

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Trabajo Final de Grado



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Evaluación de la presencia de los virus ToLCNDV y CGMMV en semillas comerciales de cucurbitáceas

Grado en Biotecnología

Curso académico: 2018-2019

Autor: Arcadio García Pérez

Tutores: Carmelo López del Rincón y María Isabel Font San Ambrosio

Tutor experimental: Cristina Sáez Sánchez

Valencia, junio de 2019

Título: Evaluación de la presencia de los virus ToLCNDV y CGMMV en semillas comerciales de cucurbitáceas

Resumen

Las virosis inciden de forma cada vez más grave en el valor final de la producción y en la rentabilidad de los cultivos. Así, en algunas zonas geográficas han llegado a convertirse en el principal factor limitante del cultivo. De particular importancia son los problemas causados por virosis emergentes. Dos ejemplos recientes de enorme gravedad se han dado los últimos años en cultivos de cucurbitáceas del sureste español. Por un lado, en otoño de 2012 en Murcia y Almería, se observaron síntomas de una nueva enfermedad viral en calabacín acompañados en muchos casos de una parada del crecimiento. El causante de esta nueva enfermedad es el virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV). El virus se encuentra ya muy difundido en España, afectando a otros cultivos como pepino, melón, sandía, calabaza y tomate. Por otro lado, desde 1996 también se ha detectado el virus del mosaico verde jaspeado del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) causando daños importantes en las principales especies hortícolas de la familia de las cucurbitáceas.

Un aspecto epidemiológico importante a tener en cuenta es el de la transmisión de estos virus a partir de semillas procedentes de plantas infectadas. Las plántulas germinadas a partir de semillas infectadas podrían actuar como primera fuente de inóculo en el campo, para su posterior transmisión agravando el impacto económico en los cultivos. El objetivo de este Trabajo Final de Grado se centra en comprobar si en semillas comerciales de cucurbitáceas (calabacín, melón, pepino y sandía) es posible detectar los virus ToLCNDV y CGMMV. Si esto fuese así, se analizará de que aislado se trata. La identificación de las fuentes primarias de inóculo puede ayudar a reducir la propagación del virus y la gravedad de los efectos sobre la producción de cucurbitáceas.

Palabras clave: melón; calabacín; pepino; sandía; virus; PCR; RT-PCR; dot-blot

Autor del TFG: D. Arcadio García Pérez

Localidad y fecha: Valencia, junio de 2019

Tutor Académico: D. Carmelo López del Rincón y Dña. María Isabel Font San Ambrosio

Title: Evaluation of the presence of ToLCNDV and CGMMV viruses in commercial seeds of cucurbits

Abstract

Virus diseases have an increasingly serious impact on the final value of production and the profitability of crops. Thus, in some geographical areas they have become the main factor limiting cultivation. Of particular importance are the problems caused by emerging viruses. Two recent examples of enormous seriousness have been given in recent years in cucurbitaceae crops in southeastern Spain. On the one hand, in the autumn of 2012 in Murcia and Almería, symptoms of a new viral disease were observed in zucchini accompanied in many cases by a stop of growth. The cause of this new disease is the curly leaf virus of tomato of New Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV). The virus is already widespread in Spain, affecting other crops such as cucumber, melon, watermelon, squash and tomatoes. On the other hand, since 1996 it has also been detected the green mottle mosaic virus of the cucumber (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) causing important damages in the main horticultural species of the cucurbit family.

An important epidemiological aspect to take into account is the transmission of these viruses from seeds from infected plants. Seedlings germinated from infected seeds could act as the first source of inoculum in the field, for subsequent transmission aggravating the economic impact on crops. The objective of this Final Degree Project is to check whether it is possible to detect the ToLCNDV and CGMMV viruses in commercial seeds of cucurbits (zucchini, melon, cucumber and watermelon). If this were possible, it will be analyzed what isolate it is. The identification of the primary sources of inoculum can help to reduce the spread of the virus and the severity of the effects on the production of cucurbits.

Keywords: melon; zucchini; cucumber; watermelon; virus; PCR; RT-PCR; dot-blot

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tutores Isabel y Carmelo por darme la oportunidad de realizar este TFG con ellos. Durante el tiempo pasado en el laboratorio, no solo he adquirido conocimientos técnicos, sino que también he aprendido a solventar problemas y buscar soluciones de la forma más efectiva, lo que considero fundamental a la hora de entrar al mundo laboral. El optimismo y el apoyo de estos dos profesores me ha ayudado a continuar en los momentos que más perdido me encontraba.

Por otro lado, me gustaría agradecer a Cristina Sáez su ayuda constante en el laboratorio así como a la hora de resolver dudas teóricas, y a Alicia y Emilio, quienes me ayudaron en los primeros días de trabajo.

Querría dar las gracias también a mis compañeros y amigos Lucas Goiriz y Ramón Rico, quienes han sido un apoyo fundamental para mí no solo a la hora de realizar este trabajo sino en toda mi etapa universitaria, así como a mis amigos de toda la vida, Saúl y Nebil.

Por último, debo darles las gracias a mis padres y hermana, quienes han creído en mí incluso cuando yo no lo hacía. Ellos fueron los que me motivaron a estudiar lo que realmente me gustaba y sin su apoyo constante no habría podido llegar hasta aquí.

Este trabajo se ha realizado en el marco de una línea de investigación del grupo de virología del COMAV financiada con el proyecto RTA2017-00061-C03-03 (INIA) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, cofinanciado con recursos FEDER.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Importancia económica de la familia de las cucurbitáceas.....	1
1.2 Factores que limitan el cultivo	2
1.3 El Virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV).....	3
1.3.1 Origen y difusión del ToLCNDV	3
1.3.2 Clasificación y estructura del ToLCNDV	4
1.3.3 Transmisión del ToLCNDV	6
1.4 El virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV)	7
1.4.1 Origen y difusión del CGMMV	7
1.4.2 Clasificación y estructura del CGMMV	8
1.4.3 Transmisión del CGMMV	9
1.5 Diagnóstico de los virus ToLCNDV y CGMMV.....	10
2. Justificación y objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1 Materiales.....	12
3.1.1 Material vegetal	12
3.1.2 Material bacteriano	14
3.1.3 Vector de clonación (plásmido)	14
3.2 Métodos	14
3.2.1 Extracción de DNA y RNA con EXTRAzol.....	15
3.2.2 Extracción de DNA y RNA con columnas de gel de sílice.....	15
3.2.3 Amplificación del DNA por PCR	16
3.2.4 Electroforesis en gel de agarosa	17
3.2.5 Purificación de DNA para la secuenciación	18
3.2.6 Obtención de extremos romos	18
3.2.7 Reacción de ligación.....	18
3.2.8 Transformación bacteriana	18

3.2.9 Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de las colonias	19
3.2.10 Purificación de plásmidos recombinantes (minipreps)	19
3.2.11 Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	20
3.2.12 Secuenciación del producto de PCR y plásmido recombinante	20
3.2.13 Análisis informático	20
3.2.14 Hibridación molecular (<i>dot-blot</i>).....	20
3.2.15 RT-PCR para verificar la presencia de CGMMV	21
4. Resultados.....	23
4.1 Detección de ToLCNDV en semillas de cucurbitáceas.....	23
4.1.1 Semillas de sandía	23
4.1.2 Semillas de calabacín	25
4.1.3 Semillas de pepino	26
4.1.4 Semillas de melón	27
4.1.5 Análisis de la presencia de ToLCNDV mediante hibridación molecular	29
4.1.6 Análisis de la presencia de ToLCNDV mediante PCR	30
4.1.7 Confirmación de la presencia de ToLCNDV por secuenciación	31
4.2 Detección de CGMMV en semillas de cucurbitáceas	33
5. Discusión	35
6. Conclusiones	37
7. Bibliografía.....	38

1. Introducción

1.1 Importancia económica de la familia de las cucurbitáceas

Debido a la calidad nutritiva de las plantas pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas, estas se han utilizado como una parte importante de la alimentación tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Ferrol y Picó, 2008; López et al., 2015). Dentro de esta familia, destaca el calabacín (*Cucurbita pepo* L.), por ser la especie distribuida mundialmente de mayor importancia económica, algo que se debe a sus propiedades culinarias (Ferrol y Picó, 2008). Las principales cucurbitáceas cultivadas son: el pepino (*Cucumis sativus* L.), el melón (*Cucumis melo* L.), la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), el calabacín y las calabazas (*Cucurbita spp.* Duch.).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (F.A.O), durante el año 2017, la superficie mundial del cultivo de melón fue de 1.220.996 hectáreas, y la producción total superó los 31 millones de toneladas. El 75,7% de la producción de dicho cultivo se concentró en el continente asiático. A nivel mundial, destacó China con más del 50% de la producción total (17 millones de toneladas), seguida de Turquía e Irán. Por otro lado, en ese mismo año, se obtuvieron 118 millones de toneladas de sandía, producidas en casi 3 millones y medio de hectáreas cultivadas. El 83,7% de dicha producción se obtuvo en Asia y sobre todo en China, que produjo más de 79 millones de toneladas. En cuanto a los cultivos de pepino y pepinillo, en 2017 se obtuvieron 83,7 millones de toneladas en 2.271.260 hectáreas. Como en los casos anteriores, China fue el primer productor mundial con casi 65 millones de toneladas, seguida de Irán y Rusia (Figura 1).

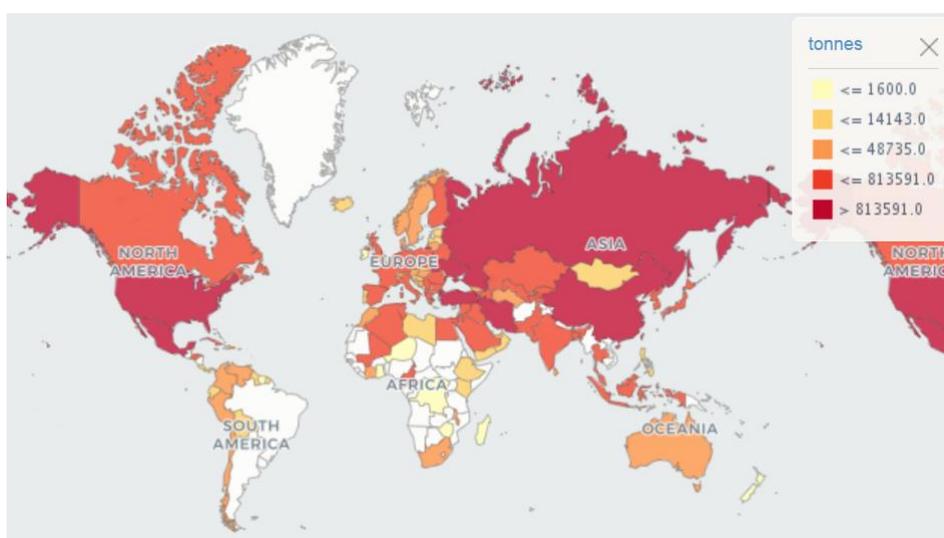


Figura 1. Producción por países de pepinos y pepinillos en 2017 (FAOSTAT, 2019). La escala de colores indica de amarillo (valores más bajos) a rojo (valores más altos) las toneladas producidas.

