

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Estudio de la resistencia a
ToLCNDV en mutantes de
insensibilidad a etileno de

Cucurbita pepo

Alumno/a: Laura Alonso López

Curso Académico: 2019/2020

Modalidad: Proyecto Experimental, Área
de Genética

Directores:

Cecilia Martínez Martínez

Jonathan Romero Masegosa



AGRADECIMIENTOS

Después de cuatro años, hoy es el día y escribo este apartado de agradecimientos para acabar mi Trabajo de Fin de Grado. Ha sido un periodo de aprendizaje intenso tanto a nivel personal como a nivel académico. Escribir este trabajo ha sido una de las experiencias más importantes de mi vida y llega el momento de agradecer a todas las personas que me han ayudado y apoyado a lo largo de su proceso.

Quiero agradecer a todos los profesores su gran esfuerzo y dedicación, haciendo mención especial a los profesores del Departamento de Genética por hacerme ver cuál era mi verdadera pasión dentro de esta amplia carrera. Agradecer a Manuel Jamilena por darme la oportunidad de formar parte de su Equipo de Investigación durante el verano para empezar a conocer cómo se trabajaba en el laboratorio donde meses después empezaría a realizar mi TFG. Durante ese verano conocí a Jonathan y no dudé en elegirlo cotutor, para él solo tengo palabras de agradecimiento. Gracias por hacer que cada tarde de laboratorio fuese mejor que la anterior y gracias por darme esa confianza desde el primer día, nunca se me olvidarán todas las conversaciones que hemos tenido a lo largo de estos meses, gracias por estar siempre que lo he necesitado sin importar el día que fuese. Por otro lado, quiero mencionar a Cecilia, quién comenzó siendo mi profesora de prácticas y acabó convirtiéndose en mi tutora de TFG. Muchísimas gracias por ayudarme de la mejor manera en la realización de este trabajo, gracias por estar siempre disponible y gracias por todos y cada uno de los consejos que me has dado para que este trabajo fuese un éxito.

A mis amigas, por haber estado día tras día a mi lado y peleando por llegar al fin de esta etapa. Mencionar a Ana y Celia, gracias por formar parte de mis días durante estos cuatro años y por todo el apoyo recibido, porque nadie sabe mejor que vosotras todo el esfuerzo que esto ha supuesto. Y como no, mencionar a María, tras seis años sin saber nada la una de la otra, volvimos a encontrarnos en la carrera y desde entonces nada nos ha separado, compartiendo todos los momentos del día juntas, gracias por reaparecer en mi vida y ser un pilar fundamental.

A Miguel, por haber aparecido cuando menos lo esperaba, pero cuando más lo necesitaba. Por todo el apoyo, el ánimo y consejos recibidos para hacerme ver que puedo conseguir todo lo que me proponga. Gracias por hacer especial el fin de esta gran etapa.

A mis padres, a mi hermano, gracias a ellos soy quien soy y sólo puedo expresar mi agradecimiento por apoyarme durante todos los años de mi vida. Gracias a mis padres por enseñarme desde pequeña lo importante que era estudiar para poder llegar a ser lo que más te apasiona en la vida. Gracias por todo el esfuerzo que habéis hecho para que llegara hasta aquí de la mejor manera posible y sintiéndome la persona más especial del mundo por teneros a mi lado.

Muchas gracias a todos,

Laura

Almería, 1 de julio de 2020

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. CARACTERÍSTICAS DE <i>Cucurbita pepo</i>	5
1.1.1. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y ORIGEN	5
1.1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	5
1.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DE CULTIVO	8
1.2. ENFERMEDADES DEL CALABACÍN: EL VIRUS DE NUEVA DELHI	9
1.2.1. ORIGEN Y EXPANSIÓN	9
1.2.2. CARACTERÍSTICAS Y SÍNTOMATOLOGÍA.....	10
1.3. RESISTENCIAS A ToLCDNV EN CUCURBITACEAS.....	12
1.4. COLECCIONES EMS EN OTRAS ESPECIES	13
1.5. COLECCIONES DE MUTANTES EMS EN <i>Cucurbita pepo</i>	14
1.6. ETILENO EN RESISTENCIA A ESTRESSES BIÓTICOS	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	18
3.2. CONDICIONES Y MANEJO DEL CULTIVO	19
3.3. FUENTE DE INÓCULO Y MÉTODO DE INOCULACIÓN	19
3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS PARA EL DESARROLLO Y PARA LA SUSCEPTIBILIDAD A ToLCNDV.....	20
3.4.1. Evaluación de la tolerancia a ToLCNDV.....	20
3.5. RECOGIDA DE MUESTRA	21
3.6. EXTRACCIÓN DE ADN	22
3.7. MEDIDA DE LA ACUMULACIÓN VIRAL DURANTE EL ENSAYO	23
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. ESTUDIO DEL VIRGOR EN EL MUTANTE <i>ein3</i> Y EN LAS PLANTAS WT.....	24
4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MUTACIÓN <i>ein3</i> EN LA TOLERANCIA A ToLCNDV.....	28
4.2.1. Evolución de la severidad	28
4.2.2. Evolución del número de hojas en respuesta a la inoculación con ToLCNDV.....	29

4.2.3. Efecto de la inoculación con ToLCNDV en el peso final de las partes aéreas y radicales de las plantas WT y mutantes <i>ein3</i>	30
4.2.4. Estudio de la correlación entre el crecimiento y la severidad de síntomas a ToLCNDV	32
5. RESULTADOS ESPERADOS	36
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

El virus Tomato Leaf Curl New Delhi (ToLCNDV) fue descrito por primera vez en 1995 en la India. Se trata de un *Begomovirus* de genoma bipartido perteneciente a la familia Geminiviridae. En 2012 fue detectado en España produciendo numerosas pérdidas en los cultivos de cucurbitáceas, mayoritariamente en calabacín (*Cucurbita pepo*). El virus es transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y hasta la fecha las estrategias de control de la enfermedad se han basado en el control del vector. Por lo que el desarrollo de variedades resistentes en calabacín no sólo es deseable, si no necesario. El etileno es una hormona con un importante papel en el desarrollo de las plantas. Está implicada en la determinación del sexo, la maduración y senescencia de los frutos, la epinastia de las hojas y en la germinación de las semillas. Además, en procesos de desarrollo junto con otras hormonas, el etileno participa en la respuesta frente a estreses bióticos, por lo que el uso de mutantes de la ruta del etileno podría ser interesante para desarrollar materiales resistentes al virus ToLCNDV. El mutante de percepción a etileno *ein3*, presenta una mutación semidominante de falta de sensibilidad causada por un fallo en la transducción de la señal de etileno. En este trabajo se ha estudiado cómo afecta dicha mutación en la tolerancia frente a un estrés biótico, en nuestro caso el virus ToLCNDV. Para ello se han estudiado distintos parámetros que pueden estar afectados por el virus o variar entre los diferentes genotipos. Nuestros resultados indican que existe una diferencia en el vigor de plantas control, WT y *ein3*, que en nuestras condiciones de cultivo es mayor en las plantas WT. Por otro lado, para comprobar el nivel de tolerancia de la mutación *ein3* frente al virus, se ha estudiado la evolución de la severidad. Posteriormente, a los 30 días después de la inoculación, se ha correlacionado la severidad frente al crecimiento mostrado en cada grupo de plantas. Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias en la respuesta a la inoculación en cada genotipo; mientras las plantas WT reducen su crecimiento al ser inoculadas, en las plantas *ein3* no se sucede así. Por tanto, la respuesta al virus ToLCNDV podría estar mediada por etileno, ya que el bloqueo de su percepción podría limitar los cambios fisiológicos debidos a la inoculación. Finalmente, en este Trabajo Fin de Grado estaba planificado cuantificar la acumulación viral mediante qPCR. Como resultado esperado, se debería haber obtenido una mayor carga viral en plantas WT.

ABSTRACT

Tomato Leaf Curl New Delhi virus (ToLCNDV) was first described in 1995 in India. ToLCNDV is a *Begomovirus* that possesses a bipartite genome of the family *Geminiviridae*. In 2012, it was detected in Spain, it causes losses to a large number of cultivated plant species of the *Cucurbitaceae* family, being one of the most affected crops zucchini squash (*Cucurbita pepo*). The virus is transmitted by white flies (*Bemisia tabaci*) and to date, disease control strategies depends on vector control. Therefore, the development of resistant varieties in zucchini is not only desirable, but necessary. One of the strategies to deal with the ToLCNDV virus is based on obtaining resistant varieties. Ethylene is a hormone with an important role in the development of plants. It is involved in determining sex, maturation and senescence of the fruits, the epinastic curvatures of leaves and seed germination. Furthermore, ethylene is essential for developmental processes and a crucial mediator of biotic stress responses in plants, so the use of mutants of the ethylene pathway could be interesting to develop resistant genotypes to ToLCNDV. The ethylene perception mutant, *ein3*, show a semi-dominant mutation caused by a failure in the signal transduction ethylene. In this work, we have studied how this mutation affects biotic stress tolerance, e.g ToLCNDV. Different parameters that may be affected by the virus or vary between different genotypes have been studied. Our results indicate that there is a difference in the vigour of control plants, WT and *ein3*, which in our conditions is higher in WT plants. On the other hand, to check the tolerance level of the *ein3* mutation against the virus, the evolution of the severity has been studied. Later on, 30 days after inoculation, the severity was correlated with the growth shown in each group of plants. The results showed differences in the response to inoculation in each genotype. WT plants reduced their growth when they were inoculated, but *ein3* plants did not show changes. Since blocking ethylene perception limits the physiological changes related to inoculation, the response to ToLCNDV in *C. pepo* could be is mediated by ethylene. Finally, in this work, it was planned to quantify viral accumulation using qPCR. As an expected result, a higher viral load should have been obtained in WT plants.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS DE *Cucurbita pepo*

1.1.1. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y ORIGEN

El género *Cucurbita* se encuentra dentro del orden *Cucurbitales*, familia *Cucurbitaceae* y subfamilia *Cucurbitoidae* (Tabla 1). La familia de las cucurbitáceas comprende unas 1000 especies agrupadas en 96 géneros (Renner and Hanno, 2016), siendo *Cucurbita*, *Cucumis* y *Citrullus* los más importantes por su valor económico. *Cucurbita pepo* incluye ocho grupos de cultivos comestibles entre los que se encuentran las calabazas y el calabacín.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del calabacín.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Subfamilia	Cucurbitoidae
Tribu	Cucurbitae
Género	<i>Cucurbita</i>
Especie	<i>Cucurbita pepo</i>

México es considerado el centro de domesticación y diversificación del género *Cucurbita*, el cual está compuesto por 20 taxones donde *Cucurbita pepo subsp. pepo* es el mejor estudiado por su importancia económica y por ser un cultivo que tiene una importante distribución mundial en su cultivo (Castellanos-Morales *et al.*, 2019).

1.1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

Cucurbita pepo es una de las especies más cultivadas y polimórficas de las cucurbitáceas, además de ser la especie con mayor importancia económica con respecto al resto de las especies que componen este género (París, 2001). La domesticación de *C. pepo* se produjo en su lugar de origen y se cree que al menos hubo dos procesos de domesticación independientes, Norte de México y Sur de Norteamérica, de manera aparecieron las dos subespecies conocidas: *C. pepo subsp. pepo* y *C. pepo subsp. ovifera* (Carvajal Moreno, 2014).

A nivel mundial, los datos proporcionados por la FAO indican que el continente que más produce este cultivo es Asia, seguido de Europa y África, siendo Oceanía el menor productor (Figura 1).

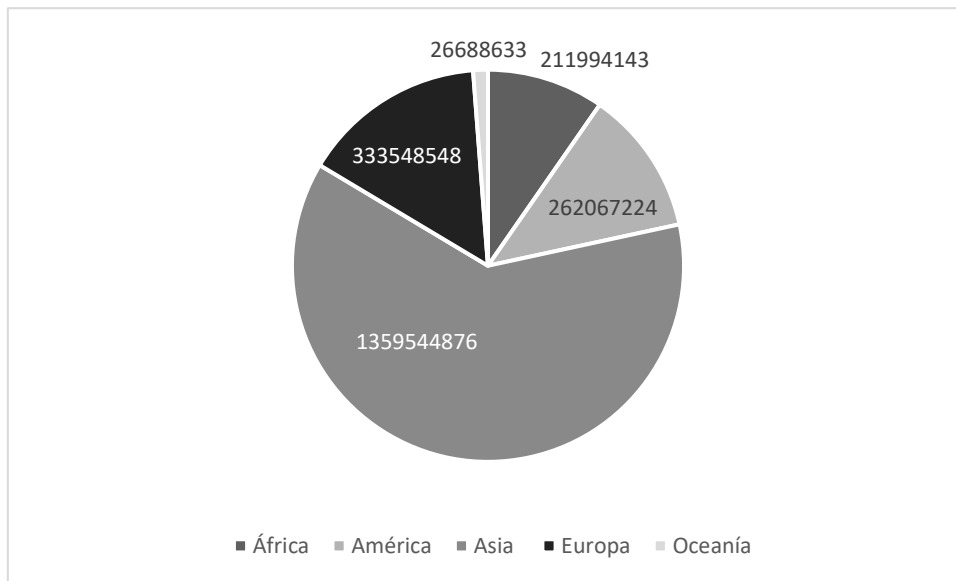


Figura 1. Producción mundial en toneladas desde 1998 hasta 2018. (Fuente: FAOSFAT, Anuario de estadísticas 2018).

La producción europea es de 334 millones de toneladas, siendo los principales productores España e Italia. En España, la superficie cultivada de calabacín se mantenía más o menos estable año tras año desde el 98 hasta el año 2011. A partir de entonces se ha observado una tendencia de incremento de la superficie cultivada, con ligeras variaciones (Figura 2 a). La producción sigue una progresión que se correlaciona con la superficie que estaba dedicada para este cultivo cada año y de nuevo en 2018 hay un máximo de producción (Figura 2 b).

