercial *Cucurbita* rootstock) under greenhouse conditions

| CHARENTAIS MELON           |                      |          |            |           |            |                      |                   |                     |  |
|----------------------------|----------------------|----------|------------|-----------|------------|----------------------|-------------------|---------------------|--|
| ROOTSTOCK                  | PLANT HEIGHT (CM)    |          |            |           |            |                      | FIRST MALE FLOWER | FIRST FEMALE FLOWER |  |
|                            | 7 DPT                | 21 DPT   | 35 DPT     | 50 DPT    | 65 DPT     | (DAYS)               | (DAYS)            |                     |  |
| allo-UPV-FA-s              | 14.4 bc <sup>a</sup> | 61.9 bc  | 137.8 ab   | 215.4 ab  | 247.8 a    | 8.20 ab <sup>a</sup> | 34.60 c           |                     |  |
| allo-UPV-FMy-s             | 15.0 bc              | 58.5 ab  | 130.0 a    | 215.2 ab  | 239.2 a    | 8.80 ab              | 31.40 bc          |                     |  |
| UPV-FA                     | 12.7 ab              | 62.1 bc  | 139.2 ab   | 220.2 ab  | 235.0 a    | 9.0 abc              | 26.40 abc         |                     |  |
| UPV-FMy                    | 13.34 bc             | 58.1 ab  | 134.0 a    | 208.2 a   | 244.2 a    | 10.0 bcd             | 32.40 bc          |                     |  |
| Cobalt                     | 19.4 d               | 70.4 c   | 149.0 b    | 255.8 c   | 262.8 a    | 12.40 d              | 23.33 a           |                     |  |
| Me x Ag                    | 15.75 c              | 60.17 ab | 149.17 b   | 229.67 b  | 261.5 a    | 12.0 cd              | 29.40 abc         |                     |  |
| Self grafted               | 14.8 bc              | 54.5 ab  | 133.8 a    | 232.4 b   | 245.0 a    | 11.0 bcd             | 25.33 ab          |                     |  |
| Non grafted                | 10.28 a              | 51.33 a  | 137.17 a   | 224.33 ab | 259.3 a    | 6.83 a               | 29.40 abc         |                     |  |
| PIGNONET PEL DE SAPO MELON |                      |          |            |           |            |                      |                   |                     |  |
| allo-UPV-FA-s              | 12.90 bc             | 41.30 cd | 105.0 bcd  | 197.60 ab | 274.80 bcd | 21.60 d              | 24.0 bc           |                     |  |
| allo-UPV-FMy-s             | 11.70 ab             | 29.80 ab | 77.40 a    | 174.20 a  | 194.60 a   | 11.80 abc            | 24.80 c           |                     |  |
| UPV-FA                     | 12.90 bc             | 41.60 cd | 109.60 cd  | 208.80 ab | 260.80 bc  | 9.80 ab              | 18.80 ab          |                     |  |
| UPV-FMy                    | 13.42 bc             | 42.08 d  | 106.50 bcd | 217.67 b  | 314.17 cd  | 11.50 abc            | 20.93 abc         |                     |  |
| Cobalt                     | 17.50 d              | 46.30 d  | 109.80 cd  | 199.20 ab | 247.80 ab  | 9.0 ab               | 22.20 abc         |                     |  |
| Me x Ag                    | 14.50 c              | 44.30 d  | 122.80 d   | 232.40 b  | 325.20 d   | 16.60 cd             | 24.0 bc           |                     |  |
| Self grafted               | 14.20 c              | 32.80 bc | 89.20 ab   | 194.40 ab | 285.0 bcd  | 13.0 bc              | 21.60 abc         |                     |  |
| Non grafted                | 10.5 a               | 21.93 a  | 94.0 abc   | 209.29 ab | 262.0 bc   | 6.43 a               | 17.29 a           |                     |  |

<sup>a</sup> Different letters within a column indicate statistical differences between rootstocks according to Fisher's Least Significant Difference ( $P \leq 0.05$ ).

TABLE 5 ■ External characteristics of Charentais and Piñonet Piel de sapo melon fruits harvested from plants grafted onto allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n), Me x Ag and the commercial *Cucurbita* hybrid 'Cobalt'.

| *CHARENTAIS* MELON |                                  |         |          |         |          |                    |                           |                           |  |
|--------------------|----------------------------------|---------|----------|---------|----------|--------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| ROOTSTOCK          | FW <sub>E</sub> (g) <sup>b</sup> | FL (cm) | FW (cm)  | RT (mm) | FT (mm)  | CW (mm)            | FF (kg·cm <sup>-2</sup> ) | RF (kg·cm <sup>-2</sup> ) |  |
| allo-UPV-FA-s      | 341.82 a                         | 8.01 a  | 8.92 a   | 3.39 a  | 21.19 a  | <sup>38.48 a</sup> | 1.95 a                    | 11.57 a                   |  |
| allo-UPV-FMy-s     | 393.89 ab                        | 8.51 ab | 9.28 ab  | 3.53 a  | 20.98 a  | 40.45 ab           | 1.97 a                    | 12.34 a                   |  |
| UPV-FA             | 447.2 ab                         | 8.94 ab | 9.79 ab  | 3.59 a  | 23.11 a  | 42.04 ab           | 2.17 a                    | 11.9 a                    |  |
| UPV-FMy            | 431.62 ab                        | 8.43 ab | 9.51 ab  | 3.82 a  | 22.95 a  | 39.08 a            | 2.32 a                    | 11.56 a                   |  |
| Cobalt             | 474.91 ab                        | 9.07 b  | 10.02 b  | 3.67 a  | 21.6 a   | 44.67 b            | 2.06 a                    | 11.97 a                   |  |
| Me x Ag            | 423.77 ab                        | 8.67 ab | 9.49 ab  | 3.53 a  | 21.27 a  | 41.37 ab           | 2.08 a                    | 11.27 a                   |  |
| Self grafted       | 416 ab                           | 8.51 ab | 9.54 ab  | 3.08 a  | 22.16 a  | 42.4 ab            | 1.99 a                    | 11.63 a                   |  |
| Non grafted        | 491.43 b                         | 8.84 ab | 10.04 b  | 3.68 a  | 23.37 a  | 42.05 ab           | 2.21 a                    | 11.99 a                   |  |
| *PIÑONET* MELON    |                                  |         |          |         |          |                    |                           |                           |  |
| allo-UPV-FA-s      | 750.17 ab                        | 14.33 a | 10.58 ab | 3.23 ab | 25.81 ab | 44.1 ab            | 3.05 ab                   | 12.62 a                   |  |
| allo-UPV-FMy-s     | 918.8 ab                         | 15.46 a | 11.38 b  | 3.38 ab | 26.44 ab | 49.43 b            | 3.48 b                    | 13 a                      |  |
| UPV-FA             | 717.86 ab                        | 14.47 a | 10.31 ab | 3.1 ab  | 25.75 ab | 43.11 ab           | 3.36 b                    | 13 a                      |  |
| UPV-FMy            | 977.6 b                          | 15.42 a | 11.54 b  | 3.47 ab | 29.12 b  | 45.06 ab           | 3.2 ab                    | 13 a                      |  |
| Cobalt             | 614.4 a                          | 14.7 a  | 9.66 a   | 3.19 ab | 21.7 a   | 40.26 a            | 2.54 a                    | 12.8 a                    |  |
| Me x Ag            | 933.83 b                         | 15.97 a | 11.12 b  | 3.09 ab | 28.61 b  | 44.75 ab           | 3.32 b                    | 12.8 a                    |  |
| Self grafted       | 974.2 b                          | 15.66 a | 11.34 b  | 3.72 b  | 28.45 b  | 45.77 ab           | 3.44 b                    | 13 a                      |  |
| Non grafted        | 820.5 ab                         | 15.35 a | 10.56 ab | 2.82 a  | 28.05 b  | 43.2 ab            | 2.89 ab                   | 13 a                      |  |

<sup>a</sup> Different letters within a column indicate statistical differences between genotypes according to Fisher's Least Significant Difference ( $P \leq 0.05$ ). <sup>b</sup> The total number of fruit collected in each combination was respectively (charentais/piñonet) 11/6 for 'allo-UPV-FA-s(6n)', 9/5 for 'allo-UPV-FMy-s(6n)', 10/7 for 'UPV-FA(3n)', 13/5 for 'UPV-FMy(3n)', 11/5 for 'Cobalt', 13/6 for 'Me x Ag', 8/5 for self grafted and 14/8 for non grafted. All were analyzed for quality. FW<sub>E</sub>: Fruit weight, FL: Fruit length, FW: Fruit width, RT: Rind thickness, FT: Flesh thickness, CW: Cavity width, FF: Flesh firmness, RF: Rind firmness.

TABLE 6 ■ Internal characteristics of charentais and piñonet melon fruits harvested from plants grafted onto allo-UPV-FA-s (6n), allo-UPV-FMy-s (6n), UPV-FA (3n), UPV-FMy (3n), 'Me x Ag' and the commercial *Cucurbita* hybrid 'Cobalt'.

| *CHARENTAIS* MELON |                         |         |          |           |           |
|--------------------|-------------------------|---------|----------|-----------|-----------|
| ROOTSTOCK          | TSS (Brix) <sup>b</sup> | pH      | L        | a         | b         |
| allo-UPV-FA-s      | 15.11 b                 | 6.05 ab | 55.06 ab | 12.31 abc | 24.26 abc |
| allo-UPV-FMy-s     | 14.18 ab                | 5.78 a  | 56.74 b  | 13.62 c   | 25.7 c    |
| UPV-FA             | 14.51 b                 | 6.35 b  | 54.57 ab | 12.18 abc | 24.12 abc |
| UPV-FMy            | 14.39 b                 | 5.88 ab | 55.39 ab | 12.82 bc  | 24.67 bc  |
| Cobalt             | 13.03 a                 | 6 ab    | 54.94 ab | 12.32 abc | 24.15 abc |
| Me x Ag            | 12.83 a                 | 6.04 ab | 55.55 ab | 12.24 abc | 24.76 c   |
| Self grafted       | 15.78 b                 | 6.25 ab | 52.66 a  | 11.93 ab  | 23.05 ab  |
| Non grafted        | 14.44 b                 | 6.2 ab  | 53.07 a  | 11.44 a   | 22.9 a    |
| *PIÑONET* MELON    |                         |         |          |           |           |
| allo-UPV-FA-s      | 14.82 ab                | 5.67 b  | 60.62 a  | -2.98 ab  | 12.32 ab  |
| allo-UPV-FMy-s     | 12.68 a                 | 5.0 a   | 59.6 a   | -3.67 a   | 11.93 ab  |
| UPV-FA             | 15.63 b                 | 5.36 ab | 58.88 a  | -3.27 ab  | 12.15 ab  |
| UPV-FMy            | 14.08 ab                | 5.6 ab  | 56.17 a  | -3.26 ab  | 11.48 ab  |
| Cobalt             | 15.94 b                 | 5.4 ab  | 55.15 a  | -3.22 ab  | 12.02 ab  |
| Me x Ag            | 14.35 ab                | 5.42 ab | 56.15 a  | -2.34 b   | 10.45 a   |
| Self grafted       | 14.26 ab                | 5.4 ab  | 61.37 a  | -3.58 a   | 13.12 b   |
| Non grafted        | 14.09 ab                | 5.19 ab | 56.12 a  | -3.43 a   | 12.16 ab  |

<sup>a</sup> Different letters within a column indicate statistical differences between genotypes according to Fisher's Least Significant Difference ( $P \leq 0.05$ ). <sup>b</sup> The total number of fruit collected in each combination was respectively (charentais/piñonet) 11/6 for 'allo-UPV-FA-s(6n)', 9/5 for 'allo-UPV-FMy-s(6n)', 10/7 for 'UPV-FA(3n)', 13/5 for 'UPV-FMy(3n)', 11/5 for 'Cobalt', 13/6 for 'Me x Ag', 8/5 for self grafted and 14/8 for non grafted. All were analyzed for quality. TSS: Total soluble solids.