Finalmente, en cuanto al grupo de las calabazas y el calabacín, durante el año 2017 se obtuvieron casi 27,5 millones de toneladas, producidas en algo más de 2 millones de hectáreas. Por detrás de China, con casi 8 millones de toneladas, destacaron como países productores India con 5 millones de toneladas y Rusia con 1,2 millones de toneladas. La producción de estos cultivos en Europa supuso el 15,4% de la producción mundial, mientras que el resto de los cultivos anteriores en ningún caso superó el 8% de la producción mundial.

En nuestro país, la producción de melón en 2018 fue de 664.154 toneladas, siendo las Comunidades Autónomas con mayor producción Castilla La Mancha con 228.336 toneladas y Murcia con 220.768 toneladas. En cuanto al cultivo de la sandía, España registró en el mismo año una producción total de 1.092.910 toneladas, siendo la región de Andalucía la que más contribuyó en el aumento de dicho valor, con más de 597.000 toneladas de fruto cosechado, seguida de Murcia con casi 199.000 toneladas. El pepino durante la cosecha de 2018 alcanzó en España las 641.870 toneladas, habiéndose cultivado el 87% en la comunidad de Andalucía, principalmente en Almería, donde se cultivaron 5.099 hectáreas en las que se produjeron 443.604 toneladas. Por último, en ese mismo año, el cultivo del calabacín alcanzó las 591.341 toneladas, destacando nuevamente Andalucía y más concretamente la provincia de Almería, que concentró el 77,12% de la producción nacional, con 456.045 toneladas (MAGRAMA, 2019).

1.2 Factores que limitan el cultivo de las cucurbitáceas

A pesar de la alta producción de las cucurbitáceas existe una gran cantidad de problemas, principalmente debidos a factores tanto bióticos como abióticos, que disminuyen considerablemente la productividad de los cultivos. Así, además del estrés hídrico y salino, los estreses bióticos que amenazan la viabilidad de los cultivos son los causados por plagas y enfermedades de etiología viral y fúngica. Se ha descrito un amplio rango de patógenos que afecta a la productividad de las cucurbitáceas, produciendo en estas más de 200 enfermedades distintas (Sharma et al., 2016). Una de estas enfermedades es el oídio, producido por hongos ectoparásitos, principalmente por *Sphaerotheca fuliginea* y *Erysiphe cichoracearum*. Esta enfermedad se encuentra distribuida mundialmente, y puede suponer pérdidas de entre un 30 y 50% de la producción (Sharma et al., 2016). Otro patógeno que afecta a estos cultivos es la bacteria *Pseudomonas syringae*, que causa la enfermedad de la mancha angular de la hoja, siendo ésta la enfermedad bacteriana más dispersada en las cucurbitáceas (Sharma et al., 2016). No obstante, se considera a las virosis como las enfermedades más dañinas de las cucurbitáceas. Sólo en la cuenca mediterránea se han descrito más de 30 virus que afectan a las cucurbitáceas, algunos de ellos causando esporádicamente brotes graves con importantes repercusiones económicas (Juárez et al., 2013). Entre los principales virus podemos destacar el *Cucumber mosaic virus* (CMV), el *Papaya ring spot virus* (PRSV), el *Melon necrotic spot virus* (MNSV), el *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) y el *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, (CYSVDV). Además, cabe mencionar el *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y el *Watermelon mosaic virus* (WMV), transmitidos por pulgones que siguen siendo de los patógenos más difundidos y destructivos de las cucurbitáceas (Ferrol y Picó 2008). Por último, se debe comentar la incidencia en nuestro país del virus *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), que desde 2012 causa gran impacto con pérdidas catastróficas, y se considera un gran problema tanto en el cultivo en invernadero como en campo abierto (López et al., 2015), y desde 1996 el *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) detectado de forma esporádica en el sureste español presentando ocasionalmente brotes graves (Célix et al., 1996).

1.3 El Virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)

1.3.1 Origen y difusión del ToLCNDV

El inicio del estudio de este virus comenzó en 1995 en la India. Inicialmente era conocido de manera genérica como ToLCV-India, término que se usaba para denominar los geminivirus causantes de la enfermedad del rizado del tomate (*Tomato leaf curl virus*). Posteriormente, se caracterizó y comparó con otros virus con los que presentaba semejanzas como el *African cassava mosaic virus* (Padidam et al., 1995). El conocimiento de su estructura y composición confirmó que se trataba de una variante del complejo de virus causantes del rizado amarillo del tomate al que se denominó *Indian tomato leaf curl virus* (Srivastava et al., 1995).

El virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi fue en sus orígenes descrito en la India causando enfermedades en cultivos de la familia de las solanáceas, más concretamente en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Pocos años después se detectó infectando otras solanáceas como berenjena (*Solanum melongena* L.), patata (*Solanum tuberosum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) y en otros países como Bangladesh, Indonesia, Irán, Malasia, Pakistán, Sri Lanka, Taiwán y Tailandia (Moriones et al., 2017; Zaidi et al., 2017). Además, el virus no sólo infecta cultivos de las solanáceas, sino que ya se ha detectado en estos países afectando a cultivos de las cucurbitáceas. Concretamente, se han encontrado cepas infectando cucurbitáceas como pepino, melón, balsamina (*Momordica charantia* L.), sandía, calabaza del peregrino (*Lagenaria siceraria* L.), esponja vegetal (*Luffa cylindrica* L.) y chayote (*Sechium edule* L.) (Moriones et al., 2017). El ToLCNDV se ha descrito ya en al menos 43 especies de plantas eudicotiledóneas, principalmente en plantas de la familia de las solanáceas y de las cucurbitáceas, pero también en especies de otras familias de gran interés agronómico como algodón (*Gossypium hirsutum*, familia *Malvaceae*), opio (*Papaver somniferum*, familia *Papaveraceae*) y soja (*Glycine max*, familia *Fabaceae*). Otras especies de plantas en las que se ha detectado el virus son *Abelmoschus esculentus*, *Ageratum* spp., *Carica papaya*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Daucus carota*, *Hibiscus cannabinus*, *Jatropha* spp., *Benincasa hispida*, *Calotropis procera*, *Catharanthus roseus*, *Chenopodium album*, *Coccinia grandis*, *Jasminum multiflorum*, *Sauropus androgynus* y *Trichosanthes cucumerina*, (Moriones et al., 2017; Zaidi et al., 2017).

El ToLCNDV fue detectado por primera vez en España en el año 2012, en un cultivo de calabacín en la provincia de Murcia, y posteriormente en la provincia de Almería en el año 2013. Este begomovirus, transmitido a través de la mosca blanca del tabaco, *Bemisia tabaci*, nunca antes se había detectado ni en España ni en Europa (Juárez et al., 2014). Los síntomas observados incluían un rizado y acucharado muy intenso de las hojas jóvenes, acompañado en muchos casos de una parada del crecimiento. Las plantas infectadas en fase tardía mostraban hojas jóvenes rizadas y acucharadas, con fuertes mosaicos y entrenudos cortos. La enfermedad también ocasionaba síntomas en los frutos, observándose un arrugado suave en la piel del fruto joven, que podía acusarse en los más desarrollados. La cepa detectada en España se encuentra ya bastante difundida, afectando de manera natural a otros cultivos de cucurbitáceas, tales como melón, sandía, calabaza y pepino, así como a algunas solanáceas como tomate (Juárez et al., 2014; Ruiz et al., 2015; INNOVAGRI, 2019). En los años siguientes, este virus se ha ido detectando en otros países de la cuenca del Mediterráneo: en 2015 fue identificado por primera vez en cultivos de melón, pepino y calabacín en Túnez (Mnari et al.,

2015), y posteriormente se identificó en Italia (Panno et al., 2016), así como en Marruecos (Sifres et al., 2018). Tras diversos análisis genéticos, se ha llegado a la conclusión de que esta cepa de la cuenca mediterránea (denominada ToLCNDV-ES) habría surgido tras diferentes eventos de recombinación (Fortes et al., 2016; Moriones et al., 2017). En la figura 2 se puede observar la distribución mundial con el paso del tiempo de este virus.

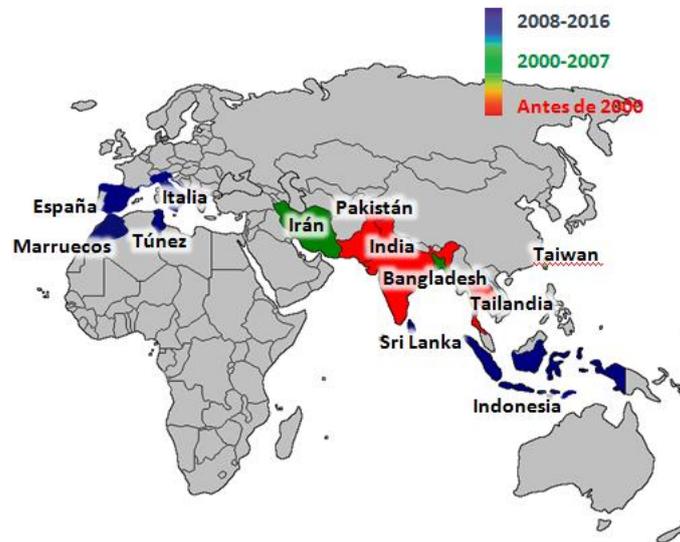


Figura 2. Distribución mundial con el tiempo del ToLCNDV (Zaidi et al., 2017).

1.2.3 Clasificación y estructura del ToLCNDV

El ToLCNDV se halla dentro del grupo II de la Clasificación de Baltimore. Pertenece a la familia *Geminiviridae*, la cual incluye nueve géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* (ICTV, 2019). Además, hay también algunas especies que todavía no han sido asignadas a ninguno de los géneros. El género *Topocuvirus* está compuesto por un solo miembro, el *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) (Rojas et al., 2005), mientras que el género *Begomovirus*, género al que pertenece el ToLCNDV, incluye multitud de especies.

El ToLCNDV presenta un genoma bipartido de DNA circular de cadena sencilla (DNAs, DNA single strand) que consta de dos segmentos denominados DNA-A y DNA-B (Figura 3) (Padidam et al., 1995; Hanley-Bowdoin et al., 2013). Cada segmento tiene un tamaño en torno a 2,7 kb y se encapsidan en partículas icosaédricas idénticas de unos 18 x 30 nm² de tamaño formadas por un total de 22 capsómeros pentaméricos que se organizan constituyendo 2 icosaedros incompletos unidos por una de sus caras, dando así a la partícula viral un aspecto geminado (Figura 4) (Zaidi et al., 2017).

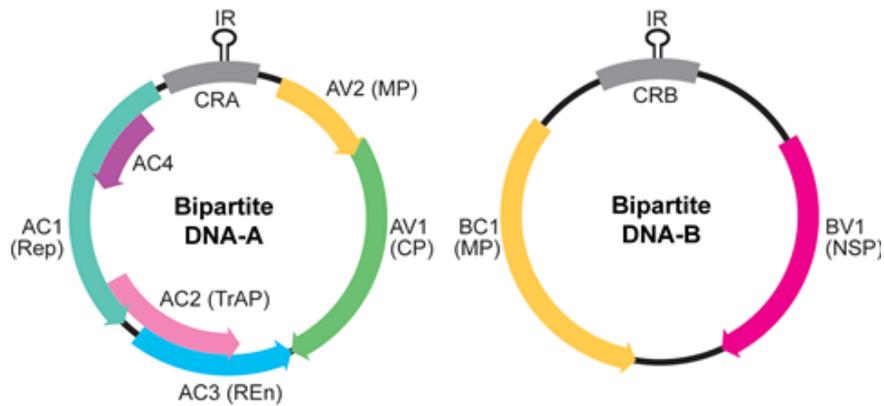


Figura 3. Organización del genoma del virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi. Componentes genómicos DNA-A y DNA-B con flechas que muestran sus respectivos genes (Zaidi et al., 2017).

