

TRABAJO FIN DE GRADO

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Análisis genético de una nueva fuente de
resistencia al virus ToLCNDV en *Cucurbita*
moschata

Alumno/a: Ana Rodríguez López

Curso académico: 2018/2019

Modalidad: Proyecto experimental,
Área de Genética

Directores:

Dr. Manuel Jamilena Quesada,
Jonathan Romero Masegosa,

Departamento de Biología y Geología
Universidad de Almería



ÍNDICE

ÍNDICE	II
RESUMEN	IV
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia de las cucurbitáceas.....	1
1.2. Importancia del cultivo de calabacín.....	2
1.3. Virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV).....	5
1.3.1. Origen y distribución geográfica	5
1.3.2. Clasificación taxonómica	6
1.3.3. Transmisión del virus.....	8
1.3.4. Especies hospedadoras y sintomatología.....	9
1.3.5. Técnicas de diagnóstico.....	10
1.4. Búsqueda y caracterización de fuentes de resistencia a ToLCNDV en el género Cucurbita .	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Ubicación de los experimentos	14
3.2. Material vegetal	14
3.3. Condiciones y manejo del cultivo.....	14
3.4. Inoculación mecánica de ToLCNDV	15
3.4.1. Fuente de inóculo.....	15
3.4.2. Método de inoculación	15
3.5. Evaluación fenotípica	16
3.5.1. Evaluación de la severidad de la infección.....	16
3.5.2. Evaluación del vigor de la planta.....	17
3.6. Análisis de la acumulación de ToLCNDV.....	18
3.6.1. Método de extracción de ácidos nucleicos	18
3.6.2. Método de detección y cuantificación de la carga viral.....	19
3.7. Análisis estadístico de los resultados	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Comparación de la tolerancia a ToLCNDV en dos accesiones de Cucurbita moschata	21



4.1.1.	Evaluación de la severidad de los síntomas	21
4.1.2.	Evaluación del vigor.....	22
4.2.	Estudio de la herencia de la resistencia a ToLCNDV en la accesión CSV0252.....	24
4.2.1.	Evaluación de la severidad en las generaciones F1 y F2	24
4.2.2.	Determinación del modo de herencia de la resistencia.....	25
4.2.3.	Evaluación del vigor en las generaciones F1 y F2.....	26
4.3.	Análisis de la acumulación de ToLCNDV mediante qPCR.....	29
5.	CONCLUSIONES.....	31
6.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	32

RESUMEN

El virus *Tomato leaf curl New Delhi Virus* (ToLCNDV) es un begomovirus bipartito de la familia *Geminiviridae* descrito por primera vez en la India en 1995. En el año 2012, este virus fue detectado en el sureste español afectando gravemente a varios cultivos de cucurbitáceas en las provincias de Almería y Murcia. Debido a los importantes daños que este virus ocasiona en las variedades comerciales de *C. pepo*, se han buscado fuentes de resistencia a ToLCNDV en cultivares del género *Cucurbita*. En el año 2017, se identificaron varias accesiones de *Cucurbita moschata* que presentaban diferentes grados de tolerancia frente al virus ToLCNDV. En este trabajo se ha estudiado el modo de herencia de la resistencia al virus en una de las accesiones previamente identificadas como resistentes (CSV0252). Para ello, la accesión resistente CSV0252 se ha cruzado con CSV0265, una accesión de *C. moschata* susceptible al virus, obteniendo las generaciones F1 y F2. Para el estudio de la herencia, se ha considerado la severidad de la sintomatología a los 20 y 30 días después de la inoculación (dpi) en plantas inoculadas mecánicamente de las generaciones parentales, F1 y F2. El vigor de las plantas y el análisis de la acumulación vírica mediante q-PCR también han sido evaluados en este trabajo a los 20 y 30 dpi. Los resultados indican que la resistencia genética a ToLCNDV en la accesión CSV0252 de *C. moschata* está conferida por un único gen dominante. Teniendo en cuenta el nivel de acumulación del virus en el ápice de las plantas parentales, F1 y F2 cuantificado mediante q-PCR, la ausencia de síntomas en la accesión CSV0252 no parece estar relacionada con una restricción en la multiplicación del virus sino más bien por una tolerancia de la planta al virus. Dado que el resto de las resistencias descritas son recesivas, esta resistencia de CSV0252 es una nueva fuente de resistencia a ToLCNDV que puede ser incorporada a los programas de mejora genética de *C. moschata* y *C. pepo*.

ABSTRACT

Tomato leaf curl New Delhi Virus (ToLCNDV) is a bipartite begomovirus of the *Geminiviridae* family which was firstly reported in India in 1995. In 2012 this virus was detected in Southern Spain causing important damages to *Cucurbitaceae* crops in the provinces of Almería and Murcia. Due to the high impact this virus has in several commercial hybrids of *Cucurbita pepo*, different Spanish laboratories started to search for a source of natural resistance to ToLCNDV in *Cucurbita* spp. Thereafter, in 2017 several *Cucurbita moschata* accessions with different degree of tolerance towards ToLCNDV were identified. In this work, we have performed a formal genetic analysis in one of the previously identified tolerant accession (CSV0252) to study the mode of inheritance of the mentioned ToLCNDV resistance. For this purpose, CSV0252 was crossed with CSV0265, a *C. moschata* susceptible accession, generating so the F1 and F2 generations. Consequently, symptom severity was evaluated at 20 and 30 days after inoculation (dai) in mechanically inoculated plants from parental, F1 and F2 generations. Furthermore, plant vigour and a viral accumulation analysis by q-PCR were also performed at 20 and 30 dai. Results indicate that the genetic resistance to ToLCNDV in the CSV0252 accession of *C. moschata* is conferred by a single dominant gene. Considering the viral accumulation level in the apex of parental, F1 and F2 plants, quantified by qPCR, the absence of symptoms in CSV0252 accession does not seem to be related to a restriction in the virus multiplication but rather to a plant tolerance to the virus. Since the rest of resistances described up to now are recessive, the resistance of CSV0252 accession is a new



source of resistance to ToLCNDV that can be incorporated into *C. moschata* and *C. pepo* breeding programs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de las cucurbitáceas

Las cucurbitáceas (familia *Cucurbitaceae*) son una familia de plantas que comprende alrededor de 98 géneros distintos en los que se incluyen un total de 975 especies, aproximadamente (Stevens, 2001 *onwards*). Los centros de origen de las cucurbitáceas están repartidos entre el Nuevo Mundo (América) y el Viejo Mundo (África, Asia y Europa) (Esquinas-Alcázar y Gulick, 1983), como se representa en la Figura 1. Así, encontramos que especies como *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita mixta* y *Cucurbita maxima* son originarias del continente americano, mientras que otras especies pertenecientes al género *Citrullus* y *Cucumis* son originarias del Viejo Mundo (Esquinas-Alcázar y Gulick, 1983).

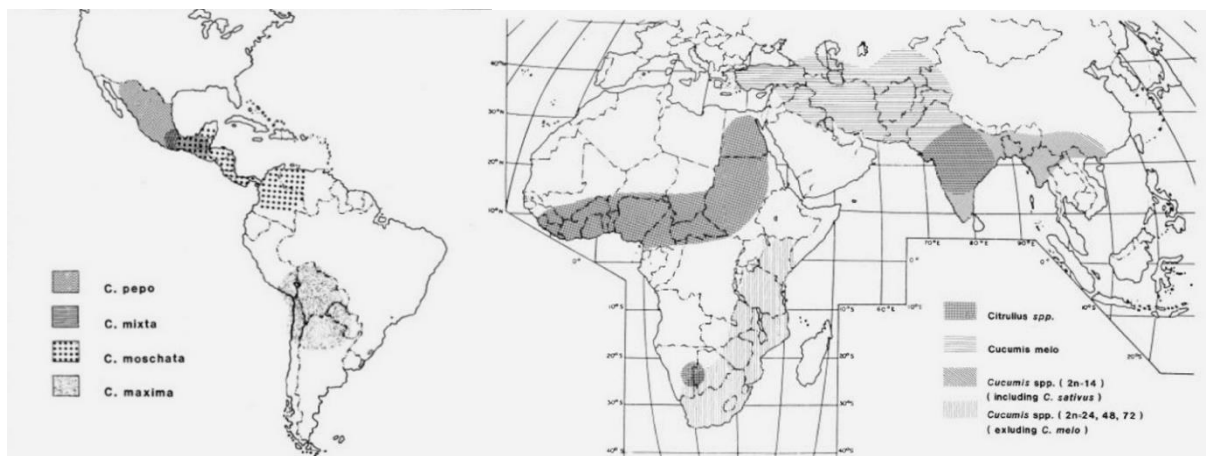


Figura 1. Centros primarios de origen de diversas especies de *Cucurbita*, *Cucumis* y *Citrullus*. (Fuente: Esquinas-Alcázar y Gulick, 1983).

En cuanto a sus características distintivas, las cucurbitáceas son plantas herbáceas, angiospermas y dicotiledóneas, que pueden ser rastreras o trepadoras gracias al desarrollo de zarcillos que les permite sujetarse a una superficie o a otros vegetales. Sus hojas son simples, lobuladas y no estipuladas, y se disponen de forma alterna. La mayoría de las especies son normalmente monoicas, pero también podemos encontrar especies dioicas y andromonoicas. Las flores masculinas poseen generalmente tres estambres, aunque pueden variar de uno a cinco; y las flores femeninas poseen un ovario ínfero que da lugar a un fruto de tipo pepónide. Todas ellas presentan una forma acampanada y una coloración blanca o amarilla. Debido a su sensibilidad a las bajas temperaturas y las heladas, el cultivo de las cucurbitáceas queda restringido a regiones cálidas, como las zonas tropicales y subtropicales.

La importancia de esta familia es múltiple, ya que su producción repercute a nivel económico, nutricional, medicinal e incluso cultural. Económicamente, el mercado de las cucurbitáceas genera elevados beneficios en el mundo. En 2017, solo en la Unión Europea, las ganancias ascendieron a un total de 2900 millones de euros en la venta de pepino, melón y otras cucurbitáceas, como vemos en la Tabla 1 (FAO, 1998 *onwards*). Desde el punto de vista nutritivo y medicinal son fuente de numerosos compuestos esenciales como vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados y minerales, entre otros, además de contener β -carotenos, licopeno y vitamina C, compuestos antioxidantes que permiten prevenir algunas enfermedades (Salama, 2006). En cuanto a su importancia cultural, el

estudio de McCreight (2017) menciona que los frutos de algunas cucurbitáceas son utilizados como ornamentales, como es el caso de las calabazas, empleadas en celebraciones como *Halloween*. Las calabazas también se han utilizado en otras culturas para crear instrumentos musicales, además de ser aprovechadas como recipientes para el almacenamiento (McCreight, 2017).

Tabla 1. Valores de venta estimados en 2017 para algunos cultivos de cucurbitáceas en la Unión Europea.

Tipo de cucurbitácea	Beneficios (millones de €)
Pepino y pepinillo	1.489,74
Melón, otros (inc. <i>Cantaloupe</i>)	319,18
Calabaza, calabacín y <i>gourds</i>	543,32
Sandía	539,66

Fuente: FAO. FAOSTAT.

Según McCreight (2017) las especies cultivadas de mayor interés comercial a nivel mundial son el pepino (*Cucumis sativus*), melón (*Cucumis melo*), sandía (*Citrullus lanatus*), calabaza y calabacín (*Cucurbita spp.*). Otras especies pertenecientes a otros géneros, como *Momordica charantia* o *Luffa ssp*, tienen importancia comercial solo en algunas zonas del mundo, principalmente en regiones de Asia (McCreight, 2017).

1.2. Importancia del cultivo de calabacín

El género *Cucurbita* incluye alrededor de 27 especies distintas que se agrupan bajo la denominación común de “calabazas” (Giner Martorell y Aguilar Olivert, 2017). Estas especies comparten una serie de características comunes, descritas en el estudio de Paris (2001): son plantas herbáceas y trepadoras que poseen largos tallos cubiertos de tricomas y provistos de zarcillos, grandes hojas palmeadas de peciolo largo, también cubiertas de tricomas, y un sistema radicular altamente ramificado. Según este estudio, la mayoría de las especies son monoicas y desarrollan flores unisexuales de color amarillo anaranjado (Figura 2).

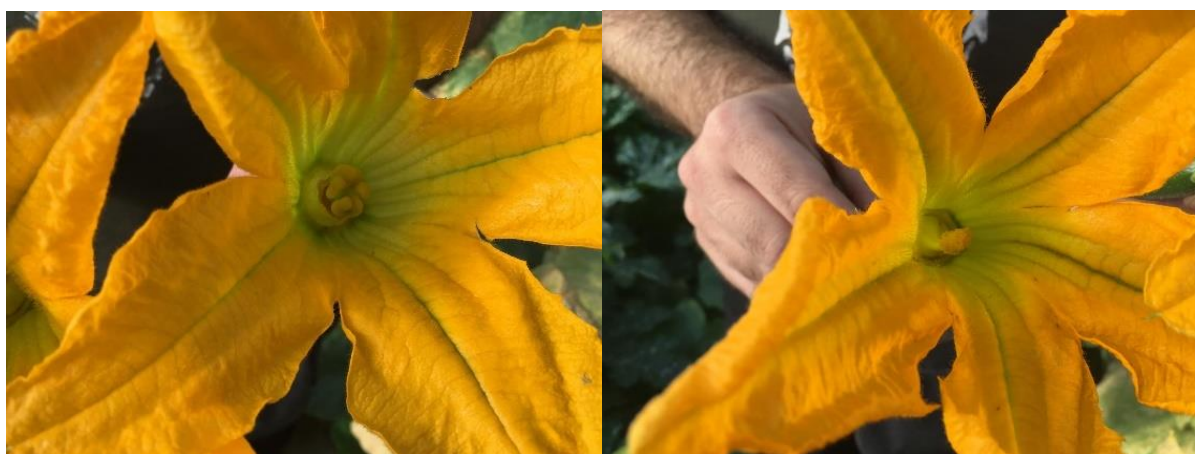


Figura 2. Flores femenina (izq.) y masculina (der.) de calabacín. Se observa el detalle de los estigmas bilobados de la flor femenina y las anteras fusionadas recubiertas de polen de la flor masculina.

En cuanto a su fruto, se desarrolla a partir del ovario ínfero de la flor femenina y existe una gran variedad de formas incluso a nivel intraespecífico, como observamos en la Figura 3, siendo este una

baya de tamaño variable cuya pulpa puede presentar distintos colores como blanco, amarillo pálido y amarillo anaranjado, entre otros.



Figura 3. Variedad de frutos obtenidos de especies del género *Cucurbita* spp. (Fuente: imágenes recuperadas de <https://www.seriousseats.com/2017/11/winter-squash-shopping-guide.html> y <https://www.smpmarketingllc.com/portfolio-view/summer-squash/>, respectivamente).

Solo cinco especies de este género son cultivadas a nivel mundial en la actualidad: *C. moschata*, *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. maxima* y *C. pepo* (OECD, 2012), siendo de especial importancia esta última.