*Identification of SNPs in allopolyploids vs triploid and their corresponding parental: unexpected genotypes*

A total of 75.526 SNPs were identified, and 43.410, those without missing data, were retained. A 71.4% (31.067) were monomorphic in our samples (they were polymorphic relative to the reference melon genome used for mapping the sequences). The reminder 12.343 SNPs were polymorphic among our samples. Within these SNPs, some display unexpected genotypes. Eighty-four were monomorphic in all the parental samples, but heterozygous in some of the hybrids, 41 in UPV-FA (3n) and 17 in allo-UPV-FA (6n), and 9 in UPV-FMy (3n) and 38 in allo-UPV-FMy (6n). Although these represent only the 0.27% of the monomorphic *loci* in the three parental, and could be sequencing errors, eight of them were only heterozygous in the hexaploids hybrids, being homozygous in both the triploid and their corresponding parental. Interestingly, these SNPs are in genes associated to the plant reproductive process (Table 7, 8). The gene MELO3C015665.2.1 codifies a zinc finger CCCH domain-containing protein 14-like that belongs to a multigenic family with members involved in embryogenesis, floral morphogenesis and male meiotic cytokinesis. The MELO3C017339.2.1 codifies a peroxisome biogenesis protein 3-2 which is a key gene of peroxisome biogenesis. Peroxisomal functions are related to reproductive processes in plants, with peroxisomes playing essential roles in pollen tube growth, elongation and orientation, and in male-female gametophyte recognition. The MELO3C026524.2.1 gene codifies a dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1), subunit of the oligosaccharyl transferase (OST) complex, involved in the pathway protein glycosylation. The OST complex is required for interspecific gametophyte recognition. The gene MELO3C004113.2.1 codifies a GDP-D-mannose epimerase that has been reported to control male gametophyte development in different manners. The most interesting genes were the following two, heterozygous in the four plants analysed of the two 6n hybrids: MELO3C007268.2.1 (FRIGIDA-ESSENTIAL 1 isoform X1) and MELO3C005250.2.1 (histidine kinase 4-like). FRIGIDA-ESSENTIAL 1 (FES1), encode a protein with a CCCH zinc finger domain, that is specifically required for the upregulation of FLOWERING LOCUS C (FLC) expression and histidine kinases belong to the multigene family of cytokinin receptors involved in many plant developmental processes, including mega-gametogenesis.

TABLE 7 ■ SNPs monomorphic in parentals and triploid hybrids and polymorphic in hexaploids, allo-UPV (6n) hybrids.

| SNP/CHR/POSITION | <i>C. FICIFOLUS</i> | <i>C. ANGURA</i> | <i>C. MYRROCARPUS</i> | UPV-FA (3n) | UPV-FMY (3n) | ALLO-UPV-FA (6n) | ALLO-UPV-FMY (6n) |
|------------------|---------------------|------------------|-----------------------|-------------|--------------|------------------|-------------------|
| S02_4355394      | T*                  | T                | T                     | T           | T            | W                | T                 |
| S02_4355401      | G                   | G                | G                     | G           | G            | R                | G                 |
| S02_24170890     | T                   | T                | T                     | T           | T            | T                | W                 |
| S03_24584463     | G                   | G                | G                     | G           | G            | G                | K                 |
| S05_24345324     | G                   | G                | G                     | G           | G            | G                | R                 |
| S08_1839092      | G                   | G                | G                     | G           | G            | R                | R                 |
| S09_19249378     | C                   | C                | C                     | C           | C            | Y                | Y                 |
| S10_4467292      | G                   | G                | G                     | G           | G            | G                | R                 |

\* Nucleotide code (Derived from IUPAC): A= A:A, C = C:C, G = G:G, T= T:T, R = A:G, Y = C:T, S = C:G, W = A:T, K = G:T, M = A:C.

**TABLE 8** ■ Genes affected by SNP variants detected in the allo-UPV (6n) hybrids and absent in the 3n hybrids and in the corresponding parents

| SNP  | GENE/POSITION            | GENE ANOTATION  | FUNCTION*   |
|--|--------------------------|---|---|
| <b>HETEROZYGOUS IN ALLO-UPV-FA (6N) HYBRIDS</b>  |                          |   |   |
| S02_4355394                                      | MELO3C015665.2.1         | zinc finger CCCH domain-containing protein 14-like                      | Role in male meiotic cytokinesis (Zhang et al., 2018)   |
| S02_4355401                                      | chr02:4352932..4356002   |   |   |
| <b>HETEROZYGOUS IN ALLO-UPV-FMY (6N) HYBRIDS</b> |                          |   |   |
| S02_24170890                                     | MELO3C017339.2.1         | peroxisome biogenesis protein 3-2                                       | Peroxisomes play essential roles in reproductive processes (Goto-Yamada et al., 2014)         |
| S02_24170890                                     | chr02:24165052..24171496 |   |   |
| S03_24584463                                     | MELO3C026524.2.1         | Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1 | Interspecific gametophyte recognition (Muller et al., 2017)                                   |
| S03_24584463                                     | chr03:24581413..24586086 |   |   |
| S05_24345324                                     | MELO3C004113.2.1         | GDP-mannose 3 epimerase   | Role in reproductive development, vegetative growth and leaf senescence (Qi et al., 2017)     |
| S05_24345324                                     | chr05:24344185..24345516 |   |   |
| S10_4467292                                      | MELO3C011834.2.1         | Protein EI24 like   |   |
| S10_4467292                                      | chr10:4466480..4471639   |   |   |
| <b>HETEROZYGOUS IN BOTH 6N HYBRIDS</b>           |                          |   |   |
| S08_1839092                                      | MELO3C007268.2.1         | Protein FRIGIDA-ESSENTIAL 1 isoform X1                                  | Regulation of FLOWERING LOCUS C (Schmitz et al., 2005)  |
| S08_1839092                                      | chr08:1834572..1845223   |   |   |
| S09_19249378                                     | MELO3C005250.2.1         | Histidine kinase 4-like   | Developmental processes, including gametogenesis and stress responses (Nongpiur et al., 2012) |
| S09_19249378                                     | chr09:19242171..19250239 |   |   |

\* Function of genes with the same annotation in other species .

## DISCUSSION

Polyploidization is an important process in plant evolution. This phenomenon is well known as one of the main mechanisms for plant speciation (Grant, 1981; Soltis et al., 2009). Breeders have also used polyploidization, mainly, to increase cell size that in turn results in broader leaves and/or larger flowers or fruits (Yadava et al., 1986; Zhang et al., 2008; Wu et al., 2012) or to restore fertility (Dewey, 1980; Chen et al., 2003). Good vigor and better adaptation to the environmental conditions have also been reported as common in polyploids (Hegarty & Hiscock, 2008; Van de Peer et al., 2009; Chen, 2010). In this work, we aimed to obtain allopolyploids from two interspecific *Cucumis* hybrids (UPV-FA and UPV-FMy) to get knowledge about allopolyploidization in *Cucumis* hybrids as well as to evaluate a putative improvement of the value of both F<sub>1</sub> hybrids as rootstocks for melon.

UPV-FA and UPV-FMy, were developed by hybridization of *C. ficifolius* (4n) with *C. anguria* (2n) and *C. myriocarpus* (2n), respectively. Both F<sub>1</sub> hybrids were confirmed as triploids and showed male sterility, as occurred with hybrids between distant taxa due to the lack of homologous chromosomes for pairing during meiosis (Hegarty & Hiscock, 2008). UPV-FA and UPV-FMy are resistant or tolerant to several pathogens and have been used successfully as melon rootstocks (Cáceres et al., 2017; Gisbert et al., 2019). As occurred with other *Cucumis* rootstocks, an increase in their hypocotyl diameters would facilitate the grafting procedure. This increase could be achieved through polyploidization.

The chemical colchicine, which inhibits the formation of spindle fibers and temporarily arrests mitosis at the anaphase stage, has been commonly employed in different ways to get polyploid plants and double haploids in breeding programs (Yetisir & Sari, 2003; Mergoum & Gómez-Macpherson, 2004; Jaskani et al., 2005). In our work, colchicine was applied to pre-germinated seeds from the crosses *C. ficifolius* x *C. anguria* (UPV-FA) and *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* (UPV-FMy); nodes from UPV-FA and UPV-

FMy plants growing *in vitro*, and F<sub>1</sub> hybrids growing at the greenhouse. Despite toxicity to this chemical was observed, hexaploids from both F1 hybrids were obtained from pre-germinated treated seeds. The same concentration and time of incubation than that used in our work to obtain hexaploid plants, was reported as adequate in the accession PI 482454 of *C. metuliferus* and in *C. sativus* by Walters and Wehner (2002), although these authors obtained higher polyploid rates (40% and 20%). Seeds were also the choice as starting material for duplication in Yadava et al. (1986) who obtained amphidiploids from an interspecific hybrid between *C. dipsaceus* Ehrenb. ex. Spach and varieties of *C. anguria*. On the other hand, the use of *in vitro* culture has been suggested to have a greater control of the polyploidization process (Sattler et al., 2016). In our work, high mortality was observed when colchicine was added to the culture media. However, UPV-FMy showed higher success in the rescue of hexaploids from *in vitro* culture than the pre-treated seeds. Although the treatment of adult plants to get polyploids has been reported with different success (Lim & Earle 2008) no stable polyploidization was achieved in our case.

Hexaploid plants obtained from treated pre-germinated seeds were grow and compared to their triploid's counterparts. The main differences between both were a slower growth and the rescue of male fertility in hexaploids. Lower growth rates could be explained by the duplication of the two divergent genomes which implies the rearrangements of each, in addition to the effect that can be caused by a toxic reagent such as colchicine (Koksal et al., 2002). Restoration of fertility in allopolyploids from interspecific and intergeneric hybrids have been also commonly reported. For instance, in the genera *Cucumis*, the interspecific hybrid (*C. hystrix* x *C. sativus*), named *Cucumis hystivus*, was sterile but this condition was reversed in the new allopolyploid ( $2n=4x=38$ ) (Chen et al., 2003). In our work, pollen viability, fruit set and the subsequent germination of seeds from fruit obtained in the self-pollinated hexaploid plants confirmed the rescue of fertility in both allopolyploids. The fact that the hexaploids are fertile is an advantage to use them as rootstocks, compared to the triploids, as these allopolyploids can be multiplied by selfing with a high success ratio, whereas the triploid hybrids must be obtained by the interspecific



cross. In addition, seeds of hexaploids are larger and heavier than those of the interspecific  $3n$  hybrids. Larger seeds were also reported in “*Planters Jumbo*” cultivar, a spontaneous tetraploid of *C. melo* (Nugent & Ray, 1992). Higher rates of fruit set and number of seeds per fruit were obtained in allo-UPV-FMy compared to allo-UPV-FA. Germination rates were also lower in the progenies of allo-UPV-FA. The improvement of fertility in allopolyploids can be absolute or partial, depending on the divergence degree between the combined genomes (Wu et al., 2001; Sattler et al., 2016; Alix et al., 2017). *C. myriocarpus* are genetically less distant to *C. ficifolius* than *C. anguria*. Meiotic aberrations as the asynchronous meiotic rhythm between two parental genomes may also be the cause to low seed production as reported in other works (Han et al., 2016). The asynchrony may differ among both genetic backgrounds.