El segmento genómico denominado DNA-A presenta 6 marcos abiertos de lectura (ORFs), denominados AC1, AC2, AC3, AC4, AV1 y AV2, mientras que el segmento genómico DNA-B codifica los genes BV1 y BC1. La letra "V" hace referencia a que los genes se transcriben a partir de la hebra de DNA que tiene la misma polaridad que el DNA viral encapsidado, mientras que la letra "C" hace a que los genes se transcriben a partir de la hebra de DNA que es complementaria al DNA viral encapsidado (Moriones et al., 2017; Zaidi et al., 2017).

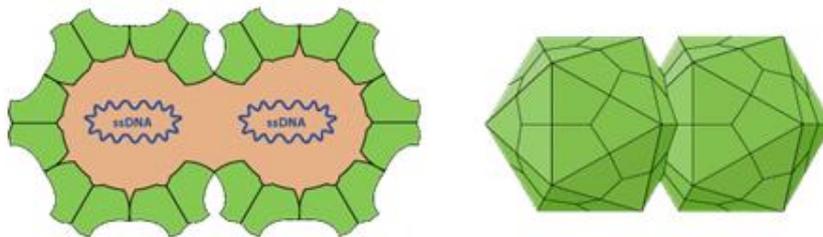


Figura 4. Esquema de la estructura típica de las partículas virales de un geminivirus bipartito (ViralZone, 2019a).

Los genes en sentido del virión y en sentido complementario en ambos fragmentos genómicos se encuentran separados por una región denominada CR (región común), la cual se encuentra conservada en ambos segmentos genómicos. Esta región está formada por 163 nucleótidos, formando 30 de ellos una horquilla tal y como se aprecia en la figura 3 (Padidam et al., 1995) y constituye el lugar donde se une la replicasa para comenzar la replicación del DNA viral.

El DNA-A tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma. El ORF AC1 del DNA-A codifica una proteína del virus asociada a la replicación (Rep). Además de esta proteína, el ORF AC2 codificada una proteína potenciadora de la replicación (REn), el ORF AC3 una proteína activadora de la transcripción, (TrAP) y el ORF AV1 codifica la proteína de la cápsida (CP). El ORF AC4 se solapa internamente con el gen AC1, y su función es la de servir como silenciador de RNA (RSS). Finalmente, el producto del ORF AV2 codifica una proteína relacionada con la formación de la cápsida, así como con una función similar a la RSS (Moriones et al., 2017). Por

otro lado, el gen BC1 de la región genómica del DNA-B codifica una proteína de movimiento (MP) y el gen BV1 codifica una proteína transportadora (NSP) (Zaidi et al., 2017). Se ha sugerido que el funcionamiento de las proteínas víricas se lleva a cabo de manera multifuncional y además, el solapamiento que se da en los distintos marcos abiertos de lectura hace que la expresión se regule de manera eficiente (Moriones et al., 2017).

1.3.3 Transmisión del ToLCNDV

El ToLCNDV es transmitido en la naturaleza por medio de la mosca blanca del tabaco (*Bemisia tabaci*). Atendiendo a la localización geográfica, existen diversas especies crípticas de *B. tabaci* que han llevado a cabo su dispersión (Moriones et al., 2017). Se ha visto que incluso un solo individuo es capaz de transmitir el virus, teniendo un mayor poder de transmisión las hembras que los machos (Moriones et al., 2017). Además, el virus puede mantenerse presente en el insecto durante más de 20 días. Los resultados de varios estudios realizados en el IFAPA (Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica) de Almería han revelado que la ratio de infección en calabacín llega hasta el 95%, lo que supera con creces lo observado en otros virus, como el virus de la cuchara en tomate (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*), que da lugar a valores situados entre 40 y 50% (INNOVAGRI, 2019). Para que se complete el proceso de infección por medio de este vector, son necesarios una serie de receptores que permiten al virus pasar del sistema digestivo a la hemolinfa y de esta a las glándulas salivarias (Ghanim y Czosnek 2016).

Además de la transmisión natural previamente descrita, algunos aislados del ToLCNDV pueden ser transmitidos de forma mecánica. Un ejemplo sería el aislado español ToLCNDV-ES, habiéndose confirmado la transmisión mecánica en diferentes especies de los géneros: *Citrullus*, *Cucumis* y *Cucurbita* (López et al., 2015). Esta capacidad de transmisión mecánica es de gran importancia a la hora de hacer grandes cribados en búsquedas de fuentes de resistencia en programas de mejora, evitando las dificultades que presenta el manejo de la mosca.

Por otro lado, aunque durante mucho tiempo se consideró que los virus del género *Begomovirus* no eran transmitidos por semillas (INNOVAGRI, 2019), recientemente sí que se ha confirmado este tipo de transmisión. En el año 2015, se documentó el primer caso de transmisión por semilla de un geminivirus, el *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) en plantas de patata dulce (Kim et al., 2015). Ese mismo año se demostró la presencia del *Yellow mosaic virus* (YMV) en la cubierta de semillas de frijol negro (Kothandaraman et al., 2015) y en 2017 se documentó la transmisión por semilla del *Beet curly top virus* (BCTV) en un cultivar de petunia en Irán (Anabestani et al., 2017). En cuanto al *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), en 2016 se comprobó la transmisión por semilla de este virus en tomate (Kil et al., 2016), en 2017 en soja blanca (kil et al., 2017a) y en pimiento dulce (Kil et al., 2017b). Todos estos resultados apuntan a que efectivamente algunos begomovirus son capaces de ser transmitidos por semilla. Sin embargo, en recientes estudios realizados en el patosistema TYLCV-*Nicotiana benthamiana* no se observó transmisión por medio de semilla (Rosas-Díaz et al., 2017), este hecho podría deberse a diferencias en los hospedadores o a diferencias en las condiciones experimentales (Rosas-Díaz et al., 2017).

1.4 El virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV)

1.4.1 Origen y difusión del CGMMV

El virus del mosaico verde jaspeado del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) fue descrito por primera vez en 1935 en Inglaterra (Ainsworth, 1935; Dombrovsky et al., 2017). Inicialmente, el virus se detectó infectando plantas de pepino, aunque rápidamente se observó que la gama de hospedadores se ampliaba a diferentes especies de la familia de las cucurbitáceas (Ainsworth, 1935). Los síntomas observados en pepino incluían un aclarado de las venas vasculares y un arrugado de las hojas jóvenes, seguido de un moteado de tonos verdes y distorsión de las hojas. El fruto era aparentemente normal, aunque podía mostrar un cierto moteado (Ainsworth, 1935).

Entre los años 1935 y 1985, el CGMMV se dispersó por Inglaterra, extendiéndose posteriormente por Europa, principalmente por países como Georgia, Dinamarca, Alemania, Finlandia, Rumanía, Rusia, Suecia, Holanda, Ucrania y lo que era en aquel entonces Yugoslavia. Posteriormente, también se detectó en el Líbano, en India y en otros países de Asia como Japón y Taiwán (Dombrovsky et al., 2017). Entre 1986 y 2006, siguió extendiéndose por Europa y Asia, apareciendo esporádicamente nuevos brotes. En los siguientes 10 años, el virus ha continuado su dispersión hacia otros continentes (Figura 5), probablemente debido al comercio internacional de semillas de cucurbitáceas contaminadas provenientes de países tropicales y subtropicales (Dombrovsky et al., 2017; Crespo et al., 2018). En 2013 se detectó por primera vez en Estados Unidos, en un campo de melones de California. En poco tiempo, el virus se propagó a parcelas cercanas con cultivos de pepino y de sandía. Se cree que el virus pudo haber entrado en el país por medio de semillas infectadas (Tian et al., 2014, Li et al., 2015a).

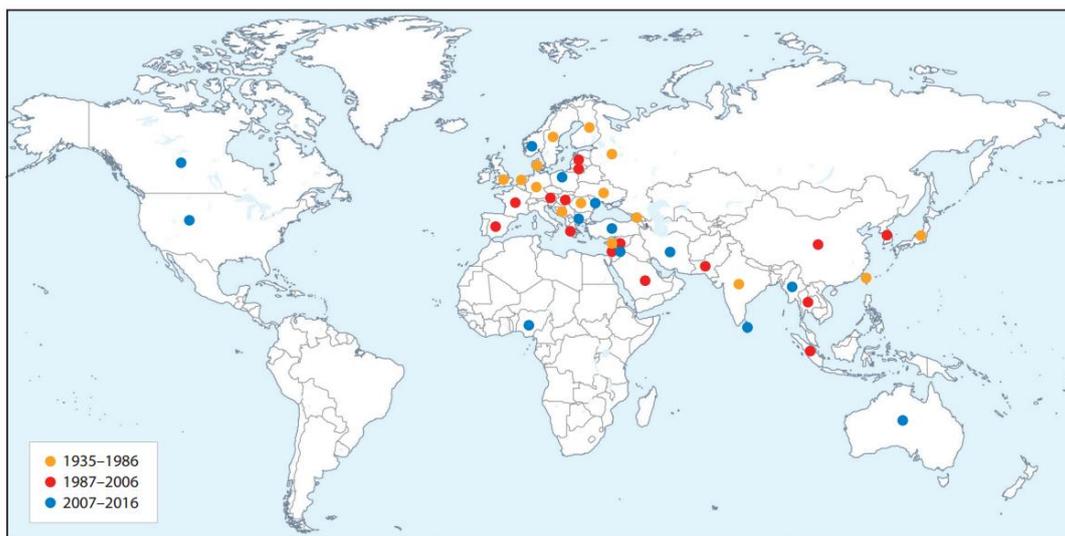


Figura 5. Distribución del virus del mosaico del moteado verde del pepino en diferentes países durante el período de 1935 a 2016 (81 años) (Dombrovsky et al., 2017). Los círculos muestran las primeras detecciones dentro de países individuales en tres periodos de tiempo diferentes: naranja, 1935-1986 (52 años); rojo, 1987-2006 (20 años); azul, 2007-2016 (10 años).

El CGMMV es un tobamovirus detectado de forma esporádica en el sureste español desde los años 90, presentando ocasionalmente brotes graves. La cepa denominada CGMMV-Sp era capaz de infectar a diferentes cultivos de la familia de las cucurbitáceas, pero no el calabacín (Célix et al., 1996). Sin embargo, desde 2015 se ha detectado una nueva raza de este virus en Almería coexistiendo con la anterior. La incidencia de este virus se está incrementando en las últimas campañas según los resultados del laboratorio de COEXPHAL y del laboratorio de virología de IFAPA en Almería (COEXPHAL, 2019).

1.4.2 Clasificación y estructura del CGMMV

El CGMMV pertenece a la familia *Virgaviridae*, la cual se compone de los géneros *Furovirus*, *Giravirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* y *Tobravirus*. Los virus pertenecientes a esta familia son biológicamente muy diversos, aunque en todos ellos es posible su transmisión mecánica. El CGMMV se encuadra dentro del género *Tobamovirus* (Adams et al., 2009). Su genoma consta de una molécula de RNA monocatenario de sentido positivo, de unos 6.400 nucleótidos (Ugaki et al., 1991), el cual se encuentra dentro de una cápsida compuesta por unas 2.000 moléculas del mismo tipo de proteína, resultando en una estructura rígida en forma de varilla, con un tamaño aproximado de 300 x 18 nm (Figura 6) (Dombrovsky et al., 2017). Esta partícula de RNA presenta dos estructuras que lo protegen de la degradación, que son una caperuza nucleotídica metilada (m7G5' pppG) en el extremo 5' y una estructura similar a un tRNA en su extremo 3' (Figura 7) (Dombrovsky et al., 2017).