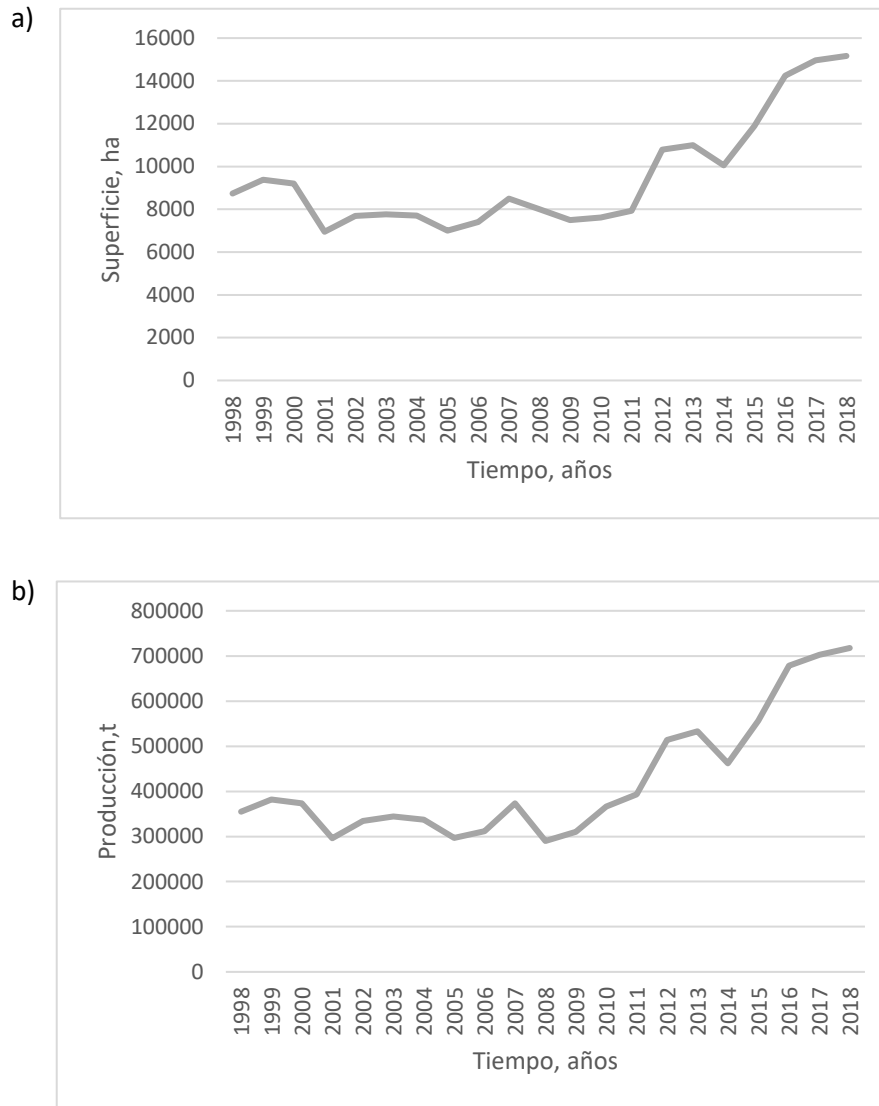


Figura 2. a) Representación de superficie en hectáreas b) Producción de calabacín en toneladas en España desde el año 1998 hasta 2018. (Fuente: FAO. Anuario 2018).

Los rendimientos del cultivo dependen de la fecha de siembra, del sistema de cultivo y de la duración de la recolección. Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) los cultivos protegidos desde septiembre a mayo tienen una capacidad productiva alta que puede alcanzar los 150.000kg/ha, variando estos datos poco en el caso del cultivo al aire libre.

El cultivo protegido del calabacín que consumimos actualmente ha ido aumentando en los últimos años gracias al cultivo de híbridos más productivos que se han obtenido a partir de variedades italianas (Carvajal Moreno, 2014).

1.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DE CULTIVO

El calabacín es una planta anual de crecimiento indeterminado cuyo sistema radicular está constituido principalmente por una raíz principal axonomorfa que alcanza un gran desarrollo en relación con las raíces secundarias (López Gázquez, 2018).

Presenta un tallo herbáceo y grueso cuya altura y tamaño de los entrenudos depende de la variedad y de las condiciones climáticas. Sus hojas son palmadas con un limbo grande de márgenes dentados, haz glabro y envés áspero recubierto de pelos a lo largo de las nerviaciones que parte de la base de la hoja y se dirigen a cada lóbulo. Es una planta monoica, donde coexisten flores masculinas y femeninas en la misma planta. Son flores que presentan un cáliz zigomorfo con cinco sépalos verdes y puntiagudos con una corola formada por cinco pétalos de color amarillo. La flor femenina se une al tallo por un corto y grueso pedúnculo de sección irregular pentagonal o hexagonal, mientras que en las flores masculinas (de mayor tamaño) dicho pedúnculo puede alcanzar una longitud de hasta 40 centímetros. El ovario es ínfero, tricarpelar, trilobular y alargado. Los estilos, en número de tres, están soldados en su base y son libres a la altura de su inserción con el estigma, este último dividido en 2 partes. Las flores masculinas poseen tres estambres soldados (Figura 4) (López Gázquez, 2018).

El fruto es un pepónide carnoso, unilocular, sin cavidad central, de color variable, liso, estriado y reticulado. Se recolecta cuando se encuentra a mitad de su desarrollo (López Gázquez, 2018).



Figura 3. Diferencias morfológicas entre flor masculina y femenina de calabacín. Fuente: Alfonso Manuel López Gázquez (2018). Evaluación fenotípica y molecular de mutantes de insensibilidad a etileno en calabacín. Universidad de Almería. Almería.

Su cultivo requiere unos requerimientos edafoclimáticos entre los que se encuentran temperatura y humedad. La temperatura óptima del cultivo depende del momento del desarrollo en el que estemos: la temperatura óptima para la germinación de las semillas está entre los 20-25°C, el desarrollo vegetativo requiere una temperatura entre los 25-30°C y la floración tiene su óptimo a los 20°C por la noche y los 25°C durante el día. La humedad del suelo debe encontrarse cercana al 95% para que el crecimiento no esté limitado y se pueda llevar a cabo el correcto desarrollo de los frutos.

1.2. ENFERMEDADES DEL CALABACÍN: EL VIRUS DE NUEVA DELHI

Las enfermedades causadas por virus en plantas representan una carga significativa para la salud de la planta y, estas tienen un gran impacto en los vegetales, cucurbitáceas y solanáceas, que se cultivan en invernaderos en la zona del Mediterráneo (Desbiez *et al.*, 2020).

Los cultivos de cucurbitáceas se ven afectados por diversas enfermedades virales entre los que se encuentran los *Potyvirus* (WMV, ZYMV, CYSDV y CVYV) y *Begomovirus* (ToLCNDV). El virus del mosaico de la sandía (WMV) causa manchas de color verde oscuro junto a los nervios y deforma el limbo de la hoja. El virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) produce deformaciones foliares y hace que los frutos no sean comerciales al poseer decoloración en la piel (Clarke *et al.*, 2020). El virus del amarilleo de las cucurbitáceas (CYSDV) produce amarillamiento internervial, fragilidad y engrosamiento de las hojas más viejas que conducen a una reducción del vigor de la planta (Kalischuk *et al.*, 2020). El virus de las venas amarillas del pepino (CVYV) causa aclareo severo en las venas que va seguido de clorosis generalizada y necrosis (Pujol *et al.*, 2019).

La infección por cada uno de estos virus puede tener lugar a través de intercambios comerciales de semillas, plantas o frutas; o bien ser propagadas por sus vectores bióticos (Desbiez *et al.*, 2020). Esta última forma de propagación es la que tiene lugar en ToLCNDV, el cual es transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) haciendo que se dificulte el control de su propagación debido a la rápida dispersión que tiene a través de la mosca blanca y por la capacidad que tiene de adaptarse a todos los ambientes (Simón *et al.*, 2018)

Bemisia tabaci es un complejo global de especies que consta de 40 especies crípticas, siendo el vector de al menos 100 especies de begomovirus que causan daños severos en los cultivos (Khatun *et al.*, 2020).

1.2.1. ORIGEN Y EXPANSIÓN

El virus de Nueva Delhi (ToLCNDV) se detectó por primera vez en el norte de India en 1995, desde donde se extendió al sur y sudeste de Asia. Fue en 2012 cuando se observó que el virus comenzaba a afectar a las cucurbitáceas en diferentes países del Mediterráneo, primero en España y luego en Túnez, Italia, Marruecos, Grecia y Argelia (Sáez *et al.*, 2020). Actualmente, se ha detectado que el virus también afecta a cultivos de cucurbitáceas en Portugal y Estonia, de manera que esto pone de manifiesto la rápida propagación que tiene ToLCNDV por toda Europa (Sáez *et al.*, 2020). El cultivo más afectado en los países europeos es el calabacín (*Cucurbita pepo* L. *subsp. pepo*). En este contexto

de alto potencial y rápida propagación, la Organización Mediterránea y Europea de Protección Fitosanitaria (EPPO) ha añadido a ToLCNDV a la lista de alertas de EPPO (EPPO 2017) (Sáez *et al.*, 2017).

El virus que llegó a España no es exactamente igual que el encontrado en India, por lo que se sospecha que el virus ha tenido que sufrir mutaciones (97% de identidad nucleotídica con los aislados en India). La cepa española se aisló por primera vez de plantas de calabacín cultivadas en Murcia y Almería en 2012-2013. Aislados de diferentes regiones y huéspedes en España han mostrado una uniformidad genética que contrasta con la alta heterogeneidad de los aislados en otras partes del mundo.



Figura 4. Distribución geográfica ToLCNDV. Fuente: Phytoma, España “EL virus de Nueva Delhi” amplía su gama de hospedantes en los cultivos españoles.

1.2.2. CARACTERÍSTICAS Y SÍNTOMATOLOGÍA

El virus de Nueva Delhi (ToLCNDV) fue el primer begomovirus de genoma bipartido detectado en España y Europa. Se encuentra dentro del género *Begomovirus*, perteneciente a la familia *Geminiviridae* y se caracteriza por estar formado por dos componentes de ssDNA (DNA-A y DNA-B).

Rojas *et al.*, 2005 afirman que para que se produzca la infección sistémica eficiente se necesitan estos dos componentes, pero encapsidados de forma independiente. El DNA-A tiene 4 ORFs (MLA) que codifican para proteínas que son requeridas para la replicación, transcripción y encapsidación del virus. Mientras que, el DNA-B presenta 2 ORFs (MLA) que codifican proteínas que están relacionadas con el movimiento viral y el desarrollo de los síntomas.

Los viriones están formados por un par de icosaedros con 110 subunidades de proteínas de cubierta cada uno de 29-30kD. Dentro de este tipo de virus encontramos 4 géneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*) dependiendo del insecto que actúa como vector, de las plantas hospedantes y de la estructura de su genoma (Güerere Pereira, 2013).

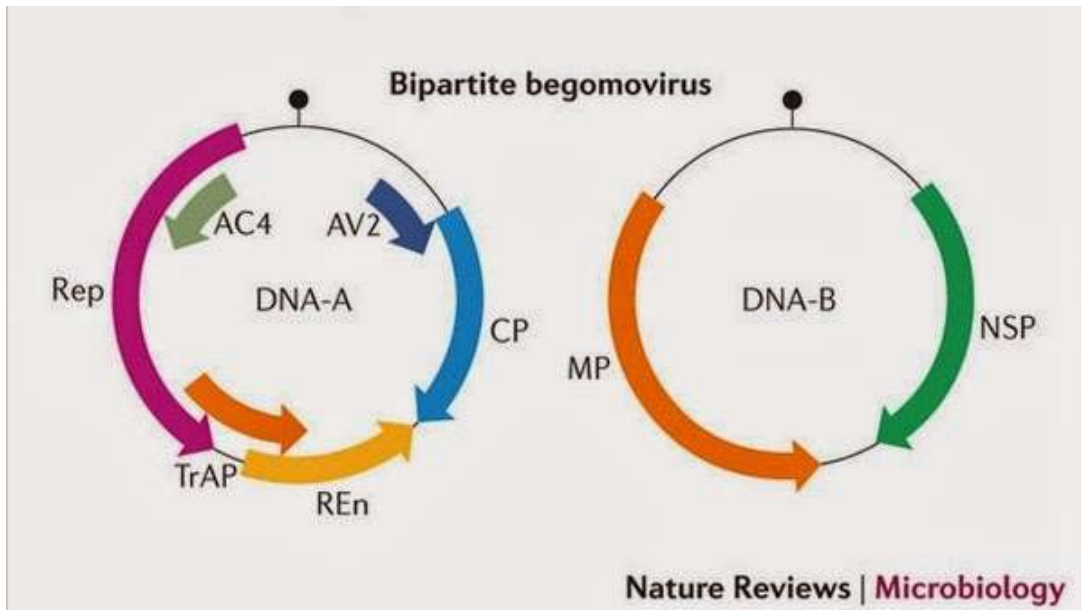


Figura 5. Estructura begomovirus. Fuente: Nature Reviews. Microbiology. Hanley-Bowdoin et al., 2013

En el sur de España, los brotes epidémicos de esta enfermedad han causado graves pérdidas económicas en invernaderos, y en cultivos de calabacín y melón en campo abierto (Sáez *et al.*, 2017). Estas pérdidas se deben al efecto sobre el crecimiento de las plantas, pero también, si la infección es tardía, a la pérdida de calidad en el fruto. En el género *Cucurbita* sus síntomas han sido evaluados en numerosas especies, entre las que se encuentran las 3 de mayor importancia a nivel mundial, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* y *Cucurbita pepo*, causando síntomas variados (Sáez *et al.*, 2016). Los síntomas característicos de *Cucurbita maxima* son la descomposición de las hojas y el color amarillento intenso, mientras que en *Cucurbita moschata* predominan síntomas de moteado foliar que evoluciona a mosaico severo. En el cultivo de calabacín (*Cucurbita pepo*), el virus causa un retraso en el crecimiento de las plantas, con entrenudos más cortos, un rizado hacia arriba y hacia abajo en sus hojas, amarilleo, clorosis, presentan un mosaico severo en hojas jóvenes y, el fruto presenta rugosidades en la piel (Sáez *et al.*, 2020).



Figura 6. Planta de calabacín afectada por ToLCNDV con hojas enrolladas hacia el envés, nervios arrugados y fruto con presencia de rugosidades. Fuente: Phytoma, España "EL virus de Nueva Delhi" amplía su gama de hospedantes en los cultivos españoles.

