



**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

GRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA

ESPECIALIDAD HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA

PROYECTO: MONOGRÁFICO

**EVALUACIÓN DE DISTINTAS VARIEDADES de *Cucurbita*
PARA RESISTENCIA AL VIRUS ToLCNDV**

ALUMNA:

Almudena Alonso Rivas

DIRECTORES:

Dr. D. Manuel Jamilena Quesada

D. Jonathan Romero Masegosa

ALMERÍA, DICIEMBRE 2017

INDICE

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
1. INTERÉS Y OBJETIVOS	7
1.1 Importancia del cultivo de calabacín	8
1.1.1 Situación mundial	8
1.1.2 Situación en España y Andalucía	11
1.2 Interés de la investigación	13
1.3 Objetivos de la investigación	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Características de la especie <i>Cucurbita pepo</i>	16
2.1.1 Origen y utilización	16
2.1.2 Clasificación taxonómica	16
2.1.3 Descripción morfológica	18
2.1.4 Exigencias en clima y suelo	20
2.1.5 Ciclos más frecuentes en España.....	20
2.1.6 Otras especies cultivadas	21
2.2 El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)...	22
2.2.1 Origen, distribución geográfica e importancia	22
2.2.2 Situación taxonómica y morfológica	24
2.2.3 Transmisión del virus.....	26
2.2.4 Sintomatología.....	27
2.2.5 Estrategias de control	29
2.2.6 Mejora genética al ToLCNDV	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 Emplazamiento del ensayo	33
3.2 Material vegetal	33
3.3 Instalaciones	34
3.3.1 Cámara de cultivo	34

Evaluación de distintas variedades de *Cucurbita* para resistencia al virus ToLCNDV

3.4	Manejo del cultivo e inoculación	35
3.4.1	Inoculación.....	35
3.5	Toma de datos	36
3.5.1	Caracterización de los síntomas de infección viral.....	37
3.5.2	Caracterización del vigor de la planta	38
3.5.3	Extracción de DNA	39
3.5.4	Análisis mediante qPCR	40
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1	Caracterización de los síntomas de infección viral.....	44
4.2	Caracterización del vigor de las plantas inoculadas con ToLCNDV	46
	Análisis de la acumulación del virus mediante Q-PCR	48
5.	CONCLUSIONES	50
6.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	52
	ANEXOS.....	56
-	Anexo I.....	57

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPALES 20 PAÍSES PRODUCTORES DE CALABAZA Y CALABACÍN EN EL MUNDO (ELABORACIÓN PROPIA A PARTIR DE F.A.O, 2017).....	8
FIGURA 2. PRINCIPALES 10 PAÍSES PRODUCTORES DE CALABAZA Y CALABACÍN EN LA UNIÓN EUROPEA (ELABORACIÓN PROPIA A PARTIR DE F.A.O, 2014).....	9
FIGURA 3. PRINCIPALES 10 PAÍSES EXPORTADORES DE CALABAZA Y CALABACÍN A NIVEL MUNDIAL (ELABORACIÓN PROPIA A PARTIR DE F.A.O., 2017).....	10
FIGURA 4 PRINCIPALES 10 PAÍSES IMPORTADORES DE CALABAZA Y CALABACÍN A NIVEL MUNDIAL (ELABORACIÓN PROPIA A PARTIR DE F.A.O., 2017).....	10
FIGURA 5. EVOLUCIÓN NACIONAL DE LA PRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE CALABACÍN CON DESDE 2005 HASTA 2015 (MAPAMA, 2017).....	11
FIGURA 6. PRINCIPALES 5 COMUNIDADES AUTÓNOMAS CON MAYOR SUPERFICIE DESTINADA AL CULTIVO DE CALABACÍN (ELABORACIÓN PROPIA A PARTIR DE MAPAMA 2017).	12
FIGURA 7. PRINCIPALES 5 COMUNIDADES AUTÓNOMAS CON MAYOR PRODUCCIÓN DESTINADA AL CULTIVO DEL CALABACÍN (ELABORACIÓN PROPIA A PARTIR DE MAPAMA 2017).	12
FIGURA 8. CULTIVO DE <i>CUCURBITA PEPO</i> , <i>MOSFOTIPO ZUCCHINI</i>	18
FIGURA 9. VARIEDADES DE <i>C.FICIFOLIA</i> , <i>C.MAXIMA</i> , <i>C.ARGYROSPERMA</i> Y <i>C.MOSCHATA</i> RESPECTIVAMENTE. (FUENTE: SIAM, 2006; MORA, 2001; SHAUN-CASE, 2006; CHEMILEVSKY, 2012).....	21
FIGURA 10. DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS ToLCNDV A NIVEL MUNDIAL ANTES DE SU DESCRIPCIÓN EN ESPAÑA. TOMADO DE RUIZ-GARCÍA, 2015	23
FIGURA 11. PROCEDIMIENTO DE INOCULACIÓN MECÁNICA POR MEDIO DE FROTIS. (HTTP://WWW.MONOGRAFIAS.COM/TRABAJOS89/CONTROL-TRANSMISION-DEL-VIRUS-DEL-MOSAICO-DEL-TABACO-MANEJO-PLANTAS/IMAGE004.JPG).....	27
FIGURA 12. SÍNTOMAS DE VIRUS NUEVA DELHI EN CULTIVO DE CALABACÍN (FUENTE: ROMERO, 2017).	29
FIGURA 13. LOCALIZACIÓN DE CÁMARAS DE CULTIVO EN LA FINCA EXPERIMENTAL UAL-ANECOOP	33

FIGURA 14. CÁMARA DE CULTIVO DE LAS INSTALACIONES DE LA FINCA EXPERIMENTAL UAL-ANECOOP	35
FIGURA 15. IMAGEN IZQUIERDA, PLANTA SIN INOCULAR CON SUS DOS HOJAS VERDADERAS DESARROLLADAS. IMAGEN DERECHA, PLANTA INOCULADA	36
FIGURA 16. EVOLUCIÓN DE LAS PLANTAS DE CALABACÍN INOCULADAS CON DEL VIRUS TOLCNDV DESDE 5 DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN (DDI) HASTA LOS 30 DÍAS DDI.	37
FIGURA 17. EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LOS SÍNTOMAS CAUSADOS POR EL VIRUS TOLCNDV. ESCALA DE 0 A 4.	38
FIGURA 18. CARACTERIZACIÓN DEL VIGOR. ESCALA 0-3.	39
FIGURA 19. MOLINILLO PARA TRITURACIÓN DE MUESTRAS.	40
FIGURA 20. TERMOCICLADOR (ROTOR-GENE Q) UTILIZADO PARA ANALIZAR LA ACUMULACIÓN DEL VIRUS EN CADA MUESTRA DE HOJA.	41
FIGURA 21. GRADO DE SEVERIDAD DE LOS SÍNTOMAS A LA INOCULACIÓN MECÁNICA CON EL VIRUS TOLCNDV A LOS 20 Y 30 DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN. (DPI). LOS DATOS INDICAN LOS SÍNTOMAS MEDIOS EN UN TOTAL DE 10 PLANTAS INOCULADAS POR ACCESIÓN. LAS BARRAS DE ERROR INDICAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR	45
FIGURA 22. EVOLUCIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA A TOLCNDV EN LAS ACCESIONES 184 (C. PEPO SUSCEPTIBLE) Y 252 (C. MOSCHATA TOLERANTE) A LOS 20 Y 30 DPI.	46
FIGURA 23. DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS PLANTAS DE DIFERENTES ACCESIONES DE <i>CUCURBITA</i> A LOS 20 Y 30 DÍAS DE SU INOCULACIÓN CON TOLCNDV. LOS DATOS INDICAN EL VIGOR MEDIO DE 10 PLANTAS INOCULADAS POR ACCESIÓN. LAS BARRAS DE ERROR INDICAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	47
FIGURA 24. ACUMULACIÓN RELATIVA DEL DNA DEL VIRUS A LOS 20 Y 30 DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN (DPI). LOS DATOS INDICAN LA ACUMULACIÓN RELATIVA DE TOLCNDV EN LAS DIFERENTES ACCESIONES RESPECTO A MUC-16 (VALOR = 1). LAS BARRAS DE ERROR INDICAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR	48

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CALABACÍN EN ANDALUCÍA (ELABORACIÓN PROPIA A PARTIR DE MAPAMA, 2017).....	13
TABLA 2. ACCESIONES UTILIZADAS EN ESTE TFG.....	34
TABLA 3. ESPECIFICACIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN CÁMARA DE CULTIVO UTILIZADA PARA LA GERMINACIÓN Y LA INOCULACIÓN CON EL VIRUS TOLCNDV	34
TABLA 4. RESUMEN DE LOS DATOS OBTENIDOS DEL ENSAYO.....	43
TABLA 5. DATOS DE SINTOMATOLOGÍA, VIGOR Y ACUMULACIÓN DEL VIRUS EN TODAS LAS PLANTAS INOCULADAS MECÁNICAMENTE CON TOLCNDV EN ESTE TFG.....	57
TABLA 6. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS DATOS DE ACUMULACIÓN DEL VIRUS, SEVERIDAD DE SÍNTOMAS Y VIGOR DE LAS DIFERENTES ACCESIONES DE CUCURBITA ANALIZADAS EN ESTE TFG.....	59

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

1. Interés y objetivos

1.1 Importancia del cultivo de calabacín

El calabacín (*Cucurbita pepo* L. Morfotipo *Zucchini*) es la especie cultivada del genero *Cucurbita* más importante a nivel económico. Se caracteriza por ser la más polimórfica de dicho genero, manifestándose de manera especial en sus frutos, muy diferentes entre sí en forma, color, tamaño o textura. También existen variaciones a nivel de las características vegetativas como longitud, tamaño de las hojas, grosor de entrenudos o hábito de crecimiento.

1.1.1 Situación mundial

Según la base de datos estadísticos de la F.A.O, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; en el año 2014 la superficie total mundial de países productores de calabazas, calabacines y calabazas dulces fueron de 2.004.058 ha en el mundo, con una producción total de 25.196.723 toneladas.

Los principales países productores, según importancia, son: China Continental con 70.241.409 T, India con 49.87.123 T, seguida de la Federación de Rusia con 12.32.162 T.

En la Figura 1 se muestran los países con mayores niveles de producción, ocupando España el decimo puesto con un total de 462.266 T en el año 2014 (F.A.O, 2017). En el ámbito de la Unión Europea, España se sitúa en cuarta posición. El país con mayor producción es la Federación de Rusia (1.232.162 T), seguido de Ucrania (1.104.550 T) e Italia (566.585 T) respectivamente (F.A.O., 2014) (Figura 2).

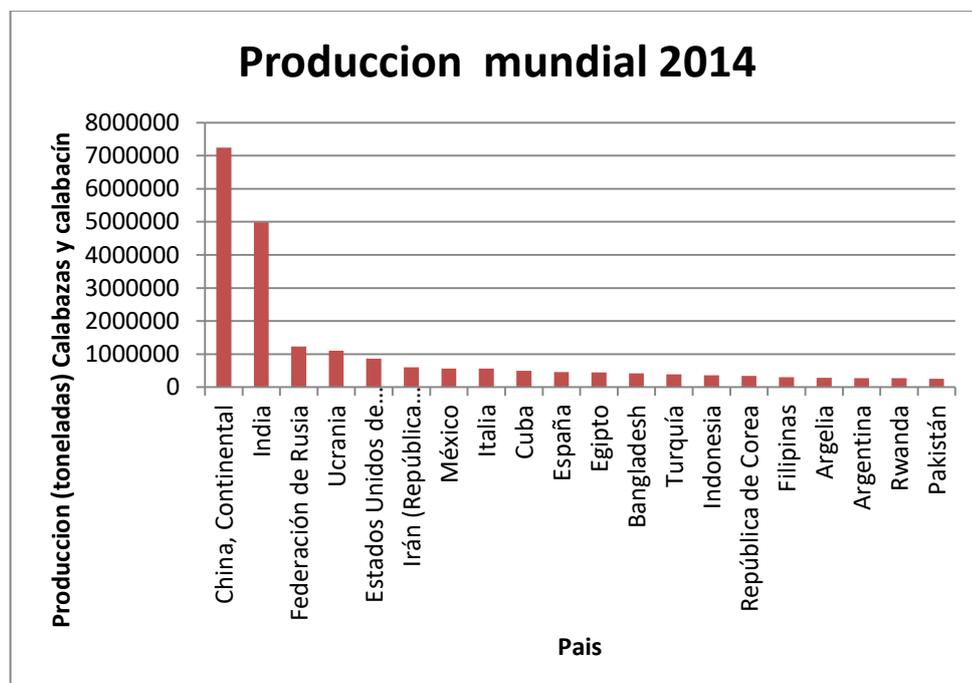


Figura 1. Principales 20 países productores de calabaza y calabacín en el mundo (Elaboración propia a partir de F.A.O, 2017)

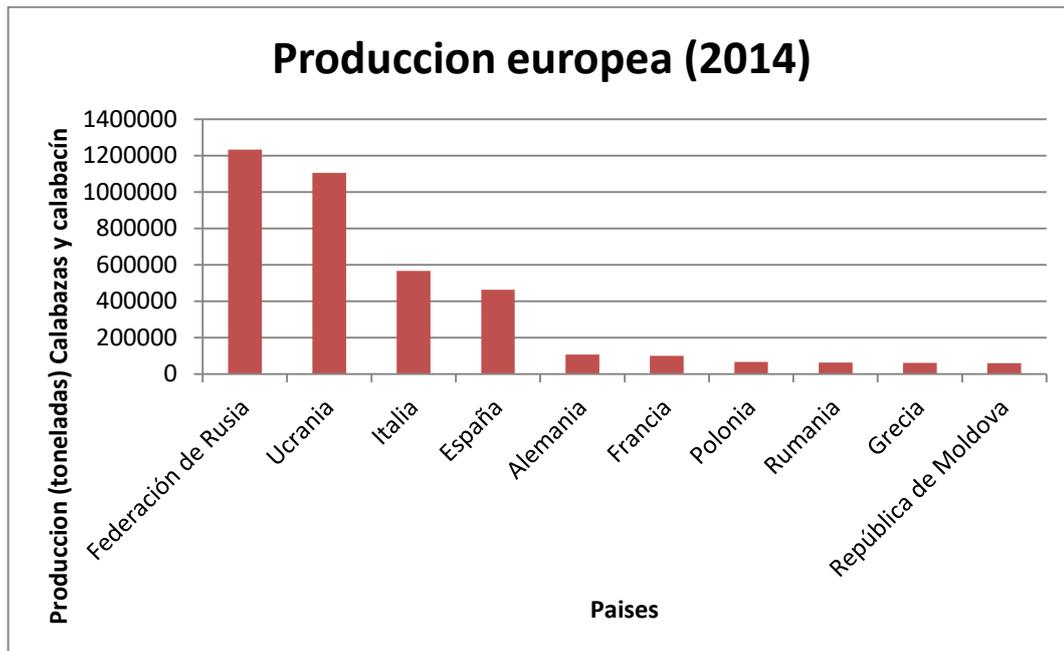


Figura 2. Principales 10 países productores de calabaza y calabacín en la Unión Europea (Elaboración propia a partir de F.A.O, 2014).