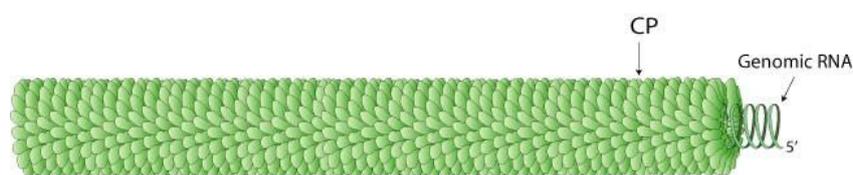


Figura 6. Esquema de la estructura típica de las partículas virales de un tobamovirus (ViralZone, 2019b).

El genoma del CGMMV codifica cuatro polipéptidos: una proteína de 126 kDa, que contiene motivos metiltransferasa y helicasa; una RNA polimerasa dependiente de RNA de 183 kDa y dos proteínas de menor tamaño, la proteína de movimiento (MP) de 30 kDa y la proteína de la cápsida de 17 kDa. Las dos proteínas de mayor tamaño se traducen a partir del codón de inicio próximo al extremo 5', y participan en la replicación viral, mientras que las dos proteínas de menor tamaño se expresan a partir de sendos RNA subgenómicos 3'-cotermiales (Figura 7) (Li et al., 2015b; Dombrovsky et al., 2017).

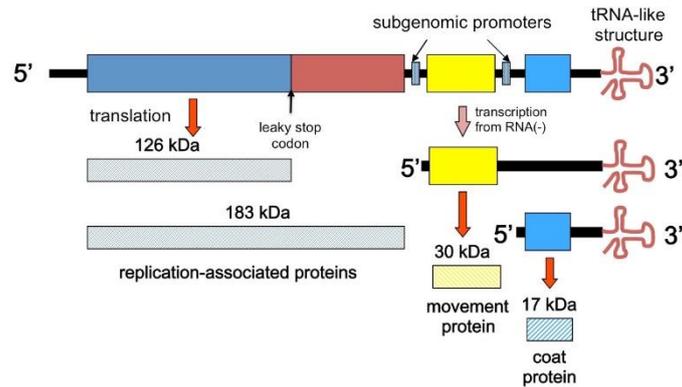


Figura 7. Organización genómica del CGMMV (grkraj.org, 2019). Se representan las proteínas asociadas a la replicación viral (126 y 183 kDa) localizadas más cercanas al extremo 5', y la proteína de movimiento (30 kDa) y de la cápsida (17 kDa), expresadas a partir de RNA subgenómicos 3'-coterminales, más cercanas al extremo 3'.

1.4.3 Transmisión del CGMMV

Todos los virus de la familia *Virgaviridae* se transmiten mecánicamente y aunque se pensaba que esta era la única forma posible de transmisión dentro del género *Tobamovirus*, género al que pertenece el CGMMV (Adams et al., 2009), a día de hoy, se ha demostrado su transmisión efectiva a partir de otros mecanismos, entre los que se encuentra la transmisión por semilla (Liu et al., 2013; Li et al., 2015a; Dombrovsky et al., 2017).

No se ha descrito ningún insecto que actúe como vector del CGMMV (Li et al., 2015a), no obstante, es capaz de dispersarse fácilmente por contacto debido a la estabilidad de sus viriones, así como a su capacidad de permanecer infecciosos en superficies contaminadas durante largos periodos de tiempo. Debido a esta estabilidad, pueden existir insectos que ejerzan un papel importante en su transmisión de manera indirecta, como aquellos utilizados en estrategias de control biológico, o insectos polinizadores (Dombrovsky et al., 2017). Además, el CGMMV puede ser transmitido a plantas sanas a partir de suelos contaminados con el virus, principalmente a través de heridas en las raíces (Li et al., 2015a; Dombrovsky et al., 2017). También se ha demostrado la transmisión efectiva mediante el uso de herramientas de poda utilizadas previamente con plantas infectadas, existiendo la posibilidad de infectar hasta nueve plantas consecutivamente (Li et al., 2015a), así como la posibilidad de infección de plantas sanas que han estado en contacto con la misma agua de riego que plantas infectadas (Li et al., 2015a). Por último, se debe mencionar otra forma efectiva de transmisión como es a través del polen. En un estudio realizado en 2013, se obtuvo que la presencia de CGMMV en fruto proveniente de la fecundación con polen de una planta de pepino infectada sobre una planta sana usada como parental femenino era de entre el 17,1 y el 51,2 % (Liu et al., 2013).

1.5 Diagnóstico de los virus ToLCNDV y CGMMV

Tras la identificación de los virus emergentes es imprescindible disponer de técnicas de diagnóstico que sean rápidas, específicas y fiables. Existen diferentes posibilidades, una de ellas es la identificación visual de la enfermedad causada por el patógeno empleando algún sistema en escala que permita evaluar el nivel de daño en la planta, basándose en la cuantía y grado de los síntomas (López et al., 2015). Es una técnica simple y rápida, pero con la desventaja de que los síntomas pueden ser confundidos fácilmente con los de otros patógenos.

Para llevar a cabo un análisis más específico se pueden emplear técnicas de detección serológica, como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Esta técnica se basa en la detección de un antígeno inmovilizado (proteína codificada por el virus en cuestión, por ejemplo, la proteína de cubierta), mediante un anticuerpo ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable colorimétricamente. Esta técnica tiene la ventaja de poder analizar un gran número de muestras de forma sencilla, rápida y económica. Sin embargo, puede verse limitada por la falta o baja reactividad de un anticuerpo concreto (Alfaro Fernández et al., 2016).

Otras técnicas que permiten detectar un gran número de muestras son las técnicas de detección de ácidos nucleicos en sus diferentes versiones: hibridación molecular y la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Las técnicas de hibridación molecular (impresión de tejido en membrana o *tissue printing*, *dot-blot*, etc.) se basan en el apareamiento específico entre dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos (DNA y/o RNA), de manera que una de las cadenas está marcada (radiactivamente o conjugada con un fluoróforo o con enzimas que den reacciones colorimétricas o quimioluminiscentes), para su posterior detección. Con esta técnica se pueden analizar muchas muestras y realizar una cuantificación relativa del título viral, ya que la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de sonda unida al ácido nucleico que se desea detectar.

En cuanto a la PCR, se han desarrollado diferentes modalidades tanto cualitativas como cuantitativas (qPCR). La técnica se basa en la amplificación de un DNA *in vitro* a partir de muestras con la ayuda de una polimerasa de DNA. Solo es necesario diseñar unos oligonucleótidos con la secuencia complementaria a la secuencia del virus que se desea amplificar, y que funcionan como iniciadores de la replicación. Posteriormente se visualizará el producto de DNA amplificado mediante electroforesis o con técnicas colorimétricas o con fluoróforos para ver los fragmentos amplificados en tiempo real. Esta técnica se puede emplear también para diagnosticar virus de RNA como el CGMMV, para lo cual será necesario hacer una transcripción reversa del RNA una vez extraído, seguido de la amplificación con la DNA polimerasa (RT-PCR). La PCR aunque puede dar lugar a falsos negativos por la presencia de inhibidores que interfieran en la reacción, suele ser el método de detección más eficaz a gran escala debido a su alta sensibilidad (Alfaro Fernández et al., 2016). Además, complementada con la secuenciación de ácidos nucleicos permite hacer estudios de diversidad y de caracterización de nuevos aislados virales. Por otra parte, si no se mantiene una manipulación rigurosa del procesado de las muestras, puede dar lugar a falso positivos por contaminaciones o hibridaciones inespecíficas.

2. Justificación y objetivos

EL ToLCNDV y el CGMMV son virus que en los últimos años han sufrido una gran dispersión, encontrándose ya distribuidos por varios continentes. La forma más sencilla y factible para la dispersión de cualquier virus es mediante el movimiento de semillas infectadas de una región geográfica a otra.

Tras la aparición y documentación de estos dos virus en el territorio nacional, principalmente en la zona de Almería y Murcia, área de intenso cultivo de cucurbitáceas, una labor esencial para frenar su dispersión es la identificación y el posterior control de lotes de semillas infectados, que podrían formar parte de los pedidos suministrados por las casas de semillas. A día de hoy, se conoce con exactitud la posibilidad de transmisión por medio de semilla del CGMMV, y aunque durante mucho tiempo se ha considerado que los virus del género *Begomovirus* no eran transmitidos por semillas, cada vez son más frecuentes las publicaciones que apoyan este tipo de transmisión de virus pertenecientes a la familia de los geminivirus, y en concreto al género *Begomovirus*, al que pertenece el ToLCNDV.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los principales objetivos de este trabajo final de grado fueron:

- 1) Puesta a punto de un protocolo para la extracción de DNA y RNA a partir de semillas de calabacín, pepino, melón y sandía.
- 2) Determinar la presencia de los virus ToLCNDV y CGMMV en lotes de semillas comerciales de calabacín, pepino, melón y sandía.
- 3) Comparar la sensibilidad en la detección de ToLCNDV y CGMMV en semilla entre diferentes técnicas moleculares.
- 4) Identificar el aislado viral presente en las semillas mediante secuenciación.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Material vegetal

El material vegetal de partida estaba compuesto por lotes de semillas pertenecientes a 133 variedades comerciales distintas: 37 variedades de sandía, de los tipos Negra, Rayada y Mini; 26 variedades de calabacín, de los tipos Verde oscuro, Verde medio, Redondo, Blanco y Amarillo; 49 variedades de pepino, de los tipos Holandés, Corto/Moruno y Cóctel; y 21 variedades de melón, de los tipos Piel de sapo, Galia, Cantalupo, Amarillo y Gaua. No obstante, debido a algunos problemas surgidos durante el procesamiento de las muestras, finalmente se analizaron 109 variedades para determinar la presencia del ToLCNDV (30 variedades de sandía, 19 de calabacín, 43 de pepino y 17 de melón) y 126 variedades para determinar la presencia del CGMMV (32 variedades de sandía, 25 de calabacín, 49 de pepino y 20 de melón) (Tabla 1). De las variedades de pepino Cuarto, Litoral y Pradera se analizaron semillas procedentes de diferentes lotes.

Tabla 1. Variedades comerciales de sandía, calabacín, pepino y melón usadas inicialmente para evaluar la presencia de los virus CGMMV y ToLCNDV.