Cucurbita pepo es la especie más polimórfica y cultivada a nivel global del género *Cucurbita* (Paris, 2001). Esta especie es, además, la que tiene mayor trascendencia económica respecto a las otras cuatro especies del género (Paris, 2001). Es originaria del Norte de México y del Sur de Norteamérica, además de ser una de las especies cultivadas más antiguas que existen (Ratnam *et al.*, 2017). Los eventos de domesticación producidos en ambas zonas fueron independientes, a partir de los cuales se originaron las dos subespecies que comprende *C. pepo*: subsp. *pepo* y subsp. *ovifera* (Carvajal Moreno, 2014). Existe una tercera subespecie, *C. pepo* subsp. *fraterna*, pero se trata de una variedad silvestre, no cultivada (OECD, 2012). Cada subespecie cultivada presenta sus propias variedades, clasificadas según la morfología de sus frutos, altamente polimórficos. Dentro de la subespecie *pepo* encontramos los morfotipos Zucchini, Cocozelle, Pumpkin y Vegetable Marrow, mientras que en la subespecie *ovifera* aparecen los morfotipos Acorn, Crookneck, Scallop y Straightneck (Figura 4).

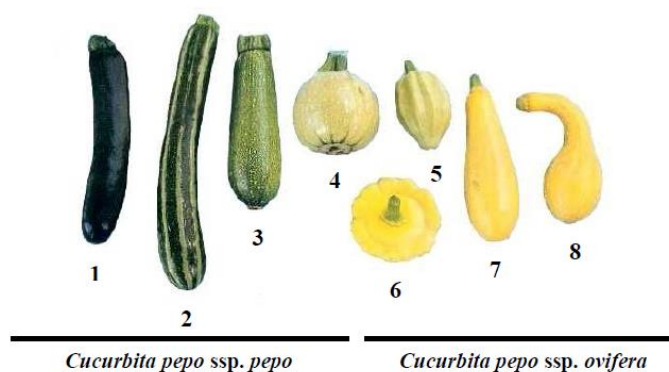


Figura 4. Frutos inmaduros de los distintos morfotipos de *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (1. Zucchini, 2. Cocozelle, 3. Vegetable Marrow y 4. Pumpkin) y *Cucurbita pepo* subsp. *ovifera* (5. Acorn, 6. Scallop, 7. Straightneck y 8. Crookneck). (Fuente: Carvajal Moreno, 2014).

El calabacín que conocemos y consumimos normalmente se corresponde con el morfotipo Zucchini, término de origen italiano que proviene de *zucca*, cuyo significado en castellano es “calabaza de verano”. Las variedades de calabacín que se cultivan actualmente son híbridos mejorados en el continente americano en los últimos 50 años, que han sido obtenidos a partir de variedades italianas (Carvajal Moreno, 2014).

En España, la importancia de este cultivo ha ido evolucionando progresivamente a lo largo de los años. En el anuario de estadística publicado por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) en 2018, se puede observar esta evolución en la superficie de cultivo dedicada al calabacín (Figura 5) y en su producción (Figura 6) desde el año 2006 hasta el 2016. A partir del año 2011 advertimos un rápido incremento tanto en la superficie cultivada como en la producción de esta hortícola.

Cuando profundizamos en la distribución de la producción de calabacín dentro del territorio español, observamos que esta se concentra principalmente en Andalucía, que en 2017 se situaba a la cabeza con un 83% de la producción nacional, según los datos provisionales recogidos por MAPAMA. Dentro de esta comunidad autónoma, la provincia de Almería es la principal productora de España debido a su suelo, clima y tradición de cultivo, además de ser también la principal exportadora (Carvajal Moreno, 2014). En ella, el calabacín es uno de los cultivos hortícolas más importantes, cuya producción ascendió en 2017 a 449.000 toneladas (un 92% del total producido en Andalucía), según los datos provisionales proporcionados por MAPAMA. La mayor parte de esta producción se destina a la exportación, siendo los principales países importadores Francia, Portugal e Italia (FEPEX, 2018).

Que la mayor parte de la producción de calabacín y su exportación se concentre en Almería implica que esta provincia tiene una gran relevancia económica a nivel nacional. En 2017, solo el beneficio de las exportaciones ascendió a un total de 244,9 millones de euros, cubriendo un 55% de la cuota nacional en lo que respecta a este cultivo (FEPEX, 2018).

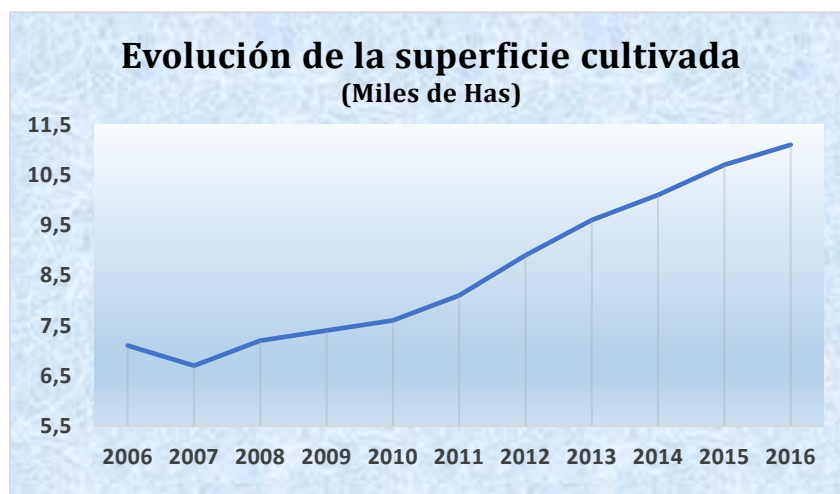


Figura 5. Evolución de la superficie destinada al cultivo de calabacín en España, en miles de hectáreas, entre el año 2006 y 2016. (Fuente: MAPAMA, Anuario de estadística 2017).

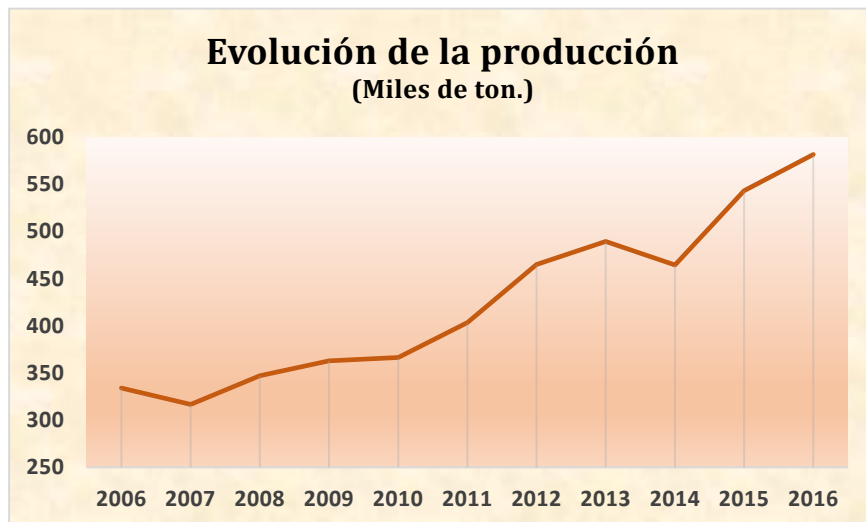


Figura 6. Evolución de la producción de calabacín en España, en miles de toneladas, entre el año 2006 y 2016. (Fuente: MAPAMA, Anuario de estadística 2017)

1.3. Virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)

Todo lo descrito anteriormente remarca la importancia y la necesidad de controlar las distintas enfermedades que afectan al calabacín. Bacterias, hongos, nematodos y virus son causantes de múltiples enfermedades en los cultivos vegetales. Estos últimos son el segundo grupo de patógenos de plantas, después de los hongos, en cuanto al impacto y al número de enfermedades que causan (García y Fraile, 2005). Las pérdidas económicas debidas a virosis en cultivos intensivos de hortalizas y frutales son mayores que las producidas por insectos, malas hierbas y enfermedades fúngicas y bacterianas, debido a que la tasa de éxito del control de la enfermedad vírica es menor que para otros patógenos (García y Fraile, 2005).

Entre los virus que causan los problemas más graves en el cultivo de cucurbitáceas encontramos CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*), CVYV (*Cucumber vein yellowing virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), CYSDV (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*) y ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*), entre otros (Juárez *et al.*, 2013). Recientemente, un nuevo virus de cucurbitáceas ha sido descubierto en España: el virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi, ToLCNDV. Las pérdidas ocasionadas por este nuevo virus emergente y la falta de medidas de control totalmente eficientes reflejan la urgente necesidad de buscar y estudiar resistencias genéticas frente a esta enfermedad.

1.3.1. Origen y distribución geográfica

Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV), o virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi, fue descrito por primera vez en 1995, en el norte de la India, como una variante del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (Padidam *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1995). Aunque en un principio este virus estaba limitado geográficamente a la India, con el paso del tiempo este ha ido extendiéndose hacia otras regiones asiáticas como Pakistán, Bangladesh, Tailandia, Indonesia, Irán, Taiwán, Filipinas y China (Simón *et al.*, 2018; Otazo González y Espino de Paz, 2018). En el año 2012, este virus fue detectado en la provincia de Murcia (sureste de España), y más tarde, en el año 2013, en Almería y Málaga (Juárez *et al.*, 2014; Otazo González y Espino de Paz, 2018). En el año 2015 ya se había extendido por la costa mediterránea hasta las provincias de Tarragona, Ciudad Real y la comunidad de Extremadura, así como a la isla de Mallorca, Italia y Túnez (Otazo González y Espino de Paz, 2018). En

el año 2017 se detecta por primera vez en Marruecos y, en 2018, es diagnosticado en las Islas Canarias, según los datos proporcionados por Otazo González y Espino de Paz (2018).

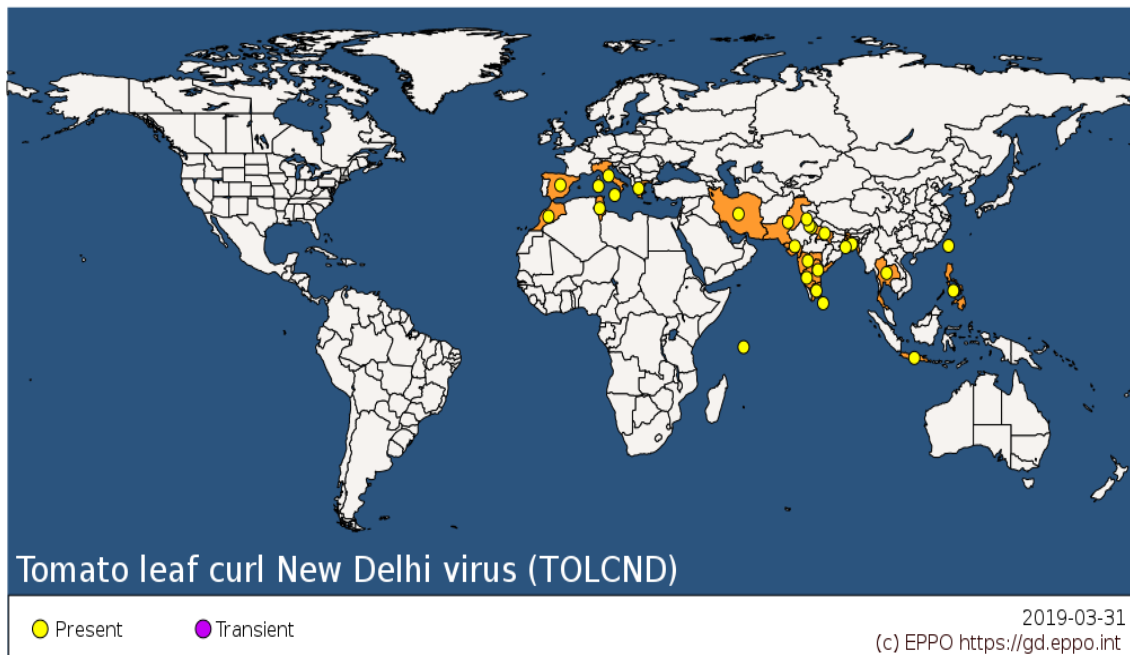


Figura 7. Distribución geográfica del virus ToLCNDV. (Fuente: imagen extraída de EPPO Global Database)

1.3.2. Clasificación taxonómica

El virus ToLCNDV pertenece a la familia *Geminiviridae*. Los geminivirus constituyen la familia de virus fitopatógenos más grande y diversa de la naturaleza, incluidos dentro del grupo II de la clasificación de Baltimore. Su genoma está compuesto por ADN monocatenario circular que debe introducirse en el interior de los núcleos de las células vegetales infectadas para poder replicarse, usando para ello moléculas de ADN de doble cadena como intermediarias (Zúñiga-Vega y Ramírez, 2002). El nombre “geminivirus” procede del latín *geminus* (= gemelos), y hace referencia a la estructura del virión, formado por dos icosaedros unidos a través de una de sus caras (Ramírez y Rivera-Bustamante, 1996; Figura 8).

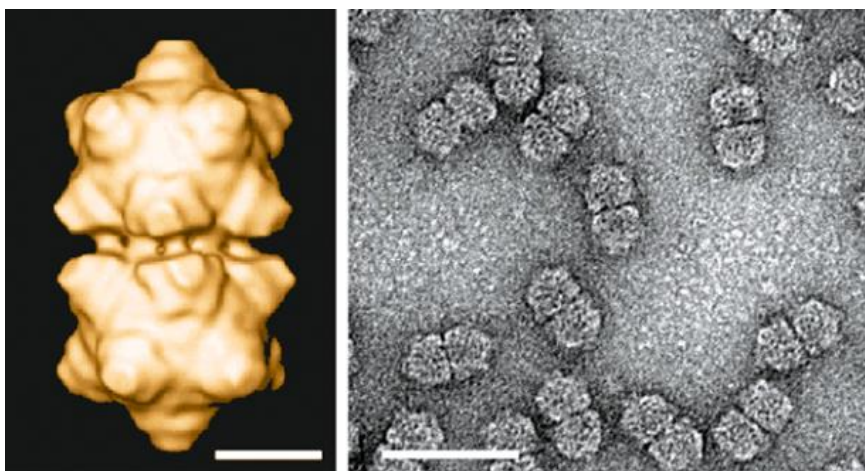


Figura 8. Morfología de los viriones de la familia *Geminiviridae*. A la izquierda se muestra una simulación del virus *Maize Streak Virus* (MSV). A la derecha se observa una fotografía al microscopio electrónico de partículas virales geminadas. (Fuente: Zhang et al., 2001).

Cada unidad icosaédrica está compuesta por 110 subunidades de capsómeros (proteínas de cubierta), cada una con un peso molecular de entre 29 y 30 kD (Zúñiga-Vega y Ramírez, 2002). El virión puede contener una o dos moléculas de ADN, denominándose virus monopartitos y bipartitos, respectivamente. Las moléculas de los virus bipartitos reciben el nombre de DNA-A y DNA-B, que son de tamaño similar (aproximadamente 2,6 kb) y presentan una constitución genética diferente a excepción de una región de 200 pb, que recibe el nombre de región común (Ramírez y Rivera-Bustamante, 1996).

Dentro de la familia *Geminiviridae* podemos encontrar nueve géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocovirus* y *Turncurtovirus* (Zerbini *et al.*, 2017), siendo el género *Begomovirus* el que engloba a la mayoría de los virus fitopatógenos que afectan a los cultivos hortícolas (Pacheco Vinaroz, 2015). El virus ToLCNDV se incluye dentro de este género.

Los begomovirus pueden presentar genomas monopartitos y bipartitos, siendo mayoritarios estos últimos. El virus ToLCNDV posee una organización genómica bipartita (Simón *et al.*, 2018). Cada una de las moléculas de ADN de estos virus tienen asociada una función concreta:

- La molécula DNA-A contiene los genes que codifican para proteínas implicadas en la encapsidación del virus, replicación del material genético, potenciación de la replicación y expresión de síntomas y movimiento a través de la planta (Malathi, 2017).
- La molécula de DNA-B contiene genes implicados en el movimiento célula a célula del virus en la planta hospedadora y en el transporte del ADN viral entre el citoplasma y el núcleo (Malathi, 2017).