1.3. RESISTENCIAS A ToLCNDV EN CUCURBITACEAS

Para combatir las infecciones causadas por virus en plantas se puede acudir a la variabilidad natural o en su defecto a la variabilidad inducida. Las resistencias detectadas hasta el momento en cucurbitáceas frente a ToLCNDV han sido detectadas y caracterizadas en fuentes de la variabilidad natural.

Sáez *et al.*, 2017 encontraron una resistencia a ToLCNDV en melón. Mediante qPCR y fenotipado de distintas accesiones de la variabilidad natural de melón se detectó y se seleccionó un genotipo WM7 resistente a ToLCNDV, perteneciente a la subsp. *agrestis* que se empleó para generar una población segregante, a partir de su cruce con una variedad sensible tipo piel de sapo. La evaluación de la F2 y BC indica que la resistencia es dominante. El análisis de QTLs con marcadores moleculares permitió detectar un QTL mayor en una región del cromosoma 11 ligada a la resistencia y dos regiones más que modifican el carácter en los cromosomas 12 y 2 (Sáez *et al.*, 2017). A partir de estos resultados se están seleccionando marcadores de interés para la mejora genética que faciliten la incorporación de la resistencia en variedades cultivadas.

Además del estudio de la resistencia a ToLCNDV realizado en melón. Se ha detectado y caracterizado otra resistencia a ToLCNDV en *Cucurbita moschata*. Mediante el cruzamiento de dos variedades, una resistente con una variedad susceptible, se obtuvieron poblaciones segregantes que fueron genotipadas mediante poliformismos de un solo nucleótido (SNP) (Sáez *et al.*, 2020). La resistencia, que cosegrega con una región del cromosoma 8, es una recesiva y reduce la expresión de los síntomas y la acumulación viraToLCNDV (Sáez *et al.*, 2020).

Los marcadores moleculares identificados, vinculados al locus de resistencia de ToLCNDV, son muy valiosos para los programas de mejora de calabacín, permitiendo la selección. Para comprobar la validez del QTL, la variedad resistente de *C. moschata*, se cruzó con la variedad susceptible MUCU16 de *C. pepo* y se analizó la sintenia entre las dos especies, encontrando que la región candidata dentro del genoma de *C. moschata* mantiene sintenia con una región del cromosoma 17 de *C. pepo*. La región candidata del cromosoma 8 de *C. moschata* también era sinténica de la región candidata del cromosoma 11 del melón, previamente descrita como responsable de la resistencia a ToLCNDV (Sáez *et al.*, 2017; 2020).

Los genes comunes en las regiones candidatas de ambas cucurbitáceas presentan polimorfismos de alto o moderado impacto, entre accesiones resistentes y susceptibles de *C. moschata* y son interesantes, no sólo para el estudio de la resistencia si no para su uso como marcadores moleculares en programas de mejora para la resistencia a ToLCNDV en estas cucurbitáceas.

1.4. COLECCIONES EMS EN OTRAS ESPECIES

Cuando no se encuentran resistencia entre las accesiones naturales de la especie, se puede generar variabilidad artificial, para estudiar la resistencia y usarla como recurso para la mejora genética. Una de las maneras más eficaces para generar variabilidad inducida es provocar mutaciones mediante Etilmetasulfonato (EMS). Las colecciones de mutantes EMS están siendo fuente de caracteres de interés para el estudio genético y para la mejora. Uno de los ejemplos mejor documentados es el de los mutantes de falta de función *mlo* en Arabidopsis y su respuesta frente a oídio y otros patógenos.

El oídio es una enfermedad causada por hongos que afecta a distintas especies de plantas cultivadas en el mundo, originando enormes pérdidas económicas. Se manifiesta mediante la formación de esporas y un micelio en la superficie de frutos y hojas que tiene un aspecto de “polvo” blanco (Peries, 2008). Esta enfermedad causada por hongos erisifáceos con un gran número de especies distintas (900 aprox) que afectan a diversas especies de plantas y árboles alrededor del mundo (Heluta *et al.*, 2013). La acción de los genes “Mildew Locus O” (*MLO*), condiciona la respuesta de la susceptibilidad que tienen las plantas a dicha enfermedad (Consonni *et al.*, 2006). De manera que esto ha hecho que surja la necesidad de crear genotipos en los que se incluya una mutación de pérdida de función para poder conseguir especies que sean resistentes al oídio.

El genoma de Arabidopsis contiene quince genes *MLO* con homología de secuencia significativa con los genes *MLO* de cebada (Gruner *et al.*, 2018). Entre los diferentes alelos de Arabidopsis *MLO*, la pérdida de función del mutante EMS, *mlo2*, confiere resistencia parcial a especies de oídio. La resistencia completa que restringe el desarrollo de hongos en la entrada de la célula huésped se observa cuando los homólogos estrechamente relacionados *MLO6* y *MLO12* están interrumpidos además de *MLO2*. Esto sugiere una redundancia parcial entre estos tres homólogos de Arabidopsis en la mediación de la susceptibilidad a los mildew, con un papel predominante para *MLO2*. El vínculo de *MLO* con la susceptibilidad a los hongos pulvulentos y el endurecimiento de la pared celular de las plantas que son mutantes de pérdida de función de *MLO*, sugieren roles negativos para las proteínas *MLO* en la inmunidad de las plantas (Gruner *et al.*, 2018).

Gruner *et al.*, 2018 llevaron a cabo un experimento donde inoculaban plantas de Arabidopsis con *Pseudomonas syringae* para ver la expresión de los genes *MLO*. En dicho estudio observaron que en Arabidopsis, *MLO2* posee un papel importante en la inmunidad de las plantas al actuar como componente esencial de la resistencia sistémica adquirida (SAR) frente a estos patógenos. La expresión del gen *MLO2*, que es promovida por la señal de ácido salicílico (SA) se induce sistémicamente después de una inoculación foliar localizada con la bacteria *P. syringae*. En comparación con las plantas tipo salvaje (Col-0), varias plantas mutantes *mlo2* fueron incapaces de aumentar la SAR al ser inoculadas con *P. syringae*, poniendo de manifiesto que la función de *MLO2* es necesaria para que se establezca SAR.

1.5. COLECCIONES DE MUTANTES EMS EN *Cucurbita pepo*

Las mutaciones son alteraciones heredables y estables que pueden ocurrir de forma natural en la naturaleza o bien pueden ser inducidas. Estas últimas son un recurso y una fuente de germoplasma para programas de mejora vegetal (Cubero, 2003). Por tanto, las mutaciones, inducidas pueden ser tan importantes para la mejora, como las detectadas entre la variabilidad natural.

En las cucurbitáceas hay al menos 5 colecciones de mutantes EMS, una en melón (Dahmani-Mardas *et al.*, 2010), dos en pepino (Boualem *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018) y dos en calabacín (Vicente-Dólera *et al.*, 2014; García *et al.*, 2018). Las dos colecciones de calabacín han sido desarrolladas sobre el mismo fondo genético MUCU16, pero han sido caracterizadas siguiendo una estrategia distinta, mientras que Vicente-Dólera *et al.*, 2014 caracteriza la colección analizando la tasa de mutación en genes discretos, García *et al.*, 2018 analizan la mutación por medio de la resecuenciación completa de dos familias mutantes. En ambos casos obtienen similares tasas de mutación comparables con las de otras especies. La colección de García *et al.*, 2018 tiene una tasa de 1 mutación cada 85 kb en la línea 1 y de una mutación cada 167 kb en la línea dos. Vicente-Dólera *et al.*, 2014 indican una tasa de mutación de 1/133 kb. En *Arabidopsis* la colección de Greene *et al.*, 2003 tenía una tasa de mutación 1/170 kb y 1/295 kb, mientras que en melón la tasa observada es de 1/573 kb (Dahmani-Mardas *et al.*, 2010). En base a estos datos de ambas colecciones se consideran de interés para el estudio de nuevos mutantes.

La colección de Vicente-Dolera *et al.*, 2014 de 950 líneas M2 fue generada al 1% y evaluada por TILLING. Se detectaron 13 mutaciones con impacto en la proteína del total de 5 genes seleccionados. La correlación genotipo/fenotipo se estudió en un gen que codifica para la enzima Peroxidasa, y se observó un efecto en la pigmentación de la planta, que era albina.

García *et al.*, 2018 desarrollaron una nueva plataforma de mutantes EMS de 3751 líneas, con concentraciones menores (alrededor de 1000 líneas se obtuvieron con una concentración del 0,2% y el resto derivan de un tratamiento EMS 0,3%). Esta colección se ha evaluado por medio de una estrategia de genética directa, realizando screenings fenotípicos de las plantas mutantes en semilla y en fase adulta, mediante la insensibilidad a etileno. De esta forma, se han detectado cuatro mutantes de insensibilidad a etileno. De estos cuatro, tres de ellos presentan herencia semidominante (*ein1*, *ein2* y *ein3*) y uno de ellos tiene herencia dominante (*EIN4*). Dos de estos mutantes han sido caracterizados hasta la fecha, el mutante *ein2* corresponde a un cambio en el receptor de etileno *CpETR1a* y la mutación de *ein3* a un cambio en el receptor *CpETR2b*. Ambas mutaciones causan cambio de aminoácido en una posición conservada entre los receptores de etileno en otras especies de plantas (García *et al.*, 2020). El fenotipo de las plantas mutantes observado, además de reducida sensibilidad a etileno, está asociado a cambios en el patrón de expresión sexual de las plantas, pasando de ser monoicas en el tipo salvaje (WT), a presentar un retraso en la aparición de la primera flor pistiladas y conversión de las flores femeninas en bisexuales, más extremo en *ein2*. Además, en condiciones de campo las plantas mutantes presentan más vigor, esto es, mayor altura de la planta y entrenudos más largos (García *et al.*, 2020).

1.6. ETILENO EN RESISTENCIA A ESTRESSES BIÓTICOS

El etileno es una hormona que está implicada en múltiples procesos del desarrollo de las plantas, entre ellos la maduración de los frutos, considerándose la hormona de la maduración, y la senescencia, siendo considerada la hormona de la senescencia en plantas. En las cucurbitáceas juega un importante papel en la determinación del sexo (Boualem *et al.*, 2008; 2009; 2015; Martínez *et al.*, 2014; Manzano *et al.*, 2016; García *et al.*, 2020). En *C. pepo*, este papel en la determinación del sexo se ha visto asociado a otras características como el desarrollo partenocárpico de los frutos (Martínez *et al.*, 2013; 2014) y un mayor vigor de las plantas (García *et al.*, 2020). Hasta el momento, en la especie *C. pepo* no se ha estudiado el papel del etileno frente a estreses bióticos y abióticos, pero este rol ha sido analizado en otras especies como *Arabidopsis* (Knoester *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2004) o tabaco (Liu *et al.*, 2004).

Esta hormona es sintetizada a partir de metionina dando lugar a SAM (S-adenosilmetionina). Este compuesto, a través de la ACC sintasa forma ACC y este a su vez se transforma en etileno a través de la enzima ACC oxidasa (Bapat *et al.*, 2010).

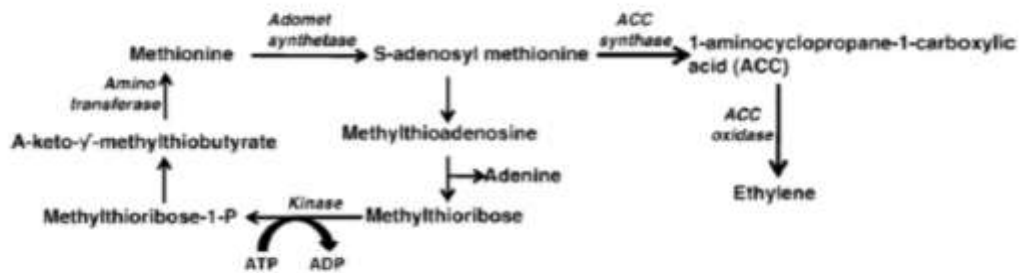


Figura 7. Ruta de biosíntesis de etileno. Fuente: V.A. Bapat *et al.*, 2010

Una vez producido, el etileno debe ser percibido y la señal transmitida hasta desencadenar una respuesta. De manera que interrupción de la señal aguas debajo de la producción puede causar un efecto en el fenotipo. Los primeros estudios con mutantes de etileno con alteración en la ruta de percepción se detectaron por medio de la triple respuesta que se caracteriza por: geotropismo transversal, inhibición de la elongación de hipocotilo y raíces y engrosamiento del hipocotilo. Esto permitió identificar los genes que controlan los receptores de etileno en *Arabidopsis thaliana* y sus respectivas mutaciones, siendo los receptores: ETHYLENE RECEPTORS 1 Y 2 (*ETR1*, *ETR2*), ETHYLENE INSENSITIVE 4 (*EIN4*) Y ETHYLENE RESPONSE SENSORS 1 Y 2 (*ERS1*, *ERS2*) (Arora, 2005).

Además de los genes de percepción se han identificado distintos factores de transcripción de la familia *Ethylene Response Factor* (*ETR*) que responden a etileno. Se ha identificado un elemento sensible al etileno, caja GCC (AGCCGCC), que se encuentra en la región promotora de los genes de defensa inducidos por etileno. La caja GCC se encuentra en la región 5' aguas arriba de la región inducible de los genes de defensa inducidos por etileno (Ohme-Takagi *et al.*, 2000).

Distintas mutaciones en miembros de la ruta de percepción y respuesta han sido descritos asociados a resistencias e incremento de susceptibilidad a distintos patógenos, indicando que el papel del etileno puede ser protector o promotor de la enfermedad (Knoester *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2004). El etileno, junto a el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) interviene en la respuesta a estreses bióticos (patógenos/insectos) (Bari y Jones *et al.*, 2009; Glazebrook *et al.*, 2005), y se ha observado que esta interacción puede ser antagónica, con el SA, o sinérgica con JA, cuya ruta converge con el etileno los *ERF* (Lorenzo *et al.*, 2003).