Cultivo	Variedad	Tipo	Cultivo	Variedad	Tipo
Sandía	Mini	Mini	Calabacín	Parador	Amarillo
	África	Negra		Jedida	Blanco
	Augusta			Lucia	
	Azabache			Geode	Redondo
	Fenway			Amalthee	Verde medio
	Fireball			Atlantis	
	Isa			Berula	
	Pasión			Cassiopee	
	Pata Negra			Dynamic	
	Stellar			Musa	
	Sun Gen			Naxos	
	Aitana			Satélite	
	Crimson Giant	Tempra			
	Crimson Sweet	Victoria			
	Crisby	Vitulia			
	Dumara	Gloria		Verde oscuro	
	Estel Deluxe	Aloha			
	Jenny	Brillante			
	Kaorí	Cardea			
	Kasmira	Celeste			
	Leopard	Cronos			
	Melania	Galatea			
	Moon Gem	Prolific			
	Motril	Sinatra			
	Obla	Zaino			
	Polifun				
	Reina Linda				
	Sanres				
	Tigrinho				
	Toro				
	Premium				
	Boston				

Cultivo	Variedad	Tipo	Cultivo	Variedad	Tipo	
Pepino	Quarto	Cóctel	Melón	Malerva	Amarillo	
	Baezal	Corto/Moruno		Alqueva	Blanco	
	Contador			Galia	Alonso	Cantalupo
	Katrina				Ajax	Gaua
	Lucena				Alpes	
	Mandy				Brimos	
	Niptuno				Brisa	
	Nibali				Esmeralda	
	Poseidón				Júcar	
	Potomac				Solear	
	Urano				Jalisco	
	Altanero	Abdera			Piel De Sapo	
	Ancla	Alarcón				
	Arrecife	Grand Rivero				
	Azabache	Ibérico				
	Batallón	Jimenado				
	Borja	Reymiel				
	Braganza	Valderas				
	Cierzo	Valverde				
	Cimbra					
	Dogo					
	Drago					
	Encina					
	Espigón					
	Jairan					
	Jungla					
	Kantaka					
	Levantino					
	Litoral					
	Madroño	Holandés				
	Manglar					
	Marítimo					
	Marumba					
	Mástil					
	Mitre					
	Mulhacen					
	Pmsaje					
	Pampero					
	Pradera					
	Sacratif					
	Sendaviva					
	Sendero					
Strategos						
Tejo						
Teseo						
Tesoro						
Valle						
Vergel						
Estrada						

3.1.2 Material bacteriano

Para amplificar los plásmidos recombinantes portadores del fragmento amplificado del ToLCNDV, se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* de la cepa DH5 α .

3.1.3 Vector de clonación (plásmido)

Para clonar el fragmento de DNA correspondiente al segmento DNA-A del ToLCNDV, se utilizó el vector pJET1.2/blunt que es suministrado linealizado y desfosforilado para evitar que se religue (Figura 8). Debido a que la actividad adenina terminal-transferasa de la Taq ADN polimerasa añade oligonucleótidos de adenina extra en el extremo 3' de los fragmentos de DNA amplificados, primero fue necesario convertir el fragmento de DNA en un fragmento con extremos romos mediante digestión con la exonucleasa suministrada en el kit ("DNA blunting enzyme"). El plásmido posee resistencia a ampicilina y un gen que codifica una proteína letal para la bacteria en caso de religación del propio vector. Si la clonación del fragmento de DNA es eficaz, se impedirá la expresión de la proteína letal. De esta manera, solo las bacterias con plásmidos recombinantes pueden formar colonias, mientras que aquellas en las que se recirculariza el vector, mueren.

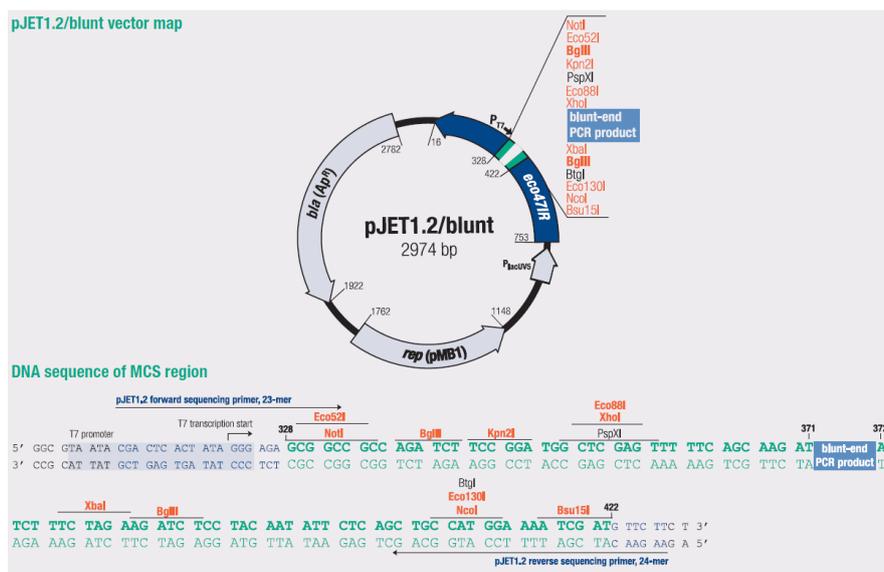


Figura 8. Mapa y características del vector de clonación pJET1.2/blunt.

3.2 Métodos

Para analizar la presencia de los virus ToLCNDV y CGMMV en las semillas comerciales, el paso inicial consistió en realizar una extracción de ácidos nucleicos. En este trabajo, se han empleado dos métodos distintos. En el primero se empleó el reactivo EXTRAzol (Blirt S.A, Polonia), que permite obtener a la vez en un mismo eluido tanto DNA como RNA. En el segundo, se emplearon columnas de gel de sílice de Thermo Scientific (K0503) o minicolumnas de Zymo (Zymo-Spin I columns, C1003-250).

3.2.1 Extracción de DNA y RNA con EXTRAzol

Como media se analizaron individualmente dos semillas de cada variedad. Cada semilla se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml, al que se le añadió una bola de vidrio o de acero inoxidable de 5,6 mm de diámetro. Las semillas de sandía se homogeneizaron con bolas de acero inoxidable, debido a su gran dureza, y el resto con bolas de vidrio. Posteriormente, el tubo se congeló en nitrógeno líquido durante 1 min aproximadamente, y se trituró la semilla con un homogenizador Retsch (MM300) durante 1,5 min a 30 s^{-1} . Ese fue el tiempo inicial de trituración, aunque en algunas variedades se tuvo que aumentar debido a la dureza de la semilla. Las semillas una vez homogeneizadas se mantuvieron en nitrógeno líquido con el fin de evitar la degradación de los ácidos nucleicos. El siguiente paso consistió en añadir a cada tubo 1 ml de EXTRAzol dentro de la cabina de flujo laminar. Se homogenizaron los tubos mediante vórtex y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. Después, se añadieron 500 μl de cloroformo, se homogenizó la mezcla con vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. La mezcla se agitó vigorosamente nuevamente con el vórtex y se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C . Posteriormente, se transfirió la fase acuosa situada en la parte superior del tubo (aproximadamente unos 400 μl) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 500 μl de isopropanol previamente enfriado a -20°C . Tras mezclarlo suavemente, el tubo se dejó a temperatura ambiente, dentro de la cabina durante 20 min. A continuación, se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se homogenizó con vórtex y se centrifugó a 7.500 g durante 5 min a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y tras dejar secar el precipitado al aire, se disolvió en 50 μl de agua ultrapura. Al contener esta muestra tanto DNA como RNA, se guardó a -80°C . A lo largo de este trabajo, este protocolo sufrió una pequeña modificación con el fin de obtener una muestra más pura y limpia, llevándose a cabo entre 2 y 4 lavados con etanol al 75% en la fase final de la extracción.

El DNA extraído fue cuantificado mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies). Usando una alícuota de 2 μl de muestra se obtuvo la concentración de DNA y las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm que indican la calidad de la muestra extraída.

3.2.2 Extracción de DNA y RNA con columnas de gel de sílice

El segundo protocolo de extracción utilizado se adaptó a pequeñas cantidades de tejido y se emplearon columnas de gel de sílice de Thermo Scientific con un límite de carga teórico de 20 μg de DNA, o minicolumnas de Zymo (Zymo-Spin I columns) con un límite teórico de 5 μg . Los protocolos fueron adaptados para poder realizar simultáneamente la extracción tanto de DNA como de RNA.

Una vez homogeneizadas las semillas como se describe en el apartado anterior, los tubos Eppendorf se centrifugaron brevemente para desplazar hacia el fondo todo el material vegetal triturado. Posteriormente se colocaron en hielo y se añadió a cada tubo 1,4 ml de tampón TEX (4 M tiocianato de guanidinio; 0,1 M acetato sódico pH 5,5; 10 mM EDTA; 0,1 M 2-mercaptoetanol). Se homogenizó la muestra con vórtex hasta que todo el extracto quedó resuspendido, y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Para extraer el RNA, se transfirieron 600 μl del sobrenadante a un tubo (1) de 2 ml enfriado en hielo, en el que se habían añadido

previamente 390 µl de etanol al 96%. La muestra se mezcló con vórtex, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se transfirió a una columna colocada sobre un tubo de 2 ml. La otra alícuota del sobrenadante inicial (700 µl aproximadamente) se transfirió directamente a una columna de gel de sílice colocada sobre otro tubo (2) de 2 ml, con el fin de proceder a la extracción del DNA. A partir de este momento, el protocolo seguido fue el mismo, tanto para la extracción de RNA (columna procedente del tubo 1) como para la extracción de DNA (columna procedente del tubo 2). Los tubos con las columnas se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 min. El filtrado se descartó y las columnas se lavaron con 500 µl de TLA (70% etanol; 10 mM acetato sódico). Se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos y el filtrado se volvió a descartar. Se repitió el lavado con TLA en las mismas condiciones. Las columnas se colocaron cada una de ellas sobre un tubo Eppendorf nuevo de 1,5 ml y se procedió a la elución de los ácidos nucleicos. En el centro de cada columna se depositaron 10 µl de TEL (20 mM Tris-HCL; pH 8,5) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 min. Por último, los tubos con las columnas se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 min y el eluido se almacenó a -20°C (DNA) o a -80°C (RNA).

3.2.3 Amplificación del DNA por PCR

Para detectar la presencia del ToLCNDV en las semillas de los cuatro cultivos analizados, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que se trató de amplificar una región del genoma viral correspondiente al segmento DNA-A y, a la vez, un fragmento de un gen interno ("gen housekeeping") de cada una de las especies que serviría como control de que el DNA extraído era de buena calidad. La pareja de cebadores usada para amplificar el DNA-A deriva de la secuencia del aislado de Murcia 11.1 (GenBank, número de acceso KF749225). Los reactivos y cantidades utilizados en las distintas reacciones de PCR llevadas a cabo en este trabajo se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Reactivos y cantidades utilizados en la amplificación por PCR para la detección del ToLCNDV.

Reactivos	Cantidades	PCR para secuenciación
Dream Taq Green Buffer 10x	1,5 µl	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,6 µl	1 µl
Cebador ND-A1F (10 µM)	0,6 µl	1 µl
Cebador ND-A1R (10 µM)	0,6 µl	1 µl
Gen housekeeping F (10 µM)	1 µl	-
Gen housekeeping R (10 µM)	1 µl	-
MgCl ₂	0,6 µl	1 µl
H ₂ O	7,48 µl	16,8 µl
Dream Taq (5 U/µl)	0,12 µl	0,2 µl
DNA	1,5 µl	1,5 µl

También se probaron algunas PCRs con una cantidad de DNA menor (1 µl), pero al obtener peores resultados, se optó por utilizar siempre la cantidad de 1,5 µl. La PCR realizada con el objetivo de secuenciar el DNA amplificado se realizó en un volumen final de 25 µl, no se

incluyeron los cebadores del gen interno y el buffer utilizado no llevaba colorante (Dream Taq Buffer 10 x). En la tabla 3 se detallan los cebadores utilizados.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación del ToLCNDV o del "gen housekeeping".