When the progenies of the allopolyploids were transferred to the greenhouse, a slower growth compared to the  $F_1$  hybrids and the presence of male flowers in the allopolyploid offspring's were observed, confirming the results obtained previously in the parental hexaploids. However, it was observed that female flowers appeared later in allopolyploids respect to the triploid hybrids. This can be consequence of the slower growth. As some authors mention, polyploid plants tend to bloom later or over a longer period (Levin, 2002; Gantait et al., 2011).

Considering that allopolyploid plantlets had good germination and plantlets increased the hypocotyl diameter compared to the triploid rootstocks UPV-FA and UPV-FMy, it was considered of interest the evaluation of the putative effect on scions of using allopolyploids progenies as rootstocks of two types of melon (Charentais and Piñonet Piel de Sapo). Grafting compatibility was found in all grafting combinations, triploids and allopolyploids. For plant growth, only few differences in early growing were observed, and no significant negative impact on quality was observed when using triploids and allopolyploids as rootstocks. Thus, our results indicate that polyploidy confers advantages to interspecific *Cucumis* hybrids, such as male fertility to facilitate

seed production, larger seeds with good germination and wider hypocotyls, that can facilitate grafting and do not cause a negative impact of fruit quality.

As stated before, one of the most important aspects of polyploidy is the restoration of male fertility. Understanding this process can be of great interest to use allopolyploids as rootstocks or for other purposes. Interspecific hybridization among distinct, yet related species, followed by chromosome doubling appears to be often accompanied by changes to genomic sequences, the epigenome, and the patterns in transcript levels. Previous studies compare allopolyploids and their direct parental lines or several generations of allopolyploids and show divergence of transcription caused either genetically or epigenetically, contributing to plant phenotype (Osabe et al., 2012). Genomic changes have been detected in both recently formed natural polyploids and resynthesized polyploids (Khasdan et al., 2010; Osabe et al., 2012). Our studies show some unexpected polymorphisms in genes that are monomorphic between the corresponding parentals and homozygous in the corresponding triploid hybrid. The fact that these SNPs appear in all the hexaploids analyzed and in any of the parentals and triploids suggests that are not sequencing errors.

The frequency of genomic changes associated with polyploidization seems to be correlated positively with the degree of divergence between parental triploid genomes. Our results suggest greater frequency in the hybrid of *C. ficifolius* × *C. myriocarpus*. If this greater frequency is a consequence of a greater divergence of both genomes, it would be consistent with the higher restoration of fertility in allo-UPV-FMy compared with allo-UPV-FA, as observed by the higher fruit set, number of seeds per fruit and germination. The novel variation relative to their progenitors that we found in this study can be due to homoeologous pairing and recombination between genomes, as it has been previously described frequently in multigenic families, or to other mechanisms. For example, Li et al. (2019) describe changes in genes of the EIN3/EIL gene family when comparing the allotetraploid from *B. napus* to the donor genomes of *B. rapa* and *B. oleracea*. Many members of the EIN3/EIL gene family acquired additional introns during the

polyploidization process. One of the most interesting results in *Cucumis* is the consistent polymorphisms found in the genes MELO3C007268.2.1 and MELO3C005250.2.1 annotated as ‘Protein FRIGIDA ESSENTIAL 1 isoform X1’ and ‘Histidine kinase 4-like’ which are related with regulation of flowering and developmental processes including gametogenesis and stress response, respectively (Schmitz et al., 2005; Nongpiur et al., 2012). FRIGIDA (FRI) upregulates the expression of the potent floral repressor FLOWERING LOCUS C (FLC) to confer the winter-annual growth habit in *Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2018). FRIGIDA homologs are also candidate genes involved in white lupin (*Lupinus albus* L.) early flowering (Rychel et al., 2019). Further studies are needed to see if the observed changes in these genes are involved in the restoration of male fertility found in *Cucumis* hexaploids.

#### REFERENCES

- ◆ Alix, K., Gérard, P. R., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. S. (2017). Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. *Annals of Botany* 120(2), 183-194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx079>
- ◆ Argyris, J. M., Ruiz-Herrera, A., Madriz-Masis, P., Sanseverino, W., Morata, J., Pujol, M., ...Garcia-Mas, J. (2015). Use of targeted SNP selection for an improved anchoring of the melon (*Cucumis melo* L.) scaffold genome assembly. *BMC Genomics*, 16, 4. <https://doi.org/10.1186/s12864-014-1196-3>
- ◆ Cáceres, A., Perpiña, G., Ferriol, M., Picó, B., & Gisbert, C. (2017). New *Cucumis* Rootstocks for Melon: ‘UPV-FA’ and ‘UPV-FMy’. *HortScience* 52(5), 792-797. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11791-17>
- ◆ Cáceres, A., Picó, M. B., & Gisbert, C. (2016). Germination of Wild *Cucumis* Species and Interspecific Hybrids. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XI<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae* (pp. 227-230), Warsaw, Poland.
- ◆ Chen, J. F., Zhuang, F. Y., Liu, X. A., & Qian, C. T. (2004). Reciprocal differences of morphological and DNA characters in interspecific hybridization

in *Cucumis*. *Canadian Journal of Botany*, 82(1), 16-21. <https://doi.org/10.1139/b03-107>

- ◆ Chen, J., Staub, J., Qian, C., Jiang, J. Luo, X. & Zhuang, F. (2003). Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Chakr. × *Cucumis sativus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(4), 688–695. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1118-7>
- ◆ Chen, J. F., & Adelberg, J. (2000). Interspecific Hybridization in *Cucumis* - Progress, Problems, and Perspectives. *HortScience*, 35(1), 11-15. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.1.11>
- ◆ Chen Z. J. (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science*, 15(2), 57-71. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.003>
- ◆ Colla, G., Pérez-Alfocea, F., & Schwarz, D. (2017). *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. Wallingford, UK:CABI.
- ◆ Contreras, R., Ranney, T., & Tallury, S. (2007). Reproductive Behavior of Diploid and Allotetraploid *Rhododendron* L. 'Fragrant Affinity'. *HortScience*, 42(1), 31-34. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.1.31>
- ◆ Davis, A. R., Perkins-Veazie, P., Hassell, R., Levi, A., King, S. R., & Zhang, X. (2008). Grafting effects on vegetable quality. *HortScience*, 43(6), 1670–1672.
- ◆ Den Nijs, A. P. M., & Visser, D. L. (1985). Relationships between African species of the genus *Cucumis* L. Estimated by the production, vigour and fertility of F1 hybrids. *Euphytica*, 34(2), 279–290. <https://doi.org/10.1007/BF00022920>
- ◆ Dewey, D. R. (1980). Some Applications and Misapplications of Induced Polyploidy to Plant Breeding. In W.H. Lewis (Ed.), *Polyploidy. Basic Life Sciences* (pp.445-470). Boston, MA: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1_23)
- ◆ Elshire, R. J, Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE*, 6(5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>

- ◆ Expósito, A., Munera, M., Giné, A., López-Gómez, M., Cáceres, A., Picó, B., ... & Sorribas, F. J. (2018). *Cucumis metuliferus* is resistant to root-knot nematode *Mi1.2* gene (a) virulent isolates and a promising melon rootstock. *Plant Pathology*, 67(5), 1161-1167. <https://doi.org/10.1111/ppa.12815>
- ◆ Fredes, A., Roselló, S., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., Pérez-de-Castro, A., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2017). Fruit quality assessment of watermelons grafted onto citron melon rootstock. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1646–1655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7915>.
- ◆ Gaeta, R. T. & Pires, J. C. (2010). Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. *New Phytologist*, 186(1), 18-28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03089.x>
- ◆ Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2011). Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(3), 485-493. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9947-1>
- ◆ Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., Gonzalez, V. M., ... Puigdomenech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11872–11877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>
- ◆ Gisbert, M. C., Cáceres, A., Perpiñá, G., Garcés-Claver, A., Gómez-Guillamón, M. L., & Picó, M. B. (2019, Julio). *Interspecific hybrids of wild Cucumis species (Fian and Fimy): new rootstocks for melon highly resistant to biotic soil stress*. Poster session presented at 6 TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CUCURBITS Cross-pollination between North and South, Ghent, Belgium.
- ◆ Gisbert, M.C., & Picó, M.B. (2014). *Determinación de la viabilidad de polen y semillas*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10251/38344>.
- ◆ Gisbert, M.C. (2010). *Utilización de la citometría de flujo para analizar la ploidía en plantas* [Video]. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10251/7781>
- ◆ González, V., García-Martínez, S., Ruiz, J. J., Flores-León, A., Picó, B., & Garcés-Claver, A. (2019). First report of *Neocosmospora falciformis* causing wilt and

root of Muskmelon in Spain. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-2013-PDN>

- ◆ Goto-Yamada, S., Mano, S., & Nishimura, M. (2014). The Role of Peroxisomes in Plant Reproductive Processes. In H. Sawada, N. Inoue & M. Iwano (Eds.), *Sexual Reproduction in Animals and Plants* (pp. 419-429). Tokyo, Japan: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-54589-7>
- ◆ Grant, V. (1981). *Plant speciation*. New York, USA: Columbia University Press.
- ◆ Guan, W., Zhao, X., Dickson, D. W., Mendes, M. L., & Thies, J. (2014). Root-knot Nematode Resistance , Yield , and Fruit Quality of Specialty Melons Grafted onto *Cucumis metulifer*. *HortScience*, *49*(8), 1046–1051. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.8.1046>.
- ◆ Han, Y., Pan, J., Thammaphichai, P., Li, Z., & Weng, Y. (2016). Asynchronous meiosis in *Cucumis hystrix*–cucumber synthetic tetraploids resulting in low male fertility. *The Crop Journal*, *4*(4), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.05.003>
- ◆ Hegarty, M. J., & Hiscock, S. J. (2008). Genomic Clues to the Evolutionary Success of Polyploid Plants. *Current Biology*, *18*(10), R435–R444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.043>.
- ◆ Jaskani, M. J., Kwon, S. W., & Kim, D. H. (2005). Comparative study on vegetative, reproductive and qualitative traits of seven diploid and tetraploid watermelon lines. *Euphytica*, *145*(3), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1644-x>
- ◆ Khan, M. R. R., Hasnunnahar, M., & Isshiki, S. (2013). Production of Amphidiploids of the Hybrids between *Solanum macrocarpon* and Eggplant. *HortScience*, *48*(4), 422-424. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.4.422>
- ◆ Khasdan, V., Yaakov, B., Kraitshtein, Z., & Kashkush, K. (2010). Developmental Timing of DNA Elimination Following Allopolyploidization in Wheat. *Genetics*, *185*(1), 387-390. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.116178>
- ◆ Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Franken, J. (1980). Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, an investigation of in vivo pollen

tube growth and seed set. *Euphytica*, 29(3), 661–672. <https://doi.org/10.1007/BF00023214>