El etileno es fundamental en la respuesta de resistencia ante la infección por hongos. Sin embargo, hay diferentes respuestas en función del patógeno y el momento de aplicación. Así, tiene un papel principal en el crecimiento de hongos endofíticos como se observa en *Atractylodes lancea*. El hongo endofítico *Gilmaniella sp.* induce la síntesis de etileno en *A. lancea* y provoca la acumulación de sesquiterpenos que interactúan con otras hormonas vegetales como el ácido jasmónico y el ácido salicílico (Yuan *et al.*, 2019). Por el contrario, en el caso de las semillas de *Arabidopsis thaliana*, la inoculación con ACC 1mM mejora la resistencia a *P. syringae* (Leendert van Loon *et al.*, 2006). Aunque el etileno no se ha citado como una hormona esencial en la resistencia contra virus, estudios en distintas especies indican que podría jugar un papel importante, tanto a nivel de percepción y respuesta (Knoester *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2004), como a nivel de síntesis, ya que la aplicación de ACC es capaz de incrementar la acumulación de TMV en plantas de tabaco, incrementando la susceptibilidad y sugiriendo que el etileno es necesario para la infección por el virus (Chen *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Este TFG ha sido elaborado con el objetivo general de comprobar si la mutación *ein3*, de insensibilidad a etileno, tiene efecto en la tolerancia a estreses bióticos, como la infección por el virus de Nueva Delhi. Para poder comprobarlo, se han abordado unos objetivos específicos entre los que se encuentran:

1. Puesto que el virus de Nueva Delhi afecta al crecimiento de las plantas, estudiar el vigor entre las plantas mutantes *ein3* y WT no inoculadas (controles) en nuestras condiciones de estudio y determinar las posibles diferencias en su crecimiento.
2. Evaluar el efecto de la mutación *ein3* frente al virus ToLCNDV, mediante la evaluación de la sintomatología según una escala de síntomas visual en las plantas, tratadas y plantas control, hasta 30 días después de la inoculación mecánica.
3. Estudiar el efecto de la inoculación del virus ToLCNDV en el crecimiento de las plantas mutantes *ein3* y WT. Y analizar la correlación entre parámetros del crecimiento, como el número de hojas verdes (HV) y la severidad.
4. Determinación mediante la técnica qPCR de la carga viral en plantas mutantes y WT inoculadas, y comprobación de la relación entre severidad y carga viral.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal usado en este trabajo procede de una colección de mutantes Etilmetanosulfonato (EMS) de *Cucurbita pepo* desarrollada por el grupo de investigación “Genética de Hortícolas” de la Universidad de Almería. Esta colección de mutantes se generó sobre el fondo genético MUC-16 y está formada por 3.750 líneas mutantes en la generación M2 (Figura 8).

La primera caracterización de esta colección se realizó a través de una estrategia de genética directa buscando mutantes insensibles a etileno. Plántulas de todas las familias de la colección de mutantes fueron expuestas a concentraciones de etileno con el objetivo de observar la triple respuesta. La ausencia de triple respuesta indicaba mutación. De esta manera se llegaron a identificar cuatro familias con esta insensibilidad que se denominan *ein1*, *ein2*, *ein3* y *EIN4*.

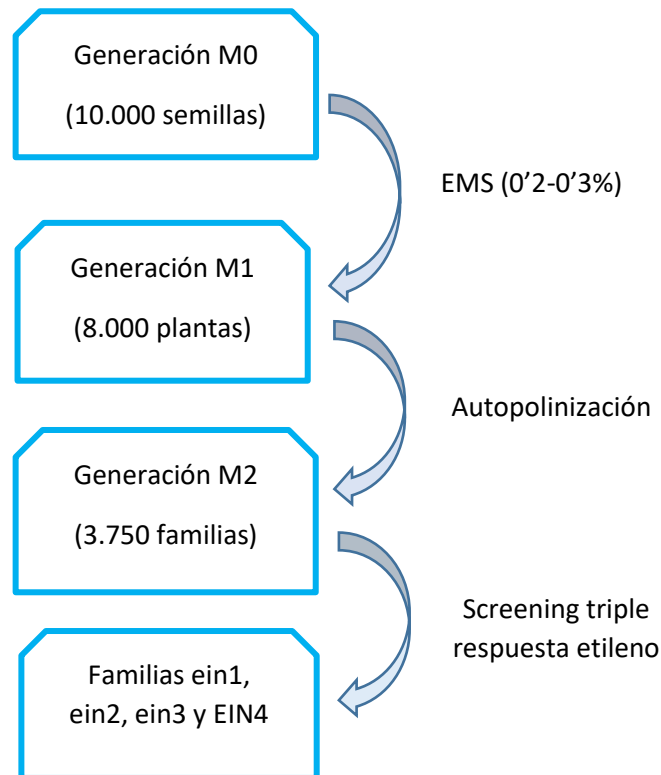


Figura 8. Proceso de obtención de semillas insensibles a etileno mediante EMS y autopolinización a partir de una generación M0 formada por 10.000 semillas. Fuente: elaboración propia en base a García *et al.*, 2018.

En la actualidad se conoce la mutación responsable del fenotipo *ein3*, localizada en la secuencia de un gen que codifica para un receptor de membrana, *CpETR2*. Usando el marcador molecular diseñado a tal efecto se pueden separar las plantas de la familia por su genotipo. En este TFG se emplea la semilla del mutante de insensibilidad a etileno, de genotipo *ein3* (*ein3/ein3*), y la semilla WT (*wt/wt*) para estudiar el efecto de esta insensibilidad en respuesta a virus ToLCNDV.

3.2. CONDICIONES Y MANEJO DEL CULTIVO

Las semillas fueron sembradas de manera manual en una bandeja de 96 alveolos donde se llevó a cabo la germinación y, posteriormente, fueron trasplantadas en maceteros de 10'5 x 9 centímetros con mezcla de sustrato para semillero y fibra de coco (50%-50%). Para el sustrato de semillero no se conoce su formulación.

La germinación y crecimiento de las plantas se llevó a cabo en una cámara en condiciones controladas, para favorecer el crecimiento de las plantas y además evitar la entrada de fitopatógenos ajenos al ensayo. Las condiciones día/ noche con 14 y 10 horas, respectivamente, fueron las siguientes: la temperatura oscilaba a lo largo del día, durante el día tenía una temperatura de 25°C y por la noche la temperatura decaía a los 19°C. La humedad también variaba a lo largo del día, siendo 66% HR en el día y 60% HR a la noche.

Se hicieron dos réplicas temporales para aumentar el número de plantas evaluadas, siendo cada planta una réplica. Cada una de las cuales estaba formada por semilla WT y semilla mutante, inoculadas con virus y control. La primera réplica estaba formada por 12 semillas WT inoculadas, 12 WT control, 7 *ein3* inoculadas y 7 *ein3* control. En cambio, la segunda estaba formada por 8 semillas WT inoculadas, 8 WT control, 10 *ein3* inoculadas y 10 *ein3* control. Finalmente, las dos réplicas fueron tratadas como una sola de manera que se agruparon los cuatro tipos de plantas.

3.3. FUENTE DE INÓCULO Y MÉTODO DE INOCULACIÓN

La inoculación de las plantas se realizó al inicio de la tercera hora verdadera, se trataron la primera hoja verdadera y un cotiledón según el método de López *et al.*, 2015. Se preparó un tampón de inoculación, compuesto por 1g de Polivinilpirrolidona (PVP) 10 al 1%, 1g de polietilenglicol al 1%, 13µL de 2-mercaptoetanol 10mM, 1g de carbón activo al 1% y por último 5mL de buffer fosfato, en un volumen final de 100mL. Este tampón se mantiene en frigorífico hasta su uso.

El inóculo estaba congelado, se prepara mezclando en un mortero 1g de inóculo de ToLCNDV con 1mL del tampón previamente preparado y macerando. Una vez macerado se añaden 3mL más de tampón y mientras se logra la mezcla de las hojas de tejido infectado con el tampón, para alcanzar una proporción 1:4 (p:v). Finalmente, con un bastoncillo, lo aplicamos sobre una de las hojas y uno de los cotiledones, habiendo echado previamente carborundum favorecer la formación de heridas que permitan la introducción del virus.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS PARA EL DESARROLLO Y PARA LA SUSCEPTIBILIDAD A ToLCNDV

3.4.1. Evaluación de la tolerancia a ToLCNDV

Se evaluaron parámetros del crecimiento de las plantas y de los síntomas desarrollados durante el ensayo a los 6, 14, 20 y 30 días después de la inoculación (dpi).

El crecimiento fue medido durante el ensayo y al final de este, por medio de:






- Número de hojas totales a 6, 14, 20 y 30 dpi.
- Peso fresco de la parte aérea y radicular a los 74 días después de la inoculación.
- Número de hojas senescentes a los 6, 14, 20 y 30 dpi.

Cada recogida de muestra suponía realizar un conteo del número total de hojas, número de hojas senescentes, severidad y un análisis de la evolución de los síntomas esperados.

A los 30dpi, además de analizar lo anteriormente descrito, se realizó un estudio de la biomasa de la parte aérea y parte radical para ver si había diferencias entre WT y mutante e inoculadas y sin inocular.

Durante el ensayo se evaluaron los síntomas individuales desarrollados por cada planta según una escala de síntomas visuales establecida por López et al (2015), recogida en la tabla 2.

Tabla 2. Escala de severidades para la medida de síntomas en respuesta a ToLCNDV.

Puntuación	Descripción	Ilustración
Severidad 0	Ausencia de síntomas	
Severidad 1	Síntomas leves (suave amarillo y abullonamiento ligero)	
Severidad 2	Síntomas moderados (mayor amarillo, arrugamiento y aparición de mosaicismo).	
Severidad 3	Síntomas severos (alto mosaicismo, clorosis elevada).	
Severidad 4	Síntomas muy severos (mosaicismo elevado, clorosis, elevado abullonamiento, arrugamiento elevado).	

3.5. RECOGIDA DE MUESTRA

Se recogieron muestras de cada planta individualizada de los dos genotipos, *ein3* y WT, y tratamiento, inoculadas con ToLCNDV y control. La recogida de muestra se planificó para poder cuantificar la acumulación viral en el periodo del estudio. Los días de evaluación, 6dpi, 14dpi, 20dpi y 30dpi se recogieron muestras de todas las plantas.

3.6. EXTRACCIÓN DE ADN

De cada una de las plantas, se recogió muestra y se guardaron en tubos eppendorf de 2mL que se almacenaron a -80°C hasta el uso de estas. El ADN fue extraído siguiendo este protocolo:

1. Añadir 750µL de tampón CTAB, previamente calentado a 65 (añadir 1'5 µL β-mercaptoetanol en el momento de usar)
2. Añadir 2 bolas de acero inoxidable y triturar en un procesador de tejido durante 10-20 segundos a 1250 strokes/min.
3. Incubar los tubos a 65 grados durante 40 minutos, agitar a mitad con vórtex e invertir los tubos 2-3 veces durante la incubación.
4. Spin y añadir 750 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) bajo la campana y usando guantes. Agitar cuidadosamente.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente. Si la fase superior es limpia continuar, si está turbia recoger la fase superior y repetir el paso con cloroformo: alcohol isoamílico.
6. Transferir la fase superior acuosa (sin tocar la interfase) a un tubo nuevo y añadirle con cuidado 700µL a -20 grados y mezclar suavemente invirtiendo los tubos hasta que precipite el ADN. Incubar a -20 grados desde 15 minutos hasta 24 horas.
7. Centrifugar los tubos a 13000rpm y temperatura ambiente durante 20 minutos.
8. Eliminar sobrenadante por inversión y añadir 600µL de Tampón de lavado. Agitar con vórtex.
9. Centrifugar a 13000rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Si el pellet está sucio, repetir los pasos 8 y 9.
10. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el ADN invirtiendo los tubos sobre papel absorbente durante 2-3 minutos y luego dejar al aire boca arriba durante 10 minutos.
11. Añadir 30µL de TE con 0'2µL de RNAsa a 10mg/mL.
12. Incubar a 37 grados en agitación 30-60 minutos.

Para ver la integridad y calidad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% tampón TBE 1X (Tris 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 1mM). Por otro lado, para medir la concentración de ADN, a partir de 2 µL del volumen total de la muestra se hizo una cuantificación de este en un espectrofotómetro (Nanodrop).

3.7. MEDIDA DE LA ACUMULACIÓN VIRAL DURANTE EL ENSAYO

Para ver la acumulación viral se realizó una qPCR con el ADN extraído de cada planta. Las amplificaciones se realizaron haciendo uso de dos cebadores para ToLA y dos cebadores para un gen constitutivo (Figura 10).

Name	Nucleotide sequence (5'→3')	Position	Amplicon Size (bp)
ToLAFW	CATTATTGCACGAATTTCCG	128–148	110
ToLAREV	ATCGTAGCCGACTGTGTCTG	218-238	---
cpEF1AFW	GCTTGGGTGCTCGACAAACT	976-996	67
cpEF1AREV	TCCACAGAGCAATGTCAATGG	1022-1043	---

Figura 9. Cebadores usados para realizar qPCR. Indicando su posición y tamaño del amplicón que generan.

El mix de reacción contenía 10 µL de iTaq Universal SYBR Green supermix (2×) (BIORAD, Hercules, CA, USA), 1 µM de cada primer, 2 µL de DNA. En un volumen total de 20 µL.

Las condiciones de qPCR fueron incubación a 95°C - 5 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C - 5 s y por último 61°C - 30 s.

Para realizar la cuantificación viral se hizo uso del método 2- $\Delta\Delta C_t$, donde $\Delta\Delta C_t$ es la diferencia entre el ΔC_t de cada muestra y el ΔC_t del gen constitutivo.