La región común presente en ambas moléculas es necesaria para iniciar la replicación. Por otro lado, las dos moléculas son interdependientes: el DNA-A depende de DNA-B para el movimiento intra e intercelular, y el DNA-B depende de DNA-A para la replicación y encapsidación (Malathi, 2017).

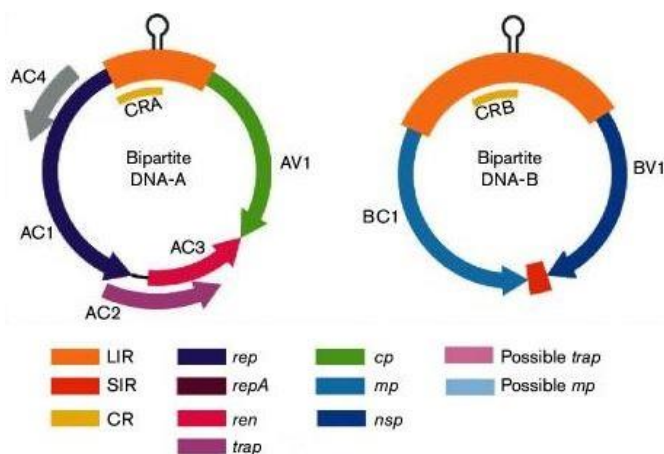


Figura 9. Organización genómica de ToLCNDV (género *Begomovirus*). (Fuente: Zerbini *et al.*, 2017).

Según Simón *et al.* (2018), los últimos estudios realizados sugieren que la cepa de ToLCNDV encontrada en España es diferente a la que surgió originalmente en el norte de India. Esta nueva cepa, denominada ToLCNDV-ES y surgida en el oeste del Mediterráneo, es la causante de la aparición de los síntomas en los cultivos de cucurbitáceas españoles (Moriones *et al.*, 2017; Simón *et al.*, 2018).

1.3.3. Transmisión del virus

El virus del rizado de la hoja de tomate de Nueva Delhi, al igual que otros begomovirus, se transmite de forma natural a través del vector *Bemisia tabaci* (Figura 10), conocida comúnmente como mosca blanca del tabaco (Chang *et al.*, 2010; Sohrab *et al.*, 2013a; López *et al.*, 2015). La transmisión a través de este vector se produce de forma persistente, es decir, ocurre durante toda la vida del insecto, ya que el virus permanece viable en su organismo durante más de 20 días, lo que coincide aproximadamente con la duración de un adulto de *B. tabaci* (Janssen y Ruíz, 2014). La transmisión es también circulativa: cuando los estados larvarios y adultos del vector se alimentan del floema de plantas infectadas por ToLCNDV, el virus avanza a través del aparato digestivo hasta el intestino, donde es incorporado a la hemolinfa del insecto, transportándose al conducto y glándulas salivales, en las que se acumula en grandes cantidades (Whitfield *et al.*, 2015; Figura 10). Cuando los vectores infectados se alimentan de una planta sana, inyectan mediante su estilete los viriones presentes en su saliva directamente en su sistema vascular, produciéndose la infección (Navas-Castillo *et al.*, 2011).

Distintos estudios han determinado que la eficiencia de transmisión del virus por el vector *B. tabaci* es muy alta: Sohrab y colaboradores (2013a) describieron una tasa de infección de hasta un 90 % en *Luffa cylindrica*, haciendo uso de una sola mosca blanca virulífera. Un estudio del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) ha descrito una tasa del 95,7 % de infección en calabacín, haciendo uso de un solo insecto (Janssen *et al.*, 2014). Esta transmisión es, además, muy rápida: tras periodos de alimentación de entre 10 y 30 minutos el virus puede acceder a la planta y ocasionar la infección de forma efectiva (Téllez *et al.*, 2017). Este corto periodo de inoculación hace que el control de la enfermedad mediante el uso de pesticidas contra el vector no sea totalmente eficaz (Téllez *et al.*, 2017).

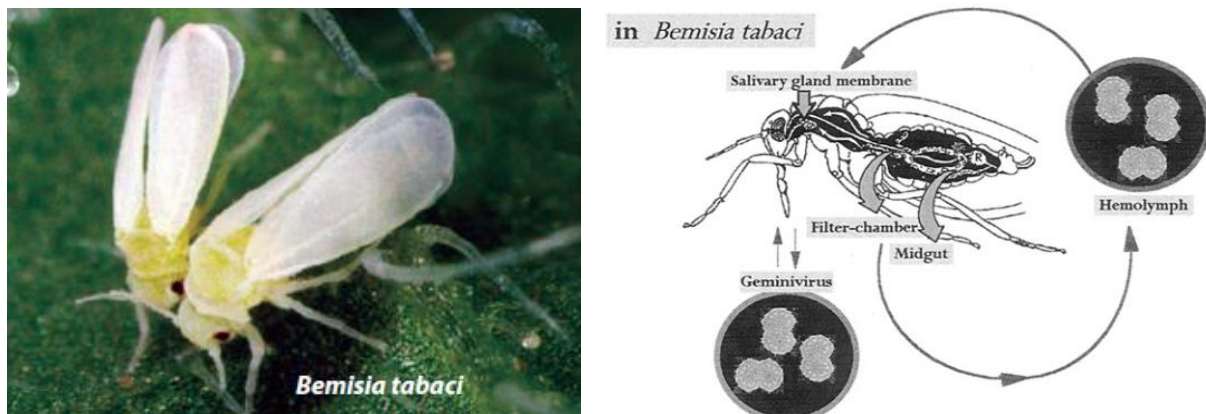


Figura 10. Izquierda: adultos de *Bemisia tabaci* (Fuente: Navas-Castillo *et al.*, 2011). Derecha: esquema del movimiento de los *Begomovirus* en el organismo de *B. tabaci* (Fuente: Hunter *et al.*, 1998).

Se han desarrollado, por otra parte, protocolos de inoculación mecánica artificial para identificar posibles resistencias a ToLCNDV (Chang *et al.*, 2010; Sohrab *et al.*, 2013a; López *et al.*, 2015). La técnica más utilizada para realizar estas inoculaciones es la transmisión mediante savia procedente de una planta infectada (Sohrab *et al.*, 2013a). Sin embargo, no todas las especies son susceptibles de ser inoculadas mediante esta técnica (López *et al.*, 2015). Además, la efectividad del método y las tasas de infección dependen de distintos factores, como la fuente utilizada y su edad, la temperatura, el buffer empleado, la estación del año y el genotipo de la planta, entre otros (Sohrab *et al.*, 2013b).

1.3.4. Especies hospedadoras y sintomatología

Actualmente se conocen un total de 43 especies que pueden ser infectadas por ToLCNDV, pertenecientes a las familias *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae* y *Malvaceae*, entre otras (Moriones *et al.*, 2017). Es, hasta la fecha, el único begomovirus bipartito capaz de causar enfermedad en plantas pertenecientes a diferentes familias (Moriones *et al.*, 2017).

En su origen, la gama de huéspedes de ToLCNDV parecía estar más limitada a algunas especies de solanáceas, como el tomate (Padidam *et al.*, 1995), la patata (Usharani *et al.*, 2004), el pimiento (Hussain *et al.*, 2004) y la berenjena (Pratap *et al.*, 2011). Sin embargo, años después, este virus ha sido detectado también en especies de cucurbitáceas como calabacín, pepino, melón, calabaza y sandía, produciendo graves pérdidas económicas (Ruíz *et al.*, 2017). El estudio de Simón *et al.* (2018) sugiere que el aislado español, ToLCNDV-ES, afecta principalmente a cucurbitáceas, siendo la infectividad en solanáceas menor. Se cree que esto es debido a la adaptación del virus a nuevos huéspedes (cucurbitáceas) y a una nueva región geográfica (Simón *et al.*, 2018).

En cuanto a la sintomatología ocasionada por ToLCNDV, podemos encontrar un cuadro sintomático común en las especies infectadas. La aparición de mosaicos, enrollamiento y abullonamiento de las hojas jóvenes, la parada del crecimiento, entrenudos cortos y desarrollo de frutos de piel rugosa son algunos de los síntomas que se observan en estas especies (Font y Alfaro-Fernández, 2014).

En España y los países de la cuenca Mediterránea, los mayores daños causados por el virus pueden observarse en calabacín (*Cucurbita pepo*) (Téllez *et al.*, 2017; Otazo González y Espino de Paz, 2018). La sintomatología desarrollada en calabacín es ligeramente distinta dependiendo de la etapa del cultivo en la que se produce la infección por ToLCNDV (Otazo González y Espino de Paz, 2018):

- Cuando la infección es temprana y ocurre durante las primeras semanas del desarrollo, los síntomas son muy intensos. Las hojas se rizan y se curvan hacia el envés o el haz, a lo largo del nervio foliar principal, se tornan cloróticas y reducen su tamaño (Font y Alfaro-Fernández, 2014; Otazo González y Espino de Paz, 2018). El crecimiento de la planta se detiene, lo que impide la formación de frutos (Font y Alfaro-Fernández, 2014). En la Figura 11 se puede observar la sintomatología descrita.



Figura 11. Síntomas en calabacín durante las primeras semanas del desarrollo. (Fuente: fotografía cedida por Jonathan Romero Masegosa).

- Si la infección ocurre en plantas de mayor edad, de entre dos y cuatro semanas, se observa el acucharamiento de las hojas más jóvenes, acortamiento de los entrenudos, aparición de amarillos intensos, clorosis internervial y deformaciones en brotes y hojas que pueden evolucionar hacia un mosaico abullonado (Figura 12) (Pacheco Vinaroz, 2015; Otazo González y Espino de Paz, 2018).



Figura 12. Síntomas en calabacín de entre dos y cuatro semanas. (Fuente: fotografía cedida por Jonathan Romero Masegosa).

- En plantas adultas, completamente desarrolladas, los síntomas foliares se mantienen y en los frutos aparece desde un rizado suave en la piel hasta intensas rugosidades y abullonados (Otazo González y Espino de Paz, 2018). Finalmente, los frutos amarillean y pueden rajarse (Pacheco Vinaroz, 2015). Todo ello puede apreciarse en la Figura 13.



Figura 13. Síntomas de la infección en plantas adultas de calabacín. A la izquierda se muestra un aborto de fruto en el que se aprecian los síntomas típicos de la infección por ToLCNDV. A la derecha se muestra una planta adulta infectada por el virus (Fuente: fotografías cedidas por Jonathan Romero Masegosa).

1.3.5. Técnicas de diagnóstico

Distintas técnicas pueden ser empleadas para detectar la presencia de ToLCNDV en el tejido vegetal de la especie infectada. Estas pueden clasificarse en técnicas serológicas y moleculares.

TÉCNICAS SEROLÓGICAS

Los ensayos ELISA, del inglés *Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay*, y sus variantes, pertenecen a este grupo. Estos se basan en la detección de las proteínas virales de cubierta mediante anticuerpos específicos unidos a enzimas o a determinados fluoróforos (Viet Ha, 2007).

Esta técnica no ha sido muy utilizada para la detección de begomovirus debido a varias razones: 1) las proteínas virales son poco inmunogénicas, lo que dificulta su interacción con el anticuerpo específico,

2) la purificación de estas a partir del material vegetal es difícil y, 3) su concentración en los tejidos vegetales suele ser baja o moderada, por lo que la sensibilidad del método puede no ser adecuada (Picó, *et al.*, 1996; Harrison, *et al.*, 2002). Por otro lado, la alta homología de las proteínas de cubierta de distintos begomovirus puede dar lugar a reacciones cruzadas entre los anticuerpos monoclonales y policlonales, lo que dificulta aún más la detección (Harrison *et al.*, 2002; Viet Ha, 2007).

A pesar de estos limitantes, distintas casas comerciales han desarrollado antisueros que permiten detectar la presencia de ToLCNDV en tejidos infectados, aunque el método parece no ser adecuado para algunos cultivos, como pepino, donde la sensibilidad de la técnica no es apropiada debido probablemente a la baja concentración de viriones en los tejidos (Figàs *et al.*, 2017). Sin embargo, el ensayo ELISA, haciendo uso de estos antisueros comerciales, es adecuado para calabacín y melón (Figàs *et al.*, 2017).

TÉCNICAS MOLECULARES

Dentro de este grupo destacan la hibridación molecular y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las técnicas de hibridación han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de virus en plantas (Viet Ha, 2007). Se basan en el emparejamiento de bases entre los ácidos nucleicos virales y sondas marcadas sintetizadas *in vitro*, cuyas secuencias son complementarias. Distintos métodos de hibridación molecular han sido utilizados para el diagnóstico de geminivirus: Southern-Blot, Dot-Blot, Squash-Blot y Tissue Printing (Viet Ha, 2007; Ulate, 2017; Picó *et al.*, 1996; Simón *et al.*, 2018). La hibridación tipo Southern-Blot fue utilizada por Padidam *et al.* (1995) para la detección inicial de ToLCNDV en muestras infectadas. Asimismo, se ha utilizado para investigar la presencia de virus en el vector (Ghanim *et al.*, 1998) y estudiar las funciones de los genes (Padidam *et al.*, 1996), entre otras aplicaciones. Se trata de técnicas sencillas, altamente sensibles y de bajo coste, de gran utilidad cuando se requiere diagnosticar y detectar virus en un gran número de muestras (Picó *et al.*, 1996).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada durante los años 80 por Mullis *et al.* (1986), permite la amplificación de una secuencia concreta de nucleótidos mediante el uso de cebadores específicos que flanquean la región de interés. Esta técnica es muy utilizada en el diagnóstico y detección de virus fitopatógenos debido a su rapidez, sensibilidad, especificidad y confiabilidad, siendo su principal desventaja la sensibilidad a contaminantes (Henson y French, 1993). La PCR a tiempo real (qPCR) es una variante de la PCR convencional y permite cuantificar la carga viral presente en una muestra gracias a la emisión de fluorescencia producida durante la amplificación. La especificidad y sensibilidad de este método es mayor a todos los descritos anteriormente (Pérfarres *et al.*, 2011), lo que lo convierten en una herramienta de diagnóstico muy potente, siendo su principal desventaja su elevado coste.

El virus ToLCNDV puede ser detectado mediante las técnicas moleculares descritas anteriormente. El desarrollo de sondas marcadas (para los protocolos de hibridación molecular) y de cebadores específicos (para el análisis por PCR y q-PCR) se realiza para secuencias concretas de cualquiera de las dos moléculas de ADN de su genoma bipartito: el DNA-A y el DNA-B (Chang *et al.*, 2010; López *et al.*, 2015). Para el caso de la qPCR convencional, la secuenciación de los productos de amplificación es necesaria para confirmar la presencia del virus en las muestras vegetales (López *et al.*, 2015).

1.4. Búsqueda y caracterización de fuentes de resistencia a ToLCNDV en el género *Cucurbita*

La diversidad genética puede ser definida, en un sentido amplio, como la variación de las características genéticas dentro y entre especies (Caruso, Broglia y Pocovi, 2015). Conservar esta diversidad permite a las especies mantener su potencial para poder sobrevivir y adaptarse a las condiciones cambiantes del medio (Caruso *et al.*, 2015). Los bancos de germoplasma son instituciones encargadas de mantener y preservar esta variabilidad genética en forma de recursos fitogenéticos (semillas, tubérculos, esquejes, explantes *in vitro*, etc.), promoviendo su utilización en programas de mejora genética de todo el mundo.