Elemento amplificado	Cebador	Secuencia
Región del segmento DNA-A	ND-A1F	5'- GGGTTGTGAAGGCCCTTGTAAAGGTGC - 3'
	ND-A1R	5'- AGTACAGGCCATATACAACATTAATGC - 3'
Región del segmento DNA-B	ND-B1d	5'- GAAACACAAGAGGGGCTCGGA - 3'
	ND-B1r	5'- GCTCCACTATCAAAGGGCGT - 3'
Gen <i>CmPEROX</i>	Cm PEROXF	5'- ACTCGATCAACTTCGAGCAAA - 3'
	Cm PEROXR	5'- TCCCACTGAAGAATACGCATC - 3'
β -actin (gen <i>CIACT</i>)	CIACT-F	5'- CCATGTATGTTGCCATCCAG - 3'
	CIACT-R	5'- GGATAGCATGGGGTAGAGCA - 3'
Gen <i>CpACS7</i>	CpACS7F	5'- GTGAGAGTGGCAAGAGGGAG - 3'
	CpACS7R	5'- CGGCATTGCAAAGAAAAGCAG - 3'
β -actin (gen <i>CIACT</i>)	Actina1 Forw-Intrón	5'- GGCTGATGCTGAGGATATYC - 3'
	Actina Rev-Intrón	5'- ACAATACCATGCTCAATGGG - 3'

Como control interno para determinar la calidad del DNA extraído, inicialmente se utilizó el gen *CmPEROX*, pero debido a los resultados erráticos que se obtuvieron, se decidió probar el gen *CIACT* que codifica la β -actina. Finalmente, se empleó el gen *CIACT* como control interno para la amplificación a partir del DNA procedente de las semillas de sandía, pepino y melón, y el gen *CpACS7* en el caso del DNA procedente de las semillas de calabacín. Por otro lado, también se empleó una pareja de cebadores distintos que hibridan en la región intrónica del gen *CIACT*. Esta pareja de cebadores se empleó para discriminar la amplificación procedente del DNA genómico de la amplificación obtenida a partir de preparaciones de RNA (RT-PCR). Para detectar el virus se utilizaron en todos los casos los cebadores ND-A1F y ND-A1R, mientras que los cebadores ND-B1d y ND-B1r sólo se utilizaron a la hora de secuenciar la región perteneciente al segmento DNA-B.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador con una desnaturalización inicial del DNA de 3 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C, acabando finalmente con una extensión de 5 min a 72°C.

3.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar los fragmentos de DNA amplificados por medio de la PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,3% en tampón TAE 1 x (40 mM Tris pH 7,5, 20 mM acetato sódico, 1 mM EDTA). En cada pocillo del gel se cargaron 10 μ l de la reacción de PCR, mientras que en uno de ellos se cargaron 5,5 μ l del marcador de pesos moleculares DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo a una potencia eléctrica de 100 voltios durante un tiempo de 45 min. Para poder visualizar el DNA, los geles fueron teñidos durante 20 min en una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Posteriormente, se lavó el gel con agua destilada y se iluminó con luz ultravioleta en un transiluminador Biorad (Universal Hood II) para visualizar y fotografiar el resultado.

3.2.5 Purificación de DNA para secuenciación

Para la purificación de los fragmentos de DNA amplificados se usó un kit GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific). La reacción de PCR con el DNA amplificado (25 μ l) se mezcló con un volumen igual de solución DBB (DNA Binding Buffer). Posteriormente, se añadió un volumen de isopropanol y se mezcló con una pipeta. La mezcla se transfirió a una columna proporcionada en el kit y se centrifugó durante 45 segundos a 13.000 rpm, descartando después el filtrado. Posteriormente, se lavó la columna con 700 μ l de solución de lavado (WB), se centrifugó durante 45 segundos a 13.000 rpm y se descartó de nuevo el filtrado. Se realizó una centrifugación adicional durante 1 min para eliminar los restos de etanol que pudiesen quedar en la columna, y esta se colocó sobre un tubo Eppendorf nuevo de 1,5 ml. Por último, el DNA retenido en la columna se eluyó en 30 μ l de buffer de elución, incubando durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugando 1 min a 13.000 rpm. El DNA eluido se guardó a -20°C.

3.2.6 Obtención de extremos romos

Tanto en este apartado como en la reacción de ligación, se utilizó el kit CloneJET PCR Cloning de Thermo Scientific. El primer paso consistió en hacer romos los fragmentos de DNA amplificados con la Taq DNA polimerasa, mediante incubación con la enzima DNA Blunting Enzyme. Para ello, se mezclaron en un Eppendorf 10 μ l de buffer de reacción 2X, 10 μ l del producto de la PCR, 6 μ l de agua libre de nucleasas y 1 μ l del enzima. La mezcla se agitó durante 5 segundos y se incubó a 70°C durante 5 min.

3.2.7 Reacción de ligación

Una vez obtenidos los extremos romos tal y como se detalla en el apartado anterior, se enfrió en hielo el contenido del tubo y se añadió 1 μ l de vector pJET1.2/blunt (50 ng/ μ L) y 1 μ l de la enzima T4 DNA ligasa. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min.

3.2.8 Transformación bacteriana

Para introducir los plásmidos conteniendo el inserto de interés en las bacterias competentes se usó la técnica del choque térmico, mediante la cual se somete a las células competentes a un estrés térmico para facilitar la entrada del plásmido al interior de las bacterias (Sambrook et al., 1989). Se mezclaron 5 μ l de la reacción de ligación con alícuotas de 50 μ l de bacterias competentes de la cepa DH5 α y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla fue calentada a 42°C durante 1 min y 45 segundos en un termobloque (Stuart SBH13OD) y se incubó nuevamente en hielo durante 5 min. A continuación, se añadieron 500 μ L de solución LB (10 g triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por cada litro de medio) y la mezcla se incubó durante 1 h a 37°C en agitación (200 rpm). Pasado ese tiempo, se sembraron 50 μ l del cultivo en una placa de Petri con medio LB-agar suplementadas con ampicilina (50 μ g/ml de ampicilina). El resto del cultivo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y las bacterias precipitadas se resuspendieron y se sembraron en otra placa de Petri. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche para favorecer el crecimiento de las colonias bacterianas.

3.2.9 Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de las colonias

En principio, todas las colonias crecidas en la placa de Petri debían haber incorporado algún fragmento de DNA. Para comprobar si se trataba del inserto de interés, se llevó a cabo una PCR de las colonias. Cada colonia de bacterias a analizar se disolvió en 10 µl de agua. De esta disolución, se tomó 1 µl para la PCR y los 9 µl restantes se guardaron en nevera hasta tener los resultados de la PCR. Los reactivos empleados para realizar la PCR se muestran en la tabla 4, y los cebadores del vector pJET1.2/Blunt utilizados en la tabla 5.

Tabla 4. Reactivos de la reacción de PCR de las colonias recombinantes.

Reactivos	Cantidades
10X Taq buffer	2 µl
dNTP mix, 2 mM each	2 µl
Cebador pJET1.2 Forward 10 µM	0,4 µl
Cebador pJET1.2 Reverse, 10 µM	0,4 µl
H ₂ O miliQ	14,1 µl
Taq DNA Polimerasa 5 U/µL,	0,1 µl
Dilución colonia en 10 µL de H ₂ O	1 µl

Tabla 5. Cebadores utilizados para la identificación de las colonias recombinantes.

Elemento amplificado	Cebador	Secuencia
Inserto del vector pJET1.2/blunt	Cebador pJET1.2 forward	5´ - CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC - 3´
	Cebador pJET1.2 reverse	5´ - AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG - 3´

La PCR se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial del DNA de 3 min a 95°C, seguida de 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 40 s a 72°C, y con una extensión final de 5 min a 72°C.

3.2.10 Purificación de plásmidos recombinantes (minipreps)

Las colonias que resultaron positivas tras visualizar en un gel de agarosa el resultado de la PCR, se seleccionaron para proceder a la extracción del plásmido recombinante. Las bacterias que se encontraban resuspendidas en 9 µl de agua se sembraron en 4 ml de medio de cultivo LB con ampicilina (50 µg/ml). El cultivo se creció a 37°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. La purificación de los plásmidos se realizó usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). Primeramente, se centrifugaron los 4 ml en los que habían crecido las bacterias a 13.000 rpm durante 1 min. Las bacterias precipitadas se resuspendieron en 250 µl de solución de resuspensión con RNAsa A (0,1 mg/ml). Esta mezcla se agitó por medio de vórtex y se añadieron 250 µl de solución de lisis. Tras mezclar por inversión, se llevó a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 5 min para favorecer la rotura de las células. Posteriormente, se añadieron 350 µl de solución de neutralización, mezclando también por inversión, se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a una

columna cromatográfica de gel de sílice proporcionada por el kit, colocada sobre un tubo de 2 ml. La columna se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y el eluido se descartó. El DNA retenido en la membrana se lavó con 500 μ l de solución de lavado y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. Este paso de lavado se repitió una vez más y finalmente se realizó una nueva centrifugación durante 1 min 13.000 rpm para eliminar el etanol residual. Por último, la columna se situó sobre un tubo Eppendorf de 1,5 ml y el DNA se eluyó con 50 μ l de la solución de elución. Primero se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó durante 2 min a 13.000 rpm para recuperar el DNA retenido en la columna.

3.2.11 Digestión del DNA con enzimas de restricción

Para verificar la presencia del inserto de interés, se llevó a cabo una digestión con enzimas de restricción. La digestión del DNA se realizó en un volumen final de 15 μ l, y los componentes de la reacción fueron 4,5 μ l de agua miliQ, 1,5 μ l de 10x Buffer 0 (Fermentas) con BSA, 1 μ l de la enzima de restricción *Bgl*II (corta en ambos lados del sitio de clonación del plásmido pJET1.2/blunt, tal y como se ve en la figura 8), y 8 μ l del plásmido purificado (miniprep). La mezcla se incubó a 37°C durante 45 min, y posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para visualizar los resultados.

3.2.12 Secuenciación del producto de PCR y plásmido recombinante

La secuenciación se realizó en un secuenciador automático (ABI 3100, Applied Biosystems) perteneciente al IBMCP. El DNA a secuenciar (producto de PCR purificado o plásmido recombinante) se cuantificó, se ajustó la concentración a 10 ng/ μ l y se envió a secuenciar un volumen total de 10 μ l. La secuenciación se realizó en las dos direcciones con los mismos cebadores utilizados en la PCR o con cebadores específicos del plásmido pJET1.2/blunt (pJET1.2 directo y pJET1.2 reverso).

3.2.13 Análisis informático

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas 2.6.6. Posteriormente se usó el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para determinar las secuencias de la base de datos del NCBI (National center for Biotechnology Information) con mayores homologías.

3.2.14 Hibridación molecular (*dot-blot*)

Esta técnica se basa en la hibridación de DNA o RNA inmovilizados en una membrana de nylon cargada positivamente, con una sonda (en este caso de RNA). La sonda debe estar marcada (con digoxigenina por ejemplo) para poder visualizar a posteriori los resultados. Para ello, se cargaron entre 2 y 2,5 μ l de DNA (detección del ToLCNDV) o RNA (detección del CGMMV) previamente extraídos como se indica en los apartados 3.2.1 y 3.2.2. Las membranas con los ácidos nucleicos se fijaron con luz ultravioleta a 120 mJ/cm² por ambas caras y se guardó en papel de filtro para su posterior hibridación.