- ◆ King, S. R., Davis, A. R., Zhang, X., & Crosby, K. (2010). Genetics, breeding and selection of rootstocks for Solanaceae and Cucurbitaceae. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.001>
- ◆ Kirkbride, J. (1993). *Biosystematic Monograph of the Genus Cucumis (Cucurbitaceae); botanical identification of cucumbers and melons*. North Carolina, USA: Parkway Publishers.
- ◆ Kokalis-Burelle, N., & Roskopf, E. N. (2011). Microplot Evaluation of Rootstocks for Control of *Meloidogyne incognita* on Grafted Tomato, Muskmelon, and Watermelon. *Journal of Nematology*, 43(3–4), 166–171.
- ◆ Koksal, N., Yetisir, H., Sari, N., & Abak, K. (2002). Comparison of Different in vivo Methods for Chromosome Duplication in Muskmelon (*Cucumis melo*). *Acta Horticulturae*, 588, 293–298. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.588.46>
- ◆ Kroon, G. H., Custers, J. B. M., Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Vrekamp, H. Q. (1979). Interspecific hybridization in *Cucumis* (L.). I. Need for genetic variation, biosystematic relations and possibilities to overcome crossability barriers. *Euphytica*, 28(3), 723–728. <https://doi.org/10.1007/BF00038940>.
- ◆ Kyriacou, M. C., Leskovar, D. I., Colla, G., & Roupshael, Y. (2018). Watermelon and melon fruit quality: The genotypic and agro-environmental factors implicated. *Scientia Horticulturae*, 234, 393–408. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.032>
- ◆ Kyriacou, M. C., Roupshael, Y., Colla, G., Zrenner, R., & Schwarz, D. (2017). Vegetable Grafting: The Implications of a Growing Agronomic Imperative for Vegetable Fruit Quality and Nutritive Value. *Frontiers in Plant Science*, 8, 741. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00741>
- ◆ Leonardi, C., Kyriacou, M. C., Gisbert, C., Oztekin, G. B., Mourão, I., & Roupshael, Y. (2017). Quality of Grafted Vegetables. In G. Colla, F. Pérez-Alfocea & D. Schwarz (Eds), *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. (pp 216–244). Wallingford, UK: CABI

- ◆ Levin, D. A. (2002). *The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution*. New York, USA: Oxford University Press.
- ◆ Li, M., Wang, R., Liang, Z., Wu, X., & Wang, J. (2019). Genome-wide identification and analysis of the *EIN3/EIL* gene family in allotetraploid *Brassica napus* reveal its potential advantages during polyploidization. *BMC Plant Biology*, *19*, 110. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1716-z>
- ◆ Li, Z., Jiang, D. & He, Y. (2018). FRIGIDA establishes a local chromosomal environment for *FLOWERING LOCUS C* mRNA production. *Nature Plants*, *4*, 836–846. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0250-6>
- ◆ Lim, W., & Earle, E. D. (2008). Effect of in vitro and in vivo colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *95*(1), 115–124. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9422-9>
- ◆ Liu, B., Ren, J., Zhang, Y., An, J., Chen, M., Chen, H., ... Ren, H. (2015). A new grafted rootstock against root-knot nematode for cucumber, melon, and watermelon. *Agronomy for Sustainable Development*, *35*(1), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0234-5>
- ◆ Matsumoto, Y., Miyagi, M., Watanabe, N., & Kuboyama, T. (2012). Temperature-dependent enhancement of pollen tube growth observed in interspecific crosses between wild *Cucumis* spp. and melon (*C. melo* L.). *Scientia Horticulturae* *138*, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.016>
- ◆ Mergoum, M., & Gómez-Macpherson, H. (Eds.). (2004). *Triticale improvement and production*. FAO Plant Production and Protection Paper No. 179. Rome, Italy: FAO.
- ◆ Müller, L., Lindner, H., Pires, N., Gagliardini, V., & Grossniklaus, U. (2016). A subunit of the oligosaccharyltransferase complex is required for interspecific gametophyte recognition in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, *7*, 10826. <https://doi.org/10.1038/ncomms10826>



- ◆ Nongpiur, R., Soni, P., Karan, R., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2012). Histidine kinases in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1230-1237. <https://doi.org/10.4161/psb.21516>
- ◆ Nugent, P. E., & Ray, D. T. (1992). Spontaneous Tetraploid Melons. *HortScience*, 27(1), 47–50. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.1.47>
- ◆ Osabe, K., Kawanabe, T., Sasaki, T., Ishikawa, R., Okazaki, K. Dennis, E. S., Kazama, T., & Fujimoto, R. (2012). Multiple Mechanisms and Challenges for the Application of Allopolyploidy in Plants. *International Journal of Molecular Science*, 13, 8696-8721. <https://doi.org/10.3390/ijms13078696>
- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mafeo, T. P. (2013). Optimising stem diameters of watermelon cultivars and indigenous *Cucumis* species for improving compatibility of inter-generic grafts. *Acta Horticulturae*, 1007, 807–812. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1007.96>
- ◆ Pofu, K., & Mashela, P. (2012). Improving survival of inter-generic grafts of nematode-susceptible watermelon cultivars and nematode-resistant *Cucumis* species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 62(4), 383-386. <https://doi.org/10.1080/09064710.2011.614634>
- ◆ Qi, T., Liu, Z., Fan, M., Chen, Y., Tian, H., Wu, D., ... Xie, D. (2017). GDP-D-mannose epimerase regulates male gametophyte development, plant growth and leaf senescence in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 7, 10309. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10765-5>
- ◆ Renner, S. S., Schaefer, H., & Kocyan, A. (2007). Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*, 7, 58 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-58>
- ◆ Rychel, S., Książkiewicz, M., Tomaszewska, M., Bielski, W., & Wolko, B. (2019). *FLOWERING LOCUS T*, *GIGANTEA*, *SEPALLATA*, and *FRIGIDA* homologs are candidate genes involved in white lupin (*Lupinus albus* L.) early flowering. *Molecular Breeding*, 39, 43. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0952-0>

- ◆ Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, *243*(2), 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- ◆ Schmitz, R., Hong, L., Michaels, S., & Amasino, R. M. (2005). *FRIGIDA-ESSENTIAL 1* interacts genetically with *FRIGIDA* and *FRIGIDA-LIKE 1* to promote the winter-annual habit of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, *132*, 5471–5478. <https://doi.org/10.1242/dev.02170>
- ◆ Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(32), 14269–14273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005338107>
- ◆ Shivanna K. R., & Rangaswamy N. S. (1992). *Pollen Biology A Laboratory Manual*. Berlin: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77306-8>
- ◆ Sigüenza, C., Schochow, M., Turini, T., & Ploeg, A. (2005). Use of *Cucumis metuliferus* as a Rootstock for Melon to Manage *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, *37*(3), 276–280
- ◆ Singh, A. K., & Yadava, K. S. (1984). An Analysis of Interspecific Hybrids and Phylogenetic Implications in *Cucumis* (*Cucurbitaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, *147*(3-4), 237–252. <https://doi.org/10.1007/BF00989386>
- ◆ Soltis, P. S., Marchant, D. B., Van de Peer, Y., & Soltis, D. E. (2015). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, *35*, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.11.003>
- ◆ Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., ... Soltis, P. S. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, *96*(1), 336–348. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800079>
- ◆ Van de Peer, Y., Maere, S., & Meyer, A. (2009). The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics*, *10*, 725–732. <https://doi.org/10.1038/nrg2600>

- ◆ Walters, S. A., & Wehner, T. C. (2002). Incompatibility in diploid and tetraploid crosses of *Cucumis sativus* and *Cucumis metuliferus*. *Euphytica*, 128(3), 371–374. <https://doi.org/10.1023/A:1021212815590>
- ◆ Wu, J. H., Ross Ferguson, A., Murray, B. G., Jia, Y., Datson, P. M., & Zhang, J. (2012). Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany*, 109(1), 169–179. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr256>
- ◆ Wu, R., Gallo-Meagher, M., Littell, R. C., & Zeng, Z. B. (2001). A General Polyploid Model for Analyzing Gene Segregation in Outcrossing Hexaploid Species. *Genetics*, 159(2), 869–882.
- ◆ Yadava, K. S., Singh, A. K., Roy, R. P., & Jha, U. C. (1986). Cytogenetics in *Cucumis* L. VI, synthetic amphidiploids. *Nucleus*, 29(1-2), 58–62.
- ◆ Yetisir, H., & Sari, N. (2003). A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization. *Scientia Horticulturae*, 98(3), 277–283. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00226-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00226-1)
- ◆ Zhang, C., Shen, Y., Tang, D., Shi, W., Zhang, D., Du, G., ... Cheng, Z. (2018). The zinc finger protein DCM1 is required for male meiotic cytokinesis by preserving callose in rice. *PLoS Genetics*, 14(11), e1007769. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007769>
- ◆ Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M., & Liu, X. (2008). In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica*, 159(1–2), 59–65. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9457-8>

## DISCUSIÓN GENERAL



## Discusión General

La presente tesis doctoral recopila varios trabajos realizados durante los últimos años y relacionados con el injerto de melón, técnica cuyo uso se ha incrementado en hortícolas al ser una herramienta útil para afrontar estreses de tipo biótico y abiótico en distintas condiciones de cultivos y que es compatible con sistemas de producción respetuosos con el medio ambiente (Colla et al., 2017). La mayoría de los trabajos recopilados en esta Tesis se plantearon para evaluar portainjertos experimentales que presentan resistencia a distintos patógenos que limitan el cultivo del melón, principalmente patógenos presentes en suelo que afectan gravemente a este cultivo. Estos patrones han sido desarrollados previamente a esta Tesis por los grupos de investigación: Mejora Genética de Cucurbitáceas y Desarrollo de Portainjertos del COMAV. El interés de desarrollar nuevos patrones en melón y en otras cucurbitáceas radica en la falta de resistencia a nematodos de los patrones de *C. maxima* x *C. moschata*, muy utilizados en sandía, además de la influencia de éstos en la calidad de los frutos de melón que, en algunas combinaciones resulta inadecuada (Colla et al., 2006; Zhao et al., 2011). Además, la aparición de nuevas razas de *Fusarium* (Gómez et al., 2014; González et al., 2019) podría acelerar la pérdida de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* raza 1, 2 presente en los híbridos de calabazas, utilizados para el control de este patógeno hasta la actualidad. Por todo ello, disponer de nuevos portainjertos es de gran interés en este cultivo que es muy demandado a nivel mundial. Entre los estudios realizados, también se ha evaluado la adecuación del injerto para la recuperación del cultivo de una variedad tradicional de melón, el Meló d'Or d'Ontinyent (Gisbert et al., 2016). Esta variedad es muy apreciada por sus cualidades organolépticas, pero es muy sensible a distintos patógenos, como suele ocurrir en los cultivares tradicionales. Por otra parte, en los ensayos llevados a cabo con melones comerciales, se han utilizado variedades de tipo Cantalupo y de tipo Piel de Sapo, ambos de gran importancia económica, habiéndose empleado este último en muy pocos estudios previos relacionados con injerto. Además, en todos estos trabajos se han incluido patrones comerciales para comparar con los experimentales.