Uno de los principales objetivos de la mejora genética vegetal es desarrollar cultivares resistentes a enfermedades ocasionadas por agentes patógenos. Para ello es necesario tener acceso a las colecciones de recursos fitogenéticos de los bancos de germoplasma, y que estos recursos estén relacionados con la especie de interés que se desea mejorar, ya que la cruzabilidad y proximidad genética entre las especies son factores clave a la hora de utilizar las fuentes de resistencia (Mantilla, 2018).

Anteriormente se ha destacado la importancia del cultivo de calabacín en la provincia de Almería, lo que hace que la búsqueda de resistencias frente a enfermedades, principalmente víricas, en este cultivo sea una prioridad. En concreto, desde la detección del virus ToLCNDV en 2013 en la provincia, la identificación de fuentes de resistencia frente a este fitopatógeno se ha convertido en un objetivo prioritario para los programas de mejora de las especies del género *Cucurbita* (Martínez *et al.*, 2017). Sáez *et al.* (2016) realizaron un estudio para identificar el desarrollo de resistencia en especies de este género, haciendo uso de 110 accesiones procedentes de distintos bancos de germoplasma entre las que se encontraban variedades tanto cultivadas como silvestres. Aunque todas las accesiones de *Cucurbita pepo* evaluadas resultaron ser susceptibles, identificaron cuatro accesiones de *Cucurbita moschata* que mostraban resistencia frente a ToLCNDV. La diversidad natural y la gran variabilidad presente en el género *Cucurbita* fue clave para identificar estas fuentes de tolerancia (Sáez *et al.*, 2016). En estas variedades se estudió la acumulación del virus mediante q-PCR llegando a la conclusión de que el virus se acumula mucho más en *C. pepo* que en *C. moschata*; la carga viral de las accesiones tolerantes de *C. moschata* fue menor que la observada en los cultivares susceptibles (Sáez *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2017).

C. moschata ya ha sido anteriormente descrita como una fuente de resistencia frente a otros virus, incluyendo ZYMV, WMV, CMV y PRSV-W (Brown *et al.*, 2003; Paris y Kabelka, 2009). La ausencia de resistencias a virus en *C. pepo* convierte a *C. moschata* en una oportunidad para la introgresión de caracteres, pues se trata de especies parcialmente cruzables (Whitaker y Robinson, 1986; Paris, 2008), lo que permitiría la obtención de híbridos interespecíficos a partir de los cuales se podrían transferir características de interés. Sin embargo, antes de llevar a cabo la introgresión de un carácter es necesario conocer su modo de herencia mediante la obtención de poblaciones segregantes (Sáez *et al.*, 2016; Sáez *et al.*, 2017a; Martínez *et al.*, 2017), de manera que puedan desarrollarse programas de mejora genética adecuados y exitosos.

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Confirmar la resistencia de la accesión CSV0252 de *C. moschata* y la susceptibilidad de la accesión CSV0265 descritas por Martínez *et al.* (2017), mediante la evaluación de la sintomatología observada tras la inoculación mecánica de ToLCNDV.
2. Determinar el modo de herencia de la resistencia de la accesión CSV0252, evaluando la severidad de la sintomatología mostrada por las generaciones F1 y F2 del cruzamiento CSV0252 x CSV0265.
3. Utilizar la PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR) para evaluar la carga vírica de ToLCNDV en los tejidos de la planta inoculadas, determinando la correlación entre la acumulación del virus y la sintomatología en las plantas parentales, F1 y F2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de los experimentos

La siembra y crecimiento de las plantas de *Cucurbita moschata*, así como la inoculación mecánica de las mismas con el virus ToLCNDV y la evaluación fenotípica, fueron llevados a cabo en la Finca Experimental UAL-Anecoop, ubicada en Paraje “Los Goterones”, s/n, Polígono 24, Parcela 281, Retamar (Almería, España). La extracción de ADN del tejido vegetal y la detección del virus mediante qPCR se realizó en el laboratorio del grupo de investigación de “Genética de Hortícolas” (Grupo BIO-293), situado en la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Almería.



Figura 14. Ubicación de la Finca Experimental UAL-Anecoop.

3.2. Material vegetal

Para la realización del experimento se hizo uso de dos accesiones de la especie *Cucurbita moschata* procedentes del Newe Ya’ar Research Centre de Israel, utilizadas anteriormente en un estudio realizado por Martínez *et al.* (2017): CSV0265 y CSV0252, descritas como susceptible y tolerante al virus ToLCNDV, respectivamente.

Para el estudio de la herencia de la resistencia se utilizaron como parentales a CSV0252 y CSV0265 y semillas de la primera generación filial (F1) procedente del cruce CSV0252 x CSV0265, y de la segunda generación filial (F2), procedente de la autofecundación de plantas F1. Ambas generaciones habían sido obtenidas previamente por el grupo de investigación “Genética de Hortícolas” (BIO-293) de la Universidad de Almería.

3.3. Condiciones y manejo del cultivo

Las semillas de las accesiones CSV0265 y CSV0252, y de la primera y segunda generación, fueron sembradas de manera manual en bandejas de 54 alveolos (Figura 15), utilizando fibra de coco como sustrato. Se dispersó vermiculita por la superficie para mantener la humedad del mismo.

Las bandejas fueron introducidas en una cámara climática para la germinación y crecimiento de plantas (fitotrón), donde las condiciones de cultivo podían ser controladas, evitando además problemas de contaminación producida por hongos fitopatógenos e insectos vectores de otros virus. La temperatura y humedad de la cámara se modificaba en cuatro horas distintas del día (Tabla 2). En cuanto a la luz, se estableció un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

Tabla 2. Valores impuestos de temperatura (°C) y humedad (%) en la cámara a lo largo del día.

Hora	Temperatura	Porcentaje de Humedad
7:00	25°C	66%
9:00	26°C	66%
19:00	25°C	60%
23:00	19°C	60%

Durante dos días, las bandejas se cubrieron para permanecer en oscuridad completa, con el fin de forzar y sincronizar la germinación de las semillas, tras los cuales fueron destapadas. Cuando las plantas desarrollaron la primera hoja verdadera, y esta se encontraba totalmente expandida, fueron trasplantadas a maceteros individuales para su inoculación (Figura 15).



Figura 15. A la izquierda se muestran las plantas dispuestas en una bandeja de corcho de 54 alveolos. A la derecha se puede observar el tipo de macetero utilizado para el trasplante y una planta trasplantada. Se aprecia que la primera hoja verdadera se encuentra totalmente desarrollada y expandida.

Durante todo el transcurso del experimento las plantas fueron regadas cada dos días con solución nutritiva, constituida por 0,6 g de abono por litro de solución. El abono utilizado contenía un 10% de nitrógeno, 50% de fósforo y 10% de potasio.

3.4. Inoculación mecánica de ToLCNDV

3.4.1. Fuente de inóculo

Plantas inoculadas mecánicamente por el grupo BIO-293 de la accesión susceptible MUC-16, perteneciente a la especie *Cucurbita pepo*, fueron utilizadas en el experimento como fuente de inóculo.

3.4.2. Método de inoculación

La inoculación mecánica de todas las plantas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por López *et al.* (2015), un día después de su trasplante. El *buffer* de inoculación empleado contenía una concentración de 50 mM de tampón fosfato potásico (pH 8), 1% de polivinilpirrolidona, 1% de polietilenglicol 6000, 10 mM de β -mercaptoetanol y 1% de carbón activo.

Los pasos seguidos para la inoculación fueron:

- 1) Obtención de material vegetal infectado únicamente por ToLCNDV.

- 2) Maceración del tejido junto con el buffer de inoculación, en una proporción 1:4 (peso:volumen), en un mortero mantenido en hielo.
- 3) Adición de carborundum (600 mesh) sobre un cotiledón y la primera hoja verdadera expandida para generar heridas por donde el virus pudiera tener acceso al sistema vascular de la planta sana.
- 4) Aplicación de la mezcla homogeneizada sobre las hojas con la ayuda de un bastoncillo.

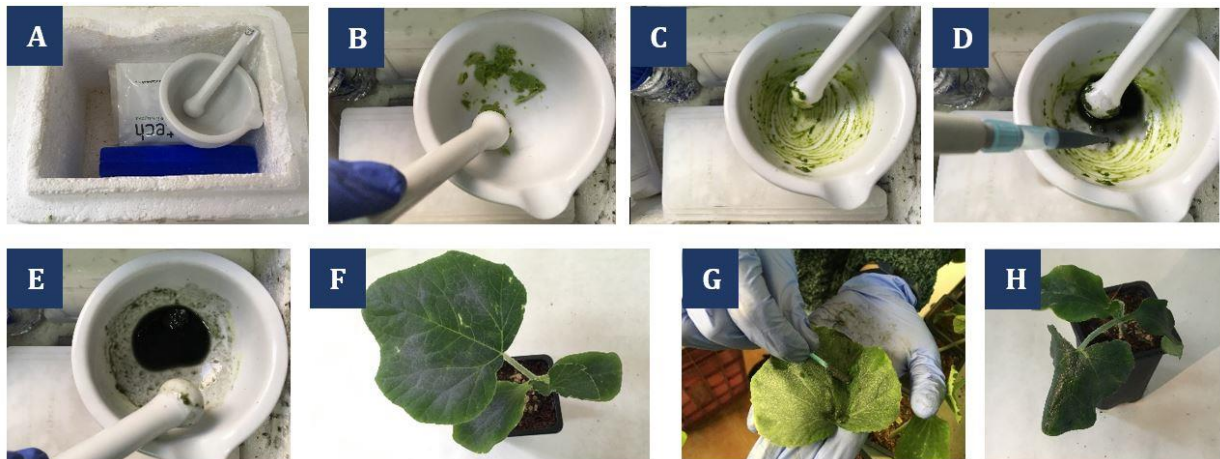


Figura 16. Secuencia de pasos seguida durante la inoculación mecánica. A) Mortero mantenido en hielo; B, C, D, E) Maceración de la fuente vegetal infectada por ToLCNDV junto al buffer de inoculación; F) Carborundum (600 mesh) esparcido sobre la primera hoja verdadera expandida y uno de los cotiledones; G) Aplicación de la mezcla mediante un bastoncillo sobre las hojas dañadas con carborundum; H) Aspecto de una planta inoculada.

3.5. Evaluación fenotípica

A los 20 y 30 días después de la inoculación se llevó a cabo una evaluación fenotípica de las plantas, atendiendo a la severidad de los síntomas ocasionados por el virus y al vigor mostrado por la planta a lo largo del proceso.

3.5.1. Evaluación de la severidad de la infección

Los síntomas mostrados por las plantas fueron evaluados visualmente y clasificados según una escala numérica (Figura 17; López *et al.*, 2015):

- Severidad 0: ausencia de síntomas.
- Severidad 1: síntomas leves que afectan a pocas hojas (ligero abullonamiento, rizado tenue de la hoja, ausencia de clorosis).
- Severidad 2: síntomas moderados (abullonamiento foliar aparente, rizado moderado de las hojas, inicio de clorosis).
- Severidad 3: síntomas severos (aparición de abullonamiento foliar, rizado intenso de las hojas, clorosis internervial y foliar, disminución del tamaño de las hojas).
- Severidad 4: síntomas muy severos (fuerte abullonamiento de las hojas, rizado intenso, parada de crecimiento, clorosis foliar, reducción del tamaño de las hojas, desarrollo de entrenudos más cortos, etc.) que afectan a varias hojas o muerte de la planta.

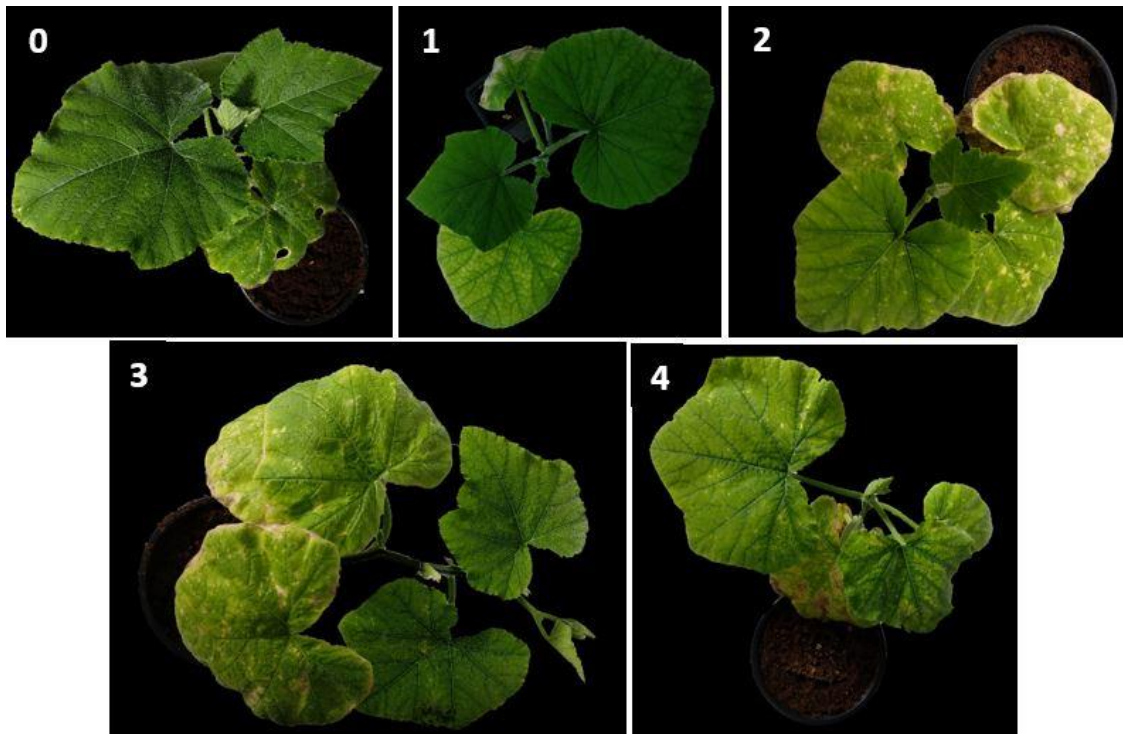


Figura 17. Escala de severidad empleada para evaluar los síntomas producidos por ToLCNDV.

3.5.2. Evaluación del vigor de la planta

El vigor de cada una de las plantas fue evaluado en función del número total de hojas verdaderas desarrolladas y el número de hojas que permanecían verdes (Figura 18). Se obtuvo una relación para determinar el porcentaje de hojas no senescentes, dividiendo el número de hojas verdes entre el total. El valor obtenido permitió relacionar el vigor mostrado por la planta y la severidad de los síntomas ocasionados por el virus ToLCNDV.



Figura 18. Detalle de las hojas clasificadas como senescentes (izq.) y verdes (der.).

3.6. Análisis de la acumulación de ToLCNDV

3.6.1. Método de extracción de ácidos nucleicos

De cada planta inoculada y evaluada fenotípicamente se recolectó una muestra de hoja de la zona apical. Todas las muestras fueron almacenadas en eppendorfs de 2 mL que se conservaron en un congelador a -80°C hasta su posterior uso.