Este apartado forma parte del capítulo resultados esperados.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si había diferencias significativas en los parámetros evaluados a lo largo del ensayo, vigor, severidad y biomasa aérea/radicular, se estudió la normalidad de los datos. En caso de observarse normalidad se hizo un análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$), en caso de existir diferencias entre las medias, se procedió a una comparación de grupos mediante un test de mínimas diferencias de Fisher (LSD). En caso de ausencia de normalidad se empleó un método no paramétrico para estudiar las diferencias, la prueba de Kruskal-Wallis. El programa estadístico empleado fue StatGraphics Centurium XVI.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DEL VIRGOR EN EL MUTANTE *ein3* Y EN LAS PLANTAS WT

La evaluación en campo del mutante *ein3* indica que ciertos parámetros del crecimiento pueden cambiar respecto al tipo salvaje (WT). A la vez que uno de los síntomas de la infección por ToLCNDV es la reducción del crecimiento. Por esta razón, en primer lugar, se ha estudiado el vigor de las plantas control, tanto WT como mutantes *ein3*, para ver si se observan diferencias. Como medida evaluó el número de hojas totales (HT) que presentaban ambos tipos de plantas a distintos tiempos (6, 14, 20 y 30 días después del inicio del ensayo). El tiempo de inicio del ensayo se considera el momento de la inoculación de las plantas tratadas, cuando estas tenían una hoja verdadera desarrollada (2-3 cm de longitud de limbo). Además, se midió el peso fresco de la planta (parte aérea) y raíz al final del ensayo (75 días).

El análisis del número de hojas reveló que a 6 y 14 días después del inicio del ensayo no existían diferencias en el número de hojas totales producidas por las plantas WT y mutantes *ein3*. Sin embargo, a partir de 20 y 30 días después del inicio del ensayo, sí se observaron diferencias, las plantas WT superaron en número de hojas a las plantas *ein3*, indicando mayor vigor (Figura 10 a).

Además del número de hojas a lo largo del tiempo, se anotó el peso fresco al final del ensayo, también como parámetro relacionado con el vigor de las plantas. En la figura 10 b se presentan los resultados de comparativas de peso fresco de parte aérea y radicular en plantas control WT y mutantes *ein3*. El WT tiene mayor peso fresco de la parte aérea y de la parte radicular que el mutante.

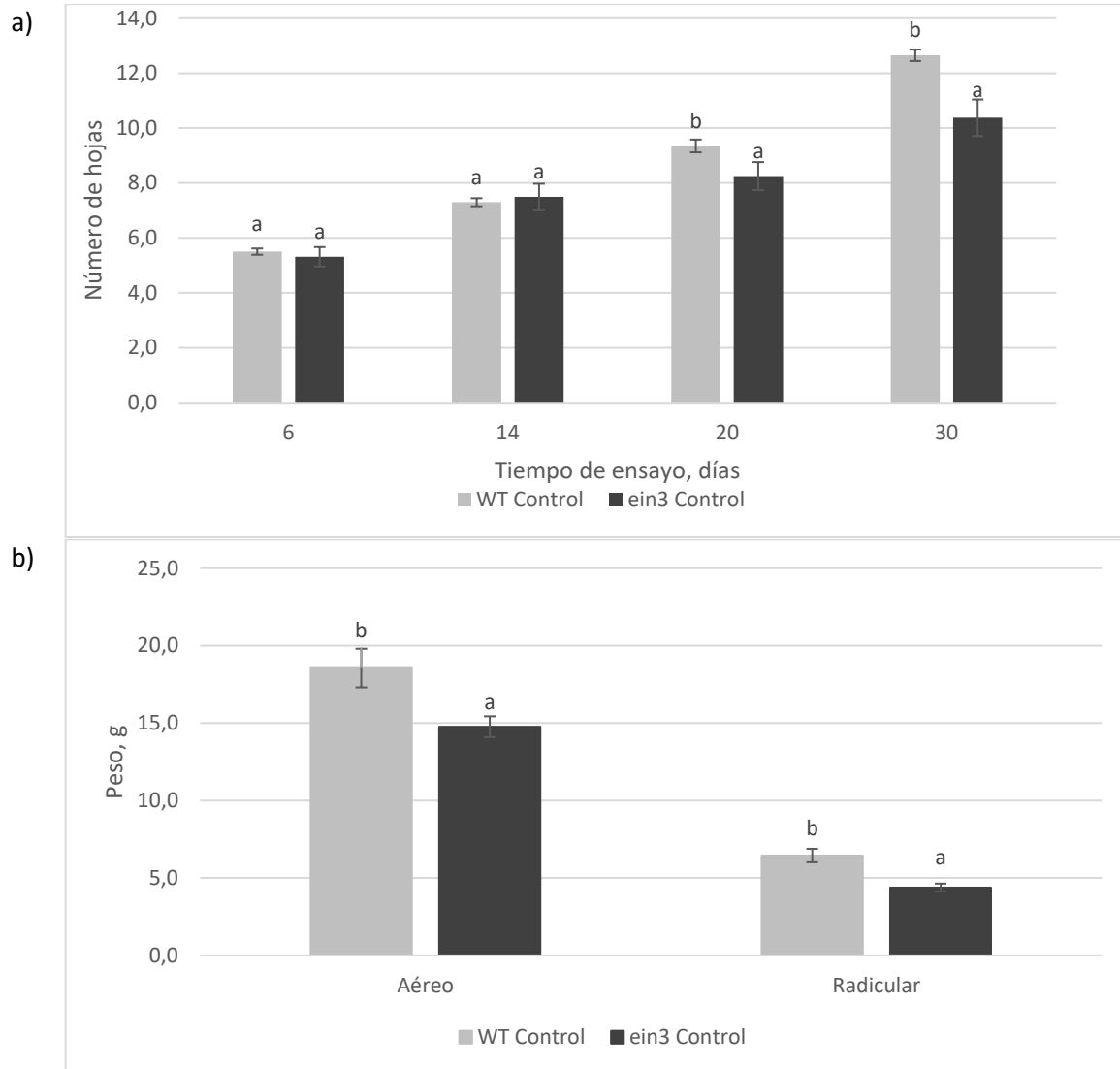


Figura 10. Parámetros de crecimiento medidos en las plantas control de los genotipos WT y mutante *ein3*. a) Número de hojas totales en plantas mutantes y WT (tipo salvaje) a los 6, 14, 20 y 30 días después del inicio del ensayo. Se representa el promedio del número de hojas totales (HT) desarrolladas en ambos grupos de plantas sin inocular (plantas control). b) Peso de las plantas control medido al final del ensayo (30 dpi). Se presentan los resultados del peso de la parte aérea de la planta y de la parte radicular. El análisis estadístico ha sido realizado entre WT y mutante para cada día (a) o parte de la planta (b) usando el test LSD que permite agrupar las medias por sus diferencias. Letras distintas simbolizan diferencias entre las medias.

Al final del ensayo las plantas *ein3* resultaron tener menos masa, tanto aérea como radicular. Estos resultados son coherentes con el número de hojas observados al final del ensayo (20 y 30 días) (Figura 10 a). Para ilustrar este resultado, en la figura 11 se muestran fotos del tamaño final de las plantas y de la raíz. Como se observa, al final del ensayo las plantas mutantes presentaban menor número de hojas y éstas tenían mayor grado de amarilleamiento (figura 11 b). El volumen raíces del mutante *ein3* eran menor que el del WT, indicando un peor desarrollo del mutante (Figura 11 c).



Figura 11. Estado de desarrollo de las plantas al final del ensayo. Se observa las diferencias en el desarrollo vegetativo y radicular alcanzado a 30 días del comienzo del ensayo. a) Planta control WT b) Planta control *ein3*. c) Comparación del tamaño y densidad radicular al final del ensayo de las plantas de genotipo WT (izquierda) y *ein3* (derecha).

Uno de los principales síntomas del virus ToLCNDV es la reducción del crecimiento. Este TFG pretende estudiar el efecto de la mutación *ein3* sobre el desarrollo de síntomas en *C. pepo*. La mutación *ein3* fue detectada en una colección de mutantes EMS evaluada para su insensibilidad a etileno (García *et al.*, 2018) y ha sido caracterizada e identificada como una mutación en un receptor de etileno (*ETR*), ha sido denominada *etr2b* por localizarse en el receptor de etileno *CpETR2*. Uno de los fenotipos observados de esta mutación está asociado a la ausencia de triple respuesta. Esto implica que ante un tratamiento con etileno en oscuridad de las plantas mutantes, no se observa el acortamiento del hipocótilo y la radícula y engrosamiento del hipocótilo asociados a la triple respuesta (García *et al.*, 2018; 2020). Entre las características que alteran la mutación se encuentran la determinación sexual, se observa un cambio de plantas monoicas a andromonoicas. Asociado con este cambio un retraso en la apertura de las flores pistiladas y, por último, mayor número de flores masculinas por planta (García *et al.*, 2020). Además, se observan diferencias en algunos parámetros relacionados con el vigor, como cambios en la altura final de la planta y el tamaño de los entrenudos, pero no diferencias en el número de nudos (hojas) entre el WT y el mutante *ein3* (García *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos en nuestras condiciones de ensayo indican que no hay diferencias entre las plantas mutantes *ein3* y WT hasta el final del ensayo (20 y 30 días), cuando el número de hojas del WT es superior al del mutante. Estos resultados son similares a los del peso fresco, y tanto el peso fresco de la parte aérea, como el de la raíz era superior en las plantas WT. El peso de la parte aérea variaba de 18,6 en las plantas WT a 14,8 en el mutante, y el peso de la raíz de 6,4 en el WT a 4,4 en el mutante *ein3*. El ensayo fue realizado en cámara de cultivo y las plantas eran crecidas en maceteros con espacio limitado para el desarrollo de las raíces, lo que puede explicar los resultados obtenidos al final del ensayo. Las raíces tienen varias funciones, como el anclaje, y son el medio para que la planta absorba el agua y los nutrientes necesarios para su supervivencia y crecimiento, por lo que las raíces tienen impacto en el crecimiento y desarrollo general de la planta (McMichael *et al.*, 2010). La limitación del desarrollo de la raíz puede explicar las diferencias observadas en el vigor. En condiciones de campo el crecimiento de las plantas *ein3* es más acelerado que las del WT (García *et al.*, 2020), es de esperar un desarrollo de la raíz más acelerado, y la limitación espacial tenga efecto en el desarrollo aéreo de la planta y el número de hojas producidas.

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MUTACIÓN *ein3* EN LA TOLERANCIA A ToLCNDV

El virus de Nueva Delhi produce una variedad de síntomas en el género *Cucurbita*, como el decaimiento de las hojas, amarilleamiento, mosaico y rizado, y muy característico en *C. pepo* un acortamiento de los entrenudos y reducción del crecimiento (Sáez *et al.*, 2016). Por esta razón se estudió el efecto del virus por medio de una escala de severidad visual (Tabla 2), y una evaluación de parámetros del crecimiento, peso fresco, número de hojas (nudos). Además, se planificó un estudio por qPCR de la carga viral, que no pudo llevarse a cabo finalmente y que se incorpora en el capítulo de resultados esperados.

4.2.1. Evolución de la severidad

La severidad de los síntomas debidos a la infección por ToLCNDV se evaluó tanto en plantas *ein3* como en plantas WT a los 14, 20 y 30 días después de la inoculación (dpi). Para comprobar si había diferencias significativas entre cada grupo de plantas se hizo un análisis estadístico a los 14, 20 y 30 dpi independientemente.

En la figura 12 se muestra la evolución de los síntomas en cada grupo de plantas y podemos ver que, tanto las plantas WT como *ein3* inoculadas mostraron síntomas más severos que las plantas sin inocular (control). Para simular el efecto de la formación de heridas, a las plántulas control se les realizó el mismo tratamiento que a las inoculadas, esto es, se aplicó carbundum de 600 mesh y se extendió con un bastoncillo sumergido en el tampón de inoculación, pero sin carga viral.

Tanto las plantas mutantes, *ein3*, como las WT, inoculadas y control, incrementan progresivamente los síntomas a lo largo del tiempo de evaluación. Estos resultados, que incluyen la reducción de crecimiento y amarilleamiento (Tabla 2), pueden también ser debidos al crecimiento en maceta en la cámara de cultivo.

A los 14 dpi sólo las plantas inoculadas de los dos genotipos presentan síntomas por encima de 1,00 en la escala de severidad. En el tiempo 20 dpi, se diferencian el WT, control e inoculado, de las plantas *ein3*, inoculadas y control, y este último grupo es el que presenta mayor índice de severidad. A los 30 dpi sólo las plantas inoculadas tienen una valoración de síntomas de severidad superior a 2,00

En la comparación de la evaluación de síntomas entre plantas WT y *ein3* control a 30 dpi, no se pudieron observar diferencias de severidad y la puntuación no supero 1,70 (Figura 12). Las plantas inoculadas WT y plantas inoculadas *ein3* muestran una evolución similar, con un incremento progresivo de los síntomas, mayor entre los 20 y los 30 dpi. A los 30 dpi, se observa que el genotipo *ein3* tiene mayor índice de severidad (2,59) que las plantas WT que presentaron un valor medio de 2,10, por lo que, según la valoración visual de síntomas mostraban clorosis y mosaico, las plantas que se vieron más afectadas por la presencia del virus eran las mutantes *ein3* (Figura 12).

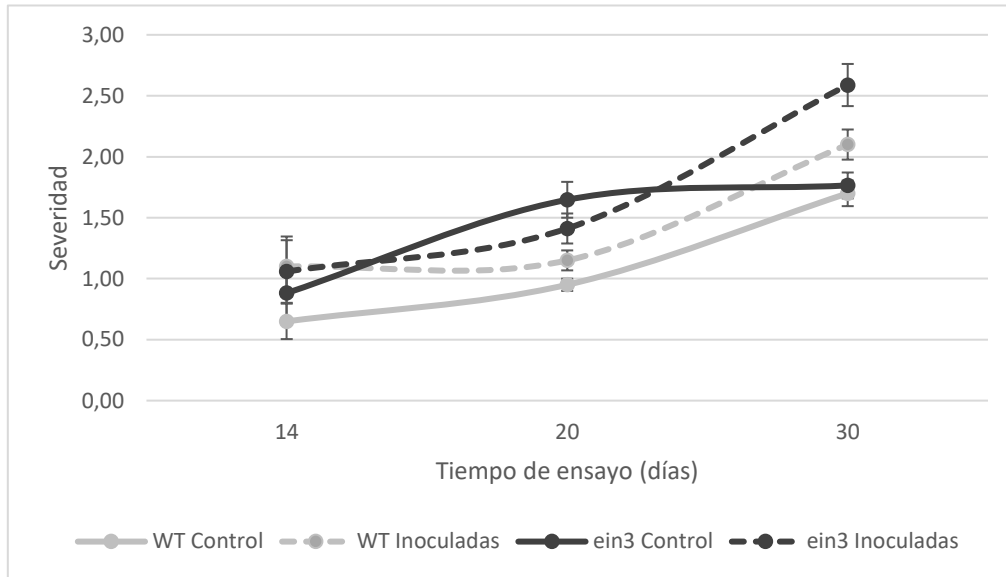


Figura 12. Evolución de la severidad de los síntomas en plantas WT y *ein3* a los 14, 20 y 30 días después de la inoculación mecánica con el virus ToLCNDV. En la figura se representa el promedio de la severidad obtenida para las plantas WT y *ein3* sin inocular e inoculadas y los errores estándar para las 73 plantas analizadas. El análisis estadístico para cada uno de los días realizado de forma independiente mostró diferencias significativas a 14, 20 y 30 dpi con un p-valor < 0,05.