En cuanto a la exportación mundial, según los datos de la F.A.O (2013), España ocupa el segundo puesto con 302.442 T, ocupando el podio México con un total de 372.923 T. El tercer país con mayor exportación es Nueva Zelanda (79.316 T), seguido de Marruecos (54.378 T) (Figura 3). Los principales países importadores son Estados Unidos (349.096 T), Francia (148.006 T), Japón (105.312 T) y Reino Unido (102.449 T) (Figura 4).



Figura 3. Principales 10 países exportadores de calabaza y calabacín a nivel mundial (Elaboración propia a partir de F.A.O., 2017).

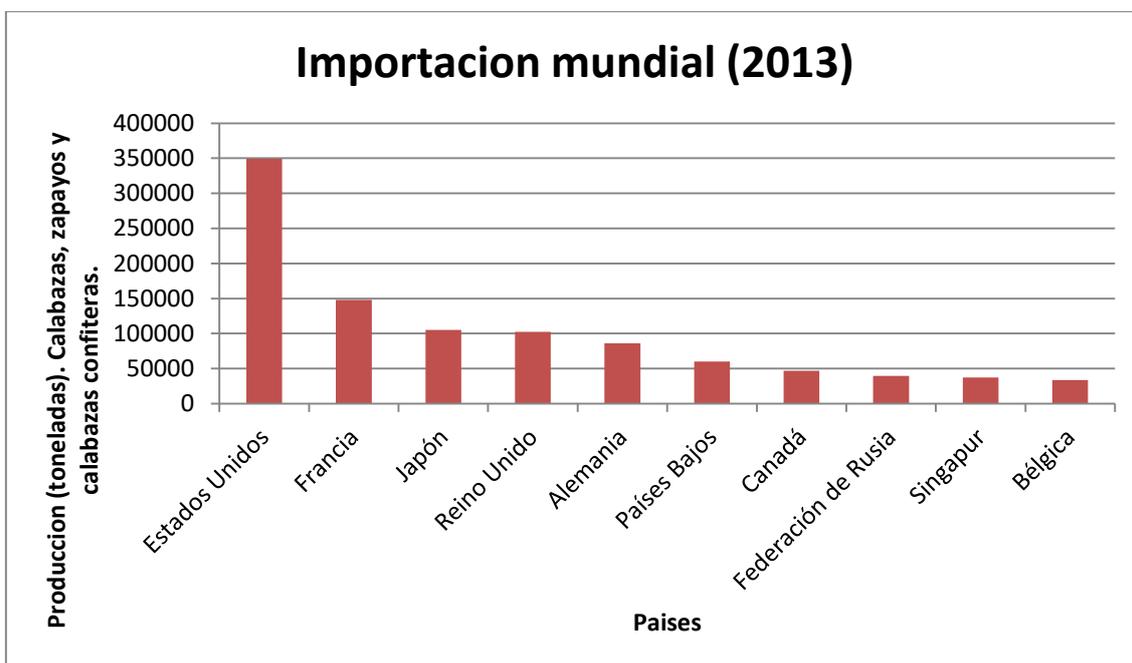


Figura 4 Principales 10 países importadores de calabaza y calabacín a nivel mundial (Elaboración propia a partir de F.A.O., 2017).

1.1.2 Situación en España y Andalucía

El cultivo del calabacín (*Cucurbita pepo*) ha experimentado un crecimiento en la superficie cultivada y en la producción

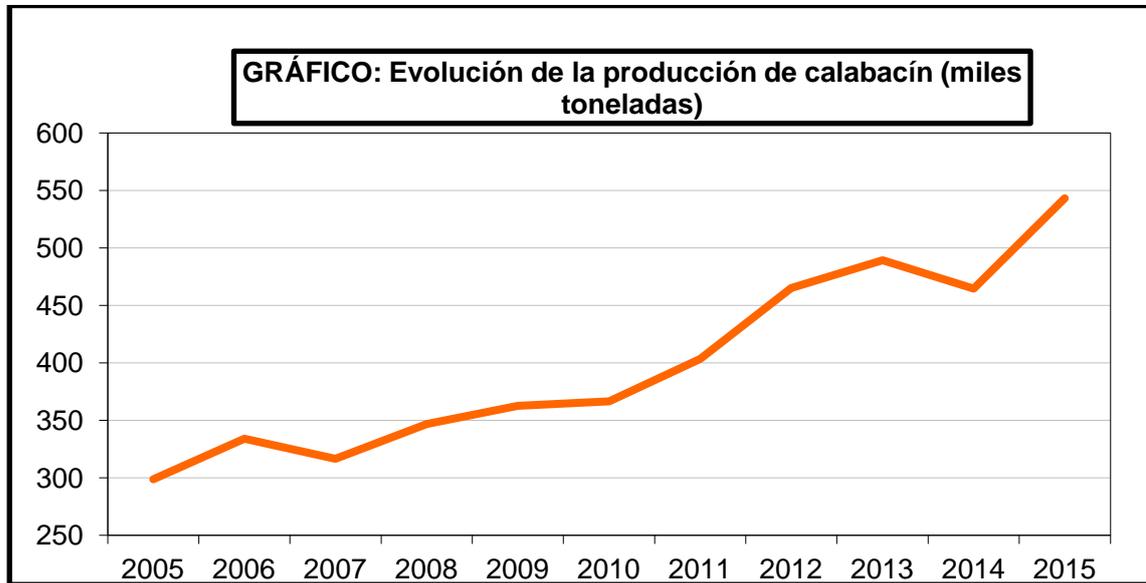


Figura 5. Evolución nacional de la producción del cultivo de calabacín con desde 2005 hasta 2015 (MAPAMA, 2017).

En España se cultivan unas 10717 ha de calabacín, dando una producción total de unas 543195 T según datos del avance del año 2016 del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2017).

Si estudiamos las producciones en España por Comunidades Autónomas, en Andalucía es donde se concentra la mayor superficie con un total de 8612 ha (7841 ha en cultivo protegido) que dan lugar a una producción de 459837 T (55525 T obtenidas en cultivo protegido) (MAPAMA, 2017) (Figura 7).

A partir de estas cifras, se deduce que Andalucía representa el 80,35% del total en superficie y 84,65% de la producción de calabacín en España.

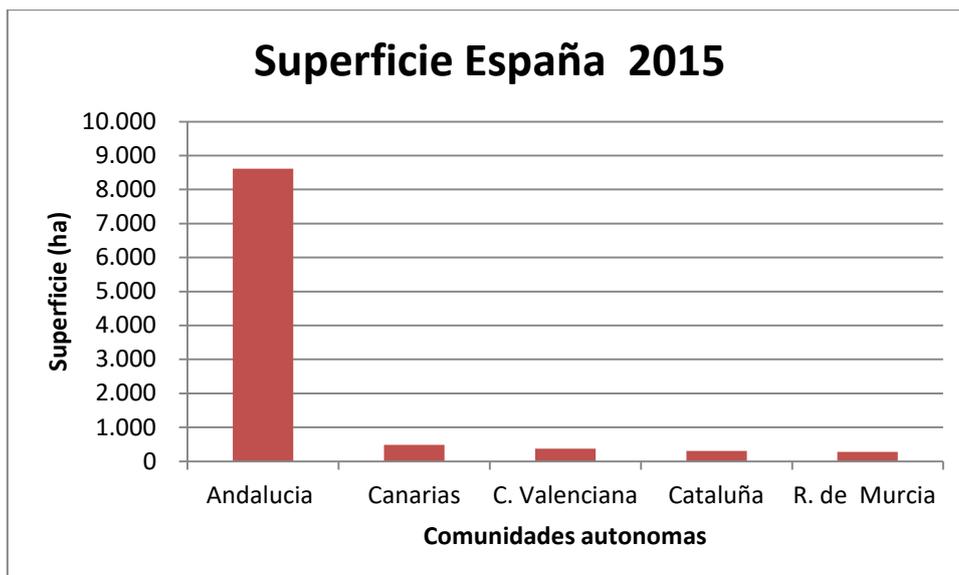


Figura 6. Principales 5 Comunidades Autónomas con mayor superficie destinada al cultivo de calabacín (Elaboración propia a partir de MAPAMA 2017).

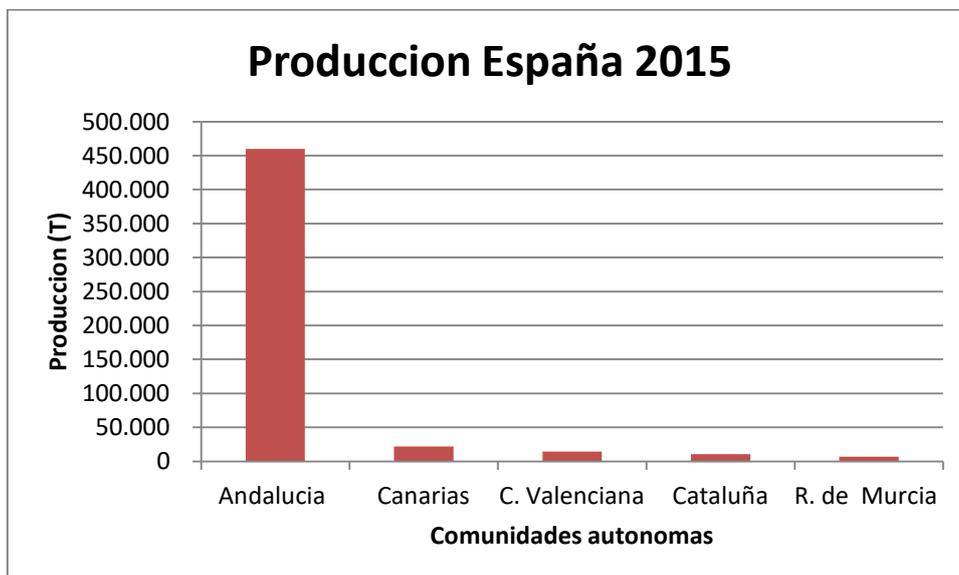


Figura 7. Principales 5 Comunidades Autónomas con mayor producción destinada al cultivo del calabacín (Elaboración propia a partir de MAPAMA 2017).

La provincia de Almería es la principal productora del cultivo de calabacín, con una superficie total de 7477 ha que dan una producción de 416388 T (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de la producción de calabacín en Andalucía (Elaboración propia a partir de MAPAMA, 2017).

	Invernadero		Aire libre	
	Superficie (ha)	Producción (kg/ha)	Superficie (ha)	Producción (kg/ha)
Almería	7.369	55.981	108	35.806
Cádiz	25	60.000	176	41.335
Córdoba	–	–	114	36.000
Granada	227	45.150	270	25.906
Huelva	–	–	20	27.000
Jaén	–	–	32	24.000
Málaga	200	50.000	–	–
Sevilla	20	55.000	30	25.000

1.2 Interés de la investigación

La familia *Cucurbitaceae* comprende cerca de 130 géneros y más de 900 especies (Carnide y Borroso, 2006). Esta familia incluye cuatro grupos fundamentales de importancia económica a nivel mundial. El género *Cucumis*, presenta dos principalmente, *Cucumis melo* y *Cucumis sativus*, otro perteneciente al grupo *Citrullus* y el género *Cucurbita*, conocidas generalmente como calabazas.

La gran importancia mundial de todos los cultivos pertenecientes a esa familia, justifican todos los esfuerzos realizados por el sector en la mejora de estos cultivos. Se han abordado distintos objetivos de mejora, uno de los principales es la mejora de la resistencia a plagas y enfermedades (Picó, 2013).

Dentro del género *Cucurbita*, destaca el cultivo de calabacín (*Cucurbita pepo*) que es de gran importancia económica tanto a nivel nacional como mundial. Para optimizar su producción se requiere de la obtención de nuevas variedades mejor adaptadas a los sistemas de cultivo, más resistentes frente a nuevas enfermedades o plagas y con mejores características organolépticas, que respondan a las cada vez mayores exigencias del mercado (Picó, 2013).

La fuente más importante para la mejora del calabacín, la encontramos en la especie más rústica *C. moschata* y también en algunas especies silvestres como *C. mendeliana*, *C. genovensis* o *C. ecuadoriensis* (Picó, 2013).

La mejora debe realizarse de una forma eficiente y competitiva, apoyándose en los crecientes conocimientos genéticos, y en los últimos avances biotecnológicos (Esteras et al., 2012).