El proceso seguido para la extracción del DNA se muestra en la Figura 19. A las muestras de hoja se les adicionó 0,3 ml de buffer de extracción (Sorbitol 0.35M, Tris base pH 7.5 0.1M, EDTA pH 8 5mM, Bisulfito de sodio 3,8 mg/mL) y se procedió a su homogeneización haciendo uso de un molino Bead Mill 24 (FISHER BRAND). A continuación, se añadió 0,3 ml de buffer de lisis nuclear (Tris-Cl pH 8 0.2M, EDTA pH 8 50mM, NaCl 2M, 2% CTAB) y 0,15 ml de N-Lauril Sarcosine de Sodio al 5%, y se incubaron durante 40 minutos en un baño mantenido a 65°C . Tras la incubación se añadió 0,7 mL de una mezcla de cloroformo:octanol en una proporción 24:1, tras lo cual se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a 8000 rpm. La fase acuosa superficial, en la que se encontraba el ADN, fue transferida a un tubo eppendorf limpio de 1,5 mL, al que se adicionó un volumen equitativo de isopropanol a -20°C para producir la precipitación del material genético. Posteriormente, se centrifugaron las muestras 10 minutos a 13.000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se adicionó etanol 70% para eliminar los restos de isopropanol del pellet y tras una centrifugación se descartó. Finalmente, se añadieron 50 μL de agua MilliQ y se incubaron los tubos a 65°C para resuspender el ADN.

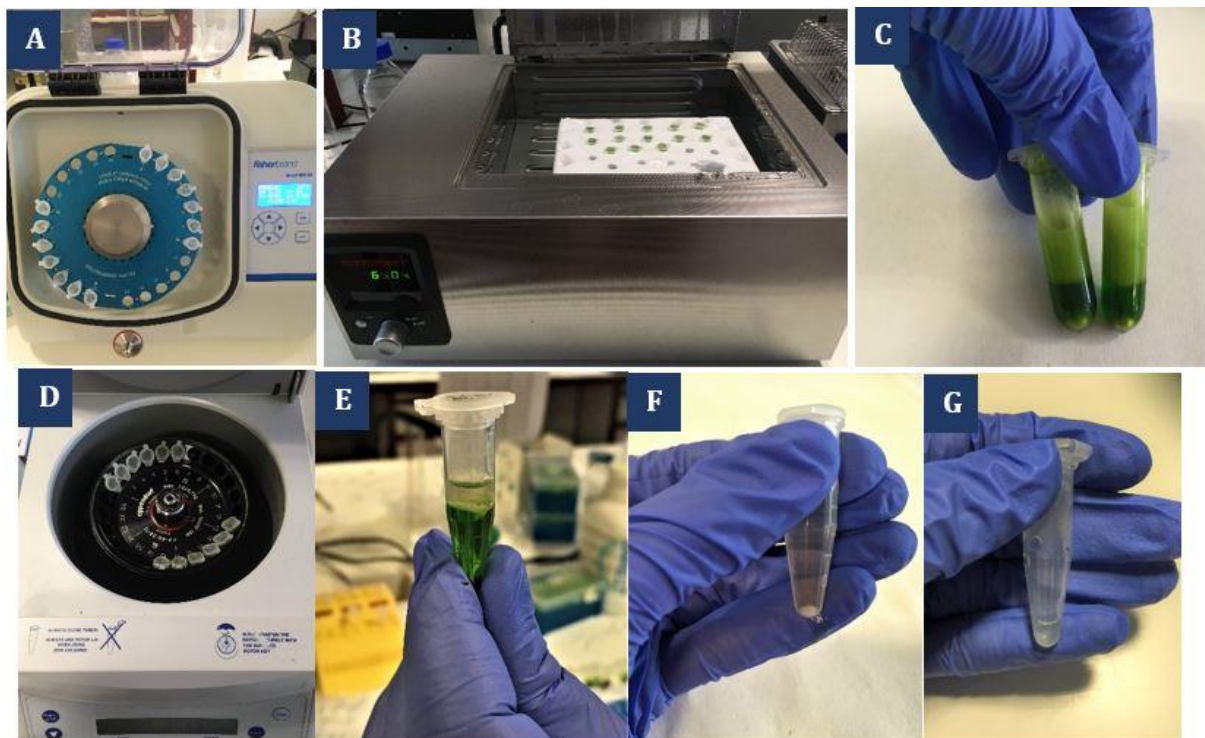


Figura 19. Método de extracción de ácidos nucleicos de muestras vegetales. A) Muestras situadas en el molino para su homogeneización; B) Muestras incubadas a 65°C en el baño; C) Aspecto de las muestras tras la adición de la mezcla cloroformo:octanol; D) Centrifugación para la separación de fases; E) Detalle de las fases generadas. La fase inicial acuosa y transparente es la que contiene el ADN; F) ADN precipitado con isopropanol; G) ADN resuspendido en agua MilliQ.

Tras la extracción del ADN vegetal y viral se procedió a determinar el estado de los ácidos nucleicos en un gel de agarosa 2X (Figura 20).

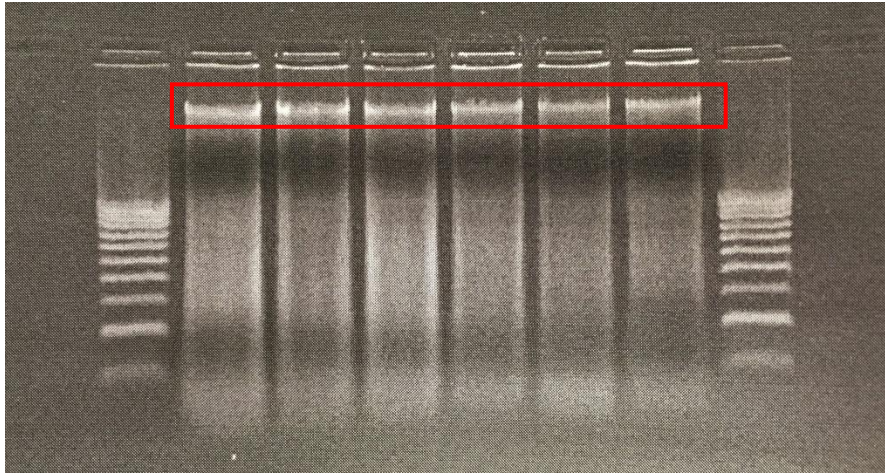


Figura 20. Comprobación del estado de los ácidos nucleicos en un gel de agarosa. Remarcado en rojo se señalan las bandas correspondientes al ADN.

3.6.2. Método de detección y cuantificación de la carga viral

La detección y la determinación de la acumulación relativa del virus en las muestras vegetales se llevaron a cabo mediante un análisis de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Para ello se hizo uso de dos cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia genética del DNA-A de ToLCNDV: ToL-A F1 5'-CATTATTGCACGAATTTCCG-3' (de 20 pb de longitud y situado en la posición 129-148) y ToL-A R1 5'-ATCGTAGCCGACTGTGTCTG-3' (de 20 pb de longitud y situado en la posición 219-238). Estos cebadores permitieron amplificar un fragmento de 110 pb, que podía ser cuantificado durante la reacción de qPCR a tiempo real.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (MyGo Pro, IT-IS Life Science Ltd) (Figura 21) en el que se fijaron las siguientes condiciones: las muestras se mantuvieron durante 5 minutos a 95°C, seguidos de 45 ciclos de 4 pasos: 5 segundos a 95°C, 15 segundos a 57°C, 15 segundos a 58°C y 72°C durante 0 segundos.



Figura 21. Termociclador MyGo Pro utilizado para analizar la acumulación relativa de virus en las muestras vegetales.

La acumulación relativa del virus de las plantas fue determinada por el método comparativo Ct (*Threshold Cycle*) usando el gen EFIAZI de *C. pepo* como control interno. En este caso, los cebadores

EF-F 5'-GCTTGGGTGCTCGACAAACT-3' (de 20 pb de longitud) y EF-R 5'-TCCACAGAGCAATGTCAATGG-3' (de 21 pb de longitud) se usaron para generar un fragmento de 67 pb.

La acumulación relativa de ToLCNDV en cada muestra fue calculada con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre el ΔCt de cada muestra y el ΔCt del gen constitutivo de referencia (Sáez *et al.*, 2016).

3.7. Análisis estadístico de los resultados

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre la severidad, el vigor y la acumulación vírica observados en las accesiones CSV0252 y CSV0265 y la F1 se procedió a realizar un análisis de la varianza (ANOVA), lo que permitió realizar una comparativa entre los individuos de ambas accesiones y los de la primera generación. Para los datos que no siguieron una distribución normal se procedió a realizar una prueba estadística de Kruskal-Wallis. Se realizaron además análisis de regresión y correlación para determinar la relación existente entre la escala de severidad y el vigor mostrado por las plantas.

Para el estudio del modo de herencia de la resistencia se evaluaron 10 individuos de cada uno de los parentales, 10 de la F1, y 184 de la F2 para la severidad de la sintomatología a los 30 días tras la inoculación con ToLCNDV. Las proporciones de segregación observadas se compararon con las proporciones esperadas para una herencia mendeliana mediante una prueba estadística de heterogeneidad χ^2 .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comparación de la tolerancia a ToLCNDV en dos accesiones de *Cucurbita moschata*

4.1.1. Evaluación de la severidad de los síntomas

La severidad de los síntomas debidos a la infección por ToLCNDV fue evaluada en las accesiones CSV0252 y CSV0265 de la especie *Cucurbita moschata* a los 20 y 30 días después de la inoculación (dpi).

La accesión CSV0252 mostró un elevado grado de tolerancia al virus, presentando un valor medio de severidad de 0,4 a 20 dpi y 0,3 a 30 dpi (Figura 22). La mayoría de las plantas inoculadas mecánicamente no mostró síntomas de la infección, y solo en una pequeña parte se observó una sintomatología leve que afectaba a las hojas más antiguas, permaneciendo las hojas nuevas en buen estado y sin signos aparentes de virosis. En cuanto a la accesión CSV0265, el promedio de severidad fue de 2,6 a 20 dpi y 2,9 a 30 dpi, mostrando por lo tanto una sintomatología más severa a la desarrollada por CSV0252 (Figura 22). En este caso todas las plantas inoculadas desarrollaron síntomas de moderados a muy severos.

Para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las accesiones CSV0252 y CSV0265, se procedió a la ejecución de un análisis de varianza (ANOVA) para la severidad a 20 y 30 dpi, el cual reveló la existencia de diferencias significativas entre sendas accesiones en ambos períodos del ensayo (p -valor < 0,05) (Figura 22).

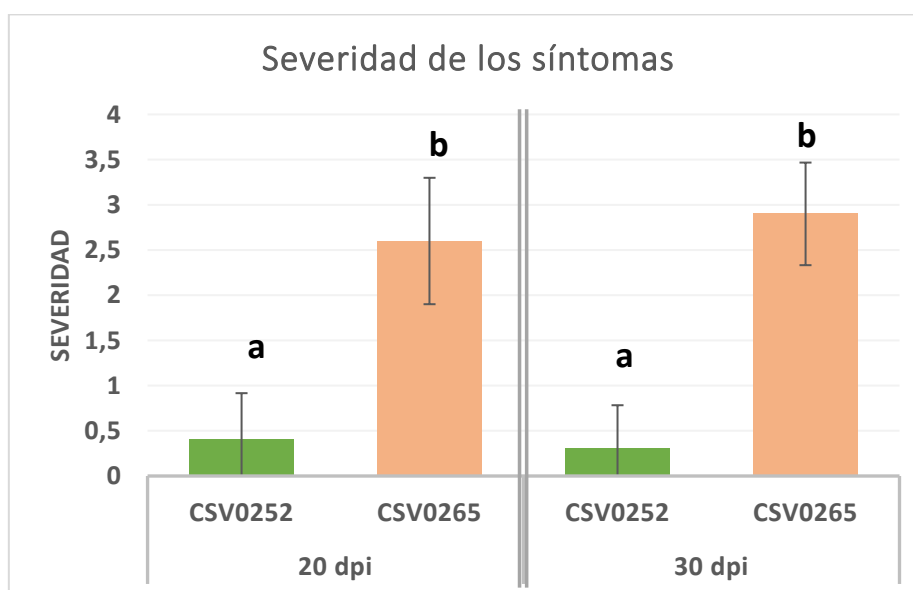


Figura 22. Grado de severidad de los síntomas de las accesiones CSV0252 y CSV0265 a los 20 y 30 días después de la inoculación mecánica con el virus ToLCNDV. En la gráfica se representa el promedio de severidad obtenido para 10 plantas inoculadas de cada accesión. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras “a” y “b” simbolizan la diferencia estadísticamente significativa existente entre las plantas de las accesiones CSV0252 y CSV0265, para un nivel de significación de 0,05.

La incidencia de la infección en ambas accesiones se detalla en la Tabla 3. A los 20 dpi, el rango de severidad de la accesión CSV0252 osciló entre 0 y 1, ascendiendo a un 60% las plantas inoculadas que permanecieron asintomáticas (severidad 0). Por su parte, el rango de severidad para la accesión CSV0265 fue de 2-4, mostrando el 50% de los individuos una severidad de 2. A los 30 dpi, el rango se

mantuvo para ambas accesiones, pero la incidencia se vio modificada: un 70% de los individuos de CSV0252 mostraron una severidad de 0, aumentando la proporción de plantas asintomáticas respecto a 20 dpi, mientras que un 70% de los individuos de CSV0265 alcanzaron una puntuación de 3.

Tabla 3. Incidencia de la sintomatología mostrada por los individuos de las accesiones CSV0252 y CSV265 a 20 y 30 dpi.

ID ¹	TOTAL	Incidencia a 20 dpi (%)					Incidencia a 30 dpi (%)				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
CSV0252	10	60	40	0	0	0	70	30	0	0	0
CSV0265	10	0	0	50	40	10	0	0	20	70	10

¹Los valores de la tabla representan el porcentaje de plantas de cada accesión que se corresponden con cada valor de la escala de severidad establecida de 0 a 4.

Estos resultados coinciden con la investigación realizada por Martínez *et al.* (2017), en la que se identificó la resistencia de CSV0252 y la susceptibilidad de CSV0265 a ToLCNDV, cuando la infección de ambas accesiones era mediada por el vector natural *Bemisia tabaci* en invernadero.

4.1.2. Evaluación del vigor

Para la evaluación del vigor de las accesiones CSV0252 y CSV0265 de *C. moschata* se consideraron varios parámetros. En primer lugar, se determinó el número total de hojas verdaderas desarrolladas por cada uno de los individuos pertenecientes a cada accesión, a continuación, se determinó el número de hojas verdes que permanecían en cada planta y, en último lugar, se estableció la relación entre la cantidad de hojas verdes no senescentes respecto al total de hojas, y se correlacionó con la escala de severidad.

La accesión CSV0252 desarrolló un mayor número de hojas verdaderas que la accesión CSV0265 (Figura 23A). A 20 dpi, el promedio de hojas desarrolladas por esta última fue de 5,5 hojas, mientras que para la accesión CSV0252 este promedio fue de 7,6 hojas, observándose una diferencia significativa entre ambas. A 30 dpi, este promedio aumentó a 8 para la accesión susceptible y a 10,3 para la resistente. El incremento en el número de hojas indica que el crecimiento no se detuvo en ninguna de las accesiones a pesar de la infección producida por la inoculación mecánica del virus, pero el desarrollo foliar fue superior en la accesión resistente, que tanto a 20 como a 30 dpi superó en dos hojas a la accesión CSV0265.

También pudieron observarse variaciones en el número de hojas que permanecieron verdes tras la inoculación. La accesión CSV0252 conservó un mayor número de hojas verdes tanto a 20 como a 30 dpi (Figura 23B), con un promedio de 4,1 y 4,7 respectivamente, frente a valores de 2,5 y 2,9 de la accesión CSV0265. Se observó que la dehiscencia y senescencia foliar se incrementaba en las plantas más sintomáticas, mientras que en las asintomáticas estos procesos se manifestaban más tarde.