4.2.2. Evolución del número de hojas en respuesta a la inoculación con ToLCNDV

Se hizo un conteo del número de hojas que presentaban las plantas a distintos tiempos (6, 14, 20 y 30 días después de la inoculación mecánica con ToLCNDV). Los resultados, representados en la figura 13, muestran el incremento progresivo del número de hojas a lo largo del ensayo, en plantas mutantes *ein3* y WT, tanto inoculadas como control.

En las plantas WT se observó, que el número de hojas pasó de las 5 hasta aproximadamente 13 hojas (en plantas control) y hasta las 12 en plantas inoculadas en 24 días (de T6 a T30). Mientras que en las plantas *ein3*, tanto las plantas control, como las inoculadas, también aumentaron el número de hojas. En las plantas control se incrementó de 5 (6 dpi) a 10 (30 dpi) y en las inoculadas de 4,9 (6 dpi) a 10 en 30 dpi (Figura 13).

Si comparamos las plantas inoculadas WT y *ein3*, se observa que existen diferencias entre ellas, al igual que en las plantas control. Confirmando, tal y como se indica en la sección “estudio del vigor en el mutante *ein3* y en plantas WT”, que hay diferencias en el crecimiento de los dos genotipos. No obstante, en ninguno de los días en los que se midió el número de hojas de las plantas, se observa diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas (control) de cada genotipo como consecuencia de la inoculación con ToLCNDV. A los 14 días de ensayo se observó un incremento en el número de hojas de las plantas WT inoculadas respecto a las plantas WT control, pero en el resto de los días (6, 20 y 30) las plantas WT inoculadas tienen, por término medio, un menor número de hojas (si bien no es un cambio significativo). En ninguno de los días analizados hay diferencias en el número de hojas entre las plantas inoculadas y no inoculadas, lo que indica que las diferencias observadas entre plantas inoculadas mutantes y WT son debidas al genotipo y no a la inoculación. Al contrario de lo indicado en

la escala visual de medida de la severidad, el crecimiento evaluado como el número de hojas, no cambia en respuesta a la inoculación con ToLCNDV.

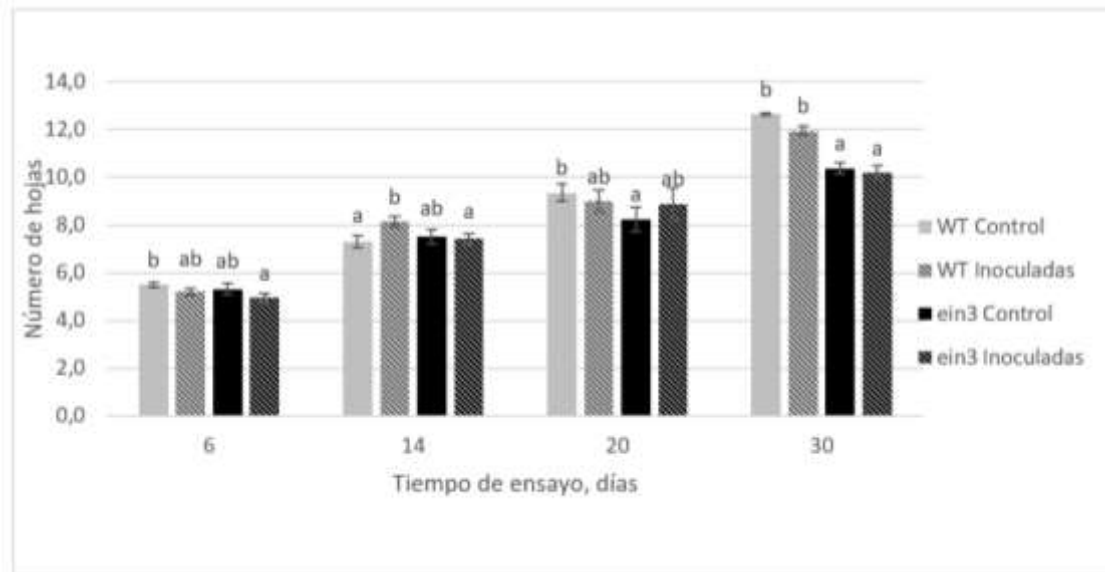


Figura 13. Representación del número de hojas en plantas mutantes *ein3* y WT a los 6, 14, 20 y 30 días después de la inoculación mecánica con ToLCNDV. En la figura se representa el promedio del número de hojas totales presentes en plantas sin inocular e inoculadas para ambos grupos de plantas. Las letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos de plantas. Las comparaciones estadísticas están hechas por días y las letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos de plantas, p-valor<0,05 para cada análisis.

4.2.3. Efecto de la inoculación con ToLCNDV en el peso final de las partes aéreas y radiculares de las plantas WT y mutantes *ein3*

El vigor de la planta puede ser estimado considerando distintos parámetros. Además del número de hojas totales, que no varía entre el mutante *ein3* y el WT en condiciones de estudio en invernadero (García *et al.*, 2018), aunque sí en nuestras condiciones de estudio (Figura 11a), se comprobó el peso de la planta considerando la parte aérea y radicular por separado. Estas diferencias en el peso aéreo y radicular de las plantas se analizaron a los 75 días después de la inoculación mecánica con ToLCNDV.

Para verificar la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas, se realizó un análisis ANOVA donde se comparó el peso aéreo y radicular de forma independiente las plantas de los cuatro tratamientos, plantas *ein3* control e inoculadas y plantas WT, control e inoculadas. Este análisis reveló que la inoculación de ToLCNDV tiene efecto sobre las plantas WT, en el peso radicular (p-valor<0'05), pero no hay diferencias entre las plantas *ein3* inoculadas y control en ninguno de los dos parámetros (Figura 15).

Las diferencias observadas entre las plantas WT, control e inoculadas, se traducen en una variación de un gramo en el peso fresco (18,5 y 17,5 gramos respectivamente en la parte aérea), e igual se observa para el peso radicular (6,4 en las plantas control y 5,2 en plantas inoculadas) (Figura 14).

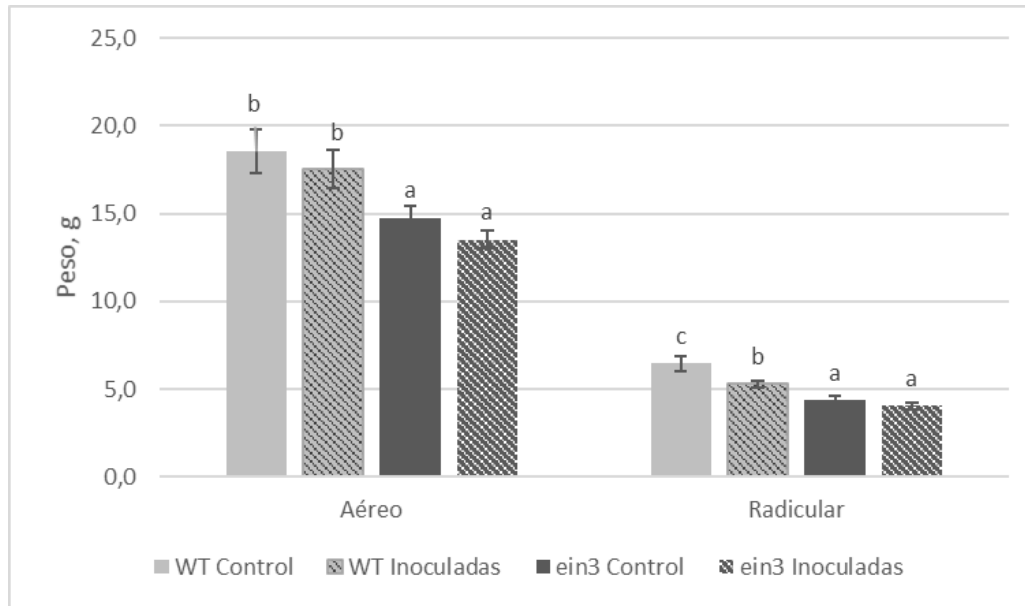


Figura 14. Comparación del peso de la parte aérea (desarrollo vegetativo) y radicular para cada grupo de plantas. Diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas entre el peso aéreo (un p-valor = 0'000249) y radicular (p-valor = 5'47·10⁻⁷) de cada grupo de plantas de forma independiente.

El programa de desarrollo vegetativo de una planta, con dos partes en crecimiento, meristemo apical y radicular, requiere de un balance raíz/parte aérea que maximiza la fotosíntesis neta diaria para una biomasa total dada (Iwasa y Roughgarden, 1984). La proporción de biomasa de raíces y parte aérea aumenta cuando la disponibilidad de nutrientes o agua en el suelo es baja, pero disminuye cuando la luz es deficiente (Chapin, 1980). Es decir, puede variar en base a estímulos externos. La inoculación con el virus afecta al peso fresco de los órganos de la planta, en particular se reduce el peso fresco de la raíz en las plantas WT. Además de analizar las diferencias en la producción de biomasa de cada genotipo y tratamiento, se estudió la relación entre el peso de la raíz y la parte aérea. El objetivo es analizar si la inoculación con ToLCNDV podía alterar este balance del que depende el correcto desarrollo de la planta. El peso de la raíz equivale a un 35 % el peso de la parte aérea de la planta en el WT, pero sólo el 30% en el genotipo *ein3* (Tabla 3, controles). La inoculación con el virus de Nueva Delhi (ToLCNDV) tiene impacto en esta relación en las plantas WT, y la relación se reduce un 4%. Por el contrario, en el mutante *ein3* no hay diferencias en la relación entre el control y las plantas inoculadas.

Tabla 3. Estudio de la relación entre el peso fresco de la raíz/parte aérea.

Genotipo	Tratamiento	Media ± ES ¹
WT	Control	0,35 ± 0,0370 b
	Inoculadas	0,31 ± 0,0368 a
<i>ein3</i>	Control	0,31± 0,0358 ab
	Inoculadas	0,31 ± 0,0257 a

¹Distintas letras indican diferencias significativas entre las medias (P<0,05).

Estos resultados están en la línea de los observados al medir el peso fresco, y confirman que la inoculación con el virus de Nueva Delhi cambia el crecimiento de las raíces y el balance raíz/parte aérea sólo de las plantas WT.

4.2.4. Estudio de la correlación entre el crecimiento y la severidad de síntomas a ToLCNDV

Además de estudiar el vigor, medido como el número de nudos producidos (o hojas totales), se anotó el número de hojas verdes. Uno de los síntomas que provoca el virus de Nueva Delhi es el amarilleamiento foliar, este parámetro puede ser indicativo de la severidad de la enfermedad y es de utilidad para contrastar los resultados obtenidos en la severidad medida con escala visual. Para ello examinamos la correlación entre la relación entre hojas verdes y hojas totales (HV/HT) y la severidad de síntomas mostrada por las plantas. Esta evaluación se hizo a los 30 días de la inoculación con el virus en ambos grupos de plantas (WT y *ein3*). En la figura 15 se muestran los resultados para los cuatro grupos de plantas estudiados, (a) WT control, (b) WT inoculadas, (c) *ein3* control y (d) *ein3* inoculadas.

Los resultados muestran que en las plantas WT inoculadas con el virus existe correlación negativa, esto es conforme aumenta la severidad, disminuye la relación HV/HT ($R^2 = 0,46$), demostrando que a medida que aumentaba el valor de severidad disminuía el número de hojas fotosintéticas (Figura 15 b). Sin embargo, no se encuentra correlación en los controles, de las plantas WT ($R^2 = 0,01$) y *ein3* ($R^2 = 0,005$) (Figura 15 a y c), ni en las plantas *ein3* inoculadas ($R^2 = 0,01$) (Figura 15 d). A pesar del mayor índice de severidad en las plantas *ein3* inoculadas observado a los 30 días del inicio del ensayo (Figura 12), no hay correlación, para este grupo de plantas, con la relación HV/HT, y lo mismo se observa para las plantas control, WT y *ein3*. Por el contrario, sí existe correlación entre la valoración de síntomas en las plantas WT inoculadas y la relación HV/HT. Estos resultados pueden deberse al tipo de valoración realizada con la escala visual, de más complejidad, por englobar distintos parámetros en la evaluación simultáneamente que pueden llevar a error. La evaluación considerando el número de hojas verdes respecto del total es más sencilla y posiblemente más acertada, ya que es coherente con los resultados obtenidos de reducción del peso fresco. La valoración mediante escala visual es importante por ser rápida y dar una visión general, pero requiere de entrenamiento y debe apoyada por otros parámetros de evaluación, como la medida de la acumulación viral de ToLCNDV por qPCR.