1.3 Objetivos de la investigación

En el presente proyecto nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un método de inoculación mecánica que nos permita evaluar la tolerancia al virus ToLCNDV en distintas accesiones del género *Cucurbita*.
2. Utilizar la inoculación mecánica y la evaluación de síntomas para la identificación de material vegetal de *Cucurbita* tolerante a ToLCNDV, que sirva de fuente de resistencia para la mejora genética de calabacín.
3. Utilizar la PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) para determinar la carga vírica de ToLCNDV en los tejidos de plantas inoculadas, determinando la correlación entre la acumulación del virus y la sintomatología.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. Revisión bibliográfica

2.1 Características de la especie *Cucurbita pepo*

2.1.1 Origen y utilización

El calabacín es originario de América del Norte, considerándose que existen dos sub-especies o variedades botánicas, *Cucurbita pepo*, subsp. *pepo* y *Cucurbita pepo*, subsp. *ovifera*, siendo originaria de México la primera y de la zona sureste de Estados Unidos la segunda (Paris, 2001)

Tras el descubrimiento de América es traído a Europa, y en 1550 hay referencias de su presencia en algunos herbarios. Después, tras cruzamientos realizados entre cultivares mexicanos y estadounidenses, aparecieron unos tipos que se extendieron por el norte de África y Oriente Próximo. Los tipos que hoy en día conocemos parecen tener su origen en los llamados *Cocozelle*, originarios del sur de Europa (Ruiz, 2013).

El género *Cucurbita* pertenece a la familia de las Cucurbitáceas. Su plantas producen flores amarillas y de corola tubular que se abren durante la mañana. Las hojas son palmeadas profundamente lobadas.

El calabacín se recoge inmaduro evitando así el endurecimiento de su epicarpio, para su comercialización y consumo.

Está constituido por un alto contenido vitamínico, incluyendo caroteno (287 ug/100g), Vitamina A (47.81 ug/100g) o Vitamina B9 (33.10 ug/100g). Además, de la alta composición de aminoácidos del calabacín, cabe destacar el ácido aspártico, ácido glutámico, leucina o lisina, entre otros.

2.1.2 Clasificación taxonómica

A continuación, se presenta la clasificación taxonómica de calabacín:

Nombre científico: *Cucurbita pepo* L.

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Dilleniidae*

Orden: *Cucurbitales*

Familia: *Cucurbitaceae*

Subfamilia: *Cucurbitoideae*

Género: *Cucurbita*

Especie: *Cucurbita pepo*

Existen ocho variedades botánicas o morfotipos comestibles diferentes de *C. pepo* clasificadas en función de la morfología de sus frutos y confirmado por análisis con marcadores moleculares (París, 1989; Paris et al. 2003; París y Janick, 2005). Estas ocho variedades son las siguientes:

- **Acorn (*C. pepo* L. var. *turbinata* Paris)**: Son plantas tanto arbustivas como rastreras, con frutos ovoides o cónicos, agudos en el ápice y longitudinalmente costado-acanalados, con 10 surcos profundos. El epicarpio de sus frutos es suave, por lo que pueden ser consumidos en estado maduro.

- **Cocozelle (*C. pepo* L. var. *Longa* Paris)**: Sus frutos son largos y bulbosos en el extremo distal, con un ratio longitud/anchura superior a 3,5.

- **Crookneck (*C. pepo* L. var. *torticollia* Alefeld)**: Es una planta de crecimiento arbustivo, con frutos de color amarillo, dorado o blanco, claviforme y curvado en el extremo apical, generalmente de epicarpio verrugoso. Se consumen inmaduros.

- **Pumpkin (*C. pepo* L. var. *pepo* Bailey)**: es una planta anual, herbácea, vivaz, de tallos flexibles y trepadores. Tiene hojas de gran tamaño y con abundante vellosidades en hojas y tallos. Las flores son amarillas, monoicas. El fruto es una baya llamada pepónide; presenta polimorfismo. La pulpa es de color amarillo-anaranjado, densa, de textura firme y de sabor dulce. Contiene en su interior numerosas semillas ovales, lisas, de 2 a 3 cm de largo, las cuales a su vez contienen una pulpa blanca y comestible.

- **Scallop (*C. pepo* L. var. *Clypeata* Alefeld)**: Sus frutos son aplastados, lignificados, generalmente discoidales y con márgenes festoneados. Actualmente, los colores amarillos son preferidos a los blancos o verdes pálidos y se consumen en estado inmaduro.

- **Straightneck (*C. pepo* L. var. *recticollis* Paris)**: Se caracteriza por tener frutos cilíndricos, amarillentos, verrugosos y ensanchados en el extremo distal, con un cuello corto y estrecho en el extremo peduncular.

- **Vegetable Marrow (*C. pepo* L. var. *fastigata* Paris)**: Posee hábito tanto rastrero como sub-arbustivo y frutos cortamente cilíndricos, con la cáscara lisa, endurecida y engrosada al madurar y de color variable desde crema hasta verde oscuro. Es muy común en Oriente Medio y en el Norte de África.

- **Zucchini (*C. pepo* L. var. *cilíndrica* Paris)**: Es el grupo de cultivares comerciales más común en la actualidad. Es una planta herbácea anual y rastrera que puede llegar a los 10m de longitud. Sus tallos son acanalados y de aspecto áspero y sarmentoso, hojas pubescentes, lobuladas y acorazonadas. Las flores dan lugar a frutos oblongos, que varían mucho en tamaño según la variedad. El epicarpio del fruto es liso y duro, además varía en color.

2.1.3 Descripción morfológica



Figura 8. Planta de *Cucurbita pepo*, morfotipo Zucchini

-Planta:

Es una planta anual, herbácea, de crecimiento indeterminado y porte rastrero o compacto (Camacho, 2002).

-Sistema radicular:

El calabacín está constituido por una raíz principal de la que parten las secundarias. Su desarrollo radicular depende del sistema de cultivo, siendo superficial en suelos enarenados, comprendiendo entre 25 y 30 cm de profundidad. En terrenos desnudos y cultivos no protegidos, el desarrollo del sistema radicular es más profundo, entre 50 y 80 cm (Reche, 1997).

-Tallo

El calabacín posee un tallo principal, áspero al tacto, cilíndrico, de superficie pelosa, grueso, consistente, con entrenudos cortos de donde parten hojas, flores, frutos y numerosos zarcillos a 10-20 cm de longitud y que nacen junto al pedúnculo del fruto (Reche, 1997).

De altura variable según la variedad, cultivo, y condiciones climáticas.

-Hojas

Las hojas son palmeadas, amplias y sostenidas por alargados peciolo. Los peciolo parten del tallo alternándose de forma helicoidal. Son largos, huecos, consistentes y espinas cortas y finas por todo su desarrollo. El limbo está constituido por cinco lóbulos, alcanzando como máximo 50 cm de ancho y largo (Reche, 1997).

De la inserción del peciolo con la hoja parten los nervios principales, extendiéndose hacia el centro de cada lóbulo, y estos se subdividen a su vez a los extremos de las hojas.

-Flor

Las flores del calabacín son grandes, solitarias, vistosas, axilares, de color amarillo y acampanadas. La planta de calabacín es monoica, por lo que se dan simultáneamente flores masculinas y femeninas. En la flor femenina falta el pedúnculo largo característico de la flor masculina, ya que ésta se une directamente al tallo por un reducido, corto y grueso pedúnculo de sección pentagonal o hexagonal pero irregular (Delgado, 1999).

Con temperaturas bajas y días cortos se propicia la formación de flores femeninas, mientras que con temperaturas altas y gran luminosidad son las flores masculinas las que se ven favorecidas en su formación. La polinización puede ser entomófila (abejas principalmente) o polinización cruzada. (Reche, 1997)

-Fruto

Es una baya grande con pericarpio fuerte una vez maduro, placenta carnosa procedente de un ovario ínfero (Camacho, 2002). Los frutos nacen de las axilas de las hojas, estando unidos a un pedúnculo grueso y corto. Se recolectan cuando aproximadamente se encuentra a la mitad de su desarrollo, inmaduros. (Reche, 1997). El fruto maduro contiene numerosas semillas, no siendo comercial por su epicarpio duro y por su gran volumen

-Semillas

Son de color blanco-amarillento, oval, alargado, puntiagudo en su extremidad, con un surco longitudinal paralelo al borde exterior, de 1,5 cm de largas. 0,6-0,7 cm de anchas y de 0,1-0,2 cm de gruesas, con superficie lisa (Reche, 1997).

2.1.4 Exigencias en clima y suelo

Principalmente todos los cultivares de *C. pepo* son menos exigentes en temperatura que los de *C. moschata*. El calabacín se puede considerar como una planta con menores requerimientos térmicos que el melón y el pepino (Maroto, 2002).

Su cero vegetativo puede ser fijado aproximadamente en 8°C (Serrano, 1979), el intervalo térmico para germinar está comprendido entre 21 y 35 °C, el mínimo térmico para germinar es de 15,5 °C y la temperatura óptima de crecimiento puede situarse entre los 18 y 24 °C (Knott, 1962), aunque algunos autores, como Serrano (1979), lo sitúan entre 25 y 35 °C.

En lo referente a la humedad, su óptimo está comprendido entre el 65 y el 80%. Se trata de una planta muy exigente en iluminación con lo cual aquí en la provincia de Almería de adapta perfectamente (Maroto, 2002).

En cuanto a suelos, es una planta que, aunque se adapta bien a terrenos arenosos, prefiere suelos de textura media, ricos en materia orgánica y bien provista de nutrientes. Es una especie medianamente resistente a la salinidad, que puede resistir la acidez hasta un pH cercano a 5,5. Generalmente el calabacín puede verse muy perjudicado, por la acumulación excesiva de aguas por condiciones deficitarias de drenaje del suelo (Maroto, 2002).

2.1.5 Ciclos más frecuentes en España

Los ciclos más frecuentes son los siguientes (Maroto, 2002):

- a) **Ciclo extra-temprano:** Se siembra en macetas de turba, a finales de noviembre, en el interior de un invernadero o en un semillero protegido. Se trasplanta cuando la planta tiene dos o tres hojas verdaderas, también en invernadero. La recolección puede iniciarse a partir de mediados de febrero.
- b) **Ciclo temprano:** La siembra se efectúa en terreno acolchado y/o túneles, a partir de mediados de febrero hasta finales de marzo. La recolección se inicia a partir del mes de mayo. Este ciclo es común de áreas benignas del litoral mediterráneo.
- c) **Ciclo normal:** La siembra se realiza, según las zonas y los valores de la temperatura mínima, a partir de mediados de abril y la recolección a partir de mediados de junio.
- d) **Ciclo tardío:** para cubrir parte de los meses de otoño y en ocasiones prolongar la recolección, pueden hacerse siembras tardías (mediados de agosto) en zonas con buena climatología. Sin embargo, este ciclo presenta algunos problemas, principalmente de incidencia de enfermedades criptogámicas y virales. Para cubrir la primera fase invernal, las siembras se retrasan hasta mediados de septiembre, realizándose el cultivo bajo invernadero.

2.1.6 Otras especies cultivadas

A parte de *C. pepo*, existen cuatro variedades más del género *Cucurbita* que fueron domesticadas y ampliamente cultivadas por sus frutos, aprovechando su pulpa, semillas o el fruto inmaduro como verdura de estación. Estos disponen de una diversidad morfológica en forma, tamaño y color (Nee 1990, Paris et al., 2001). Se trata de las especies *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita argyrosperma*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita máxima*.



Figura 9. Variedades de *C.ficifolia*, *C.maxima*, *C.argyrosperma* y *C.moschata* respectivamente. (Fuente: Siam, 2006; Mora, 2001; Shaun-Case, 2006; Chemilevsky, 2012)

- ***C. ficifolia***: es una especie de enredadera trepadora de importancia en las zonas de altitud. En bajas alturas se emplea como pie de injerto para melón (*Cucumis melo*) o pepino (*Cucumis sativus*). *C. ficifolia* presenta menor variabilidad genética en comparación con las demás especies cultivadas del género, con pocas variaciones en los patrones de coloración y dimensiones de los frutos y semillas (Priori et al., 2013).
- ***C. maxima***: planta anual, originaria de América presenta cultivares más tolerantes a las temperaturas más frescas. Podemos distinguir dos subespecies: *C. maxima ssp. maxima* que agrupa las variedades cultivadas; y *C. maxima ssp. andreana* siendo la subespecie silvestre, no se emplea como uso local, pero se han encontrado resistencias a virus como Clover Yellow Vein Virus (CYVV), Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) y Watermelon Mosaic Virus tipo 2 (WMV) (Lira et al., 2009).
- ***C. argyrosperma***: originaria de Mesoamérica, su fruto se cosecha maduro o inmaduro. Su cultivar es sensible a bajas temperaturas, siendo junto con *C. moschata* altamente tolerantes a las altas temperaturas. Los frutos presentan variaciones en tamaño y en la curvatura del cuello. La coloración externa es blanca o amarillenta, con rayas de color verde oscuro.
Dentro de *C. argyrosperma* encontramos dos subespecies. *C. argyrosperma ssp. argyrosperma* que se ubican todos los tipos domesticados ; y *C. argyrosperma ssp. sororia* que comprende las formas silvestres. Además la importancia recae en la localización de resistencias de enfermedades virales como Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) y Tomato Ringspot Virus (ToRSV) (Lira et al., 2009).

- ***C. moschata***: originaria de regiones tropicales de América, no se han detectado variedades silvestres. Se desarrolla en clima cálido y con alta humedad, presentando junto a *C. argyrosperma* los cultivares más tolerantes a altas temperaturas. Una vez la planta está bien establecida puede soportar bien los extremos de sequía y de humedad (Wessel- Beave et al., 2004).
C. moschata es menos estudiada que *C. pepo* y *C. máxima*, en parte porque tiene pocos cultivares distribuidos comercialmente a excepción del 'Butternut', y aun no hay una clasificación específica
En Colombia el cultivo de *C. moschata* se caracteriza por su amplia dispersión, presentando una gran variabilidad en cuanto tamaño, forma y color de fruto, grosor y textura de pulpa, color, etc.

2.2 El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)

2.2.1 Origen, distribución geográfica e importancia.

El virus del rizado de la hoja de tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV), se identificó por primera vez en el año 1995, como una variante del virus causante del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en India, afectando a cultivos de tomate, donde se ha convertido en su principal patógeno (Ruiz-García et al., 2015).

Trascurridos pocos años, el número de hospedadores se ha visto incrementado, alcanzando miembros de la familia *Cucurbitaceae* y *Solanaceae*.