Por lo tanto, los datos obtenidos aportan conocimiento acerca del comportamiento de estos portainjertos, con las variedades y condiciones de cultivo utilizadas. Por último, se complementó este trabajo con la evaluación de la inducción de la poliploidía para determinar si era una estrategia adecuada para incrementar el diámetro de los hipocótilos de dos híbridos interespecíficos de *Cucumis*, lo cual facilitaría la realización del injerto. La poliploidización conduce en numerosas ocasiones a un mayor tamaño de los órganos de las plantas y también puede provocar otros efectos en el desarrollo y floración (Zhang et al., 2010; Gantait et al., 2011; Wu et al., 2012; Sattler et al., 2016), que se han estudiado también en las plantas obtenidas y al utilizar éstas como portainjertos. Los resultados de los distintos estudios se discuten a continuación.

#### Evaluación de portainjertos experimentales para el cultivo de melón (capítulo 1)

El desarrollo de portainjertos exige de la selección de accesiones de partida con características de interés y del buen comportamiento agronómico de las plantas injertadas. Para que el injerto se lleve a cabo con éxito, necesita de una buena compatibilidad entre el patrón y la copa, que permita funcionar a la planta injertada como si de una única planta se tratase. Los intercambios de moléculas entre patrón y copa van a influir en el desarrollo de la planta y de los frutos, por lo que en la evaluación de portainjertos experimentales es importante considerar todos estos aspectos para determinar su utilidad real.

En un primer estudio (Gisbert et al., 2016) se evaluó un portainjerto experimental obtenido por cruzamiento de *C. melo* subespecie *melo* var. *inodorus* tipo Piel de Sapo y una accesión de *C. melo* subespecie *agrestis* var. *chinensis* 'Pat 81' (PRMc) que es resistente a *M. cannonballus* (Fita et al., 2007a) en un campo con problemas de colapso. *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker es, junto con *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich., uno de los patógenos responsables del colapso del melón y causa pérdidas económicas de relevancia en determinadas regiones del sur-oeste de los Estados Unidos, y en las principales áreas de producción de cucurbitáceas de Centro y Sur América, la región Mediterránea, y el Lejano y Medio oriente (Martyn & Miller, 1996; Cohen et

al., 2012; Ben Salem et al., 2013). La comparación de este portainjerto con un patrón comercial de melón (PC-64-376RZ de Rijk Zwaan) corroboró la resistencia del primero y la tolerancia del segundo, finalizándose el cultivo en todas las plantas injertadas con las dos variedades utilizadas: el Meló d'Or d'Ontinyent (melón tradicional muy apreciado en la Comunidad Valenciana) y el cv. Finura (híbrido comercial de tipo Piel de Sapo). Claramente, la resistencia de PRMc se constató al extraer las raíces que mostraron un desarrollo radicular claramente superior a las del resto de patrones. Se corroboró también en este estudio la sensibilidad del cultivar tradicional, en el que ninguna de las plantas no injertadas pudo terminar el cultivo, ya que este hongo ascomiceto pudre las raíces, fundamentalmente cuando se acerca el momento de la cosecha. El comportamiento agronómico y la calidad de los frutos de la variedad tradicional al injertar en el patrón experimental PRMc resistente a *Monosporascus*, indican que el uso de este patrón en suelos con problemas de colapso es una buena alternativa a la utilización de otros portainjertos, que si bien son tolerantes, no son resistentes e incrementan los niveles de patógeno en suelo, en este caso en forma de ascosporas muy resistentes.

En un segundo estudio se evaluaron diversos patrones experimentales, que son el resultado de explorar la variabilidad intra e interespecífica de los géneros *Cucurbita* y *Cucumis*. Los híbridos y accesiones utilizadas en este trabajo se seleccionaron por ser resistentes a distintos patógenos y se utilizaron como portainjertos del mismo cultivar tipo Piel de Sapo (cv. Finura) utilizado previamente. Como característica general, todos los híbridos de calabaza provocaron un aumento del tamaño de los frutos y de la cavidad seminal, como era esperable pues este efecto se ha descrito en otros trabajos (Fita et al., 2007b; Verzera et al., 2014). En los híbridos intraespecíficos de las especies *C. moschata* (Mo x Mo NL) y *C. pepo* (Pe x Pe), se observó un menor vigor y un retraso en la floración y cuajado de la variedad injertada, obteniéndose una menor producción. Estos efectos también fueron observados por Edelstein et al. (2004) al utilizar diferentes híbridos intra e interespecíficos de *Cucurbita* y se han relacionado con el grado de compatibilidad entre el patrón y la variedad de melón utilizada (Salehi-Mohammadi et al., 2009; Soteriou et al., 2016). El retraso en la antesis de las flores femeninas también fue reportado por Guan



et al. (2015) en un melón tipo Galia (cv. Arava) injertado sobre el híbrido de *Cucurbita* Strong Tosa (Syngenta Seeds Inc., Gilroy, CA), aunque en este caso no se alteró la época de cosecha ni la producción. En los frutos de plantas injertadas en Pe x Pe se observaron también diferencias: mostraron menor contenido en sólidos solubles y una disminución del pH, modificaciones que no son deseables desde el punto de vista de la calidad y que también se han observado en algunas combinaciones patrón-injerto en distintas hortícolas (Leonardi et al., 2017). Estos dos patrones quedaron descartados como adecuados para el injerto de melón. Sin embargo, el híbrido interespecífico *C. maxima* x *C. ecuadorensis* (Ma x Ec) se comportó de forma similar al control comercial *C. maxima* x *C. moschata* (CO), por lo que este patrón podría ser una alternativa a éste, al tratarse de un híbrido multiresistente (Montero-Pau et al., 2017).

Con los híbridos de *Cucumis* [Me x Ag (antes PRMc), Me x Me (antes 64-376RZ), Fi x An y Fi x My] se obtuvieron, en general, mejores resultados y mayor reproducibilidad de los mismos, salvo para la accesión de *C. metuliferus*, en la que colapsaron las plantas injertadas en la primera anualidad a pesar de que no se observaron hongos en el sistema radicular. En el resto de ensayos en los que se utilizó este patrón los resultados fueron satisfactorios. También lo han sido en otros ensayos realizados en colaboración con el grupo que dirige el Dr. Sorribas en los que se comprobó la resistencia a nematodos y su utilidad como portainjerto (Gisbert et al., 2017; Expósito et al., 2018). Todo ello conduce a pensar que el colapso en la primera anualidad (realizado en suelo y con riego a manta) podría deberse a un estrés hídrico en el momento de la maduración que estas plantas no fueron capaces de soportar, y en las que la formación de miriñaque tras el injerto provocó una gran diferencia entre el diámetro del hipocótilo de la variedad y el portainjerto en la zona de unión. El que las especies silvestres de *Cucumis* presenten plántulas poco vigorosas y con hipocótilos delgados es una de las principales dificultades que se ha descrito para utilizar especies de este género como portainjertos, ya que según Pofu et al. (2013), puede ser causa de colapso tras el injerto o a lo largo del cultivo. En el caso de los patrones Fi x My y Fi x An, la formación de miriñaque es menor que con *C. metuliferus* aunque también presentan un diámetro reducido del hipocótilo. Sin

embargo, no se ha observado colapso en ninguna de las anualidades y ensayos realizados hasta la fecha, que también han incluido cultivo en suelo bajo distintas condiciones de riego.

En cuanto a la modificación de las características de los frutos de plantas injertadas sobre patrones de *Cucumis*, con el patrón Me x Ag se obtuvieron frutos de mayor tamaño y ancho de la cavidad y también se observó este último efecto en frutos de plantas injertadas en Fi x An. Como hemos comentado previamente esta alteración en el fruto se produce de manera habitual al utilizar patrones de *Cucurbita* como también se ha observado en este trabajo. Con estos resultados consideramos de interés continuar con el estudio de todos los híbridos de *Cucumis* cuyos resultados se discuten en el siguiente punto.

Dentro de este primer capítulo también se estudió la posible influencia de los patrones de *Cucurbita* y *Cucumis* en el aroma de los frutos, en colaboración con el grupo de Mejora de la calidad dirigido por el Dr. J. Cebolla, ya que, aunque son pocos los trabajos realizados, se ha podido constatar un descenso en el contenido de compuestos claves del aroma del melón al utilizar distintos híbridos de *Cucurbita* (Verzera et al., 2014). En este estudio las diferencias en el perfil aromático en comparación con frutos de plantas sin injertar fueron mayores al utilizar híbridos de *Cucurbita* que al emplear patrones de *Cucumis*. Entre los híbridos de *Cucumis*, las mayores desviaciones respecto al aroma del melón de plantas sin injertar se han observado al utilizar *C. metuliferus*. Por lo tanto, teniendo en cuenta todos los parámetros estudiados, podemos concluir que la utilización de patrones más cercanos filogenéticamente provoca menos cambios en el desarrollo de la variedad y en la calidad de sus frutos. Esto se evidenció también al injertar sandía sobre *Citrullus amarus*; los frutos obtenidos mostraron características más parecidas a las sandías de plantas sin injertar que los frutos de las plantas injertadas en híbridos de *C. maxima* x *C. moschata* (Fredes et al., 2017).

Caracterización de germoplasma de *Cucumis* para su potencial utilidad como portainjerto de melón (Capítulo 2)

Los patrones candidatos a ser portainjertos de melón, deben mostrar resistencias a estreses, compatibilidad con distintas variedades, un buen comportamiento agronómico y no influir de manera negativa en la calidad de los frutos. Pero, además, para que un patrón pueda utilizarse a escala comercial, es indispensable que la disponibilidad de semilla y la germinación no sean una limitación. Así, por ejemplo, la germinación errática de *Solanum torvum* Sw. resistente a nematodos y por lo tanto muy demandado, es uno de los principales problemas para utilizar este patrón en berenjena (Gisbert et al., 2011a). Puesto que la presencia de dormancia es común en especies silvestres o no cultivadas, se suele necesitar de tratamientos o recurrir al cultivo *in vitro* para estimular la germinación y/o conseguir una germinación uniforme (Gisbert et al., 2011b). Hay también que considerar que cuanto más sencillo sea obtener una germinación uniforme, mayor facilidad para su manejo en los semilleros. También, en este sentido, es importante que el tamaño de los hipocótilos de las dos plantas a injertar sea similar, de manera que resulte sencillo obtener una buena unión entre el patrón y el injerto y que esta facilite el correcto crecimiento de la planta.