Se procedió a realizar un análisis estadístico ANOVA para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el número de hojas totales y hojas verdes para ambas accesiones, a 20 y 30 dpi. El análisis confirmó estas diferencias (p -valor < 0,05), que quedan representadas en la Figura 23.

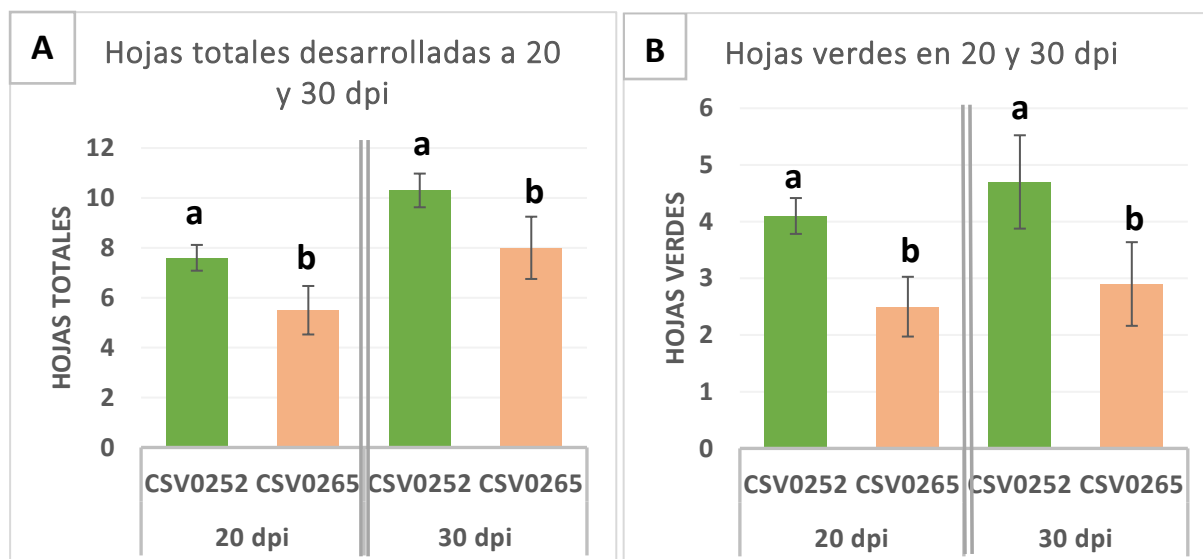


Figura 23. A) Número de hojas totales verdaderas desarrolladas y B) número de hojas que permanecen verdes, a 20 y 30 dpi en las accesiones CSV0252 y CSV0265. En ambas gráficas se muestra el promedio de las hojas totales y las hojas verdes, respectivamente, para 10 individuos de cada accesión. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras “a” y “b” simbolizan la diferencia estadísticamente significativa existente entre las plantas de las accesiones CSV0252 y CSV0265, para un nivel de significación de 0,05.

Por otro lado, se estableció al final del ensayo (30 dpi) una relación entre el número de hojas verdes (HV) y el número de hojas totales (HT) con el fin de determinar el porcentaje de hojas no senescentes y su correlación con el grado de severidad. Los resultados se detallan en la Tabla 4, donde se observa que la accesión CSV0252 presentó valores HV/HT mayores que los de la accesión CSV0265, es decir, el porcentaje de hojas no senescentes en la accesión resistente fue superior al de la susceptible. Se observa también que, conforme aumentaba la severidad, el valor de la relación HV/HT iba disminuyendo, lo que indicaría que una sintomatología más severa está relacionada con una aceleración del proceso de senescencia de las hojas. Para determinar el vínculo entre ambas variables se llevó a cabo un análisis de regresión, el cual evidenció una relación lineal entre la severidad y el porcentaje de hojas no senescentes, con un coeficiente de determinación R^2 igual a 0,974. Para el coeficiente de correlación r se obtuvo un valor igual a -0,987, lo que revela una correlación fuerte e inversa entre ambas variables.

Tabla 4. Relación entre hojas verdes/hojas totales (HV/HT) en los individuos de las accesiones CSV0252 y CSV0265 a 30 dpi.

ID ¹	Relación HV/HT a 30 dpi				
	0	1	2	3	4
CSV0252	0,471	0,418	-	-	-
CSV0265	-	-	0,402	0,355	0,333

¹Los valores que se muestran en la tabla representan un promedio de la relación HV/HT para los individuos que se corresponden con cada valor de la escala de severidad.

Tras el análisis de estos resultados, podemos concluir que la accesión CSV0252 mostró mayor vigor que la accesión CSV0265 durante la realización del ensayo. Estos resultados varían con respecto a los obtenidos por Martínez *et al.* (2017), puesto que se determinó que, a pesar de que la accesión CSV0265 era más susceptible a la infección, su vigor era mayor al de la accesión resistente. Esta discrepancia en los resultados obtenidos puede deberse a las condiciones ambientales del ensayo, puesto que los

experimentos realizados por Martínez *et al.* (2017) se llevaron a cabo en invernadero, mientras que los de este TFG se desarrollaron bajo condiciones ambientales controladas, siendo la luz un parámetro de gran importancia para el desarrollo vegetativo.

Otros trabajos han descrito la relación entre la tolerancia a la infección y una disminución de la pérdida de vigor (Paudel y Sanfaçon, 2018). Los resultados obtenidos para la relación HV/HT podrían apoyar esta hipótesis, puesto que las plantas mantenían un mayor vigor cuanto menor era la severidad de la sintomatología observada.

4.2. Estudio de la herencia de la resistencia a ToLCNDV en la accesión CSV0252

4.2.1. Evaluación de la severidad en las generaciones F1 y F2

Diez individuos de la primera generación filial (F1), procedente del cruce CSV0252 x CSV0265, fueron evaluados para la severidad de la sintomatología a los 20 y 30 días después de la inoculación. La incidencia de síntomas en esta generación se muestra en la Figura 24A. El rango de severidad tanto a 20 como a 30 dpi osciló entre 0 y 1, con una incidencia de 10% y 90% respectivamente, lo que indica una elevada tolerancia de la F1 a la infección por ToLCNDV.

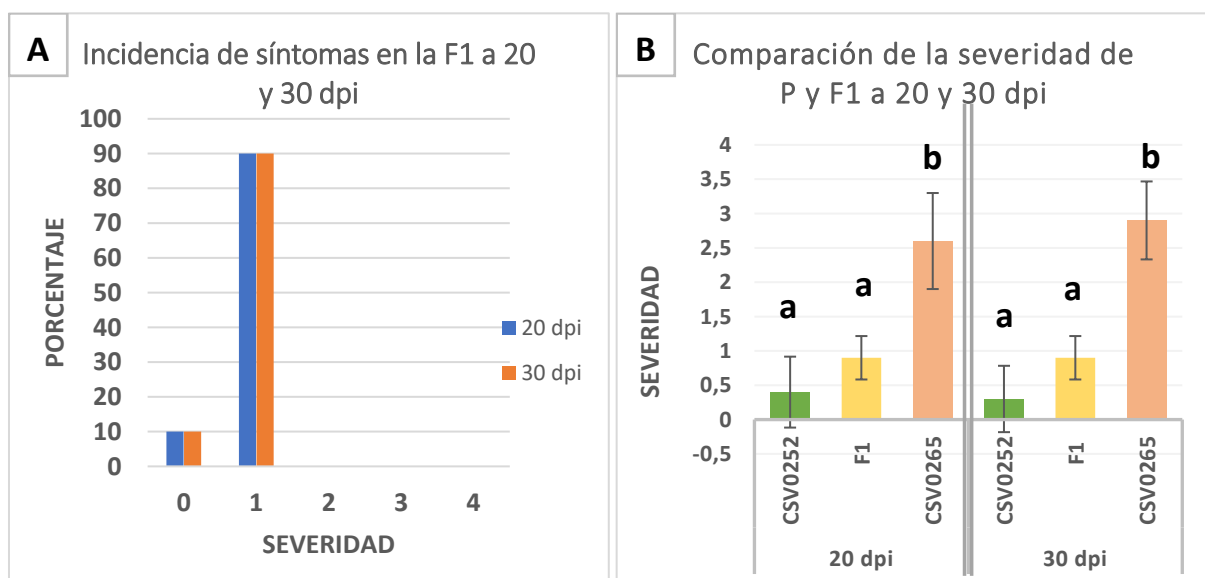


Figura 24. A) Incidencia de síntomas en la primera generación filial (F1) a 20 y 30 dpi. La escala severidad se puntúa en valores de 0 a 4. B) Comparación de la severidad de los síntomas de los parentales CSV0252 y CSV0265 y la F1 a 20 y 30 dpi. Se representa el promedio de severidad para 10 individuos de cada generación. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras “a” y “b” simbolizan la diferencia estadísticamente significativa existente entre las plantas de diferentes generaciones, para un nivel de significación de 0,05.

El promedio de severidad de los síntomas alcanzó un valor de 0,9, próximo al del parental CSV0252 (Figura 24B). Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los parentales CSV0252 y CSV0265 y la F1, tanto a 20 como a 30 dpi, se procedió a la ejecución de un análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis, puesto que los datos no se ajustaban a una distribución normal, el cual reveló la existencia de diferencias significativas entre sendas generaciones (p -valor < 0,05). El análisis indicó que la severidad media de los síntomas en la generación F1 no difería significativamente de la que presentaban las plantas del parental CSV0252 (Figura 24B).

La incidencia de los síntomas fue evaluada también en 184 individuos de la segunda generación filial (F2) a los 20 y 30 dpi. En la Figura 25 puede observarse la segregación fenotípica mostrada por la F2 en ambos períodos del ensayo. A 20 dpi, un 71% de las plantas evaluadas presentó síntomas leves (severidad 1) y un 7% permanecieron asintomáticas. No se observaron individuos con síntomas muy severos (severidad 4) y un porcentaje muy pequeño, del 3%, presentó una puntuación de 3. A 30 dpi el porcentaje de plantas con una severidad de 1 disminuyó hasta el 56%, sin embargo, el número de plantas asintomáticas aumentó hasta un 11%, lo que indica una recuperación de las plantas frente a la infección vírica. Por otro lado, un 7% de los individuos alcanzó una puntuación de 4. Se observó también un incremento en el número de individuos con una severidad de 3 respecto a 20 dpi. Tanto a 20 como a 30 dpi, el porcentaje de plantas con síntomas moderados (severidad 2) permaneció en torno al 20%. Cabe destacar que, en ambos períodos del ensayo, la mayor parte de las plantas evaluadas mostraron una sintomatología leve (Figura 25).

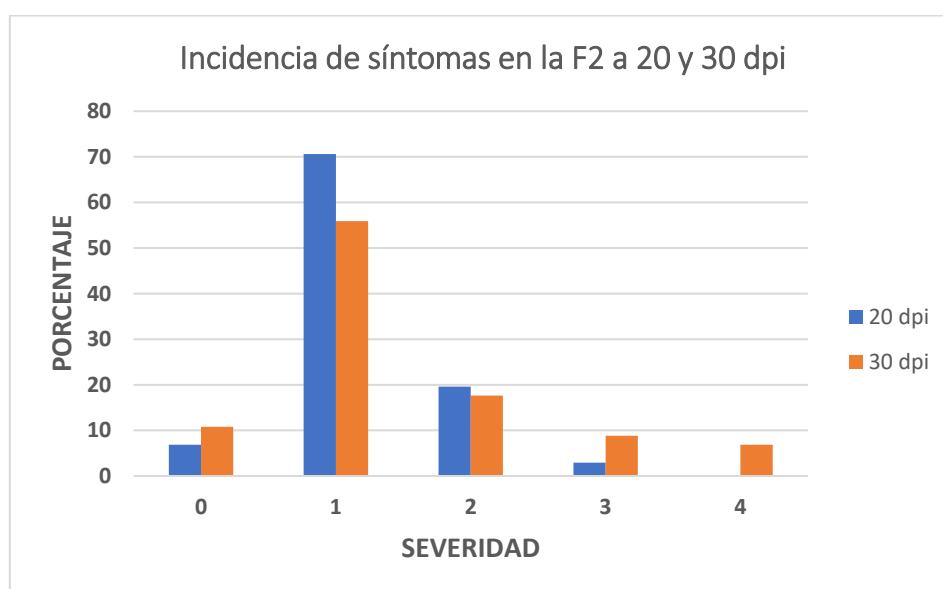


Figura 25. Distribución de la incidencia de síntomas en la segunda generación filial (F2) a los 20 y 30 días después de la inoculación. Se representa el porcentaje de plantas de un total de 184 individuos que se corresponden con cada valor de la escala de severidad (puntuada de 0 a 4).

4.2.2. Determinación del modo de herencia de la resistencia

Para el análisis genético formal, las plantas con puntuaciones de síntomas de 0 y 1 (similares a las encontradas en el progenitor resistente CSV0252) se clasificaron como resistentes, y aquellas con puntuaciones de síntomas entre 2 y 4 (similares a las observadas en el progenitor CSV0265) fueron clasificadas como susceptibles.

Todos los individuos de la F1 evaluados mostraron una sintomatología leve o permanecieron asintomáticos al final del ensayo (30 dpi). El hecho de que todas las plantas analizadas en la F1 se mostraran resistentes a la infección por ToLCNDV indica un control dominante de este carácter.

El control genético de la resistencia al virus fue estudiado en la generación F2. En una población de 184 plantas, 134 de ellas permanecieron sin síntomas o con síntomas leves al final del ensayo (severidad 0 y 1), mientras que 50 plantas mostraron síntomas moderados a muy graves a 30 dpi

(severidad 2–4), con rizado foliar, clorosis y disminución del tamaño de la hoja, típico de la infección por ToLCNDV. La prueba χ^2 indicó que esta segregación se ajustó a una relación 3:1 (resistente: susceptible), esperada para un solo gen dominante para la resistencia (p-valor = 0,496) (Tabla 6).

Tabla 6. Segregación de plantas resistentes/susceptibles en la generación parental (CSV0252 y CSV0265), F1 y F2 a los 30 días tras la inoculación con ToLCNDV.

Generación	Número de plantas			Proporción esperada	χ^2	P-valor
	Total	R ¹	S ¹			
Parental resistente, CSV0252	10	10	0	1:0	-	-
Parental susceptible, CSV0265	10	0	10	0:1	-	-
F1	10	10	0	1:0	-	-
F2	184	134	50	3:1	0,46 ²	0,496

¹R= resistente, S= susceptible.²La probabilidad del valor de χ^2 fue calculada para la proporción esperada para una herencia monogénica dominante.

En 2018, Sáez *et al.* publicaron la existencia de una resistencia recesiva frente al virus ToLCNDV en una accesión de *Cucurbita moschata*, sin embargo, hasta ahora no se había descrito ninguna resistencia dominante frente al virus en el género *Cucurbita*, aunque sí en otros géneros de la familia *Cucurbitaceae* como *Cucumis melo* (Sáez *et al.*, 2017b) y *Luffa cylindrica* (Islam *et al.*, 2010). Este hallazgo podría ser interesante para futuros programas de mejora de cucurbitáceas, en los que la accesión CSV0252 de *C. moschata* podría utilizarse como un posible donante resistente para desarrollar híbridos comerciales resistentes a ToLCNDV en calabacín y calabaza.