En la actualidad se considera un problema emergente en cultivos de la India, Pakistán, Bangladesh y Tailandia. Además también se ha detectado en Indonesia, Taiwán e Irán (Ruiz-García, 2015).

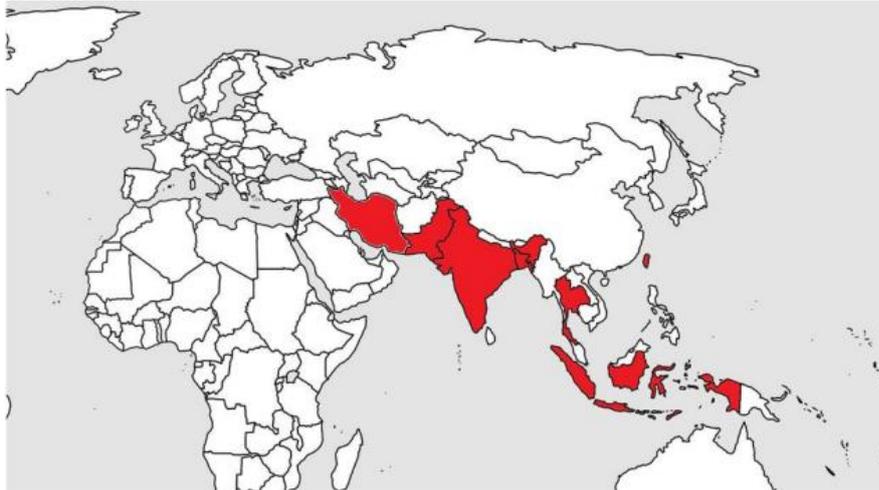


Figura 10. Distribución del virus ToLCNDV a nivel mundial antes de su descripción en España. Tomado de Ruiz-García (2015).

En muchos de estos países, el virus produce enfermedad en los principales cultivos de Solanáceas, como pimiento, tomate y patata y en especies espontáneas de la misma familia *Solanum nigrum*. En estos países, se ha visto también cepas de ToLCNDV afectando a cultivos de Cucurbitáceas tales como pepino, melón, sandía y calabaza (Janssen *et al.* 2014).

Se especula que el virus que afecta a los cultivos de España es otra cepa diferente a la descrita en India (Janssen *et al.* 2014).

Se han partido de múltiples hipótesis explicando la introducción de este virus a España. La más aceptada es a través de plantas de jardinería, ya que no ha podido ser transportado en plantas hortícolas, frutales o en semillas.

La similitud nucleotídica del aislado que se tiene en España de ToLCNDV es menor con otros aislados del virus, todos procedentes y caracterizados en India o en el oriente lejano, pero se sitúa entre el 90% y el 95%. Esta detección ha sido la primera que se ha hecho de ToLCNDV en España (Juárez *et al.*, 2014).

En otoño de 2011, se empezó a observar en determinadas plantas de calabacín que estaban infectadas por algún virus que les causaba “mosaicos” en hojas. Los análisis ELISA frente a virus de la familia *Potyviridae* y otros virus conocidos como SqMV o CGMMV dieron negativo. Un año después, una misma situación se repitió, con una incidencia variable, de entre un 2% y un 80% en al menos 12 parcelas y distribuidas por toda la Comarca de Campo de Cartagena (Juárez *et al.* 2014).

En el año 2013, se observaron los síntomas de esta enfermedad en las regiones de Murcia y Almería incidiendo en el cultivo de calabacín, tanto en invernadero como al aire libre. Durante ese año, este virus se fue extendiendo provocando pérdidas, tanto de producción como económicas. Además del cultivo de calabacín también ha sido afectado el cultivo de melón. Desde el momento de su detección, la incidencia en los cultivos ha ido creciendo de manera exponencial, viéndose también afectadas otras especies de la familia de cucurbitáceas que son susceptibles al virus ToLCNDV, incluyendo ciertos riesgos en especies de la familia de las solanáceas (Juárez et al., 2014)

2.2.2 Situación taxonómica y morfológica

El virus de Nueva Delhi pertenece al género Begomovirus de la familia *Geminiviridae*, con un genoma bipartito compuesto por dos moléculas de ADN monocatenario de aproximadamente 2,7 kb cada uno, denominados DNA- A y DNA-B respectivamente. Ambos DNAs son necesarios para la infección y el desarrollo de los síntomas en las plantas huéspedes, aunque el DNA-A tiene capacidad de replicación autónoma dentro del huésped (Hamilton et al., 1983, Harrison, 1985).

ToLCNDV se transmite de forma persistente por medio de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Sáez et al., 2016).

Los geminivirus son virus de plantas, descritos por primera vez por Goodman en 1977 (Goodman 1977a, 1977b). De acuerdo con la clasificación de Baltimore, los geminivirus se consideran los virus de clase II y es la familia más grande conocida de los virus de ADN de cadena sencilla.

Los geminivirus comprenden una numerosa y diversa familia (*Geminiviridae*) de virus de plantas, cuyo genoma es un ADN de cadena sencilla que se duplica usando moléculas intermediarias de ADN de cadena doble dentro de las células vegetales infectadas (Bridson et al., 1989). Los viriones están constituidos por un par de icosaedros y cada uno consta de 110 subunidades de proteína de cubierta, de 29-30kD cada una. Estos virus contribuyen solo con unos pocos factores para su duplicación y transcripción y son dependientes de las ADN y ARN polimerasas nucleares de la planta hospedante (Hamilton et al. 1983, Harrison 1985, Bisaro et al. 1990, Fauquet y Fargette 1990).

Los geminivirus (familia *Geminiviridae*) se clasifican en cuatro géneros, previamente denominados subgrupos, que se caracterizan por el tipo de insecto vector, las plantas hospedantes y la estructura del genoma que poseen (Rybicki 1994, Padidam et al. 1995).

Los géneros son:

-*Mastrevirus*: tienen genoma monopartito y son transmitidos por cicadelas (pertenecientes a la familia *Cicadellidae*) en plantas monocotiledóneas. El virus del estriado del maíz (Maize streak virus, MSV) representa a este género (Bock 1974, Harrison *et al.* 1977, Rybicki y Huges 1990).

-*Curtovirus*: poseen genoma monopartito y son transmitidos por cicadelas (pertenecientes a la familia *Cicadellidae*) en plantas dicotiledóneas. El virus del encrespamiento apical de la remolacha (Beat curly top virus, BCTV) es el representante de éste género (Briddon *et al.* 1989, Mumford 1974).

-*Topocuvirus*: la transmisión de este virus se realiza mediante membranácidos (*Membracidae*) y las plantas hospedadoras pertenecen son dicotiledóneas. El virus que representa a este género es el virus del seudorizado del tomate (Tomato pseudo-curly top virus, TPCTV).

-*Begomovirus*: presentan genomas bipartitos (ADN A y ADN B), excepto algunos aislados de TYLCV (Navot *et al.* 1991) y son transmitidos por la mosca blanca *B. tabaci* a plantas dicotiledóneas de manera persistente, circulativa y no propagativa. El virus representante de este género es el virus de la cuchara o virus del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV).

El genoma de algunos begomovirus presenta una única hebra de DNA que codifica todas las proteínas necesarias para que el virus infecte a la planta y muestre la sintomatología correspondiente. Estos begomovirus “autosuficientes” se denominan begomovirus monopartitos.

Además, encontramos otros begomovirus que se encuentran asociados con beta-satélites para poder infectar la planta huésped. El beta-satélite es una pequeña molécula de DNA que se encuentra en una capsula separada del genoma viral. A estos se les designa begomovirus monopartitos asociados a beta-satélites.

En otros podemos encontrar beta-satélite y alfa-satélites, que es otra pequeña molécula de ADN en una capsula aparte del genoma viral. A estos se les asigna el nombre de begomovirus monopartitos asociados a alfa y beta satélites.

Por último, nos encontramos con begomovirus que presentan un genoma compuesto por dos hebras diferentes, de igual tamaño (DNA-A y DNA-B) que se encapsulan en viriones distintos, ambos de mismo tamaño y forma, hablándose entonces de begomovirus bipartitos. El DNA-A codifica unas proteínas implicadas en la replicación y el encapsulamiento del virus, por lo que su presencia es necesaria para que se produzca la infección. Este es el caso del virus del rizado de la hoja de tomate Nueva Delhi (Tomato Leaf Curly New Delhi Virus, ToLCNDV) (Juárez *et al.*, 2014).

2.2.3 Transmisión del virus

Los virus pueden transmitirse de diferentes modos. Las formas más comunes son por medio de inoculación mecánica, por insectos, propagación vegetativa, semilla o polen.

De la misma forma que otros begomovirus, ToLCNDV se transmite por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) de forma persistente y circulativa.

Los estados larvarios y adultos de *Bemisia tabaci* adquieren el virus cuando se alimentan de plantas infectadas. Los viriones alcanzan el intestino del vector, coloniza el tejido y sufre un periodo de latencia necesario para que el patógeno se desarrolle por todo el organismo y se encuentre en cantidades importantes en las glándulas salivares del insecto. A medida que el insecto va alimentándose de plantas sanas, va transmitiendo los viriones (Janssen et al. 2014).

El virus tiene una persistencia en el insecto de 20 días aproximadamente, siendo el ciclo de vida de un adulto de *Bemisia tabaci* prácticamente igual. Por lo que se puede decir, que durante todo el ciclo de vida de este insecto, si ha sido infectado, podrá transmitir el virus (Janssen et al., 2014).

La transmisión mecánica es otra forma de infección. Esta consiste en introducir el virus de forma manual por heridas mecánicas facilitando así su infección. La transmisión mecánica puede darse de manera manual, como puede ser por medio de las labores culturales en los invernaderos, o de manera artificial en laboratorios desde el punto de vista experimental.

La transmisión mecánica artificial se puede realizar de diferentes modos, por medio de injerto, frotis e inyecciones.

Mediante la técnica del injerto se necesita una planta sana que actúe como patrón, en la cual se le hará una hendidura que llegara a los tejidos vasculares. Se elige una hoja o una rama de la planta infectada que presente los haces vasculares descubiertos, y se pondrán en contacto con los del patrón para que se produzca la transmisión del virus. El injerto se sella con parafilm o polietileno y la planta se coloca en un lugar fresco en la espera de la aparición de los síntomas (Mena, 2010).

La técnica de frotis es una de las técnicas más empleadas debido a su rapidez y seguridad, facilitando así el estudio de los virus en ausencia de vectores (Mena, 2010). Su realización es simple y consiste en:

- a) Se recogen muestras de plantas con síntomas bien marcados, aproximadamente dos centímetros cuadrados, preferentemente de hoja.

Evaluación de distintas variedades de *Cucurbita* para resistencia al virus ToLCNDV

- b) El tejido se macera en un mortero adicionándole una solución buffer con un pH de 7.0 a 8.5.
- c) Se añade carborundo, que es un abrasivo artificial que se obtiene calentando a altas temperaturas el carbón en polvo con sílice hasta que se cristaliza en granos hexagonales. Se encuentra en polvo.
- d) Con un bastoncillo de algodón humedecido en el tampón realizado se impregna la hoja.
- e) Se lava con agua para evitar el exceso.
- f) Las plantas inoculadas se cultivan en una cámara de ambiente controlado y fuera del alcance de los insectos.

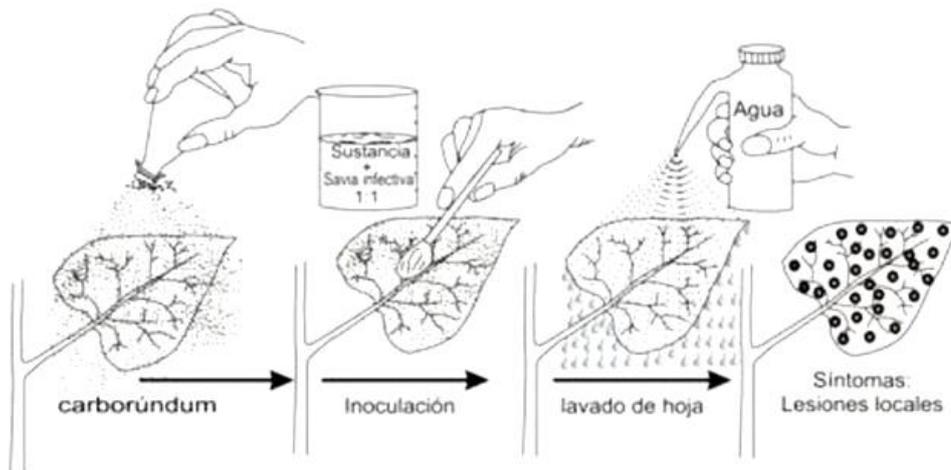


Figura 11. Procedimiento de inoculación mecánica por medio de frotis.
(<http://www.monografias.com/trabajos89/control-transmision-del-virus-del-mosaico-del-tabaco-manejo-plantas/image004.jpg>)

También encontramos la técnica de inyección que fue una de las que se utilizaron por primera vez para la transmisión de virus en plantas. En la actualidad se emplea para transmitir aquellos virus que no es posible por medio de la técnica de frotis.

2.2.4 Sintomatología

El virus ToLCNDV presenta una sintomatología común en todas aquellas especies que son susceptibles, variando según la especie, la severidad con la que el virus se manifiesta en diferentes partes de la planta.

Los síntomas primarios que se presentan son leves punteaduras en las hojas debido a las picaduras del vector provocando un enroscamiento de las hojas hacia en haz o envés, y ligeros abullonamientos.

Además, podemos ver mosaicos, amarillos foliares y apicales, clorosis internervial caracterizada por la decoloración de los nervios, un síntoma que se aprecia sobre todo en la fase inicial de la infección.

El rizado foliar también es un síntoma característicos de este virus, causando diferentes cambios en el aspecto de la hoja, pudiendo ser acucharamientos. En infecciones severas, el virus provoca filimorfismo apical, reduciendo así el tamaño de los folíolos y del área fotosintéticamente activa.