Las membranas se prehibridaron durante 2 h a 68°C con 10 ml de solución de prehibridación (Tabla 6). Transcurrido este tiempo, se descartó la solución de prehibridación y se añadió nueva solución con sonda (25 ng/ml) desnaturalizada, almacenada a -20 °C. La solución de

hibridación se mantuvo durante toda la noche en el horno de hibridación. En el caso de la membrana conteniendo muestras de RNA, al ser la sonda de CGMMV también de RNA, la hibridación se realizó a 68°C, mientras que en el caso de las muestras de DNA, al ser la sonda de ToLCNDV de RNA, la temperatura fue de 56°C. Los lavados y el revelado de las membranas son idénticos en ambos casos, y se detallan a continuación. Primeramente, las membranas se lavaron dos veces durante 5 min con 10 ml de buffer 2 x SSC/0,1% (w/v) SDS a temperatura ambiente y otras dos veces con 10 ml de 0,5 x SSC/0,1% (w/v) SDS a 68° C durante 15 min. El resto del proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con 10 ml de Buffer TL (Buffer T1 [0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl a pH 7,5 con NaOH] y 0.3% (w/v) Tween 20) durante 5 min y posteriormente se bloquearon con 10 ml de Buffer T2 (18 ml de buffer T1 y 2 ml del reactivo blocking de Roche al 10%) durante 30 min. A continuación, se incubaron las membranas durante 45 min con 10 ml de Buffer T2 conteniendo 1 µl del anticuerpo antidigoxigenina (dilución 1:10.000). Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 min con 10 ml de Buffer TL, seguido de un lavado de 5 min con buffer T3 (0,1 M Tris-HCl a pH 9,5 y 0,1 M NaCl). Finalmente, las membranas se incubaron durante 5 min con una solución formada por buffer T3 y sustrato (CSPD) (Chemiluminescence substrate) (dilución 1:100), colocándolas entre plásticos y eliminando el exceso de sustrato y a continuación se colocó una película de revelado (Amerhans). El revelado de la película se realizó automáticamente en la cámara oscura del IBMCP.

Tabla 6. Solución de prehibridación con formamida. Volumen total de 50 ml.

Componente y proporción	Cantidad
50% formamida	25 ml
5 x SSC	12,5 ml (SSC 20x) [(3M NaCl; 0,3 M citrato sódico 2 H ₂ O; pH 7.0 con HCl diluido)]
0,1% SLS	0,5 ml (SLS 10%) ([1:10 en H ₂ O estéril])
0,02% SDS	0,1 ml (SDS 10%)
2% blocking (de una solución 10%)	10 ml (10%)
H ₂ O	Ajustar a 50 ml

3.2.15 RT-PCR para verificar la presencia del CGMMV

Las muestras que mostraron señal de hibridación con la sonda de CGMMV se analizaron mediante RT-PCR (transcriptasa inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa) para tratar de confirmar los resultados. Para sintetizar el DNA complementario a partir del RNA, se utilizó el kit Thermo Scientific RevertAid RT. El primer paso consistió en mezclar en un tubo Eppendorf de 1,5 ml de volumen, 3 µl de RNA con 1 µl de cebador (Random Hexamer primer) y 8 µl de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó en un termobloque (Stuart SBH13OD) durante 5 min a 65°C. Posteriormente, a cada tubo se añadieron 4 µl de 5x Reaction buffer, 1 µl de la enzima RiboLock RNase inhibitor (20 U/µl), 2 µl de 10 mM dNTPs y 1 µl de la enzima RevertAid RT (200 U/µl), obteniendo así un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y después a 43°C durante 60 min. Finalmente, la reacción se detuvo incubándola a 70°C durante 5 min. Posteriormente se realizó una PCR con los reactivos y cebadores indicados en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Reactivos utilizados en la amplificación por PCR para la detección del CGMMV.

Reactivos	Cantidades
Dream Taq Buffer 10x	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Cebador CGMMV F (10 µM)	1 µl
Cebador CGMMV R (10 µM)	1 µl
Gen housekeeping F (10 µM)	1,5 µl
Gen housekeeping R (10 µM)	1,5 µl
MgCl ₂	1 µl
H ₂ O	13,8 µl
Dream Taq (5 U/µl)	0,2 µl
DNA complementario	1,5 µl

Tabla 8. Cebadores utilizados para la amplificación del CGMMV o del "gen housekeeping".

Elemento amplificado	Cebador	Secuencia
Genoma viral (CGMMV)	CGMMV-F	5' - GAAGAGTCCAGTTCTGTTTC - 3'
	CGMMV-R	5' - ACCCTCGAAACTAAGCTTTC - 3'
β-actin (gen <i>CIACT</i>)	CIACT-F	5' - CCATGTATGTTGCCATCCAG - 3'
	CIACT-R	5' - GGATAGCATGGGGTAGAGCA - 3'
<i>CpACS7</i>	<i>CpACS7</i> -F	5' - GTGAGAGAGTGGCAAGAGGGAG - 3'
	<i>CpACS7</i> -R	5' - CGGCATTGCAAAGAAAAAGCAG - 3'

4. Resultados

4.1 Detección del ToLCNDV en semillas de cucurbitáceas

Para analizar la presencia del ToLCNDV en los lotes de semillas comerciales, el método inicial utilizado fue la reacción en cadena de la polimerasa. Se comenzó con las semillas de pepino y las extracciones de DNA se realizaron con el reactivo EXTRAzol y usando el gen *CmPEROX* como control interno en la reacción de PCR. La concentración de DNA obtenida osciló aproximadamente entre 100 y 500 ng/ μ l. No obstante, debido a que los resultados fueron erráticos y poco reproducibles se decidió realizar las extracciones con las columnas de gel de sílice. En este trabajo, solo se han considerado como resultados concluyentes aquéllos en los que se amplificó correctamente el gen utilizado como control interno, lo que confirmaría la buena calidad del DNA extraído. Además de cambiar el método de extracción del DNA, conforme avanzó el estudio, también se decidió cambiar el control interno y utilizar en pepino, melón y sandía el gen *CIACT* que codifica la β -actina (Kong et al., 2015), mientras que en calabacín se usó el gen *CpACS7*.

De las 133 variedades comerciales distintas, finalmente se obtuvieron resultados concluyentes de 109 variedades (30 de sandía, 19 de calabacín, 43 de pepino y 17 de melón). En la mayoría de los casos, se analizaron dos semillas por variedad y para realizar la PCR se mezcló el DNA extraído de las dos semillas de cada variedad. Cuando los resultados fueron positivos, se analizaron las dos muestras individualmente y se analizaron nuevas semillas de dicha variedad. A continuación, se describen los resultados obtenidos con las semillas de cada uno de los cuatro cultivos evaluados.

4.1.1 Semillas de sandía

De las 37 variedades disponibles de sandía se analizaron 32 (Tabla 9). Para confirmar la calidad del DNA extraído, en todos los casos se empleó como control interno el gen *CIACT*. Este gen se amplificó a partir del DNA extraído de las semillas de 30 variedades. Falló la amplificación a partir de una muestra de DNA extraído con columnas de gel de sílice (variedad Kasmira), así como en la única muestra de DNA que se había extraído con EXTRAzol (variedad Estel Deluxe). Sin embargo, en ninguna de las muestras se detectó la presencia del ToLCNDV. En la figura 9 se muestra el resultado de la PCR de 12 variedades de sandía. Como puede observarse 11 de ellas quedan validadas por la amplificación del gen interno y una no (variedad Kasmira, carril 11).

Tabla 9. Resultados obtenidos tras el análisis por PCR de las semillas de sandía. Se muestra la variedad, tipo de sandía y método de extracción del DNA empleado.

Variedad	Tipo	Extracción	PCR DNA			
			Control Interno β -actin (<i>CI</i> ACT)	ToLCNDV		
Sandía Estel Deluxe	Rayada	EXTRAzol	-	-		
Sandía Aitana			+	-		
Sandía Crimson Giant			+	-		
Sandía Crimson Sweet			+	-		
Sandía Crisby			+	-		
Sandía Dumara			+	-		
Sandía Jenny			+	-		
Sandía Kaori			+	-		
Sandía Kasmira			-	-		
Sandía Leopard			+	-		
Sandía Melania			+	-		
Sandía Moon Gem			+	-		
Sandía Motril			+	-		
Sandía Obla			+	-		
Sandía Polifun			+	-		
Sandía Reina Linda			+	-		
Sandía Sanres			+	-		
Sandía Tigrinho			+	-		
Sandía Toro			+	-		
Sandía Premium			+	-		
Sandía Boston			+	-		
Sandía Mini			Mini	Columna	+	-
Sandía África			Negra		+	-
Sandía Augusta					+	-
Sandía Azabache					+	-
Sandía Fenway					+	-
Sandía Fireball	+	-				
Sandía Isa	+	-				
Sandía Pasión	+	-				
Sandía Pata Negra	+	-				
Sandía Stellar	+	-				
Sandía Sun Gen	+	-				

(+) Indica amplificación del gen interno o del virus y (-) indica no amplificación.



Figura 9. Electroforesis con el resultado de la amplificación a partir del DNA extraído de 12 variedades de sandía. A la izquierda, se muestra la amplificación del gen *CI*ACT (221 pb) utilizado como control interno. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). De las 12 muestras analizadas, la amplificación del control interno falló en la variedad Kasmira (carril 11). En ninguna de las muestras se detectó la presencia del ToLCNDV. En el gel de la derecha, se muestra el resultado de la amplificación de los controles en un gel hecho en paralelo. Con una flecha roja se muestra la banda de amplificación correspondiente al DNA-A del ToLCNDV (504 pb). En el control positivo "C₁+" se amplificó DNA de una semilla de melón procedente de una planta infectada con ToLCNDV en invernadero. En el control positivo "C₂+" se amplificó DNA procedente de hoja de una planta de melón piel de sapo infectada en un invernadero de Almería. En los tres carriles restantes se muestran los controles negativos de la PCR, perteneciendo el carril 1 a una planta libre de virus, el 2 al control de agua y el 3 al de mezcla de PCR.

4.1.2 Semillas de calabacín

De las 26 variedades disponibles de calabacín se analizaron 25 (Tabla 10) y como control interno de amplificación se empleó el gen *CpACS7*. Dicho gen se amplificó a partir del DNA de 19 variedades, fallando en cinco muestras de DNA extraído con columnas de gel de sílice, así como en la única muestra de DNA extraído con EXTRAzol (variedad Aloha). Además, en 10 de las muestras (5 que habían resultado positivas y 5 negativas) también se empleó el gen *CIACT* como control interno, pero el resultado fue el mismo (Tabla 10). No obstante, en este cultivo se observó una mejor amplificación al usar como control interno el gen *CpACS7*. El ToLCNDV se detectó en la variedad de calabacín Geode (Figura 10).

Tabla 10. Resultados obtenidos tras el análisis por PCR de las semillas de calabacín. Se muestra la variedad, tipo de calabacín y método de extracción del DNA empleado.