En 2017 se identificaron tres QTLs relacionados con la resistencia a ToLCNDV en melón y se sugirió la presencia de un locus dominante principal en uno de ellos (Sáez *et al.*, 2017b). La realización de un análisis de QTLs en la población segregante F2 objeto de estudio de este TFG podría ser de interés para la identificación de regiones del genoma que contribuyen a la resistencia a ToLCNDV en la accesión CSV0252 de *C. moschata*. La detección de marcadores moleculares ligados al locus que confiere la resistencia, e incluso el gen responsable de la misma, podría facilitar su transferencia a las líneas de mejora en los programas actuales de mejora genética en las especies del género *Cucurbita*.

4.2.3. Evaluación del vigor en las generaciones F1 y F2

El número total de hojas verdaderas desarrolladas y el número de hojas que permanecieron verdes (no senescentes) se evaluó para la primera generación filial, de modo que pudiera compararse su vigor con el de los parentales resistente y susceptible.

El promedio de hojas totales desarrolladas por los individuos de la F1 a 20 dpi fue de 6,9, valor intermedio al de ambos parentales, pero más cercano al del parental CSV0252 (Figura 26A). En 30 dpi, el promedio de hojas verdaderas desarrolladas por la F1 ascendió a 10,3, idéntico al observado en el parental tolerante (Figura 26A).

En cuanto al número de hojas no senescentes que permanecieron en las plantas, se determinó el promedio tanto a 20 como a 30 dpi, alcanzando valores de 3,8 y 4,2 respectivamente. El promedio de hojas verdes en la primera generación, calculado para ambos períodos del ensayo, se mantuvo cercano al observado en el parental CSV0252, y mucho más distante al del parental CSV0265 (Figura 26B).

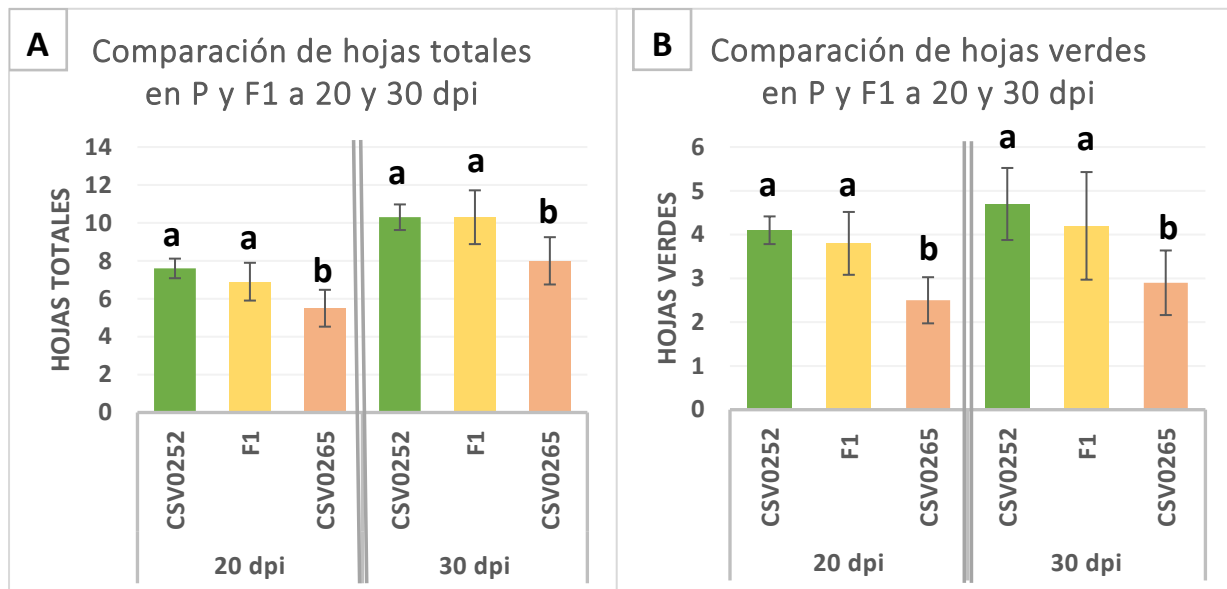


Figura 26. A) Número de hojas totales verdaderas desarrolladas y B) número de hojas que permanecen verdes a 20 y 30 dpi en los parentales CSV0252 y CSV0265 y la F1. En ambas gráficas se muestra el promedio de las hojas totales y las hojas verdes, respectivamente, para 10 individuos de cada accesión. Las barras de error indican la desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes generaciones, para un nivel de significación de 0,05.

Se realizó una prueba ANOVA que permitió determinar diferencias estadísticamente significativas entre el número de hojas totales desarrolladas y el número de hojas verdes presentes en parentales y F1 a 20 y 30 dpi (p -valor < 0,05). La prueba de rangos múltiples determinó la existencia de dos grupos homogéneos a partir de la comparación de las medias: uno constituido por el parental CSV0265 y otro por el parental CSV0252 y la F1 (Figura 26B), lo que indica diferencias entre ambos grupos. Estos resultados revelan que los individuos de la primera generación presentaron un vigor similar al observado en el parental resistente.

En la segunda generación filial se evaluó a los 30 días tras la inoculación la relación entre el número de hojas totales desarrolladas por los individuos, así como el de hojas verdes, y la severidad de la sintomatología. Se determinó también la correlación entre la relación HV/HT y la severidad.

Se observó que el número total de hojas verdaderas que desarrollaron los individuos no correlacionaba con la severidad de los síntomas (Tabla 5), puesto que para todos los valores de la escala de sintomatología se observó un promedio de hojas en torno a 9. Sin embargo, sí se observó relación entre la cantidad de hojas verdes que permanecieron en la planta y la severidad (Tabla 5). Se realizó un análisis de regresión, que evidenció una relación lineal entre ambas variables, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,946. El coeficiente de correlación r se calculó obteniendo un valor igual a -0,973, lo que indica una correlación fuerte e inversa: conforme la severidad aumenta, el número de hojas no senescentes de la planta disminuyen.

Tabla 5. Hojas totales y verdes presentes en los individuos de la F2 a los 30 dpi.

Datos de F2 a 30 dpi ¹	Severidad a 30 dpi				
	0	1	2	3	4
Hojas totales	9,45	8,96	9,11	8,89	9,43
Hojas verdes	4,36	3,88	3,39	3,11	3,00

¹Los valores que se muestran en la tabla representan un promedio del número de hojas totales y no senescentes para los individuos que se corresponden con cada valor de la escala de severidad.

Estos resultados sugieren que la infección vírica no afectó al crecimiento vegetativo de las plantas, pero sí al número de hojas viables, observando un incremento en el número de hojas senescentes conforme aumentaba el grado de severidad. Este comportamiento ha sido descrito previamente por otros autores, que explican la relación entre el estrés biótico (generado durante el ataque de un fitopatógeno, en este caso, ToLCNDV) y un aumento en la senescencia foliar (Hernández *et al.*, 2016; Díaz-Mendoza *et al.*, 2016). Un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) producido como respuesta al estrés genera a su vez un estrés oxidativo que puede conducir a la aparición de síntomas de senescencia en los tejidos sensibles a la infección (Hernández *et al.*, 2016; Zimmermann y Zentgraf, 2005). Por otro lado, el envejecimiento de las hojas más antiguas también puede ocurrir con el objetivo de movilizar nutrientes hacia las hojas más jóvenes para hacer frente a la infección (Díaz-Mendoza *et al.*, 2016).

Se determinó, por otra parte, la correlación entre la relación HV/HT y la severidad de los síntomas en los individuos de la población segregante F2, para comprobar si el comportamiento de las plantas era similar al observado en la generación parental. Se llevó a cabo un análisis de regresión que mostró una relación lineal entre ambas variables (Figura 27), con un coeficiente de determinación R^2 igual a 0,940. El análisis de la correlación reveló una asociación fuerte e inversa entre la relación HV/HT y la sintomatología, con un coeficiente de correlación r igual a -0,982. Estos resultados reafirman la existencia de un vínculo entre el vigor de los individuos y la severidad de los síntomas de la infección que ya había sido observado previamente en los parentales resistente y susceptible.

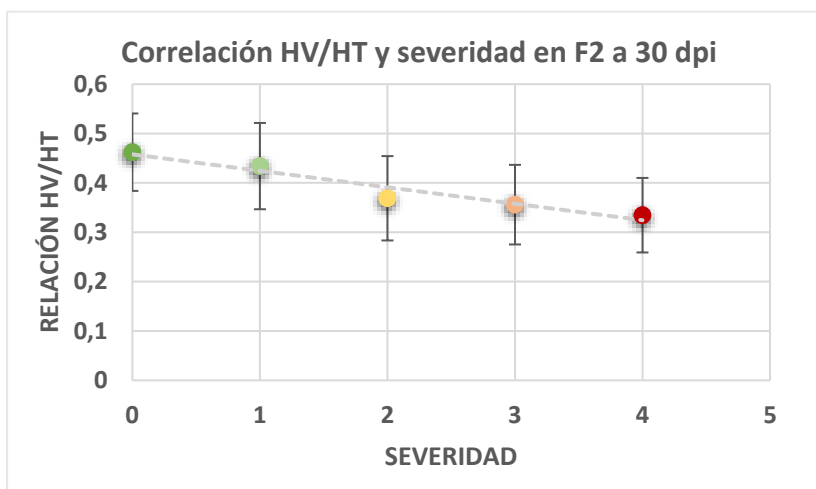


Figura 27. Correlación entre la relación HV/HT y la severidad de la sintomatología en los individuos de la F2 a 30 dpi. Cada punto representa el promedio de la relación HV/HT para los individuos que se corresponden con cada valor de la escala de severidad (puntuada de 0 a 4). Las barras de error representan la desviación estándar.

4.3. Análisis de la acumulación de ToLCNDV mediante qPCR

Para determinar la presencia y acumulación del virus ToLCNDV en los individuos de cada generación durante los días posteriores a la inoculación se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Se evaluó la acumulación relativa en 10 plantas de cada parental y 10 de la F1. Para la F2 se escogieron al azar 10 individuos para cada uno de los extremos de severidad: plantas con una puntuación de 0 similares a la accesión resistente CSV0252 y plantas con una puntuación de 4 semejantes a la accesión susceptible CSV0265.

Tanto a 20 como a 30 dpi se detectó ADN viral en todas las plantas evaluadas, incluso en aquellas que se mantuvieron asintomáticas. Los detalles de la acumulación de ToLCNDV se muestran en la Figura 28. A 20 dpi se observó que los parentales CSV0252 y CSV0265 presentaron una carga vírica relativa similar, ligeramente menor en el parental resistente. En la F1, esta acumulación se vio reducida aproximadamente a la mitad respecto a la observada en los parentales. Los individuos de la F2 con una puntuación de severidad de 0 (F2 T) mantuvieron una acumulación viral próxima a la del parental tolerante, mientras que para las plantas con una puntuación de severidad de 4 (F2 S) se observaron los mayores valores de acumulación vírica (Figura 28). A 30 dpi la acumulación relativa se vio incrementada en todas las generaciones, lo que indicaría que el virus se multiplicó de forma activa en el tejido vegetal. En este período del ensayo, las accesiones parentales siguieron el mismo patrón que a 20 dpi: la acumulación en el parental resistente permaneció ligeramente inferior a la del parental susceptible. La carga viral en la F1 se mantuvo muy por debajo en comparación con el resto, conservando un valor semejante al observado a 20 dpi. En la F2 T, el valor de la acumulación se mantuvo cercano al de los parentales, aunque levemente superior al obtenido para el parental CSV0265. Para la F2 S se observaron nuevamente los mayores valores de acumulación, alcanzando una carga vírica 1,6 veces por encima de la exhibida por el parental susceptible a 30 dpi (Figura 28).

Se realizó una prueba ANOVA para determinar diferencias estadísticamente significativas en la acumulación del virus a 20 y 30 dpi en las diferentes generaciones (Figura 28). A los 20 dpi no se observaron diferencias significativas entre las plantas de cada generación, excepto entre los valores de las plantas F1 y las de aquellas plantas sensibles de la F2. Sin embargo, a los 30dpi las plantas resistentes de la F2 mostraron la misma carga viral que las plantas parentales, pero con diferencias significativas respecto a la F1, que es la que menor carga viral mostró, y a las plantas sensibles de la F2 (F2S), que fueron las que más carga viral acumularon (Figura 28).

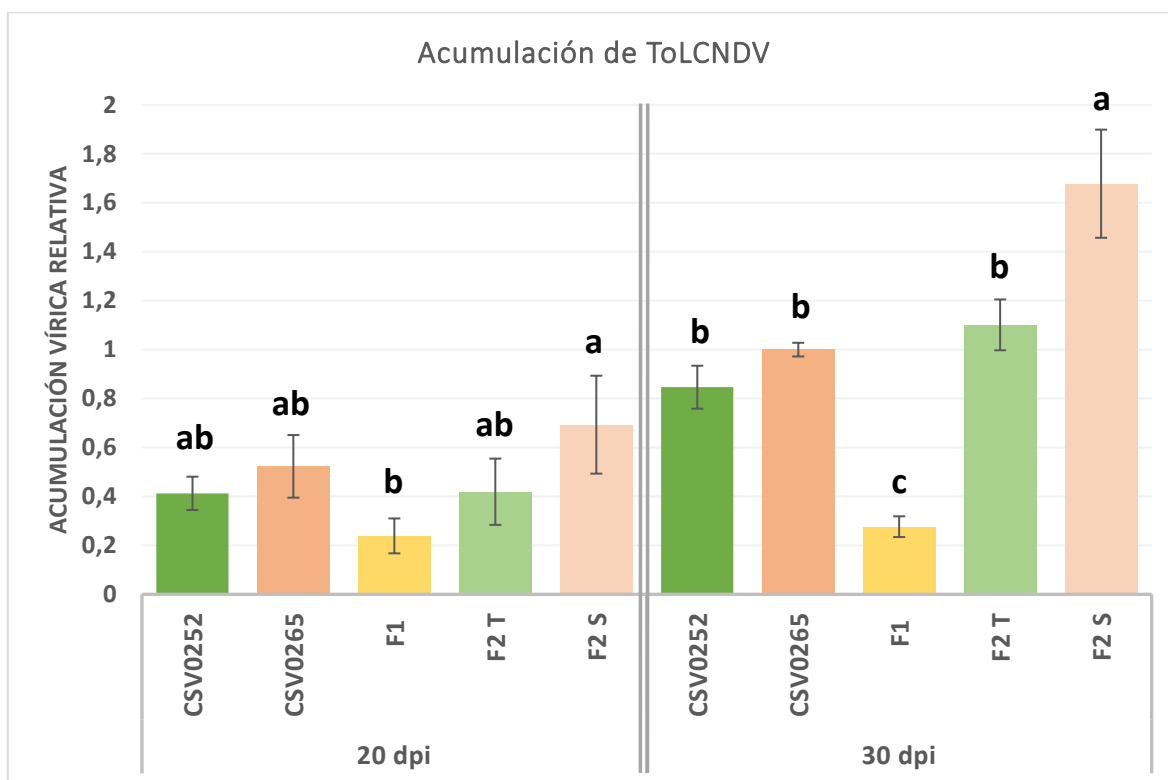


Figura 28. Acumulación relativa del ADN del virus ToLCNDV a los 20 y 30 días después de la inoculación (dpi). Los datos indican la acumulación relativa del virus en las plantas de las diferentes generaciones evaluadas, relativizadas a la acumulación presente en el parental susceptible CSV0265 a 30 dpi (valor = 1). Las barras de error indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre plantas de diferentes generaciones para $p < 0,05$.