Además, la planta se encuentra debilitada, con poco vigor pudiendo llegar a la parada de crecimiento y sus frutos perder calidad.

Los síntomas varían según diferentes variantes, como son las condiciones climáticas, la edad de la planta o hospedante. La temperatura es uno de los factores más importantes dentro de las condiciones ambientales, influyendo directamente en la susceptibilidad del virus. En cuanto a la edad de la planta, de manera general cuando son más jóvenes más susceptibles son al ataque del virus. En relación al hospedante, el cultivo más susceptible en este momento es el calabacín (*Cucurbita pepo*) siendo capaz de producir grandes pérdidas en la producción y hacer que el fruto se desprece comercialmente.



Figura 12. Síntomas de virus Nueva Delhi en cultivo de calabacín (Fuente: Romero, 2017).

2.2.5 Estrategias de control

Existen diferentes estrategias de control llevadas a cabo para prevenir la infección por virus:

Físicas: colocación de doble malla en invernadero, eliminación de plantas infectadas, rotación de cultivos, colocación de placas cromotrópicas, trampas adhesivas, etc.

Químicas: eliminación del vector de transmisión (*Bemisia tabaci*) mediante tratamientos fitosanitarios.

Control biológico: mediante la utilización de fauna auxiliar enemiga del insecto vector, por ejemplo: *Orius insidiosus*.

2.2.6 Mejora genética para resistencia a ToLCNDV

Para poder dar una solución al problema ocasionado por el virus ToLCNDV, desde el punto de vista genético se plantea la posibilidad de trabajar con genes de resistencia.

Para identificar y seleccionar genes de resistencia (R) a ToLCNDV, se debe realizar un cribado de accesiones o cultivares de la especie a mejorar (*C. pepo*), o por otro lado, realizarlo en especies emparentadas, como por ejemplo, *C. moschata*, *C. máxima* o *C. ficifolia*.

Una vez localizada la especie que posee resistencia frente al virus, se deberán hacer cruces con la variedad comercial para finalmente conseguir introgresar el gen R. Serán necesarias varias generaciones de cruces y retrocruces para conseguir una nueva variedad comercial con la resistencia.

Hasta el momento se han llevado a cabo varios cribados de material vegetal del género *Cucurbita* y *Cucumis* para identificar accesiones resistentes a ToLCNDV.

Un estudio realizó un screening de 110 accesiones del género *Cucurbita* (Sáez et al., 2016) dividido en dos ensayos, uno en una cámara climática empleado inoculación mecánica como forma de transmisión del ToLCNDV, y el segundo durante la temporada primavera-verano en Almería bajo invernadero con mosca blanca virulífera. Los resultados obtenidos demostraron la alta susceptibilidad de las especies *C. pepo*. La especie *C. máxima* que estaba representada por accesiones desde su centro de origen Argentina y países vecinos, mostró una infección retrasada en comparación con *C. pepo*. Sin embargo, los síntomas fueron evolucionando siendo muy severos, descartándola para desarrollar posibles resistencias en cultivares.

Los mejores resultados obtenidos fueron en *C. moschata*, clasificándola como buena candidata para programas de mejora genética para evitar daños causados por ToLCNDV, siendo parcialmente cruzable con *C. pepo*. Actualmente se están realizando cruces para producir poblaciones segregantes para introgresar el gen de resistencia en calabacín.

Otro estudio realizado (Martínez et al., 2015), analizó 143 accesiones de *Cucurbita* y *Lagenaria* seleccionadas de los bancos de germoplasma de la Universidad de Almería en España (BSUAL) y en el Centro de Investigación Neve Ya'ar en Israel. El ensayo tuvo lugar en un invernadero con mosca blanca como fuente de inóculo. Entre las especies de *Cucurbita*, *C. moschata* mostró tener el menor nivel de síntomas a ToLCNDV, seguido de *C. argyrosperma*, siendo estas dos especies las únicas que no mostraron a los 35 días de su trasplante una incidencia total en su población. Dentro de las accesiones de *C. pepo* analizadas, el morfotipo *Cocozelle* fue la que menor nivel de infección de virus mostraba. Las accesiones de *C. moschata* seleccionadas en este estudio ya habían sido seleccionadas como fuente de resistencias para otros virus como CMV, PRSV, WMV y ZYMV. A pesar de que no se encontró ninguna resistencia en *C. pepo*, algunas accesiones presentaron un retraso en el inicio de los síntomas, pudiendo indicar algún tipo de resistencia intermedia. Se está realizando cruces para poder evaluar los híbridos.

A partir del material vegetal más tolerante a ToLCNDV del trabajo de Martínez et al (2015) se seleccionaron las accesiones de *C. pepo* y *C. moschata* que hemos estudiado en este TFG.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1 Emplazamiento del ensayo

La primera parte del ensayo (siembra, inoculación, crecimiento y evaluación visual de las plantas utilizadas) se ha llevado a cabo en las instalaciones de la Fundación Finca Experimental UAL-ANECOOP, localizada en el Paraje “Los Goterones” (Retamar) (Figura 6).

Concretamente, esta primera parte se ha realizado en un fitotrón o cámara de crecimiento, donde las plantas han podido desarrollarse bajo unas condiciones de temperatura y humedad idóneas.

La segunda parte del trabajo (cuantificación del virus ToLCNDV mediante qPCR) se ha desarrollado en el laboratorio del grupo de Genética de Hortícolas (BIO293) de la Universidad de Almería, ubicado en la Escuela Superior.



Figura 13. Localización de cámaras de cultivo en la Finca Experimental UAL-ANECOOP

El ensayo ha sido realizado entre los meses de abril y junio de 2017.

3.2 Material vegetal

En base a los resultados obtenidos en un trabajo realizado con anterioridad por el grupo de genética de Hortícolas (Bio293) de la Universidad de Almería (Martínez et al., 2015), se han seleccionado 7 accesiones de un total de 110 muestreadas.

Estas 7 accesiones pertenecen a las especies, *Cucurbita pepo* y *Cucurbita moschata* (Tabla 2), y se han seleccionado por su tolerancia al virus ToLCNDV durante el ensayo de

campo realizado anteriormente mediante el uso de mosca blanca virulífera (Martínez et al., 2015)

Todas estas accesiones proceden del Banco de Semillas de la UAL (BSUAL). Además, se ha utilizado una variedad tradicional, Muc16, como control del ensayo.

Tabla 2. Accesiones utilizadas en este TFG.

Accesión	Especie	Morfotipo
Muc16	<i>C. pepo</i>	Zucchini
179	<i>C. pepo</i>	Cocozelle
184	<i>C. pepo</i>	Cocozelle
220	<i>C. pepo</i>	Scallop
252	<i>C. moschata</i>	
256	<i>C. moschata</i>	
266	<i>C. moschata</i>	
279	<i>C. moschata</i>	

3.3 Instalaciones

3.3.1 Cámara de cultivo

La cámara de cultivo en la que se llevó a cabo el ensayo ha mostrado un aislamiento completo, no habiéndose encontrado problema alguno de contaminación debida a insectos plaga u hongos fitopatógenos.

Por otro lado, las condiciones ambientales han sido controladas durante todo el proceso. La relación de horas de luz (día-noche) han sido 14-10 respectivamente. Mientras que la temperatura y humedad se ve modificada en cuatro horas distintas (Tabla 3).

Tabla 3. Especificaciones de temperatura y humedad en cámara de cultivo utilizada para la germinación y la inoculación con el virus ToLCNDV.

Hora de cambio	Temperatura	Humedad
7:00	25°C	66.0%
9:00	26°C	66.0%
19:00	25°C	60.0%
23:00	19°C	60.0%

La disposición de las plantas dentro de la cámara de cultivo puede observarse en la Figura 14.



Figura 14. Cámara de cultivo de las instalaciones de la Finca Experimental UAL-ANECOOP

3.4 Manejo del cultivo e inoculación

Se realizó una siembra directa de manera manual en bandejas de semillero de 96 alveolos. Se dispuso de 10 semillas de cada accesión y otras 10 semillas de MUC-16, como control. Después de la siembra, las semillas se mantuvieron en oscuridad durante dos días para forzar y sincronizar la germinación de todas las semillas.

Una vez que las semillas germinaron y mostraban dos hojas verdaderas se trasladaron a maceteros individuales (dimensiones: 5,5 x 5,5 cm), para su posterior inoculación.

En el transcurso del cultivo se han aplicado riegos alternos con solución nutritiva, formada por 10-50-10 (N-P-K), aportando 0,90gr de abono por cada 100L de agua.

3.4.1 Inoculación.

La inoculación se realizó un día después a su trasplante.

Partiendo de inóculo fresco, se realizaron inoculaciones mecánicas sobre todas las plantas de cada una de las accesiones y también sobre el control sensible (Muc16). Para realizar la inoculación se ha utilizado aproximadamente 1 gramo de material infectado. A continuación, se maceró y se agregó 5 mL de buffer hasta que la solución fuera homogénea.

Se utilizó carburumdum para realizar una herida sobre la cual se aplicase a continuación la mezcla preparada de inóculo y buffer (Figura 15).



Figura 15. Imagen izquierda, planta sin inocular con sus dos hojas verdaderas desarrolladas. Imagen derecha, planta inoculada

3.5 Toma de datos

Se realizó una toma de datos a los 20 y 30 días después de su trasplante, evaluando la severidad con la que las plantas se han visto afectadas y el vigor presente a lo largo del proceso. Del mismo modo, en estos días se tomaron muestras de cada planta de cada accesión y control para realizar el análisis cuantitativo del virus ToLCNDV.

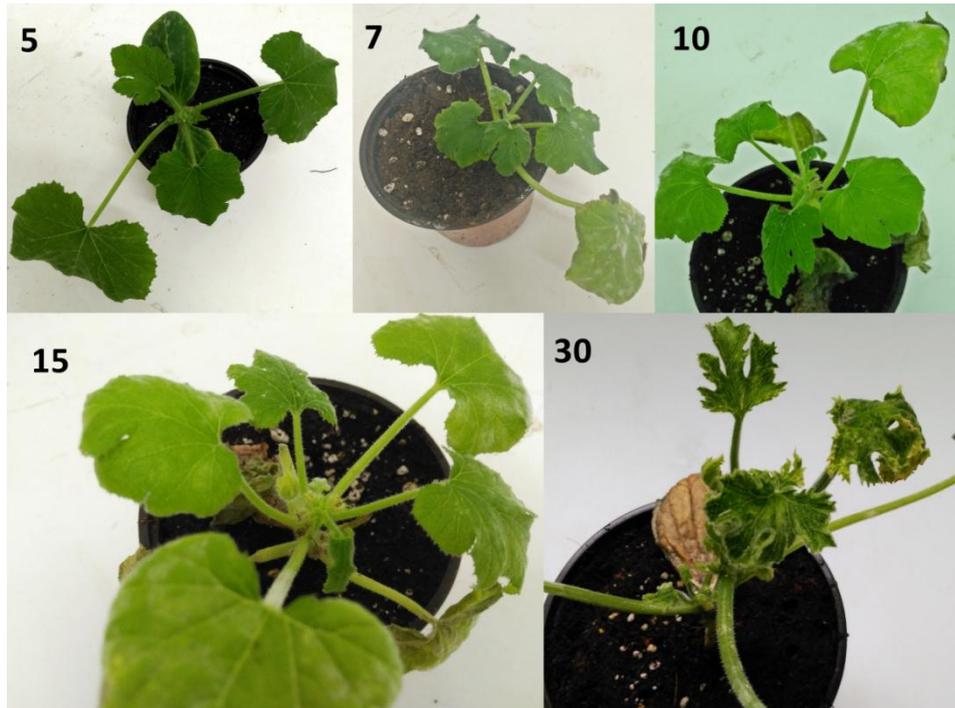


Figura 16. Evolución de las plantas de calabacín inoculadas con el virus ToLCNDV desde 5 días después de la inoculación (DDI) hasta los 30 días DDI.

3.5.1 Caracterización de los síntomas de infección viral

Se observaron los síntomas y se puntuaron con una escala de gravedad de 0 a 4. La puntuación fue la siguiente (Martínez et al, 2015):

- Ausencia de síntomas. Valor 0
- Síntomas leves que afectan a una hoja. Valor 1.
- Síntomas moderados que afectan a dos hojas. Valor 2.
- Síntomas severos que afectan a tres hojas. Valor 3.
- Síntomas muy severos que afectan a varias hojas, incluyendo clorosis, con entrenudos más cortos. Valor 4

Según este rango, se ha analizado individualmente cada una de ellas de forma visual, pudiendo verlo más detalladamente en la Figura 17.

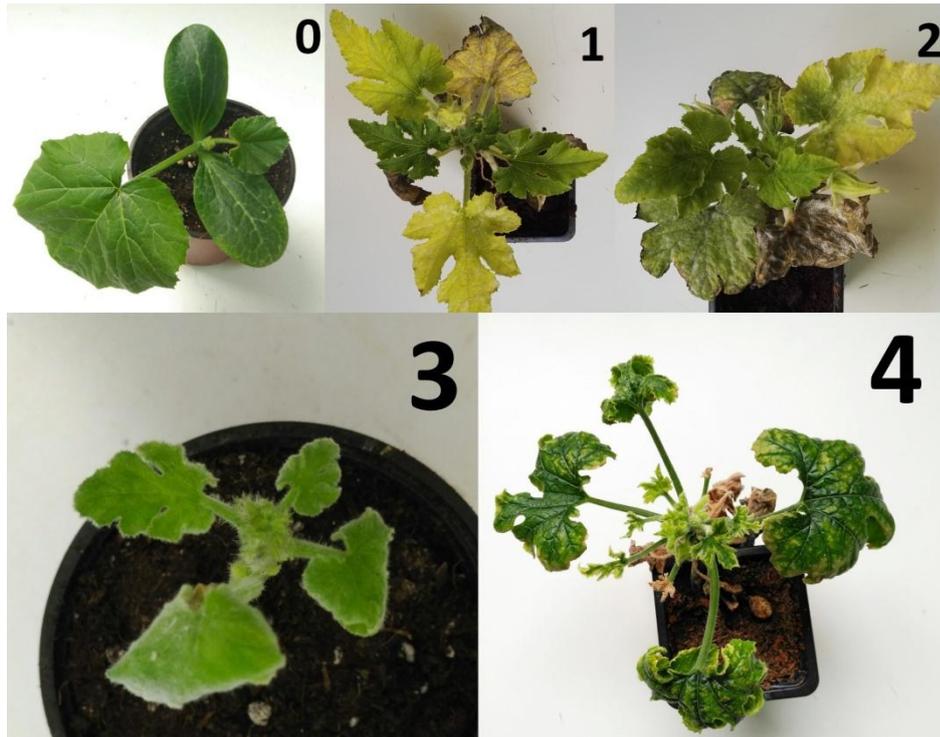


Figura 17. Evaluación de la severidad de los síntomas causados por el virus ToLCNDV. Escala de 0 a 4.