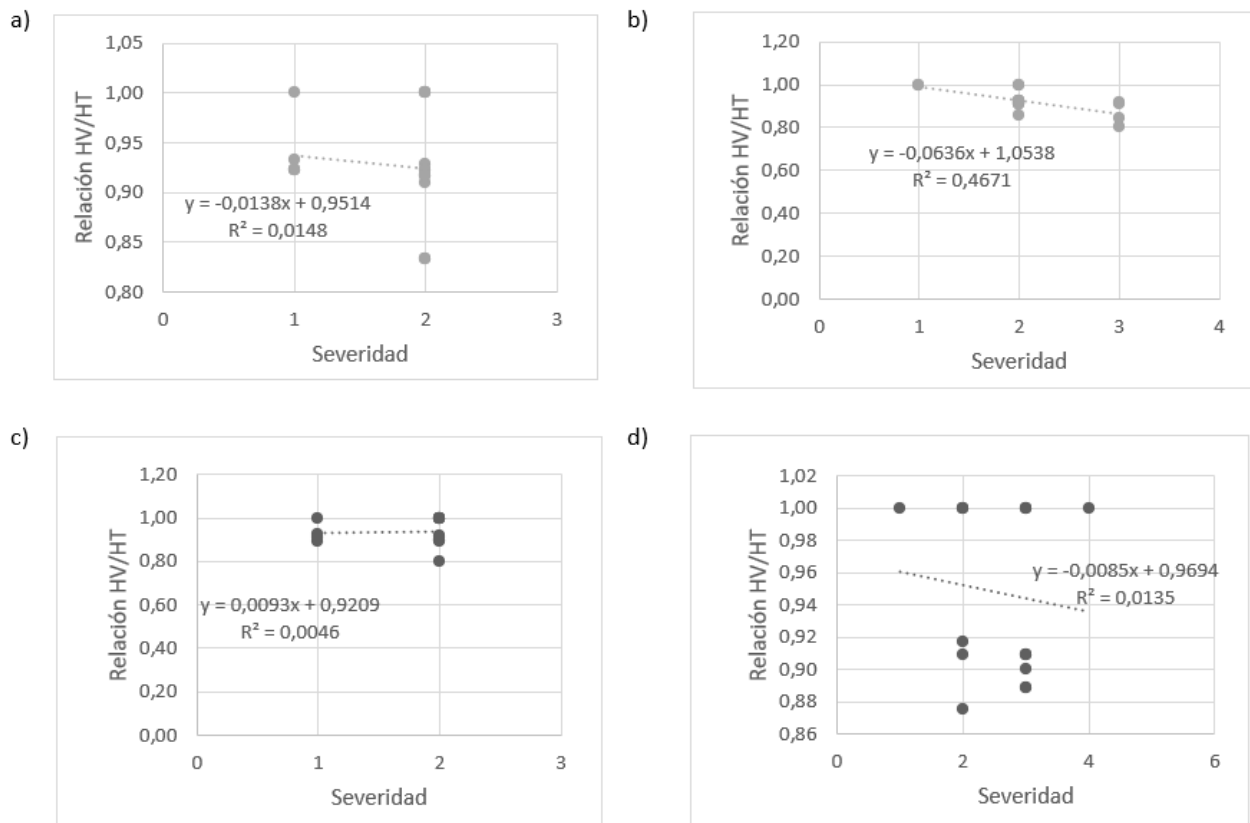


Figura 15. Correlación entre la relación HV/HT y severidad medidas 30 días después de la inoculación en cada grupo de plantas. a) WT control b) WT inoculadas c) *ein3* control d) *ein3* inoculadas.

Los receptores de etileno, *CpETR1a* y *CpETR2b*, homólogos a los receptores *ETR1* y *ETR2* en *Arabidopsis thaliana*, controlan la determinación del sexo de las plantas de calabacín (*C. pepo*) y el vigor. Hasta la fecha se han descrito dos mutaciones en estos genes, la mutación *etr1a* se localizó en el nucleótido del primer exón del gen *CpETR1a*, y la mutación *etr2b* se localizó en la posición del nucleótido 1018 del primer exón del gen *CpETR2b*. Ambas mutaciones, que corresponden a los mutantes *ein2* y *ein3* de *C. pepo*, respectivamente, confieren insensibilidad a etileno (García *et al.*, 2018; García *et al.*, 2020) En este TFG se analiza el impacto de la mutación *etr2b* que nosotros denominamos *ein3* sobre la tolerancia al virus ToLCNDV. El análisis de la insensibilidad a etileno de los dos mutantes y sus dobles mutantes indica que las plantas *ein3* tienen un fenotipo de insensibilidad alto (63,7%, calculado en base a su falta de respuesta durante la triple respuesta) (García *et al.*, 2020) y por tanto tienen una respuesta a etileno alterada, por lo que pueden causar cambio de fenotipo en procesos del desarrollo de las plantas afectados por etileno.

El *ein3* presenta una mayor tasa de crecimiento y altura de las plantas en comparación con las plantas WT, y este aumento de crecimiento se debe principalmente a un aumento de la longitud de los entrenudos (García *et al.*, 2020). Sin embargo, en nuestro caso se observa lo contrario. Los controles *ein3* muestran un crecimiento menor que los controles WT, lo que puede ser explicado en base a que las plantas fueron crecidas en maceteros, con espacio para el desarrollo de las raíces limitado, de

manera que aunque al inicio del ensayo no hay diferencias entre WT y el mutante, el crecimiento se ve afectado a lo largo del ensayo, ya que el papel principal de las raíces es la absorción de agua y nutrientes. En nuestro caso, es al final del ensayo (a partir de los 20 días) cuando las plantas WT son más vigorosas que las mutantes. Estos resultados contrastan con los de García *et al.*, 2020 probablemente por tratarse de un experimento en campo, de manera que esto pone de manifiesto que los resultados que hemos obtenido se deben al lugar y condiciones donde han sido crecidas las plantas.

En este TFG se aborda también el efecto del virus ToLCNDV sobre las plántulas. La inoculación se realizó cuando estas desarrollaron su tercera hoja, y se inocularon una hoja y un cotiledón. Al analizar los resultados de la inoculación, por medio de una escala visual de severidad, observamos que, pasados 30 días de la inoculación, las plantas mutantes *ein3/ein3* mostraban síntomas más severos que las plantas *wt/wt*, siendo dichos síntomas, menor crecimiento aéreo, amarilleamiento, rugosidades y mosaicos más acentuados. Durante los primeros días de la inoculación no se observaron diferencias entre las plantas inoculadas de ambos genotipos. Además de medir la severidad mediante una escala visual, se realizaron otras medidas como el número de hojas totales (HT) que las plantas producían, el número de hojas verdes (HV) y, al final del ensayo, medidas del peso fresco de la parte aérea de la planta y de las raíces. No se observa efecto de la inoculación sobre el número de hojas totales, ni en plantas WT, ni en plantas mutantes. Sin embargo, el peso fresco de las raíces es menor en las plantas WT inoculadas que en las plantas WT control, pero no hay diferencias debidas a la inoculación en el mutante. A pesar de observar variación en el peso fresco de la parte aérea y raíz entre los otros tratamientos, no hay diferencias significativas. Este resultado se refleja en la relación peso fresco raíz/peso fresco parte aérea, y mientras que el balance permanece constante entre las plantas mutantes *ein3*, inoculadas y control, la relación se reduce en las plantas WT debido a la inoculación. Puesto que la severidad indicaba lo contrario, evaluamos la correlación entre la relación HV/HT y la severidad, y encontramos que no hay correlación entre la valoración de la severidad y la relación HV/HT en las plantas inoculadas *ein3*. En base a estos resultados consideramos que los síntomas de la medidos con la escala de severidad no son debidos a la inoculación mecánica con ToLCNDV. La escala de evaluación de síntomas a ToLCNDV ha sido empleada con éxito en distintas especies de las cucurbitáceas, entre ellas *C. moschata*, *C. maxima* y *C. pepo*, observando variedad de síndromes y un incremento de los mismos con el paso del tiempo (Sáez *et al.*, 2016; Sáez *et al.*, 2020). Es posible, por tanto, que los síntomas visuales observados en las plantas *ein3* sean debidos a las condiciones de crecimiento y no al propio desarrollo de la enfermedad.

Los virus son organismos biotrofos obligados y, por tanto, la primera línea de defensa establecida viene dada por los genes R, y la ruta del ácido salicílico (Penninckx *et al.*, 1996; Widyasari *et al.*, 2020). No obstante, diferentes trabajos ponen de manifiesto el importante papel del etileno en la respuesta a enfermedades víricas. El virus enano del arroz (RDV) desencadena la producción de etileno al estimular la actividad de la S-adenosil-L-metionina sintetasa (SAMS), incrementando la susceptibilidad al RDV. La proteína del virus Pns11 es capaz de interactuar con OsSAMS1 y promover la producción de etileno. La sobreexpresión de *OsSAMS1*, o la aplicación exógena de etileno, incrementa la susceptibilidad a la infección por el RDV. Por el contrario, los mutantes que bloquean la *OsSAMS1* (knockout), así como el

mutante de la ruta de respuesta a etileno, *Osein2*, son más resistentes a la infección por RDV (Zhao *et al.*, 2017).

A nivel de percepción y respuesta también se han realizado trabajos, así el silenciamiento del represor constitutivo de la respuesta a etileno, *CTR1*, en *Nicotiana benthamiana* desencadena una rápida respuesta hipersensible (Liu *et al.*, 2004). Mientras que la sobreexpresión constitutiva de *NtERF5* (ERF5-Oex) en tabaco se asocia a una mayor resistencia al virus del mosaico del tabaco (TMV). En las plantas ERF5-Oex infectadas por el TMV, el ARN viral se acumula entre un 10 y 30% del nivel de tipo silvestre, por lo que *NtERF5* podría estar implicado en controlar la propagación viral (Fischer y Dröge-Laser, 2004). Los *Ethylene Response Factors*, *ERF*, son una de las familias de factores de transcripción con mayor importancia en plantas y su sobreexpresión se ha asociado a un incremento de la resistencia a patógenos bacterianos, fúngicos y virales.

Los genes *Ethylene Transcription Factor*, *ETR*, también juegan un papel importante en la respuesta a virus. Las plantas transgénicas de tabaco Tetr expresan el mutante *etr1-1* de *Arabidopsis*, que confiere insensibilidad a etileno. Estas plantas, Tetr, muestran sensibilidad a los hongos del suelo *Fusarium* y *Pythium*, así como a otros hongos necrófagos como *Botrytis cinerea*, *Cercospora nicotianae* y la infección bacteriana por *Erwinia carotovora*. En contraste no presentan susceptibilidad ante la infección por hongos biotrofos como *Oidium neolycopersici*, y tampoco frente al virus del mosaico del tabaco (TMV). En *Arabidopsis*, los mutantes de insensibilidad a etileno *etr1-1* y *ein2-1* también se han evaluado frente a un amplio rango de patógenos con similar respuesta, por lo que parecen susceptibles a los patógenos necrófagos, pero no biotrofos (Knoester *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2004).

Estos resultados en tabaco y *Arabidopsis* son coherentes con los observados en este TFG, para el mutante de insensibilidad *ein3*, cuya mutación se localiza en el receptor de etileno *CpETR2b*. Considerando los parámetros de crecimiento medidos (peso fresco de la parte aérea o de la raíz y número de hojas fotosintéticas), la inoculación de un patógeno biotrofo, el ToLCNDV, no afecta a las plantas insensibles a etileno, pero sí a las plantas WT.

5. RESULTADOS ESPERADOS

Para completar este trabajo se planeó realizar una qPCR que nos permitiera cuantificar la carga viral en cada una de nuestras plantas. Para realizarla hicimos dos réplicas metodológicas de acumulación viral por cada planta, de manera que en el mismo ADN hicimos dos qPCR: una para cuantificar el virus y otra para cuantificar el gen de referencia, mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para cada genotipo, mutante *ein3* y WT, y tratamiento, control e inoculadas, se esperaban analizar 73 plantas.

Al ser un virus de ADN, la extracción del mismo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado “Materiales y métodos”. Una vez extraído el ADN, hicimos la qPCR de amplificación de un fragmento del virus y de un gen de referencia del calabacín, normalizando la cantidad de ADN del virus respecto a la amplificación del gen de referencia. Para referenciar la expresión del virus al WT tenemos que ver la expresión que tiene en los controles. Partimos del hecho de que como los controles no deben tener acumulación del virus, y por tanto no debería haber amplificación del gen del virus en estas muestras. En nuestro caso podríamos emplear de control las plantas WT y les asignaríamos un valor de 1, puesto que las plantas mutantes *ein3*, deberían tener menor acumulación viral, el nivel de expresión del virus estaría por debajo de 1. Teniendo esto en cuenta, esperaríamos que, en el caso de los controles, tanto WT como *ein3*, no se observara acumulación viral, confirmando que la inoculación estaba bien hecha. En base a los cambios de fenotipo observados a lo largo del ensayo en el crecimiento de las plantas, debemos tener acumulación viral en *ein3* y WT, pero más en el WT (Figura 16).

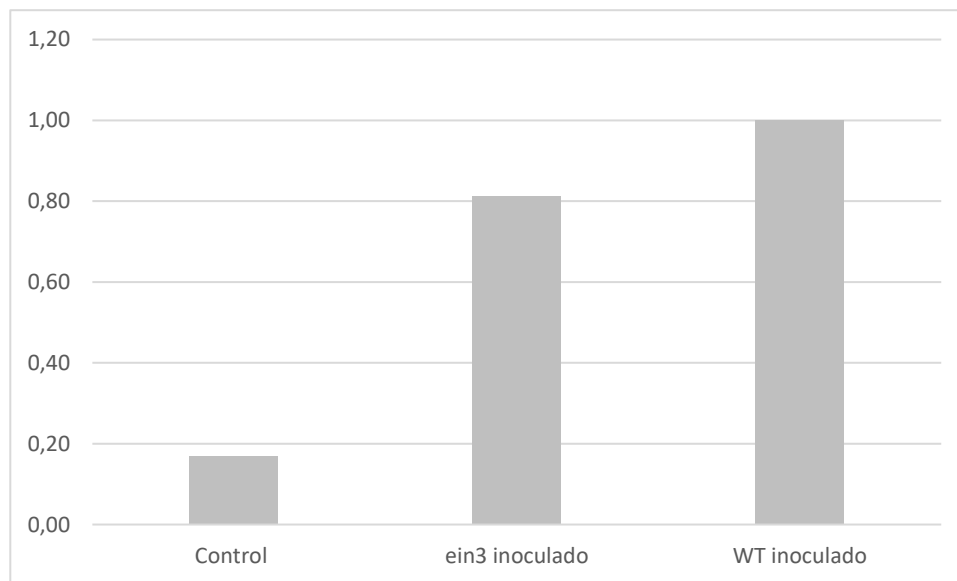


Figura 16. Acumulación viral simulada. Representación de la expresión del virus en las plantas WT y *ein3* inoculadas y control.