La obtención de los híbridos UPV-FA y UPV-FMy (en el trabajo anterior denominados Fi x My y Fi x An) fue factible a pesar de las barreras de cruzabilidad existentes en el género *Cucumis*, al utilizar *C. ficifolius* como madre en los cruces, como también se había descrito en otros trabajos (Kho et al., 1980; Den Nijs & Visser, 1985). Los frutos que se obtienen como resultado de estos cruzamientos contienen mucha semilla, por lo que la obtención de este recurso como material partida no es una limitación. Tampoco lo es en el caso de *C. metuliferus*, en el que se obtienen por autofecundación frutos con semillas abundantes y viables (Cáceres et al., 2016a). En cuanto a la germinación, tras comparar 6 tratamientos que incluían escarificación y cultivo *in vitro* en condiciones estándar o previa estratificación, y el cultivo utilizando sustrato con semillas estratificadas e incubadas posteriormente o no durante dos días

a 37° C, se pudo comprobar que los dos últimos tratamientos eran adecuados para todos los patrones evaluados (*C. metuliferus*, UPV-FA y UPV-FMy), así como para los parentales *C. anguria*, *C. ficifolius* y *C. myriocarpus* (Cáceres et al., 2016a). No se obtuvo germinación en las semillas obtenidas del cruce entre *C. ficifolius* y la accesión de *C. metuliferus* utilizada como portainjerto en este estudio. Este resultado era esperable según lo descrito en la bibliografía para *C. metuliferus*, que muestra incompatibilidad con el resto de especies de *Cucumis* (Singh & Yadava, 1984; Beharav & Cohen, 1995). Los porcentajes de geminación obtenidos en los tres genotipos de *Cucumis* (cercaos al 100%), indican que la capacidad de germinación es otra característica favorable para su uso como portainjertos. En cuanto al tamaño de los diámetros de los hipocótilos, éstos resultaron ser algo mayores en los híbridos F<sub>1</sub> en comparación con los parentales correspondientes (Cáceres et al., 2017). La hibridación ha sido favorable para aumentar el tamaño del hipocótilo y además combinar las resistencias de ambos parentales en cada portainjerto derivado. Aun así, su tamaño sigue siendo algo pequeño, por ello se abordó la inducción de la poliploidía como estrategia de mejora de este carácter, como se discute más adelante.

También se consideró de interés la caracterización morfológica de los híbridos y la comparación con sus respectivos parentales (Cáceres et al., 2017). Esta caracterización es novedosa, pues no se ha publicado en otros trabajos en los que se ha comprobado la cruzabilidad entre las especies *C. ficifolius*, *C. anguria* y *C. myriocarpus*. Los híbridos F<sub>1</sub> mostraron características morfológicas intermedias respecto a los parentales y presentaron esterilidad masculina.

Por otra parte, y aunque ya se había observado previamente un buen comportamiento frente a distintos tipos de estrés en los materiales en estudio, se han ido realizando distintos ensayos para comprobar la resistencia de los patrones a distintos patógenos y en condiciones de inoculación diversas. Los híbridos UPV-FA y UPV-FMy mostraron resistencia a *Fusarium oxysporum* (Cáceres et al., 2016b, 2017), lo que guarda relación con los resultados publicados por Liu et al. (2015) respecto a los parentales

de los que derivan. También, en estudios llevados a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Sorribas se ha comprobado la resistencia a nematodos de ambos híbridos (F. J. Sorribas, comunicación personal, 2019) lo que también es acorde con lo descrito en algunas accesiones de *C. anguria* (Den Nijs & Custers, 1990) y *C. myriocarpus* (Pofu et al., 2011). También se validó en un campo infestado con *Monosporascus cannonballus*, la resistencia a este patógeno, siendo UPV-FMy moderadamente resistente y UPV-FA altamente resistente (Cáceres et al., 2017). Esta resistencia es también muy interesante pues el colapso de las plantas se asocia en muchos casos con el ataque de este hongo, cuya presencia es común en las zonas de cultivo de melón. En estas evaluaciones destacó, además, el vigoroso sistema radicular que presentan ambos patrones en campo y que les puede ser de utilidad para afrontar otros tipos de estrés. También en estas evaluaciones, se observó resistencia a oídio. En este caso, resultó ser alta para UPV-FMy y moderada para UPV-FA. Puesto que hay evidencias científicas de que el uso de portainjertos de *Cucurbita*, *Lagenaria* y *Citrullus* resistentes a oídio reduce el impacto de la enfermedad en las variedades injertadas susceptibles, tanto en el caso del pepino (*C. sativus*) (Sakata et al., 2006) como en sandía (*C. lanatus*) (Kousik et al., 2018), la resistencia a este hongo también aumenta el valor de los híbridos UPV-FA y UPV-FMy como portainjertos. Por último, en Cáceres et al. (2016b) también se evaluó la respuesta a distintos virus en UPV-FA, resultando ser tolerante a ZYMV, WMV y ToLCNDV. Al igual que en el caso anterior, la tolerancia del patrón podría conferir cierta tolerancia a la copa injertada.

En cuanto a estreses de tipo abiótico, se llevó a cabo una primera evaluación del comportamiento de los híbridos en condiciones de estrés osmótico mediante un ensayo con plantas *in vitro* en medio de cultivo con sorbitol. Este compuesto reduce el potencial hídrico y se utiliza como agente de estrés osmótico (Verslues et al., 2006). En este ensayo, los híbridos interespecíficos mostraron una tolerancia superior respecto a la mostrada por *C. metuliferus*. De los tres, UPV-FA fue el más tolerante (Cáceres et al., 2017).

En cuanto a su comportamiento como portainjertos se obtuvieron buenos resultados en esta caracterización, tanto para la variedad Charentais (tipo Cantalupo), en

cultivo de invernadero, como para la variedad Finura (tipo Piel de Sapo), en condiciones de campo, obteniéndose en ambas variedades una buena calidad de los frutos. Como se ha comentado anteriormente, la calidad del fruto es un parámetro a considerar ya que se ha visto modificada negativamente al utilizar algunas combinaciones de portainjerto-variedad específicas (Zhao et al., 2011; Verzera et al., 2014).

En conjunto, el comportamiento agronómico y la calidad de los frutos obtenidos en éste y en otros ensayos descritos anteriormente, junto con las características que presentan ambos portainjertos en cuanto a resistencias y disponibilidad de semilla y de plántula para llevar a cabo el injerto, confirman que ambos portainjertos pueden ser utilizados en melón de manera comercial. Como mejora de estos patrones, al igual que la de otros del género *Cucumis*, se propone el aumento del diámetro de los hipocótilos que facilitaría la realización del injerto.

Poliploidización como herramienta de mejora en portainjertos (Capítulo 3)

El tamaño de los hipocótilos de híbridos y especies de *Cucumis* es pequeño y puede ser una limitación para su uso como patrones, al dificultar la unión del injerto y el posterior funcionamiento de la planta injertada (Pofu et al., 2013). Puesto que la poliploidización conduce en muchas ocasiones a un aumento en el tamaño de los órganos de las plantas (Zhang et al., 2010; Gantait et al., 2011; Wu et al., 2012), se evaluó como estrategia para incrementar el diámetro de los hipocótilos en los dos portainjertos de *Cucumis*, UPV-FA y UPV-FMy. Hay que señalar, que el pequeño diámetro de hipocótilo que presentan ambos híbridos no ha limitado la obtención de planta injertada en vivero comercial al utilizarlos como patrones de melón, pero un incremento del diámetro supondría una mejora de sus características.

La colchicina, que es uno de los agentes antimitóticos más utilizado para la obtención de poliploides (Hansen & Andersen, 1996; Pintos et al., 2014), ha resultado también útil en nuestro trabajo para la obtención de alopoliploides. De las

metodologías comparadas, se obtuvieron alopoliploides de ambos híbridos al tratar con colchicina semillas pre-germinadas y, también resultó adecuado el cultivo *in vitro* de entrenudos tratados con este agente antimitótico. En este caso, se obtuvieron únicamente alopoliploides de UPV-FMy (alo-UPV-FMy). Ambas estrategias han sido satisfactorias en otros estudios (Skálová et al., 2010). Así, por ejemplo, Yadava et al. (1986) obtuvieron anfidiplóides a partir de un híbrido entre *C. dipsaceus* Ehrenb. Ex. Spach y *C. anguria* utilizando semillas. Sattler et al. (2016) indican que el cultivo *in vitro* facilita la estandarización y control de los procesos de poliploidización. Aunque el tratamiento de plantas adultas para obtener poliploides también ha sido empleado (Lim & Earle, 2008), no se logró una poliploidización estable en nuestro caso.

Las plantas poliploides destacaron por mostrar un crecimiento más lento y por ser fértiles. Lo primero podría asociarse a que la duplicación de dos genomas divergentes en los alopoliploides conllevaría a reorganizaciones cromosómicas. El efecto tóxico causado por la colchicina también podría contribuir a una disminución de la tasa de crecimiento (Koksál et al., 2002). Otra consecuencia de la poliploidización es la recuperación de la fertilidad, lo que concuerda con estudios realizados anteriormente (Chen et al., 2003; Contreras et al., 2007). Las plantas alopoliploides, procedentes de plantas  $F_1$  con esterilidad masculina, resultaron fértiles, pudiéndose obtener semillas con buena capacidad de germinación en ambos híbridos. Las plantas de partida, se desarrollaron por hibridación de *C. ficifolius* (4n) con *C. anguria* (2n) y *C. myriocarpus* (2n), respectivamente, y ambos híbridos  $F_1$  se confirmaron como triploides con esterilidad masculina. Se verificó también que los alopoliploides que resultaron fértiles eran hexaploides (6n). El rescate de la fertilidad supone una ventaja, ya que las semillas pueden obtenerse por autofecundación mientras que la generación de UPV-FA y UPV-FMy necesita del cruce de los parentales correspondientes. En las plantas poliploides no se observó un aumento en el tamaño de las hojas, como se ha observado en otros estudios (Zhang et al., 2010; Gantait et al., 2011). Se produjo un retraso de la floración (Gantait et al., 2011), y se obtuvieron frutos de menor tamaño que los resultantes de los cruces para obtener los híbridos 3n. Sin embargo, en los frutos de los alopoliploides, las semillas

eran de mayor tamaño al igual que el diámetro de los hipocótilos de las plántulas, con lo cual gracias a la poliploidización se ha conseguido la mejora planteada.

Con estos resultados se consideró de interés la evaluación de las plantas hexaploides como portainjertos, observándose un comportamiento similar al de las plantas injertadas en los híbridos  $3n$ . Por lo tanto, los alopoliploides podrían utilizarse como portainjertos, con la ventaja de producir semilla más fácilmente y facilitar la formación del injerto. No obstante, se requiere de más evaluaciones con un mayor número de variedades y condiciones de cultivo, así como estudiar su estabilidad genética para determinar si son utilizables como lo son los portainjertos UPV-FA y UPV-FMy, que han mostrado la reproducibilidad de los resultados.