3.5.2 Caracterización del vigor de la planta

El vigor de la planta se evaluó visualmente en una escala de 0 a 3, siendo 0 aquellas cuyo crecimiento era más lento y 3 con crecimiento más vigoroso (Martínez et al., 2015).

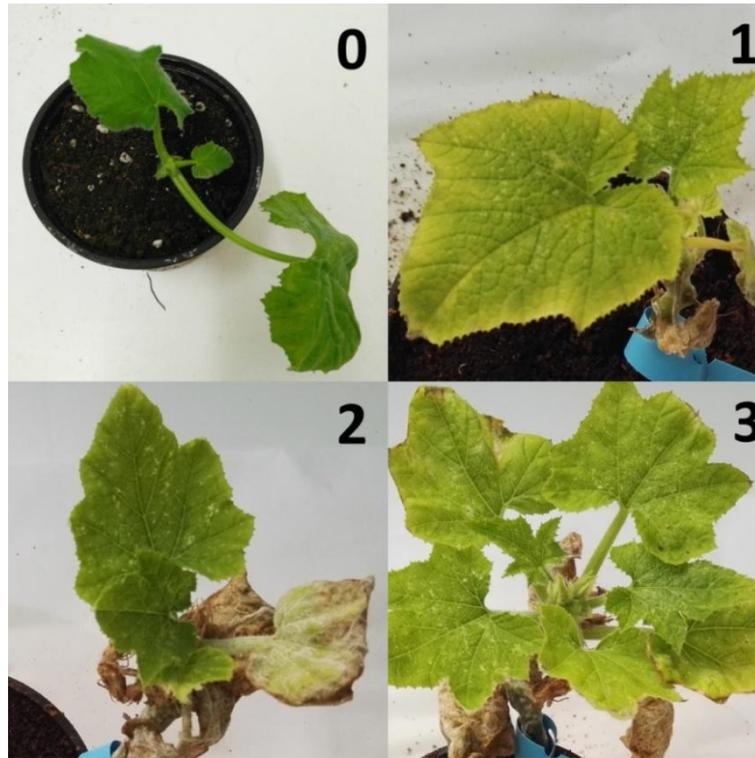


Figura 18. Caracterización del vigor. Escala 0-3.

3.5.3 Extracción de DNA

De todo el material vegetal se recogieron muestras de hojas de la zona apical de la planta inoculada en eppendorf de 2mL, se congelaron en nieve carbónica o en nitrógeno líquido, y se conservaron en un congelador a -80°C .

El material vegetal se pulverizó sin descongelar utilizando el molino Retsch MM301. Posteriormente se añadieron a cada muestra un tampón de extracción, descrito a continuación.

Tampón de extracción (500mL)

- 5 ml. Tris ClH 1M pH 8
- 50 ml. EDTA 0.5 M pH 8
- 50 ml. ClNa 5 M
- 395 ml. Agua destilada
- 350 μl . de B-mercaptoetanol.

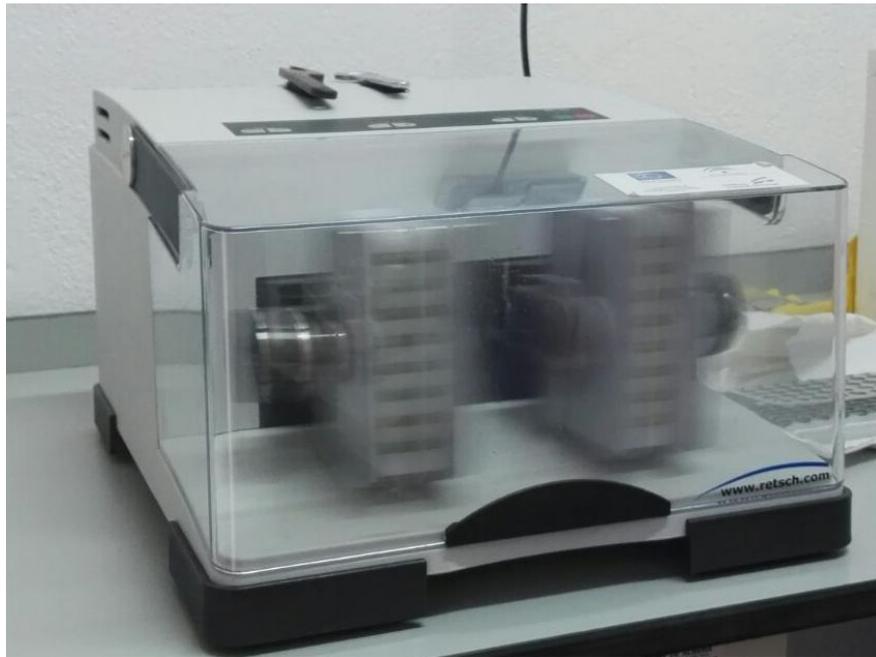


Figura 19. Molinillo para trituración de muestras.

A continuación se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12.000 rpm, y el sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf de 1,5 mL limpio.

3.5.4 Análisis mediante qPCR

Tras realizar el proceso descrito en el punto anterior, y con el fin de determinar la acumulación relativa del virus en las plantas de cada accesión, se ha procedido a realizar el análisis mediante PCR cuantitativa

Para ello se han empleado cebadores diseñados a partir del segmento A del genoma de ToLCNDV: ToLCNDVF1 5'-AATGCCGACTACACCAAGCA-3', posición 1145-1169, y ToLCNDVR1 5'-GGATCGAGAAGAGAGTGGCG-3', posición 1399-1418. Estos dos cebadores generan un fragmento de 274 pb en las reacciones de qPCR que se pueden cuantificar a tiempo real.

La q-PCR se realizó utilizando un termociclador (Rotor- Gene Q, QUIAGEN)(Figura 7). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: las muestras se mantuvieron durante 5 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 3 pasos, 5 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 72°C durante 0 segundos (Martínez et al., 2015).



Figura 20. Termociclador (Rotor-Gene Q) utilizado para analizar la acumulación del virus en cada muestra de hoja.

La acumulación relativa del virus de las plantas fue determinada por el método comparativo Ct (Threshold Cycly) usando el gen EFIAZI de *C. pepo* como control interno. En este caso, los cebadores 5'-GCTTGGGTGCTCGACAAACT-3' y 5'-TCCACAGAGCAATGTCAATGG-3' se usaron para generar un fragmento de 67 pb.

La acumulación relativa de ToLCNDV en cada muestra fue calculada con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre ΔCt de cada muestra y la ΔCt de la muestra del gen constitutivo de referencia (Martínez et al., 2015).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

Para este estudio se han ensayado una serie de accesiones del género *Cucurbita*, previamente seleccionadas por su tolerancia al virus ToLCNDV bajo condiciones de campo con mosca blanca virulífera (Martínez et al., 2015). Además, como control hemos utilizado MUC-16, una variedad tradicional de *C. pepo* muy sensible al virus.

La Tabla 4 resume los resultados obtenidos en las diferentes accesiones de *Cucurbita* analizadas.

Tabla 4. Resumen de los datos obtenidos del ensayo.

Especie	Morfortipo	Accesión	Síntomas				Plantas con síntomas (%)		Vigor	
			20 dpi		30 dpi		20 dpi	30 dpi	20dpi	30 dpi
			media	rango	media	rango			media	media
<i>C.pepo</i>	Zucchini	MUC-16	4	4-4	4	4-4	100	100	0	0
<i>C.pepo</i>	<i>Cocozelle</i>	179	2,1	1-3	3,8	2-4	100	100	1	0,4
<i>C.pepo</i>	<i>Cocozelle</i>	184	2,2	1-3	3,5	2-4	100	100	1,9	0,8
<i>C.pepo</i>	<i>Scallop</i>	220	1,5	1-2	3,3	2-4	100	100	0,7	0,8
<i>C.moschata</i>		252	0,5	0-1	0,5	0-1	50	50	1,6	3
<i>C.moschata</i>		256	0	0-0	0	0-0	0	0	3	3
<i>C.moschata</i>		266	1,9	1-4	2,8	0-4	100	70	0,8	0,7
<i>C.moschata</i>		279	1,3	1-2	2,2	1-4	100	100	0,4	1,3

Se analizaron 8 accesiones, siendo la mayoría muy susceptibles a la transmisión mecánica de ToLCNDV, desarrollando síntomas severos a muy severos a los 30 días después de la inoculación (dpi). Entre los síntomas observados, cabe destacar el abullonamientos de las hojas, mosaicos severos en hojas jóvenes, entrenudos cortos e interrupción del crecimiento vegetativo de las plántulas.

Las accesiones de *C. pepo* y *C. moschata* mostraron diferencias a lo largo de su desarrollo en cuanto a la respuesta de la transmisión de ToLCNDV. Las accesiones de *C.pepo* mostraron síntomas rápidamente, teniendo un alto grado de incidencia en la población alcanzando a los 20 días tras su trasplante el 100% de incidencia. Por el contrario, las accesiones de *C. moschata* presentaron una mayor variación. De hecho, se han detectado accesiones que apenas mostrados síntomas a la inoculación del virus y las plantas se desarrollaron de manera normal. Sin embargo, en otras la sintomatología fue similar a la detectada en la especie *C. pepo*.

4.1 Caracterización de los síntomas de infección viral

MUC-16 se empleó como control del ensayo, es una accesión altamente susceptible al virus ToLCNDV, mostrando síntomas severos (valor máximo de severidad 4) precozmente en la totalidad de las plantas inoculadas (Figura 21).

Las tres accesiones analizadas de *C. pepo* fueron altamente susceptibles a la transmisión mecánica del virus (síntoma medio 3,53; en un rango entre 3,3 y 3,8). De hecho, tanto los morfotipos de *Cocozelle* como *Scallop* mostraron una sintomatología similar a la de MUC16, la variedad susceptible que hemos usado como testigo. Estas accesiones mostraron síntomas claros de la infección por el virus: color amarillo en las hojas, parada del crecimiento, hojas acucharadas, clasificando esta especie como susceptible al virus ToLCNDV.

Las accesiones de *C. moschata* mostraron, sin embargo, variaciones entre ellas (síntoma medio 1,37; en un rango entre 0 y 2,8), siendo la más susceptible la accesión 279, que mostró una incidencia en la población del 100%, y un nivel de severidad medio de los síntomas a los 30 días de 2,2 (rango 0-4). La accesión 266 fue la que presentó mayor severidad de síntomas, con un valor de 2,8, aunque la incidencia fue menor que en la accesión 279 (Figura 21).

La accesión 252 mostró un grado de tolerancia al virus muy elevado, con un rango de severidad de los síntomas medio de 0,5, en un rango entre 0 y 1, y solo la mitad de las plantas inoculadas mostraron síntomas, mientras que el resto fueron totalmente resistentes a la infección (Figura 21).

Por último, la accesión 256 no mostró ningún síntoma a la inoculación con el virus a los 20 y 30 dpi (Figura 21), lo que sugiere que esta accesión es completamente resistente al virus ToLCNDV.

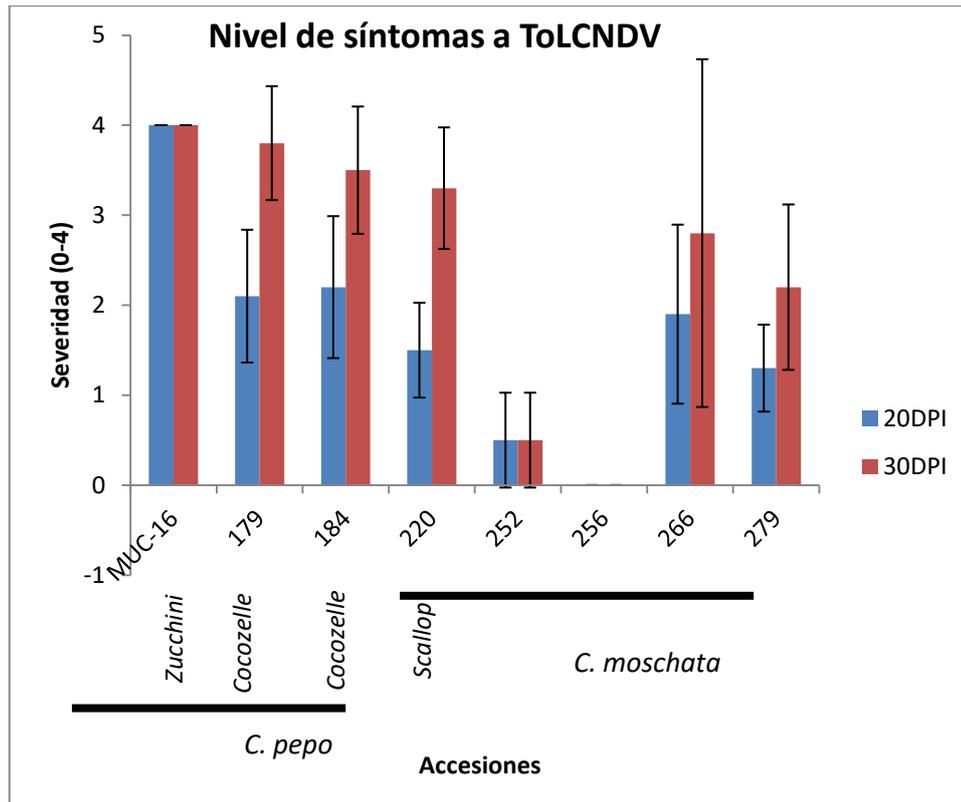


Figura 21. Grado de severidad de los síntomas a la inoculación mecánica con el virus ToLCNDV a los 20 y 30 días después de la inoculación. (dpi). Los datos indican los síntomas medios en un total de 10 plantas inoculadas por accesión. Las barras de error indican la desviación estándar

Para concluir, a partir de la figura anterior (Figura 21), la accesión que mayor grado de síntomas ha mostrado a los 20 días tras su trasplante ha sido la 184, mientras que a los 30 días ha sido la 179, ambas de la especie *C. pepo*.