A la vista de los resultados, la ausencia de síntomas observada en los individuos de la accesión resistente CSV0252, al igual que en los de la F2 T, no parece estar relacionada con una restricción en la multiplicación del virus, sino con otros mecanismos de resistencia. La severidad de la sintomatología no siempre está correlacionada con el nivel de acumulación del virus (Paudel y Sanfaçon, 2018), lo que explicaría por qué las plantas de la accesión CSV0252 y F2 T, a pesar de tener una acumulación vírica similar a la de la accesión susceptible CSV0265, no presentaron síntomas de la infección.

Por otro lado, la evaluación de la acumulación vírica en las generaciones F1 y F2 parece indicar que la carga viral depende de la combinación de distintos genes procedentes de ambos parentales. Esta combinación parece influir de manera significativa en la acumulación del virus en las plantas F1, observándose una disminución en la acumulación relativa de ToLCNDV. La identificación de estos genes y la evaluación de su relación con la resistencia de la accesión CSV0252 será uno de los requisitos previos para su utilización en futuros programas de mejora genética de especies cultivadas del género *Cucurbita*.

5. CONCLUSIONES

PRIMERA.- La inoculación mecánica de ToLCNDV ha demostrado que la accesión CSV0252 de *Cucurbita moschata* es resistente al virus, mostrando las plantas de esta accesión ausencia de síntomas o síntomas muy leves de la enfermedad.

SEGUNDA.- El análisis genético formal llevado a cabo en este trabajo mediante la evaluación de la severidad de los síntomas en las generaciones F1 y F2 del cruzamiento entre CSV0252 y la accesión susceptible CSV0265, ambas de la especie *C. moschata*, indica que la resistencia genética de CSV0252 al virus ToLCNDV está conferida por un único gen dominante.

TERCERA.- La tolerancia de la accesión CSV0252 al virus ToLCNDV no está asociada con una disminución en la multiplicación y acumulación del virus en la planta, aunque la menor carga viral de las plantas F1 del cruzamiento CSV0252 x CSV0265 indica que una combinación favorable de genes de ambas accesiones puede reducir la multiplicación del virus en la planta.

6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Brown, R.N., Bolanos-Herrera, A., Myers, J.R. y Miller Jahn, M. (2003). Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. *Euphytica*, 129: 253-258. <https://doi.org/10.1023/A:1022224327064>
- Caruso, G. Broglia, V. y Pocovi, M. (2015). Diversidad genética. Importancia y aplicaciones en el mejoramiento vegetal. *Lhawet/Nuestro entorno*, 4 (1): 45-50.
- 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.
- Chang, H.H., Ku, H.M., Tsai, W.S., Chien, R.C. y Jan, F.J. (2010). Identification and characterization of a mechanical transmissible begomovirus causing leaf curl on oriental melon. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 219–228. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9586-0>
- Díaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, Santamaria ME, González-Melendi P, Martínez M y Díaz I. (2016). Plant senescence and proteolysis: two processes with one Destiny. *Genet Mol Biol*, 39 (3): 329-38. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0015>
- EPPO. (2019). EPPO Global Database (available online). Recuperado de: <https://gd.eppo.int> [15 de Marzo de 2019].
- Esquinas-Alcazar, J. T. y Gulick, P. J. (1983). Genetic Resources of *Cucurbitaceae*: A Global Report. IBPGR Secretariat, Rome.
- FEPEX: Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas. (2018). Exportación/importación españolas de frutas y hortalizas. Recuperado de: <http://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-esp%C3%B1ola-frutas-hortalizas> [24 de Marzo de 2019].
- Figàs, M., Alfaro-Fernández, A., Font, M., Borràs, D., Casanova, C., Hurtado, M., Plazas, M., Prohens, J. and Soler, S. (2017). Inoculation of cucumber, melon and zucchini varieties with *Tomato leaf curl New Delhi virus* and evaluation of infection using different detection methods. *Ann. Appl. Biol.*, 170: 405-414. <http://doi.org/10.1111/aab.12344>
- Font San Ambrosio, M. I. y Alfaro Fernández, A. O. (2014). Sintomatología del virus del rizado del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) en los cultivos españoles. *Phytoma España*, 257: 36-40.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1998). FAOSTAT statistics database. [Rome?]: FAO.
- García Arenal, F. y Fraile Pérez, A. (2005). Las virosis de las plantas y su control. *Phytoma España*, 169: 79-81.
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M. y Czosnek, H. (1998). Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*, 240 (2): 295-303. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8937>

- Giner Martorell, A. y Aguilar Olivert, J.M. (2017). Calabaza. En: J. V Maroto Borrego y C. Baixauli Soria (Coords), *Cultivos hortícolas al aire libre* (pp.625-664). España: Cajamar Caja Rural.
- Harrison, B.D., Swanson, M.M. y Fargette, D. (2002). Begomovirus coat protein: serology, variation and functions. *Phys. And Mol. Plant Path*, 60: 257-271. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0404>
- Henson, J.M. y French, R. (1993). The polymerase chain-reaction and plant-disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 81-109. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000501>
- Hernández, J. A., Gullner, G., Clemente-Moreno, M. J., Künstler, A., Juhász, C., Király, L. (2016) Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94: 134-148. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.09.001>
- Hunter, W.B., Hiebert, E., Webb, E., Tsai, J.H. y Polston, J.E. (1998). Location of Geminiviruses in the Whitefly Bemisia tabaco (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease*, 82 (10): 1147-1151. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.10.1147>
- Hussain, M., Mansoor, S., Iram, S., Zafar, Y. and Briddon, R. W. (2004). First report of *Tomato leaf curl New Delhi virus* affecting chilli pepper in Pakistan. *Plant Pathology*, 53: 794-794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01073.x>
- Islam, S., Munshi, A.D., Mandal, B., Kumar, R. y Behera, T.K. (2010). Genetics of resistance in *Luffa cylindrica* Roem. Against *Tomato leaf curl New Delhi virus*. *Euphytica*, 174: 83-89. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0138-7>
- Janssen, D. y Ruíz L. (2014). ToLCNDV: Un nuevo virus de cucurbitáceas en España transmitido por mosca blanca. *Almería en verde: la revista del agricultor*, 116: 12-15.
- Janssen, D., Ruíz, L., Simón, A. y García, C. (2014). Control en invernadero del virus de Nueva Delhi de la hoja rizada del tomate. *Vida Rural*, 378: 32-36.
- Juárez, M., Kassem, M. A., Sempere, R. N., Gómez, P., Mengual, C. M. y Aranda, M. A. (2013). Virus de cucurbitáceas en el sureste español: viejos conocidos y nuevas amenazas. *Phytoma España*, 250: 31-36.
- Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M.A., Gosálvez, B., Castillo, E., ... Navas-Castillo, J. (2014). First Detection of *Tomato leaf curl New Delhi virus* Infecting Zucchini in Spain. *Plant dis.*, 98: 857. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1050-PDN>
- López, C., Ferriol, M. y Picó, M.B. (2015). Mechanical transmission of *Tomato leaf curl New Delhi virus* to cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in *Cucumis melo*. *Euphytica*, 204: 679-691. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1371-x>
- Malathi V.G. et al. (2017) Begomoviruses and Their Satellites Occurring in India: Distribution, Diversity and Pathogenesis. EN: Mandal B., Rao G., Baranwal V., Jain R. (Eds) *A Century of Plant Virology in India*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5672-7_5

- Mantilla Paredes, B. A. (2018). Búsqueda de fuentes de resistencia al virus del rizado amarillo del tomate Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*) en tomate (trabajo fin de máster). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- MAPAMA: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2018). Anuario de estadística 2017. Madrid, España.
- Martínez, C., Manzano, S., Megías, Z., García, A., Garrido, R., Paris, H. S. y Jamilena, M. (2017). Screening of *Cucurbita* germplasm for ToLCNDV resistance under natural greenhouse conditions. *Acta Hort.*, 1151: 57-62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.10>
- McCright, J.D. (2017). Cultivation and Uses of Cucurbits. En: R. Grumet, N. Katzir y J. García-Mas (Eds.), *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* (pp. 1-12). España: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/7397_2016_2
- Moriones, E., Praveen, S. y Chakraborty, S. (2017). *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus*: An Emerging Virus Complex Threatening Vegetable and Fiber Crops. *Viruses*, 9 (264). <https://doi.org/10.3390/v9100264>
- Mullis, K., Faloona, R., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E. y Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 49: 219-248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>
- OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development. (2012). Consensus Document on the Biology of *Cucurbita L.* (Squashes, Pumpkins, Zucchini and Gourds). *ENV/JM/MONO*, 53. París, Francia.
- Otazo González, H.C. y Espino de Paz, A.I. (2018). Virus de Nueva Delhi (ToLCNDV) en cucurbitáceas. GMR Canarias, 2018.
- Pacheco Vinaroz, B. (2015). Estudio de la gama de huéspedes del virus del rizado del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) en cultivos y flora arvense del sureste español (trabajo fin de grado). Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España.
- Padidam, M., Beachy, R. N. y Fauquet, C. M. (1995). *Tomato leaf curl* geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *J Gen Virol.*, 76 (Pt 1): 25-35. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-1-25>
- Padidam, M., Beachy, R. N. y Fauquet, C. M. (1996). The Role of AV2 ("Precoat") and Coat Protein in Viral Replication and Movement in *Tomato Leaf Curl Geminivirus*. *Virology*, 224 (2): 218-225. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0546>
- Paris, H. S. (2001). History of the Cultivar-Groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural reviews*, 25: 71-78. <https://doi.org/10.1002/9780470650783.ch2>

- Paris, H.S. (2008). Summer Squash. En: J. Prohens y F. Nuez (Eds.), *Handbook of Plant Breeding: Vegetables I* (pp. 351-379). Springer, Heidelberg (DE). https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_11
- Paris, H.S. y Kabelka, E. (2009). Gene list for *Cucurbita* species. *Cucurbit Genet. Coop.*, 31-32: 44-69.
- Paudel, D.B. y Sanfaçon, H. (2018) Exploring the Diversity of Mechanisms Associated With Plant Tolerance to Virus Infection. *Front. Plant Sci.*, 9: 1575. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01575>
- Péréfarres, F., Hoareau, M., Chiroleu, F., Reynaud, B., Dintinger, J. y Lett, J.M.(2011). A novel synthetic quantification standard including virus and internal report targets: application for the detection and quantification of emerging begomoviruses on tomato. *Virology Journal*, 8: 389. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-389>
- Picó, B., Díez, M.J Y Nuez, F. (1996). Improved Diagnostic Techniques for *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in Tomato Breeding Programs. *Plant Disease*, 83 (11): 1006-1012. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.11.1006>
- Pratap, D., Kashikar, A.R. y Mukherjee, S. (2011). Molecular characterization and infectivity of a *Tomato leaf curl New Delhi virus* variant associated with newly emerging yellow mosaic disease of eggplant in India. *Viol. J.*, 8: 305. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-305>
- Ramírez, P. y Rivera-Bustamante, R. (1996). Identificación de Geminivirus. En: L. Hilje (Ed.), *Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus* (pp. 52-63). Costa Rica: cCATIE.
- Ratnam, N., Vandana, Najibullah, Md. y Ibrahim, Md. (2017). A Review on *Cucurbita pepo*. *IJPPR*, 9 (9): 1190-1194. DOI: <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i09.10305>
- Ruiz, L., Simón, A., Velasco, L. Y Janssen, D. (2017). Biological characterization of *Tomato leaf curl New Delhi virus* from Spain. *Plant Pathology*, 66: 376-382. <https://doi.org/10.1111/ppa.12587>
- Sáez, C., Martínez, C., Ferriol, M., Manzano, S., Velasco, L., Jamilena, M., López, C. and Picó, B. (2016). Resistance to *Tomato leaf curl New Delhi virus* in *Cucurbita* spp. *Annals of Applied Biology*, 169: 91-105. <https://doi.org/10.1111/aab.12283>
- Sáez, C., Martínez, C., Ferriol, M., Manzano, S., Jamilena, M., López, C. y Picó, B. (2017a). Tolerance to ToLCNDV in *Cucurbita* spp. *Acta Hortic.*, 1151, 31-36. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.6>
- Sáez, C., Esteras C., Martínez C., Ferriol M., Dhillon N.P..S, López C. y Picó B. (2017b). Resistance to *Tomato leaf curl New Delhi virus* in melon is controlled by a major QTL located in chromosome 11. *Plant Cell Rep*, 36(10):1571-1584. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2175-3>
- Sáez, C.; Martínez, C.; Esteras, C.; Ferriol, M.; Montero-Pau, J.; Blanca, J.M. ... Picó, B. (2018). A mayor QTL located in chromosome 8 of *Cucurbita moschata* is responsible of resistance to *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV). En *Cucurbitaceae 2018*. (61 - 61). Davis, USA: UC Davis.

- Salama, A.M. (2006). Las cucurbitáceas: importancia económica, bioquímica y medicinal. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
- Simón, A., Ruíz, L., Velasco, L. y 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>
- Sohrab, S.S., Karim, S., Varma, A., Abuzenadah, A.M., Chaudhary, A.G., Damanhoury, G.A. y Mandal, B. (2013a). Characterization of *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus* infecting cucurbits: Evidence for sap transmission in a host specific manner. *Afr. J. Biotechnol*, 12 (32): 5000-5009. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12012>
- Sohrab, S. S, Karim, S., Varma, A., Azhar, E. L, Mandal, B., Abuzenadah y A.M., Chaudhary, A.G. (2013b). Factors affecting sap transmission of *Tomato leaf curl New Delhi* begomovirus infecting sponge gourd in India. *Phytoparasitica*, 41: 591–592. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0319-8>
- Srivastava, K.M., Hallan, V., Raizada, R. K., Chandra, G., Singh, B.P y Sane, P.V. (1995). Molecular cloning of Indian tomato leaf curl virus genome following a simple method of concentrating the supercoiled replicative form of viral DNA. *J. Virol. Methods*, 51 (2-3): 297-304. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00122-W](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00122-W)
- Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. Recuperado de: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [16 de marzo de 2019].
- Téllez, M. d. M., Simón, A., Rodríguez, E y Janssen, D. (2017). Control of *Tomato leaf curl New Delhi virus* in zucchini using the predatory mite *Amblyseius swirskii*. *Biological Control*, 114: 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.008>
- Ulate Solano, M. J. (2017). Detección de begomovirus (Fam. *Geminiviridae*) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) (Trabajo Fin de Grado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Usharani, K.S., Surendranath, B., Paul-Khurana, S.M., Garg, I.D. y Malathi, V.G. (2004). *Potato leaf curl* – A new disease of potato in northern India caused by a strain of *Tomato leaf curl New Delhi virus*. *Plant Pathol*, 53: 235. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.00959.x>
- Viet Ha, C. (2007). Detection and Identification of Potyviruses and Geminiviruses in Vietnam (tesis doctoral). Queensland University of Technology, Queensland, Australia.
- Whitaker T.W. y Robinson R.W. (1986). Squash breeding. En: M.J., Basset (Ed.), *Breeding Vegetable Crops* (pp. 209–242). Westport, CT, USA: AVI.
- Whitfield, A. E., Falk, B.W. y Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480: 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>
- Zerbini F, Briddon R, Idris A, Martin D, Moriones E, Navas-Castillo J, Rivera-Bustamante R, Roumagnac P, Varsani A, ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae, *Journal of General Virology*, 98:131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>



- Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., McKenna, R. (2001). Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology*, 279: 471–477. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0739>
- Zimmermann, P. y Zentgraf, U. (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10 (3): 515-534.
- Zúñiga-Vega, C. y Ramírez, P. (2002). Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 64: 25-33.