En el marco de este trabajo, el grupo de mejora llevó a cabo un genotipado por secuenciación de los materiales empleados, realizado con el fin de estudiar posibles cambios genéticos tras la duplicación cromosómica. En estudios previos, en los que se comparan alopoliploides, sus líneas parentales directas y varias generaciones de alopoliploides, ya se ha descrito la ocurrencia de cambios genómicos, tanto en los poliploides naturales recientemente formados como en los poliploides resintetizados (Khasdan et al., 2010; Osabe et al., 2012). En nuestro trabajo, también hemos observado cambios, entre ellos, polimorfismos inesperados en genes de los alopoliploides, que son monomórficos entre los parentales correspondientes y homocigotos en el híbrido triploide de partida. El hecho de que estos SNP aparezcan en todos los hexaploides analizados sugiere que no se deben a errores de secuenciación. Estos cambios, además, parecen correlacionarse positivamente con el grado de divergencia genética, produciéndose con mayor frecuencia en el híbrido de *C. ficifolius* x *C. myriocarpus*. Esto sería consistente con una mayor restauración de la fertilidad en alo-UPV-FMy en comparación con alo-UPV-FA, como se ha observado en este trabajo (mayor número de semillas, número de semillas por fruto y germinación en UPV-FMy).



La variación novedosa con respecto a sus progenitores que encontramos en este estudio puede deberse al emparejamiento de regiones homeólogas y la recombinación entre genomas, como se ha descrito previamente con frecuencia en familias multigénicas, o a otros mecanismos. Por ejemplo, Li et al. (2019) al comparar el alotetraploide de *B. napus* con los genomas donantes de *B. rapa* y *B. oleracea* encontraron cambios en genes de la familia EIN3 / EIL, muchos de ellos adquirieron intrones adicionales durante el proceso de poliploidización. Uno de los resultados más interesantes en nuestro trabajo son los polimorfismos consistentes encontrados en los genes MELO3C007268.2.1 y MELO3C005250.2.1 anotados como ‘FRIGIDA ESSENTIAL 1’ e ‘Histidina quinasa 4’, que están relacionados con la regulación de la floración y el desarrollo, procesos que incluyen gametogénesis y respuesta al estrés, respectivamente (Schmitz et al., 2005; Nongpiur et al., 2012; Li et al., 2018; Rychel et al., 2019). Se necesitan más estudios para determinar si los cambios observados en estos genes están involucrados en la restauración de la fertilidad masculina que se ha dado en los hexaploides de *Cucumis* en nuestro estudio.

Con los resultados obtenidos hemos podido corroborar que la poliploidización es una estrategia válida para aumentar el tamaño de los hipocótilos en *Cucumis*, así como para restaurar la fertilidad de híbridos estériles. Los resultados obtenidos al utilizar los aloploidos como portainjertos indican que también podrían utilizarse como portainjertos de melón, pero es necesario llevar a cabo un mayor número de estudios para evaluar posibles cambios en generaciones de autofecundación y/o la influencia que pudieran ejercer sobre la copa en otras variedades/condiciones de cultivo. Los resultados del genotipado también resultan muy interesantes y abren la puerta a realizar otros estudios para determinar si los cambios producidos están relacionados con la restauración de la fertilidad.

## Bibliografía

- ◆ Beharav, A., & Cohen, Y.(1995). Attempts to overcome the barrier of interspecific hybridization between *Cucumis melo* and *C. metuliferus*. *Israel Journal of Plant Science*, 43(2), 113-123. <https://doi.org/10.1080/07929978.1995.10676597>
- ◆ Ben Salem, I., Correia, K. C., Boughalleb, N., Michereff, S. J., León, M., Abad-Campos, P., ... Armengol, J. (2013). *Monosporascus eutypoides* , a Cause of Root Rot and Vine Decline in Tunisia, and Evidence that *M. cannonballus* and *M. eutypoides* are Distinct Species. *Plant Disease*, 97(6), 737–743. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-12-0464-re>
- ◆ Cáceres, A., Perpiña, G., Ferriol, M., Picó, M. B., & Gisbert, C. (2017). New *Cucumis* Rootstocks for Melon: ‘UPV-FA’ and ‘UPV-FMy.’ *HortScience*, 52(5), 792–797. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11791-17>
- ◆ Cáceres, A., Picó, M. B., & Gisbert, C. (2016a). Germination of Wild *Cucumis* Species and Interspecific Hybrids. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XI<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 227-230), Warsaw, Poland.
- ◆ Cáceres, A., Ferriol, M., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2016b). Use of Wild *Cucumis* as Potential New Rootstocks for Melons. In E.U. Kozik & H.S. Paris (Eds). *XI<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, (pp. 300-304), Warsaw, Poland.
- ◆ Chen, J. F., Staub, J. E., Qian, C. T., Jiang, J., Luo, X., & Zhuang, F. Y. (2003). Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Chakr. x *Cucumis sativus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(4), 688–695. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1118-7>
- ◆ Cohen, R., Pivonia, S., Crosby, K. M., & Martyn, R. D. (2012). Advances in the Biology and Management of *Monosporascus* Vine Decline and Wilt of Melons and Other Cucurbits. In J. Janick. (Ed.), *Horticultural Reviews* 39 (pp. 77-120). New Jersey, USA:Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118100592.ch2>

- ◆ Colla, G., Pérez-Alfocea, F., & Schwarz, D. (Eds.) (2017). *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. Wallingford, UK: CABI.
- ◆ Colla, G., Roupahel, Y., Cardarelli, M., Massa, D., Salerno, A., & Rea, E. (2006). Yield, fruit quality and mineral composition of grafted melon plants grown under saline conditions. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *81*(1), 146–152. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512041>
- ◆ Contreras, R., Ranney, T., & Tallury, S. (2007). Reproductive Behavior of Diploid and Allotetraploid *Rhododendron* L. ‘Fragrant Affinity’. *HortScience*, *42*(1), 31–34. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.1.31>
- ◆ Den Nijs, A. P. M. & Custer, J. B. M. (1990). Introducing resistance into cucumbers by interspecific hybridization. In D.M. Bates, R.W. Tobinson, & C. Jeffrey (Eds.), *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae* (pp. 382–396). London, UK: Cornell University Press.
- ◆ Den Nijs, A. P. M., & Visser, D. L. (1985). Relationships between African species of the genus *Cucumis* L. Estimated by the production, vigour and fertility of F1 hybrids. *Euphytica*, *34*(2), 279–290. <https://doi.org/10.1007/BF00022920>
- ◆ Edelstein, M., Burger, Y., Horev, C., Porat, A., Meir, A., & Cohen, R. (2004). Assessing the effect of genetic and anatomic variation of *Cucurbita* rootstocks on vigour, survival and yield of grafted melons. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *79*(3), 370–374. <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511775>
- ◆ Expósito, A., Munera, M., Giné, A., López-Gómez, M., Cáceres, A., Picó, B., ... Sorribas, F. J. (2018). *Cucumis metuliferus* is resistant to root-knot nematode *Mi1.2* gene (a) virulent isolates and a promising melon rootstock. *Plant Pathology*, *67*(5), 1161–1167. <https://doi.org/10.1111/ppa.12815>
- ◆ Fita, A., Picó, M. B., & Nuez, F. (2007a). Melon roots under stress: Melon vine decline. *Plant Stress*, *1*, 93–104.
- ◆ Fita, A., Picó, M. B., Roig, C., & Nuez, F. (2007b). Performance of *Cucumis melo* ssp. *agrestis* as a rootstock for melon. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *82*(2), 184–190. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512218>

- ◆ Fredes, A., Roselló, S., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., Pérez-de-Castro, A., Gisbert, C., & Picó, M. B. (2017). Fruit quality assessment of watermelons grafted onto citron melon rootstock. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1646–1655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7915>.
- ◆ Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2011). Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(3), 485–493. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9947-1>.
- ◆ Gisbert, C., Gammoudi, N., Munera, M., Giné, A., Pcurull, M., Sorribas, F. J., & Picó, M. B. (2017). Evaluation of two potential *Cucumis* spp. resources for grafting melons. *Acta Horticulturae*, 1151, 157–162. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.25>.
- ◆ Gisbert, C., Cáceres, A., Perpiñá, G., Bernat, G., Pérez-de-Castro, A., & Picó, M. B. (2016). El injerto como técnica para la recuperación de variedades tradicionales: “el meló d’Or d’Ontinyent”, un caso de estudio. *Phytoma*, 282, 40–47.
- ◆ Gisbert, C., Prohens, J., Raigón, M. D., Stommel, J. R., & Nuez, F. (2011a). Eggplant relatives as sources of variation for developing new rootstocks: Effects of grafting on eggplant yield and fruit apparent quality and composition. *Scientia Horticulturae*, 128(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.007>.
- ◆ Gisbert, C., Prohens, J. & Nuez, F. (2011b). Treatments for improving seed germination in eggplant and related species. *Acta Horticulturae*, 898, 45–51. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.898.4>
- ◆ Gómez, J., Serrano, Y., Pérez, A., Porcel, E., Gómez, R., & Aguilar, M. I. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, affecting melon in Almería Province, Spain. *Australasian Plant Disease Notes*, 9, 136. <https://doi.org/10.1007/s13314-014-0136-z>
- ◆ González, V., García-Martínez, S., Ruiz, J. J., Flores-León, A., Picó, B., & Garcés-Claver, A. (2019). First report of *Neocosmospora falciformis* causing wilt and root of Muskmelon in Spain. *Plant Disease*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-2013-PDN>

- ◆ Guan, W., Zhao, X., & Huber, D. J. (2015). Grafting with an Interspecific Hybrid Squash Rootstock Accelerated Fruit Development and Impaired Fruit Quality of Galia Melon. *HortScience*, *50*(12), 1833-1836. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.12.1833>.
- ◆ Hansen, N. J. P., & Andersen, S. B. (1996). *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*, *88*, 159-164. <https://doi.org/10.1007/BF00032447>
- ◆ Khasdan, V., Yaakov, B., Kraitshtein, Z., & Kashkush, K. (2010). Developmental Timing of DNA Elimination Following Allopolyploidization in Wheat. *Genetics*, *185*(1), 387-390. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.116178>
- ◆ Kho, Y. O., Den Nijs, A. P. M., & Franken, J. (1980). Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, an investigation of in vivo pollen tube growth and seed set. *Euphytica*, *29*(3), 661-672. <https://doi.org/10.1007/BF00023214>
- ◆ Koksall, N., Yetisir, H., Sari, N., & Abak, K. (2002). Comparison of different in vivo methods for chromosome duplication in muskmelon (*Cucumis melo*). *Acta Horticulturae*, *588*, 293-298. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.588.46>
- ◆ Kousik, C. S., Mandal, M., & Hassell, R. (2018). Powdery Mildew Resistant Rootstocks that Impart Tolerance to Grafted Susceptible Watermelon Scion Seedlings. *Plant Disease*, *102*(7), 1290-1298. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1384-RE>
- ◆ Leonardi, C., Kyriacou, M. C., Gisbert, C., Oztekin, G. B., Mourão, I., & Roupheal, Y. (2017). Quality of Grafted Vegetables. In G. Colla, F. Pérez-Alfocea & D. Schwarz (Eds), *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. (pp. 216-244). Wallingford, UK: CABI
- ◆ Li, M., Wang, R., Liang, Z., Wu, X., & Wang, J. (2019). Genome-wide identification and analysis of the *EIN3/EIL* gene family in allotetraploid *Brassica napus* reveal its potential advantages during polyploidization. *BMC Plant Biology*, *19*, 110. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1716-z>