Por otro lado, la accesión que menor grado de síntomas ha mostrado ha sido 256 (severidad 0) junto con 252 (severidad 0,5), tanto a los 20 y 30 días tras su trasplante, siendo ambas de la especie *C. moschata*

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Martínez et al., (2015) que detectaron que la resistencia a ToLCNDV solo se observa en las accesiones de *C. moschata*, y que las entradas de *C. pepo* son muy susceptibles a este virus. De hecho, nuestros resultados validan los obtenidos previamente, indicando que las accesiones 252 y 256 eran resistentes a ToLCNDV bajo infección natural con mosca en invernadero.

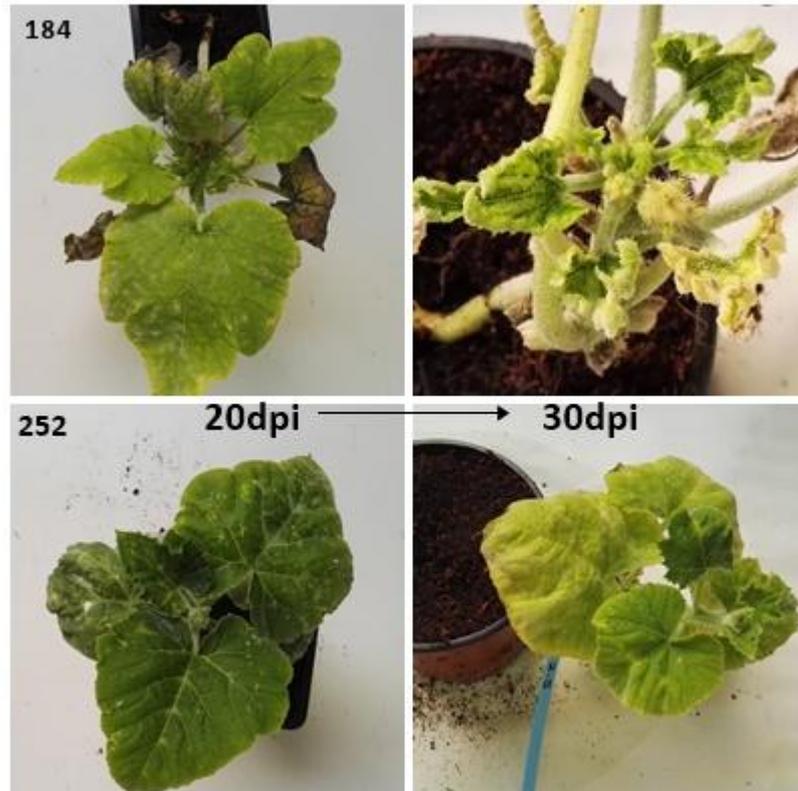


Figura 22. Evolución de la sintomatología a ToLCNDV en las accesiones 184 (*C. pepo* susceptible) y 252 (*C. moschata* tolerante) a los 20 y 30 dpi

4.2 Caracterización del vigor de las plantas inoculadas con ToLCNDV

El vigor de las plantas se valoró de 0 a 3, valorando 0 las plantas con el menor desarrollo vegetativo, y 3 aquellas plantas más vigorosas. La valoración se ha realizado en las diferentes variedades estudiadas (Figura 23).

Como podemos observar dentro de las especies de *C. pepo*, *Cocozelle* se muestra más vigorosa a los 20 que a los 30 días, mostrando un decrecimiento continuo con el paso de los días. Por el contrario, la otra especie de *C. pepo*, *Scallop* su desarrollo foliar se ha visto incrementado a los 30 días, aun así muestra un valor muy bajo en su desarrollo (Figura 23).

Dentro de las especies de *C. moschata*, las accesiones 266 y 279 muestran un desarrollo foliar muy reducido respecto a la 252 y 256, alcanzando como promedio un valor de 0,8; en un rango entre 0,4 y 1,3 (Figura 23).

Por el contrario, las otras dos accesiones de *C. moschata*, 252 y 256 se han mostrado más vigorosas destacando sobre las demás accesiones. La accesión 252 se ha mostrado más reducida a los 20 días, produciéndose un crecimiento continuo hasta los 30 días alcanzando

el valor máximo de vigor. La accesión 256 destaca frente a todas las demás, mostrándose la más vigorosa de todas las accesiones analizadas (Figura 23).

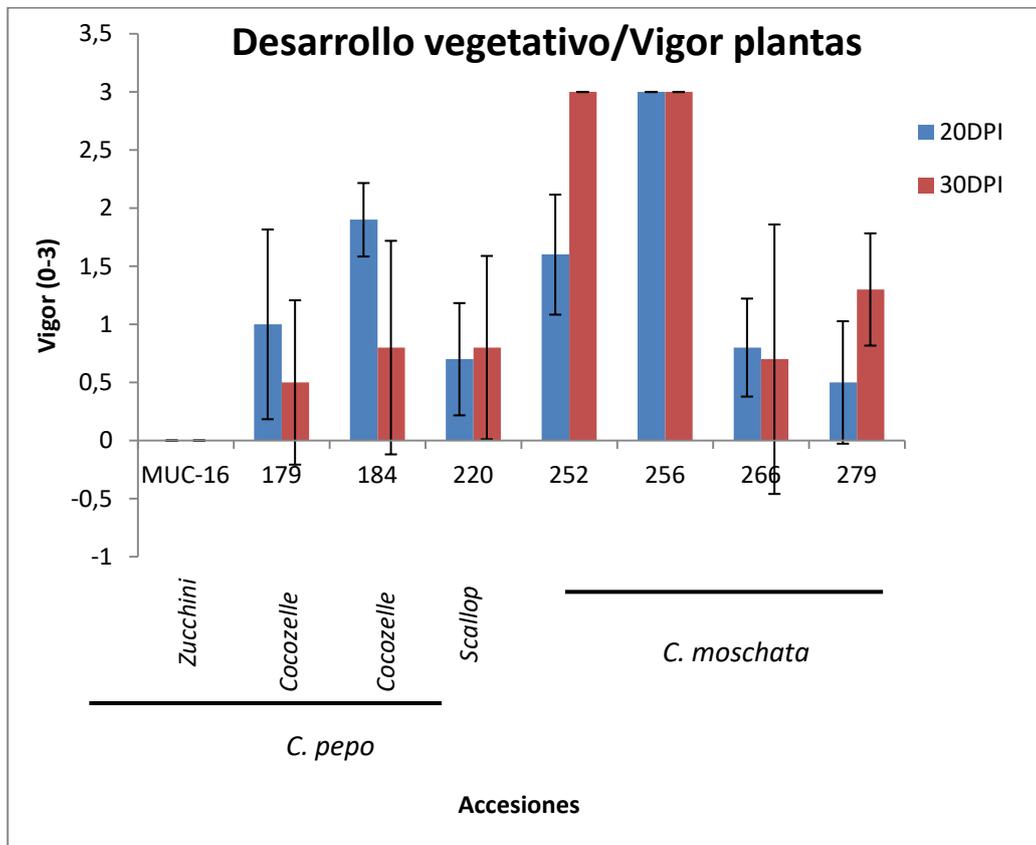


Figura 23. Desarrollo vegetativo de las plantas de diferentes accesiones de *Cucurbita* a los 20 y 30 días de su inoculación con ToLCNDV. Los datos indican el vigor medio de 10 plantas inoculadas por accesión. Las barras de error indican la desviación estándar.

Estos resultados demuestran que la resistencia de las accesiones a ToLCNDV parece estar correlacionada con el vigor de la planta. Las accesiones menos vigorosas fueron la 179 y la 279, ambas susceptibles al virus. Sin embargo, las más vigorosa fueron las accesiones 256 tanto a los 20 y 30 días, junto con la 252 que se ha visto como su crecimiento ha sido continuo con el paso de los días, posiblemente por la tolerancia al virus que presentan ambas accesiones.

Estos resultados varían con respecto a los de Martínez et al. (2015), que no encontró diferencias de vigor entre variedades resistentes y susceptibles al virus. En nuestro caso, el vigor de las variedades más resistentes (252 y 256) destaca sobre el de las demás, a excepción de la accesión 220. Estas diferencias entre ambos ensayos pueden deberse a las condiciones ambientales, debido a que el ensayo realizado por Martínez et al. (2015), fue en

invernadero mientras que el de este TFG presento condiciones ambientales controladas, siendo la luz de gran importancia en el desarrollo vegetativo.

4.3 Análisis de la acumulación del virus mediante Q-PCR

Para determinar la acumulación del virus ToLCNDV durante los días posteriores a la inoculación, se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR), analizando la acumulación del virus de todas las accesiones, y corroborando así los datos analizados de forma visual a través de la sintomatología a la infección vírica. Los detalles de estos datos se pueden consultar en el Anexo I.

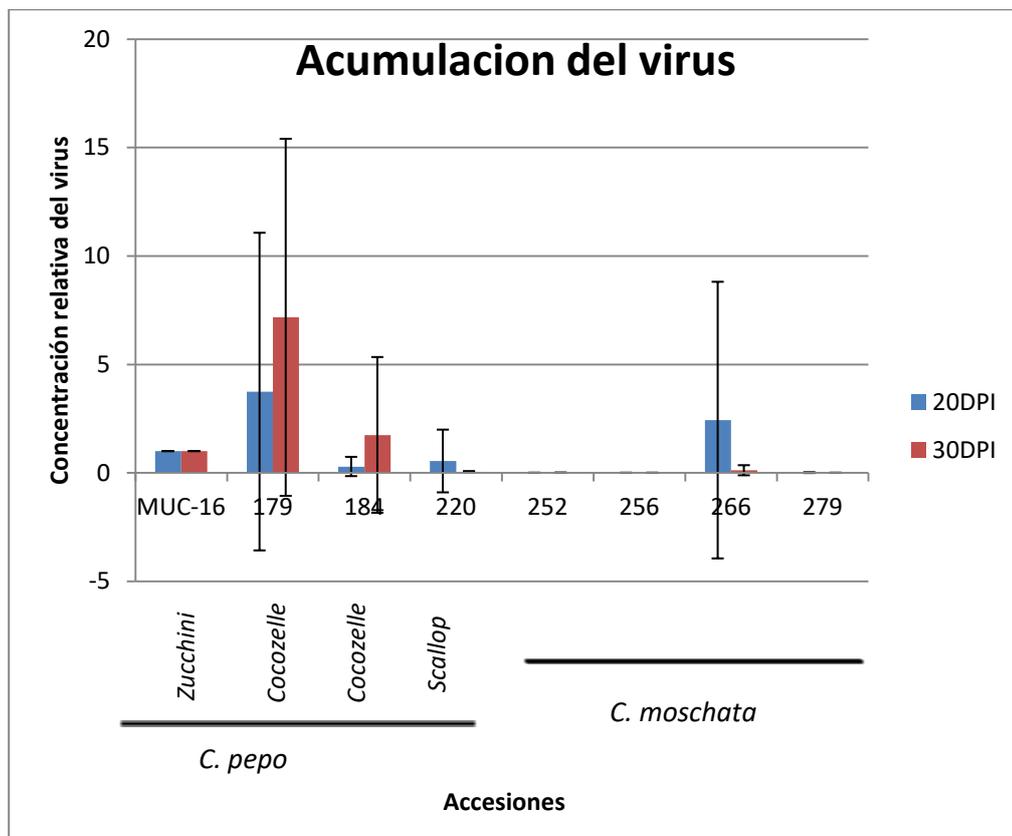


Figura 24. Acumulación relativa del DNA del virus a los 20 y 30 días después de la inoculación (dpi). Los datos indican la acumulación relativa de ToLCNDV en las diferentes accesiones respecto a MUC-16 (valor = 1). Las barras de error indican la desviación estándar

Los datos demuestran que tanto a los 20 y 30 dpi, la accesión con mayor acumulación vírica fue 179 (Figura 24), corroborando así los datos de sintomatología del virus en las hojas de las plantas de las diferentes accesiones de *Cucurbita*.

Por el contrario, las accesiones que menor acumulación de virus mostraron a los 20 y 30 dpi fueron 252 y 256, pudiendo así verificar la tolerancia que presenta estas dos accesiones al virus (Figura 24). De alguna manera, la ausencia de virus en la parte apical de

las plantas inoculadas a los 30 dpi, demuestra que las plantas asintomáticas de estas accesiones han sido capaces de restringir la multiplicación y movimiento del virus en la planta, por lo que estas accesiones las podemos considerar como resistentes al virus. Resultados similares fueron obtenidos por Martínez et al. (2016) utilizando mosca blanca para la inoculación, y el mismo método de Q-PCR que hemos utilizado en este trabajo. Estas accesiones podrían ser una fuente útil de resistencia a ToLCNDV en los futuros programas de mejora genética de calabacín y calabazas de las especies que se cruzan con *C. moschata*. El grupo BIO293 de la UAL ha iniciado ya un programa de retrocruzamiento para introgresar esta resistencia en calabacín (morfotipo *Zucchini* de *C. pepo*). Utilizando estos materiales, y en pocos años, las empresas de semillas habrán incorporado esta resistencia genética para ToLCNDV en los híbridos comerciales de calabacín.