6. CONCLUSIONES

PRIMERA. – En nuestras condiciones de estudio las plantas WT control presentan un mayor crecimiento que las mutantes *ein3* control. Este resultado puede ser debido a las condiciones de cultivo en cámara y con un espacio reducido para el desarrollo radicular.

SEGUNDA. – La severidad, medida según una escala visual de síntomas, se ha incrementado a lo largo del tiempo del ensayo y, al final del mismo, es mayor en las plantas inoculadas mutantes *ein3* que en el genotipo WT. Este resultado contrasta con otros parámetros del crecimiento, por lo que sería necesario corroborar con medidas como la acumulación viral.

TERCERA. – Entre los parámetros del crecimiento evaluados, no se observan cambios debidos a la inoculación por ToLCNDV en el número de hojas totales al final del ensayo, ni el peso fresco de la parte aérea. Sin embargo, el virus de Nueva Delhi afectó al crecimiento de las raíces de las plantas WT, pero no al crecimiento de las raíces de los mutantes *ein3*.

CUARTA. – Existe correlación negativa entre la severidad y la relación de hojas verdes/hojas totales en las plantas WT inoculadas, pero no en entre las plantas WT control o entre las plantas *ein3* control o inoculadas. Por lo tanto, la medida de la relación del número de hojas fotosintéticas respecto a las totales puede ser un buen índice contrastante de la severidad medida por medio de una escala visual.

QUINTA. – Como se ha observado para otros virus, el etileno favorece los cambios fisiológicos asociados a la infección. En este ensayo se observa una reducción del tamaño de la raíz asociada a la inoculación con ToLCNDV en las plantas WT inoculadas, que no se observa en las plantas inoculadas *ein3* en relación a su control.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arora, A. Ethylene receptors and molecular mechanism of ethylene sensitivity in plants. (2005). *Current Science* 89(8).

Bapat VA, Trivedi PK, Ghosh A, Sane VA, Ganapathi TR, Nath P. (2010). Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol Adv* 28:94–107

Bari R, Jones JD. Role of plant hormones in plant defence responses (2009). *Plant Molecular Biology*.69:473–488. DOI: 10.1007/s11103-008-9435-0

Boualem A, Fergany M, Fernandez R, Troadec C, Martin A, Morin H et al. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. (2008). *Science* 321, 836-838. doi:10.1126/science.1159023

Boualem A, Troadec C, Kovalski I, Sari M-A, Perl-Treves R, et al. (2009). A Conserved Ethylene Biosynthesis Enzyme Leads to Andromonoecy in Two Cucumis Species. *PLoS ONE* 4(7): e6144. doi:10.1371/journal.pone.0006144

Boualem A, Fleurier S, Troadec C, Audigier P, Kumar APK, Chatterjee M, et al. (2014). Development of a Cucumis sativus TILLING Platform for Forward and Reverse Genetics. *PLoS ONE* 9(5): e97963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097963>

Boualem A, Troadec C, Camps C, Lemhemdi a, Morin H, Sari MA et al. (2015). A cucurbit androecy gene reveals how unisexual flowers develop and dioecy emerges. *Science* 350, 688-691 doi:10.1126/science.aac8370

Carvajal Moreno, F. (2014). Mejora de la vida comercial, calidad y conservación de calabacín (*Cucurbita pepo* L.): estudio comparativo en variedades comerciales (tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.

Castellanos-Morales G, Ruiz-Mondragón KY, Hernández-Rosales HS, Sánchez-de la Vega G, Gámez N, Aguirre-Planter E, Montes-Hernández S, Lira-Saade R, Eguiarte LE. (2019). Tracing back the origin of pumpkins (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo* L.) in Mexico. *Proc. R. Soc. B* 286: 20191440. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.1440>

Chapin F S. (1980). The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11:233-60.

CHEN Chen, CUI Qing-zhi, HUANG San-wen, WANG Shen-hao, LIU Xiao-hong, LU Xiang-yang, CHEN Hui-ming, TIAN Yun. (2018). An EMS mutant library for cucumber. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(07): 1612-1619.

Chen L, Zhang L, Li D, Wang F, Yu D. (2013). WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 110:E1963–E1971. DOI: 10.1073/pnas.1221347110

Clarke R, Webster CG, Kehoe MA, Coutts BA, Broughton S, Warmington M, Jones RAC. (2020). Epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbit crops in a remote tropical environment. Virus Research. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197897>

Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B. (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. Nature Genetics. 38(6):716-20. doi: 10.1038/ng1806

Sáez C., Martínez C., Montero-Pau J., Esteras C., Sifres A., Blanca J., Ferriol M., López C. and Picó B. (2020). A Major QTL Located in Chromosome 8 of *Cucurbita moschata* Is Responsible for Resistance to Tomato Leaf Curl New Delhi Virus. doi: 10.3389/fpls.2020.00207

Cubero, J.I. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. Ed. Mundiprensa

Dahmani-Mardas F, Troadec C, Boualem A, Lévêque S, Alsadon AA, Aldoss AA, et al. (2010). Engineering Melon Plants with Improved Fruit Shelf Life Using the TILLING Approach. PLoS ONE 5(12): e15776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015776>

Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Millot P, Berthier K, Girardot G, Gognalons P, Hirsch J, Moury B, Nozeran K, Piry S, Schoeny A, Verdin E. (2020). Distribution and evolution of the major viruses infecting cucurbitaceous and solanaceous crops in the French Mediterranean area, Virus Researchdoi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198042>

Fischer, Ute and Dröge-Laser, Wolfgang. (2004). Overexpression of NtERF5, a New Member of the Tobacco Ethylene Response Transcription Factor Family Enhances Resistance to Tobacco mosaic virus. Molecular Plant-Microbe Interactions 17(10):1162-71

Font Ambrosio, MI y Alfaro Fernández AO. (2015). “El virus de Nueva Delhi” (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) amplía su gama de hospedantes en los cultivos españoles. Recuperado de: https://www.phytoma.com/images/pdf/272_octubre_2015_HORTICOLAS_virus_nueva_delhi.pdf

García A, Aguado E, Parra G, Manzano S, Martínez C, Megías Z, Cebrián G, Romero J, Beltrán S, Garrido D and Jamilena M. (2018). Phenomic and Genomic Characterization of a Mutant Platform in *Cucurbita pepo*. Front. Plant Sci. 9:1049. DOI: 10.3389/fpls.2018.01049

García A., Aguado E., Garrido D., Martínez C., Jamilena M. (2020). The plant Journal: for cell and molecular biology. DOI:10.1111/tpj.14846

Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. (2005). Annual Reviews Phytopathology.43:205–227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923

Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H., et al. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. Genetics 164, 731–740.

Grumet R; Katzir N and Garcia-Mas J. (2017). Genetics and Genomics of Cucurbitaceae. Switzerland. Springer Nature. DOI 10.1007/978-3-319-49332-9

Gruner, K., Zeier, T., Aretz, C. and Zeier, J. (2018). A critical role for *Arabidopsis* MILDEW RESISTANCE LOCUS O2 in systemic acquired resistance. Plant J. 94, 1064–1082 <https://doi.org/10.1111/tpj.13920>

Güerere Pereira, Pascual. (2013). Evaluación de la transmisión del Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-Mld) en hospederas alternas cultivadas y silvestres mediante el biotipo B de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius)) (Hemiptera: Aleyrodidae). Universidad de Córdoba. Córdoba

Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E.R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. Nature Reviews Microbiology, 11, 777-788.

Heluta V.P., Korytnianska V.G., Akata I. (2013). Distribution of *Erysiphe platani* (Erysiphales) in Ukraine. Acta Mycol. 48 (1): 105–112.

Iwasa, Y., & Roughgarden, J. (1984). Shoot/root balance of plants: Optimal growth of a system with many vegetative organs. Theoretical Population Biology, 25(1), 78-105. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(84\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0040-5809(84)90007-8)

Kalischuk ML., Roberts PD., Paret ML. (2020). A rapid fluorescence-based real-time isothermal assay for the detection of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in squash and watermelon plants, Molecular and Cellular Probes. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101613>.

Khatun MF, Hwang H-S, Shim J-K, Kil E-J, Lee S, Lee K-Y. (2020). Identification of begomoviruses from different cryptic species of *Bemisia tabaci* in Bangladesh, Microbial Pathogenesis. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104069>

knoester M, van Loon LC, van den Heuvel J, Henning J, Bol JF and Linthorst, HTM. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. Proc. Natl. Acad Sci. USA 95: 1933-1937

Leendert C. van Loon, Bart P.J. Geraats and Huub J.M. Linthorst. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *TRENDS in Plant Science*, volume 11, issue 4, P184-191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.005>

Liu Y, Nakayama N, Schiff M, Litt A, Irish VF, S P Dinesh-Kumar. Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamina*. *Plant Molecular Biology*. (2004). 54(5):701-711. DOI: 10.1023/b:plan.0000040899.53378.83

López Gázquez, A. M. (2018). Evaluación fenotípica y molecular de mutantes de insensibilidad a etileno en calabacín. Universidad de Almería. Almería.

Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*; 15:165–178. DOI: 10.1105/tpc.007468

Manzano S., Aguado E., Martínez C., Megías Z., García A., Jamilena M. (2016). The Ethylene Biosynthesis Gene CitACS4 Regulates Monoecy/ Andromonoecy in Watermelon (*Citrullus lanatus*). *PLoS ONE* 11(5): e0154362. DOI:10.1371/journal.pone.0154362

Martínez C., Manzano S., Megías Z., Garrido D., Picó B., Jamilena M. (2013). Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in fruit set and early fruit development in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *BMC Plant Biol.* 2013;13:139. DOI:10.1186/1471-2229-13-139

Martínez C., Manzano S., Megías Z., Garrido D., Picó B. and Jamilena M. (2014). Sources of parthenocarpy for Zucchini breeding: relationship with ethylene production and sensitivity. *Euphytica* 200, 349–362. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1155-8>

Martínez-Valdivieso D., Gómez P., Vicente-Dólera N., Rubira F., Moya M., Del Río Celestino M. (2012). Obtención y caracterización de mutantes morfológicos en calabacín (*Cucurbita pepo* spp. *pepo*). XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Almería, España.

McMichael B., Oosterhuis D., Zak J., Beyrouthy C. (2010). Growth and Development of Root Systems. In: Stewart J.M., Oosterhuis D.M., Heitholt J.J., Mauney J.R. (eds) *Physiology of Cotton*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3195-2_6

Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., Shinshi, H. (2000). Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol.* 41, 1187–1192

Paris, H. S. (2001). History of the Cultivar-Groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural reviews*, 25: 71-78. <https://doi.org/10.1002/9780470650783.ch2>

Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, et al. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*. 8(12):2309-2323. doi:10.1105/tpc.8.12.2309

Peries OS. (2008). Studies on strawberry mildew, caused by *Sphaerotheca macularis* (Wallr. Ex Fries) Jaczewski. *Annals of Applied Biology*. 1962;50(2):211–224

Pujol M., Alexiou KG., Fontaine A-S., Mayor P., Miras M., Jahrmann T., Garcia-Mas J. and Aranda MA. (2019). Mapping Cucumber Vein Yellowing Virus Resistance in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) by Using BSA-seq Analysis. *Front. Plant Sci*. 10:1583. doi: 10.3389/fpls.2019.01583

Renner SS. and Schaefer H. (2016). Phylogeny and Evolution of the Cucurbitaceae. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. doi: 10.1007/7397_2016_14

Rojas, M., Hagen, C., Lucas, W. and Gilbertson, R. (2005). Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp.361-394

Romero Masegosa, Jonathan. (2015). Análisis genético de mutantes alterados en el desarrollo del fruto de tomate. Universidad de Almería. Almería.

Sáez Sánchez, C., Martínez Martínez, C., Ferriol Molina, M., Manzano, S., Velasco, L., Jamilena, M. and López Del Rincón, C. (2016). Resistance to Tomato leaf curl New Delhi virus in *Cucurbita spp*. *ANNALS OF APPLIED BIOLOGY*. 169(1):91-105. doi:10.1111/aab.12283

Sáez-Sánchez C., Esteras Gómez C., Martínez-Martínez C., Ferriol Molina M., Dhillon N., López Del Rincón C. and Picó Sirvent MB. (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. doi:10.1007/s00299-017-2175-3

Sáez C., Martínez C., Montero-Pau J., Esteras C., Sifres A., Blanca J., Ferriol M., López C. and Picó B. (2020). A Major QTL Located in Chromosome 8 of *Cucurbita moschata* Is Responsible for Resistance to Tomato Leaf Curl New Delhi Virus. *Front. Plant Sci*. 11:207. doi: 10.3389/fpls.2020.00207

Simón, A., Ruiz L., Velasco L. and Janssen, D. (2018). Absolute Quantification of Tomato Leaf curl New Delhi virus Spain strain, ToLCNDV-ES: Virus Accumulation in a Host-Specific Manner. *Plant Disease* 102: 165-171. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0840-RE>

Takahashi H, Kanayama Y, Zheng MS, Kusano T, Hase S, Ikegami M, Shah J. (2004). Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in Arabidopsis modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. *Plant Cell Physiol* 45:803-809

Vicente-Dólera N, Troadec C, Moya M, del Río-Celestino M, Pomares-Viciano T, et al. (2014). First TILLING Platform in *Cucurbita pepo*: A New Mutant Resource for Gene Function and Crop Improvement. PLoS ONE 9(11): e112743. doi:10.1371/journal.pone.0112743

Widyasari K, Alazem M, Kim KH. (2020). Soybean Resistance to Soybean Mosaic Virus. Plants (Basel). 9(2):219. doi:10.3390/plants9020219

Yuan J, Zhang W, Sun K, Tang M-J, Chen P-X, Li X and Dai C-C. (2019). Comparative Transcriptomics and Proteomics of *Atractylodes lancea* in Response to Endophytic Fungus *Gilmaniella* sp. AL12 Reveals Regulation in Plant Metabolism. Front. Microbiol. 10:1208. doi: 10.3389/fmicb.2019.01208

Zhao, S., Hong, W., Wu, J., Wang, Y., Ji, S., Zhu, S., Wei, C., Zhang, J., & Li, Y. (2017). A viral protein promotes host SAMS1 activity and ethylene production for the benefit of virus infection. eLife, 6, e27529. <https://doi.org/10.7554/eLife.27529>