- ◆ Li, Z., Jiang, D. & He, Y. (2018). FRIGIDA establishes a local chromosomal environment for *FLOWERING LOCUS C* mRNA production. *Nature Plants*, 4, 836–846. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0250-6>
- ◆ Lim, W., & Earle, E. D. (2008). Effect of in vitro and in vivo colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(1), 115–124. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9422-9>
- ◆ Liu, B., Ren, J., Zhang, Y., An, J., Chen, M., Chen, H., ... Ren, H. (2015). A new grafted rootstock against root-knot nematode for cucumber, melon, and watermelon. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0234-5>
- ◆ Martyn, R. D. & Miller, M. E. (1996). Monosporascus Root Rot and Vine Decline: An Emerging Disease of Melons Worldwide. *Plant Disease*, 80(7), 716–725. <https://doi.org/10.1094/pd-80-0716>
- ◆ Montero-Pau, J., Esteras, C, Blanca, J. Ziarsolo, P, Cañizares, J., & Picó, B. (2017). Genetics and Genomics of *Cucurbita* spp. In R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas (Eds.), *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae* (pp. 211–227). Springer. [https://doi.org/10.1007/7397\\_2016\\_10](https://doi.org/10.1007/7397_2016_10)
- ◆ Nongpiur, R., Soni, P., Karan, R., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2012) Histidine kinases in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1230-1237. <https://doi.org/10.4161/psb.21516>
- ◆ Osabe, K., Kawanabe, T., Sasaki, T., Ishikawa, R., Okazaki, K. Dennis, E. S., Kazama, T., & Fujimoto, R. (2012). Multiple Mechanisms and Challenges for the Application of Allopolyploidy in Plants. *International Journal of Molecular Science*, 13, 8696-8721. <https://doi.org/10.3390/ijms13078696>
- ◆ Pintos, B., Calvarro, L. M., & Garay, A. G. (2014). Agentes antimitóticos en la obtención de plantas doble-haploides. *Reduca (Biología)*, 7(2), 12-18.
- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mafeo, T. P. (2013). Optimising stem diameters of watermelon cultivars and indigenous *Cucumis* species for improving

compatibility of inter-generic grafts. *Acta Horticulturae*, 1007, 807–812. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1007.96>

- ◆ Pofu, K. M., Mashela, P. W., & Mphosi, M. S. (2011). Management of *Meloidogyne incognita* in nematode-susceptible watermelon cultivars using nematode-resistant *Cucumis africanus* and *Cucumis myriocarpus* rootstocks. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8790–8793. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1252>
- ◆ Rychel, S., Książkiewicz, M., Tomaszewska, M., Bielski, W., & Wolko, B. (2019). FLOWERING LOCUS T, GIGANTEA, SEPALLATA, and FRIGIDA homologs are candidate genes involved in white lupin (*Lupinus albus* L.) early flowering. *Molecular Breeding*, 39, 43. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0952-0>
- ◆ Sakata, Y., Sugiyama, M., Ohara, T., & Morishita, M. (2006). Influence of Rootstocks on the Resistance of Grafted Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Scions to Powdery Mildew (*Podosphaera xanthii* U. Braun & N. Shishkoff). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75(2), 135–140. <https://doi.org/10.2503/jjshs.75.135>
- ◆ Salehi-Mohammadi, R., Khasi, A., Lee, S. G., Huh, Y. C., Lee, J. M., Babalar, M. & Delshad, M. (2009). Assessing Survival and Growth Performance of Iranian Melon to Grafting onto *Cucurbita* Rootstocks. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 27(1), 1-6.
- ◆ Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- ◆ Schmitz, R., Hong, L., Michaels, S., & Amasino, R. M. (2005). FRIGIDA-ESSENTIAL 1 interacts genetically with FRIGIDA and FRIGIDA-LIKE 1 to promote the winter-annual habit of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 132, 5471-5478. <https://doi.org/10.1242/dev.02170>
- ◆ Singh, A. K., & Yadava, K. S. (1984). An Analysis of Interspecific Hybrids and Phylogenetic Implications in *Cucumis* (*Cucurbitaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 147(3-4), 237–252.

- ◆ Skálová, D., Ondřej, V., Dolealová, I., Navrátilová, B., & Lebeda, A. (2010). Polyploidization Facilitates Biotechnological *In Vitro* Techniques in the Genus *Cucumis*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 475432. <https://doi.org/10.1155/2010/475432>
- ◆ Soteriou, G. A., Papayiannis, L. C., & Kyriacou, M. C. (2016). Indexing melon physiological decline to fruit quality and vine morphometric parameters. *Scientia horticulturae*, 203, 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.032>
- ◆ Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45(4), 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- ◆ Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Condurso, C., Crinò, P., Romano, D., ... Paratore, A. (2014). Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L . subsp . *melo* var . *inodorus* H . Jacq .) in relation to different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 169, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.008>
- ◆ Wu, J. H., Ferguson, A. R., Murray, B. G., Jia, Y., Datson, P. M., & Zhang, J. (2012). Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany*, 109(1), 169–179. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr256>
- ◆ Yadava, K. S., Singh, A. K., Roy, R. P., & Jha, U. C. (1986). Cytogenetics in *Cucumis* L. VI, synthetic amphidiploids. *Nucleus*, 29(1-2), 58-62.
- ◆ Zhang, W., Hao, H., Ma, L., Zhao, C., & Yu, X. (2010). Tetraploid muskmelon alters morphological characteristics and improves fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.038>
- ◆ Zhao, X., Guo, Y., Huber, D. J., & Lee, J. (2011). Grafting effects on postharvest ripening and quality of 1-methylcyclopropene-treated muskmelon fruit. *Scientia Horticulturae*, 130(3), 581-587. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.010>





## CONCLUSIONES



## Conclusiones

- ◆ El uso de un portainjerto híbrido (*C. melo* subsp. *melo* grupo *ibericus* Piel de Sapo x *C. melo* subsp. *agrestis* grupo *chinensis* PAT81) resistente a *M. cannonballus*, permitió cultivar la variedad tradicional de Meló' d'Or d'Ontinyent, proporcionándole resistencia en suelos donde previamente se reportó colapso de melón y adicionalmente conservando las características agronómicas y organolépticas del fruto.
- ◆ El híbrido interespecífico Ma x Ec (*C. maxima* x *C. ecuadorensis*) se recomienda como una alternativa a los patrones de *Cucurbita* (*C. maxima* x *C. moschata*) comercialmente utilizados, por presentar una buena compatibilidad y ser el que menor impacto negativo sobre los frutos presentó, a diferencia del resto de híbridos experimentales de *Cucurbita* que causaron un leve retraso en el desarrollo de la variedad injertada y alteraciones en los rasgos del fruto.
- ◆ Los portainjertos derivados del género *Cucumis* (*C. ficifolius* x *C. anguria*, *C. ficifolius* x *C. myriocarpus* y *C. melo* subsp. *melo* grupo *ibericus* Piel de Sapo x *C. melo* subsp. *agrestis* grupo *chinensis* PAT81) mostraron mejor compatibilidad con la variedad comercial de melón Piel de Sapo (*C. melo*) sin mostrar cambios significativos en los parámetros de calidad del fruto, debido posiblemente a su mayor proximidad filogenética comparado con los portainjertos de *Cucurbita*.
- ◆ La hibridación interespecífica permitió ampliar la base genética y combinar caracteres de interés en genotipos superiores, como los híbridos UPV-FA y UPV-FMy que mostraron un elevado poder germinativo, vigor, mayor diámetro de sus hipocótilos, y resistencias a factores de estrés biótico y abiótico, siendo estas características deseables para su aprovechamiento a nivel comercial como portainjertos de melón tipo Cantalupo y Piel de Sapo, tanto bajo condiciones de cultivo protegido (hidropónico) como a campo abierto (suelo).

- ♦ El uso de *Cucumis metuliferus* como portainjerto de melón, mostró variaciones en su comportamiento a lo largo del período de estudio y bajo los distintos ambientes evaluados. Plantas menos vigorosas, formación de miriñaque, reducción notable del tamaño del fruto y del rendimiento, fueron evidenciados bajo condiciones de estrés, desencadenando en algunos casos, fenómenos de colapso, sin embargo, es una especie de interés por su elevada resistencia a patógenos del suelo.
- ♦ La poliploidización a partir de la inmersión de semillas en solución de colchicina permitió la obtención de dos alopoliploides (alo-UPV-FA y alo-UPV-FMy) que mostraron recuperación de la fertilidad y mayor diámetro de hipocótilo que sus predecesores, rasgos de interés que pueden ser aprovechados para su uso como portainjertos de melón.
- ♦ Los hexaploides obtenidos, alo-UPV-FA y alo-UPV-FMy, utilizados como patrones de dos tipos de melón (Cantalupo y Piel de Sapo) mostraron buena compatibilidad sin alterar los parámetros comerciales de calidad del fruto, aunque alo-UPV-FA retrasó el apareamiento de la floración masculina en el cultivar Piñonet (Piel de Sapo).
- ♦ Los polimorfismos diferenciales de sus parentales y de las F1 triploides, identificados en alo-UPV-FA y alo-UPV-FMy se encuentran en genes que codifican proteínas involucradas en procesos de floración y desarrollo (MELO3C007268.2.1 y MELO3C005250.2.1, anotados como ‘FRIGIDA ESSENTIAL 1’ e ‘Histidina quinasa 4’ respectivamente), lo que podría estar relacionado con la recuperación de la fertilidad en los poliploides.



El injerto es una antigua técnica utilizada desde hace décadas por el ser humano para el mejoramiento vegetal. Consiste en la combinación de las características de dos (o más) variedades o especies diferentes por medio de la unión o fusión del sistema radicular de una (portainjerto/patrón) para potenciar la parte aérea (vástago/copa) de otra. Esta estrategia ha sido adaptada y aprovechada para el cultivo de especies hortícolas de gran importancia en la alimentación mundial. Entre estas, destaca el melón (*Cucumis melo* L.), especie diploide ( $2x=24$ ) perteneciente a la familia Cucurbitaceae y sin duda uno de los cultivos más demandados en el mundo entero por sus beneficios nutricionales y versatilidad gastronómica. Sin embargo, su alta demanda exige la aplicación de tecnologías limpias y eficientes que permitan hacer frente a las plagas y enfermedades que limitan su producción. El injerto y el uso de patrones resistentes y vigorosos ha sido una estrategia útil para hacer frente a patógenos del suelo como *Fusarium*, *Monosporascus* o nemátodos principalmente, aunque los efectos observados en otros procesos fisiológicos (fotosíntesis, respiración, floración, fructificación, etc.) ha llevado a su aprovechamiento con otros enfoques de mejoramiento vegetal.

El estudio de la inmensa diversidad genética existente dentro de la familia Cucurbitaceae, ha sido clave para identificar características de interés (resistencia, tolerancia, vigor, precocidad) en parientes silvestres del melón comercial, y desarrollar a partir de estos, nuevos genotipos para su uso como portainjertos, mediante la aplicación de estrategias biotecnológicas, como la hibridación o la poliploidización.

Este documento es un compendio de trabajos realizados con el objetivo de aportar experiencias y conocimiento en el desarrollo de patrones mejorados, su uso en el injerto de melón bajo diferentes condiciones de estrés y las implicaciones en el impacto de la calidad del fruto.