Todas as accesiones de *C. pepo* analizadas fueron, sin embargo, bastante susceptibles al virus, acumulando también una gran cantidad de DNA vírico en los tejidos apicales de las plantas inoculadas (Figura 24). La accesión 279 que mostraba un alto nivel de severidad de síntomas, es la única que no ha mostrado un nivel alto de DNA vírico.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

PRIMERA. Se ha puesto a punto un método de inoculación mecánica y un método de PCR a tiempo real con primers de ToLCNDV que permite discriminar entre accesiones susceptibles y tolerantes al virus en plántulas de diferentes accesiones del género *Cucurbita*.

SEGUNDA. El análisis de la sintomatología del virus en hojas de plántulas inoculadas mecánicamente nos ha permitido confirmar la resistencia de dos accesiones de *Cucurbita moschata* resistentes al virus.

TERCERA. Las accesiones resistentes de *C. moschata* han mostrado un mayor vigor de plántula que las accesiones susceptibles, además de no acumular ningún DNA del virus en el ápice de las plántulas. Estas dos características, y especialmente la falta de acumulación del DNA del virus, podrían ser utilizadas para identificar y seleccionar plantas resistentes a ToLCNDV en calabacín y otras especies de *Cucurbita*.

CUARTA. Ninguna de las variedades de *C. pepo* identificadas como más tolerantes en un ensayo previo en campo, han mostrado menos síntomas o menos acumulación vírica tras la inoculación mecánica con el virus, lo que demuestra que *C. pepo* es una especie muy susceptible a ToLCNDV.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- Bisaro, D.M.; Sunter, G.; Revington, G.N.; Brought, C.L.; Hormuzdi, G.G.; Hartitz, M. 1990. Molecular genetics of tomato golden mosaic virus replication: Progress toward defining gene functions, transcription units and the origin of DNA replication. In Pirone, TP; Shawm JG. Ed. *Viral genes and plant pathogenesis*. New York, Springer-Verlag. pp 89-105.
- Bock, K.R. 1974. Maize streak virus. In: CMI/AAB Descripciones de plant viruses No. 133, New England. Commonwealth Mycology Institute. 4p.
- Briddon, R.W.; Watts, J.; Markam, P.G.; Stanley, J. 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172:628-633.
- Camacho, F. (2002) Material didactico de Horticultura Intensiva- 3a I.T.A. (Hortofruticultura y Jardinería) 2002/2003. Universidad de Almería.
- Carnide, V., & Borroso, M. (2006). Las Cucurbitáceas: bases para su mejora genética. *Horticultura Internacional* (53):16–21. Recuperado de http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rhi53/16_21.pdf
- Delgado J (1999) El cultivo de calabacin en el Levante de Almeria. *Técnicas de producción de frutas y hortalizas en los cultivos protegidos*. Ed. Instituto la Rural
- Esteras, C., Blanca, J., Roig, C., Cañizares, J., Ziarsolo, P., Monforte, A.J., Vicente-Dólera, N., Nuez, F., Gómez, P., Picó, B. (2012). Nuevas herramientas genómicas para la mejora de *Cucurbita pepo*, 41–48.
- Fauquet, C.; Fargette, D. 1990. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology, and control. *Plant Disease* 74:404-411
- Hamilton, W.D.O.; Bisaro, D.M.; Coutts, R.H.A.; Buck, K.W. 1983. Demonstration of the bipartite nature of genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research* 11:7387-7396
- Harrison, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82.
- Harrison, B.D.; Barker, H.; Bock, K.R.; Guthrie, E.J.; Meredith, G.; Atkinson, M. 1977. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* 270:760-762.
- Janssen, D.; Ruiz, L. 2014. ToLCNDV: un nuevo virus de cucurbitáceas en España transmitido por mosca blanca. Departamento de Virología, IFAPA, *La Mojonera*. *Departamento de Fitopatología*. LABCOLOR, COEXPHAL

- Juárez, M., Gosalvez, B., Hernando, Y., & Aranda, M. a. (2014). Virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV): Un nuevo virus que afecta gravemente cucurbitáceas en Almería y Murcia, 1–10.
- Knott, J. E.(1962). Handbook for vegetable growers. John Willey & Sons (Rev. pr.). New York-London-Sidney.
- Lira, R., Eguiarte, L. E., & Montes-Hernández, S. (2009). Proyecto Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros *Cucurbita* y *Sechium* que crecen y/o se cultivan en México, 107. Recuperado de http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Cucurbita%20y%20Sechium/Informe_Final/Informe%20final%20Cucurbita%20y%20Sechium.pdf
- M.A.P.A.M.A (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2017). Datos Provisionales de Hortalizas Año 2016. Recuperado de <http://www.mapama.gob.es/>
- Maroto, J.V., (2002). Horticultura herbácea especial. Ediciones Mundi prensa (5ª ed). Madrid
- Martínez, C., Manzano, S., Megías, Z., García, A., Garrido, R., Paris, H.S. and Jamilena, M. (2015). Screening of *Cucurbita* germplasm for ToLCNDV resistance under natural greenhouse conditions. Acta Hortic. 1151, 57-62 DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1151.10 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.10>
- Mena, J.D. 2010. Virus Fitopatógenos. Departamento de Protección Vegetal. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Universidad Autónoma de Sinaloa
- Mumford, D.L. 1974. Purification of beat curly top virus. Phytophathology 64:136-139.
- Navot, N.; Pichersky, E.; Zeidan, M.; Zamir, D.; Czosnek, H. 1991. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. Virology 185:151-161.
- Nee ZM (1990) The domestication of *Cucurbita* (*Cucurbitaceae*). Econ. Bot.,: 44: 56- 68
- Padidam, M.; Beachy, R.N.; y Fauquet, C.M. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. Journal of General Virology 76:249-263.
- Paris HS (1989) Historial records, origins, and development of edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). Economic Botany 43: 423-443
- Paris HS (2001) History of the cultivar- groups of *Cucurbita pepo*. Horticultural Review 25: 71-170
- Paris HS, Janick J (2005) Early evidence for the culinary use of squash flowers in Italy. Chronica Horticulturae 45: 20-21

- Paris HS, Yonash N, Portnoy V, Mozes- Daube N, Tzuri G, Katzir N (2003) Assessment of genetic
- Picó Sirvent, MB. (2013). Mejora de Cucurbitáceas por resistencia a plagas y enfermedades fúngicas. <http://hdl.handle.net/10251/29886>
- Priori D; Barbieri RL; Castro CM; Oliveira AC; Vilela JCB; Mistura CC. 2013. Diversidad genética de *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* y *C. ficifolia* empleando marcadores microsatélites. *Horticultura Brasileira* 31: 361-368
- Reche, J. (1997). Cultivo de calabacín en invernadero. Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Almería.
- Ruiz Platt, A. L. (2013). Comparación De La Partenocarpia, La Calidad Poscosecha Y La Producción De Etileno En El Fruto De Diferentes Variedades De Calabacín (*Cucurbita Pepo* L.) Morfotipo *Zucchini*, 1–128. Proyecto fin de carrera. Escuela Politécnica Superior. Universidad Almería
- Ruiz-García, ML; Simón-Martínez, A; Garcia-García, MC; Janssen, D. 2015. El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi. Almería. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. 1-21p.
- Rybicki, E.P.; Huges, F.L. 1990. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *Journal of General Virology* 71:2519-2526.
- Rybicky, E.P. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of geminiviridae. *Archives of Virology* 139:49-77.
- Sáez, C., Martínez, C., Ferriol, M., Manzano, S., Velasco, L., Jamilena, M., Picó, B. (2016). Resistance to Tomato leaf curl New Delhi virus in *Cucurbita* spp. *Annals of Applied Biology*, 169(1):91–105. <https://doi.org/10.1111/aab.12283>
- Serrano, Z. (1979). Cultivo de hortalizas en invernadero. Ed. Aedos. Barcelona.
- Wessel-Beaver, L., Cuevas, H. E., Andres, T. C., Piperno, D. R., Lebeda, A., & Paris, H. S. (2004). Genetic compatibility between *Cucurbita moschata* and *C. argyrosperma*. In *Progress in cucurbit genetics and breeding research. Proc. of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Olomouc, Czech Republic, 12-17 de julio 2004.* (p. 393-400). Palacký University in Olomouc. <http://www.cabdirect.org/abstracts/20043174427.html>

ANEXO

-ANEXO I

Tabla 5. Datos de sintomatología, vigor y acumulación del virus en todas las plantas inoculadas mecánicamente con ToLCNDV en este TFG.

ID	PLANTA	20DPI	30 DPI	20 DPI	30 DPI	20 DPI	30DPI
		EXPRESIÓN qPCR	EXPRESIÓN qPCR	SEVERIDAD (0-4)	SERVERIDA D (0-4)	VIGOR (0-3)	VIGOR (0-3)
179	1	0,07856	12,72858	2	4	1	0
179	2	22,00867	0,52851	3	-	1	0
179	3	0,72196	8,22491	3	-	1	0
179	4	0,99309		2	4	1	1
179	5	0,26243	0,05479	2	2	0	1
179	6	11,55143	-	2	-	0	0
179	7	1,81504	1,07177	2	-	2	0
179	8	0,00105	-	3	-	0	0
179	9	0,00433	20,39297	1	4	2	2
179	10	0,00002		1	4	2	1
184	1	0,00002	0,14359	2	3	2	2
184	2	0,83509	-	2	-	2	0
184	3	0,61132	8,16810	3	-	2	0
184	4	1,23114	-	3	-	2	0
184	5	0,00008	0,02401	2	2	2	2
184	6	0,07381	-	2	-	2	0
184	7	0,00016	0,28126	1	4	1	1
184	8	0,00011	0,10224	1	3	2	2
184	9	0,14161	-	3	-	2	0
184	10	0,00028	-	3	3	2	1
220	1	0,00167	0,07032	2	2	0	1
220	2	0,00107	-	2	-	0	0
220	3	4,59479	-	2	-	0	0
220	4	0,00018	0,05256	1	3	1	1
220	5	0,00010	0,07911	2	3	1	1
220	6	0,00005	0,01351	1	3	1	1
220	7	0,79554	-	2	-	1	0
220	8	0,01951	0,01910	1	3	1	2
220	9	0,00010	0,06839	1	3	1	2
220	10	0,01192	-	1	-	1	0
252	1	0,00022	0,02556	0	0	2	3
252	2	0,00006	0,02225	0	0	2	3
252	3	0,00009	0,00001	1	1	2	3
252	4	0,00016	0,00000	0	0	2	3
252	5	0,00028	0,00000	1	1	1	3
252	6	0,00002	0,00000	1	1	1	3
252	7	0,00007	0,00000	1	1	2	3
252	8	0,00186	0,00000	0	1	2	3
252	9	0,00003	0,00000	0	0	1	3
252	10	0,00006	0,00000	1	0	1	3

Evaluación de distintas variedades de *Cucurbita* para resistencia al virus ToLCNDV

266	1	0,00078	0,00000	1	0	0	2
266	2	0,00036	-	2	-	1	0
266	3	0,84675	-	2	-	1	0
266	4	0,13584	-	2	-	1	0
266	5	20,39297	-	3	-	1	0
266	6	2,90795	-	2	-	0	0
266	7	0,00036	-	4	-	1	0
266	8	0,00150	0,00001	1	0	1	2
266	9	0,00066	0,46652	1	-	1	0
266	10	0,00021	0,00000	1	0	1	3
279	1	0,00231	0,00000	1	2	0	2
279	2	0,00032	0,00000	1	2	0	1
279	3	0,00100	0,00000	2	1	1	2
279	4	0,06037	0,00000	1	2	1	1
279	5	0,00046	0,00123	1	2	1	1
279	6	0,00010	0,00009	1	4	1	1
279	7	0,00006	0,00028	1	3	1	1
279	8	0,00003	0,00419	2	3	0	1
279	9	0,00021	0,00080	1	2	0	1
279	10	0,00007	0,00015	2	1	0	2
256	1	0,00003	0,00000	0	0	3	3
256	2	0,00005	0,00000	0	0	3	3
256	3	0,00005	0,00176	0	0	3	3
256	4	0,00001	0,00000	0	0	3	3
256	5	0,00000	0,00000	0	0	3	3
256	6	0,00000	0,00032	0	0	3	3
256	7	0,00000	0,00006	0	0	3	3
256	8	0,00083	0,00145	0	0	3	3
256	9	0,00006	0,00000	0	0	3	3
256	10	0,00002	0,00035	0	0	3	3

Tabla 6. Media y desviación estándar de los datos de acumulación del virus, severidad de síntomas y vigor de las diferentes accesiones de *Cucurbita* analizadas en este TFG.

Acumulacion del DNA del virus									
MEDIA	MUC-16	179	184	220	252	256	266	279	
20DPI	1	3,74366	0,28936	0,54249	0,00029	0,00007	2,42874	0,00649	
30DPI	1	7,16692	1,74384	0,05050	0,00478	0,00033	0,11663	0,00067	
DESVIACION									
20DPI	0	7,32230	0,44410	1,44540	0,00056	0,00020	6,37771	0,01894	
30DPI	0	8,23142	3,59248	0,02789	0,01011	0,00055	0,23326	0,00130	

Severidad de sintomas									
MEDIA	MUC-16	179	184	220	252	256	266	279	
20DPI	4	2,100	2,200	1,500	0,500	0,000	1,900	1,300	
30DPI	4	3,800	3,500	3,300	0,500	0,000	2,800	2,200	
DESVIACION									
20DPI	0	0,738	0,789	0,527	0,527	0,000	0,994	0,483	
30DPI	0	0,632	0,707	0,675	0,527	0,000	1,932	0,919	

Vigor									
MEDIA	MUC-16	179	184	220	252	256	266	279	
20DPI	0	1,000	1,900	0,700	1,600	3,000	0,800	0,500	
30DPI	0	0,500	0,800	0,800	3,000	3,000	0,700	1,300	
DESVIACION									
20DPI	0	0,816	0,316	0,483	0,516	0,000	0,422	0,527	
30DPI	0	0,707	0,919	0,789	0,000	0,000	1,160	0,483	