Variedad	Tipo	Extracción	PCR DNA				
			Control Interno		ToLCNDV		
			<i>CpACS7</i>	β -actin (<i>CIACT</i>)			
Calabacín Aloha	Verde Oscuro	EXTRAzol	-		-		
Calabacín Brillante		Columna		+		-	
Calabacín Cardea				+		-	
Calabacín Celeste				+	+	-	
Calabacín Cronos				+		-	
Calabacín Galatea				-	-	-	
Calabacín Prolific				+		-	
Calabacín Sinatra				+		-	
Calabacín Zaino				+	+	-	
Calabacín Parador			Amarillo		+	-	
Calabacín Jedida	Blanco			+	-		
Calabacín Lucia	Redondo	Columna	-	-	-		
Calabacín Geode				+	+	+	
Calabacín Amalthee				-	-	-	
Calabacín Atlantis				+		-	
Calabacín Berula				+		-	
Calabacín Cassiopee				-	-	-	
Calabacín Dynamic				+		-	
Calabacín Musa			Verde Medio		+		-
Calabacín Naxos					+		-
Calabacín Satélite					+		-
Calabacín Temptra		+			-		
Calabacín Victoria		+			-		
Calabacín Vitulia		+			-		
Calabacín Gloria		-		-	-		

(+) Indica amplificación del gen interno o del virus y (-) indica no amplificación.

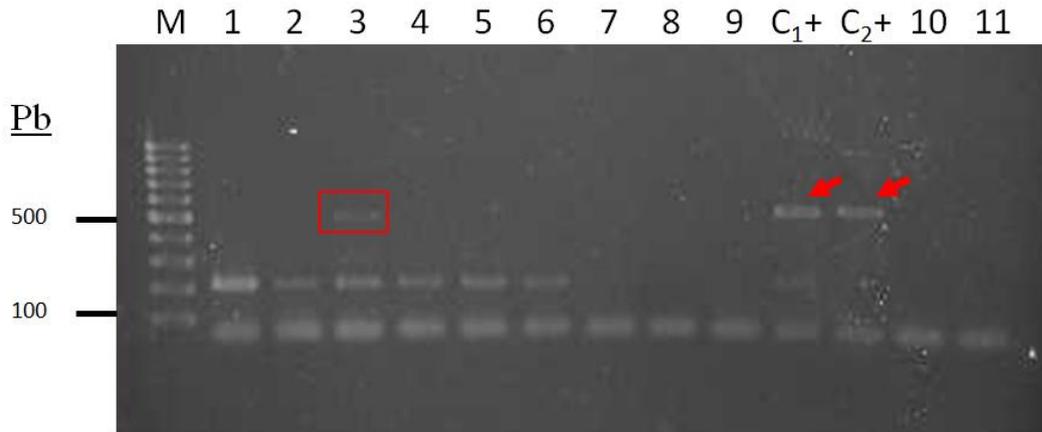


Figura 10. Electroforesis con el resultado de la amplificación a partir del DNA extraído de 9 variedades de calabacín. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). El control interno (gen *CICT*, 221 pb) se amplificó en 6 muestras analizadas (carriles 1-6) y falló en tres (carriles 7-9). En el carril 3 (variedad Geode) se observa una banda de 504 pb (marcada en un rectángulo rojo) que corresponde a la amplificación del ToLCNDV. Con una flecha roja se muestra la banda de amplificación correspondiente al DNA-A del ToLCNDV (504 pb) en los controles positivos. En el control positivo "C₁+" se amplificó DNA de una semilla de melón procedente de una planta infectada con ToLCNDV en invernadero. En el control positivo "C₂+" se amplificó DNA procedente de hoja de una planta de melón piel de sapo infectada en un invernadero de Almería. En los carriles 10 y 11 se muestran los controles de agua y mezcla de PCR, respectivamente.

4.1.3 Semillas de pepino

El análisis de la presencia del ToLCNDV se llevó a cabo de manera efectiva en 43 de las 49 variedades disponibles de pepino (Tabla 11). Como los análisis se comenzaron con este cultivo, el número de extracciones realizadas con EXTRAzol fue bastante mayor que en el resto (8 de 49). En estos casos, se utilizó el gen *CmPEROX* como control interno y se obtuvo amplificación en 5 de las 8 muestras, además en una de ellas (Pepino Jungla) también se detectó la presencia del ToLCNDV (Figura 11). En las muestras restantes, la extracción del DNA se realizó con columnas de gel de sílice y como control interno se empleó el gen *CICT*. Inicialmente se usaron dos parejas diferentes de cebadores de ese gen, pero como se observaron bandas inespecíficas con una de las parejas (β -actin *CICT-int*), se eligió a partir de entonces la pareja de cebadores *CICT-F/CICT-R*. Finalmente, de las 43 muestras de semillas que se obtuvieron resultados concluyentes, el ToLCNDV se detectó únicamente en la variedad Jungla (Figura 11). En algunos casos, como en la variedad Sacratif (Figura 12, carril 3), se aprecia una banda inespecífica que podría confundirse con una banda debida a la presencia de ToLCNDV. Posteriores análisis determinaron que esta variedad estaba libre de virus.

Tabla 11. Resultados obtenidos tras el análisis por PCR de las semillas de pepino. Se muestra la variedad, tipo de pepino y método de extracción del DNA empleado.

Variedad	Tipo	Extracción	PCR DNA				
			Control Interno			ToLCNDV	
			<i>CmPEROX</i>	β -actin (<i>CIAC</i> -int)	β -actin (<i>CIAC</i>)		
Pepino Encina	Holandés	EXTRAzol	+			-	
Pepino Jairan			-			-	
Pepino Jungla			+			+	
Pepino Kantaka			+			-	
Pepino Marumba			+			-	
Pepino Mástil			-			-	
Pepino Tejo			-			-	
Pepino Marítimo		EXTRAzol/Columna	+		+	-	
Altanero		Columna			+	-	
Pepino Ancla					+	-	
Pepino Arrecife				+		-	
Pepino Azabache				+	+	-	
Pepino Batallon					+	-	
Pepino Borja				+		-	
Pepino Braganza					+	-	
Pepino Cierzo					+	-	
Pepino Cimbra					+	-	
Pepino Dogo					+	-	
Pepino Drago					+	-	
Pepino Espigon					+	-	
Pepino Levantino					+	-	
Pepino Litoral					+	-	
Pepino Madroño					+	-	
Pepino Manglar				+		-	
Pepino Mitre				+		-	
Pepino Mulhacen					-	-	
Pepino Pmsaje					+	-	
Pepino Pampero					+	-	
Pepino Pradera					+	-	
Pepino Sacratif				+		-	
Pepino Sendaviva					+	-	
Pepino Sendero					-	-	
Pepino Strategos					+	-	
Pepino Teseo					+	-	
Pepino Tesoro					+	-	
Pepino Valle					+	-	
Pepino Vergel					+	-	
Estrada			Cóctel			+	-
Quarto						+	-
Pepino Baezal			Corto/Moruno			+	-
Pepino Contador						+	-
Pepino Katrina					-	-	
Pepino Lucena				+		-	
Pepino Mandy					+	-	
Pepino Niptuno					+	-	
Pepino Nibali				+		-	
Pepino Poseidón					+	-	
Pepino Potomac				+	-		
Pepino Urano				+	-		

(+) Indica amplificación del gen interno o del virus y (-) indica no amplificación.

4.1.4 Semillas de melón

En el caso del melón, de las 21 variedades disponibles se analizaron 20, pudiéndose amplificar el control interno en 17 de ellas (Tabla 12). En semillas procedentes de 4 variedades la extracción del DNA se realizó con EXTRAzol, pero el control interno (gen *CmPEROX*) sólo se pudo amplificar en dos de las muestras, detectándose el virus en una de ellas, concretamente en la variedad Valderas (Figura 11). En el resto de variedades la extracción se realizó con columnas de sílice y como control interno se usó el gen *CIAC*; empleando la pareja de cebadores *CIAC*-F/*CIAC*-R en 13 muestras y la pareja Actina1 For-Intrón/Actina Rev-Intrón en otras cuatro. De estas 17 últimas muestras, 16 quedaron validadas por la amplificación del gen interno, pero el virus no se detectó en ninguna de ellas. En la figura 12 se aprecia también algunas bandas inespecíficas al analizar la variedad Melón Alonso (carril 10) que podría

confundirse con una banda debida a la presencia de ToLCNDV. Posteriores análisis determinaron que esta variedad estaba libre de virus.

Tabla 12. Resultados obtenidos tras el análisis por PCR de las semillas de melón. Se muestra la variedad, tipo de melón y método de extracción del DNA empleado.

Variedad	Tipo	Extracción	PCR DNA				
			Control interno			ToLCNDV	
			<i>CmPEROX</i>	β -actin (<i>CI</i> ACT-int)	β -actin (<i>CI</i> ACT)		
Melón Abdera	Piel De Sapo	EXTRAzol	-			-	
Melón Grand Rivero			-			-	
Melón Ibérico			+		+	-	
Melón Valderas			+			+	-
Melón Alarcón						+	-
Melón Jimenado					+	-	
Melón Reymiel				+		-	
Melón Valverde					-	-	
Melón Malerva		Amarillo	Columna			+	-
Melón Alqueva		Blanco				+	-
Melón Alonso	Cantalupo			+		-	
Melón Magestium					+	-	
Melón Ajax	Galia				+	-	
Melón Alpes					+	-	
Melón Brimos					+	-	
Melón Brisa						+	-
Melón Esmeralda						+	-
Melón Jucar						+	-
Melón Solear		Gaua			+		-
Melón Jalisco				+		-	

(+) Indica amplificación del gen interno o del virus y (-) indica no amplificación.

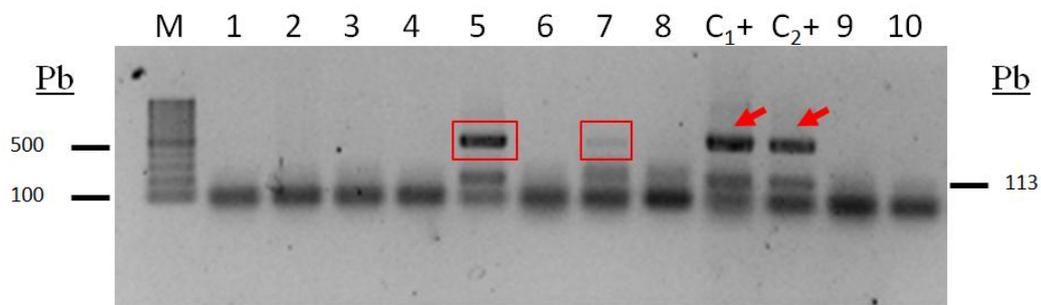


Figura 11. Electroforesis con el resultado de la amplificación a partir del DNA extraído con EXTRAzol de 5 variedades de melón (carriles 1-5) y 3 de pepino (carriles 6-8). En este caso, como control interno de amplificación se usó el gen *CmPEROX* (113 pb). M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). De las 5 muestras de melón analizadas la amplificación del control interno falló en las cuatro primeras, pero no en la muestra 5 (Melón Valderas,) en la que también se observa una banda de 504 pb (marcada en un rectángulo rojo) que corresponde a la amplificación del ToLCNDV. De las 3 muestras de pepino analizadas, la amplificación del control interno falló en la primera (carril 6). En la muestra del carril 7 (Pepino Jungla) se observa una banda de 504 pb (marcada en un rectángulo rojo) que corresponde a la amplificación del ToLCNDV. Con una flecha roja se muestra la banda de amplificación correspondiente al DNA-A del ToLCNDV (504 pb) en el control positivo. En el control positivo "C₁+" se amplificó DNA de una semilla de melón procedente de una planta infectada con ToLCNDV en invernadero. En el control positivo "C₂+" se amplificó DNA procedente de hoja de una planta de melón piel de sapo infectada en un invernadero de Almería. En los carriles 9 y 10 se muestran los controles de agua y mezcla de PCR, respectivamente.

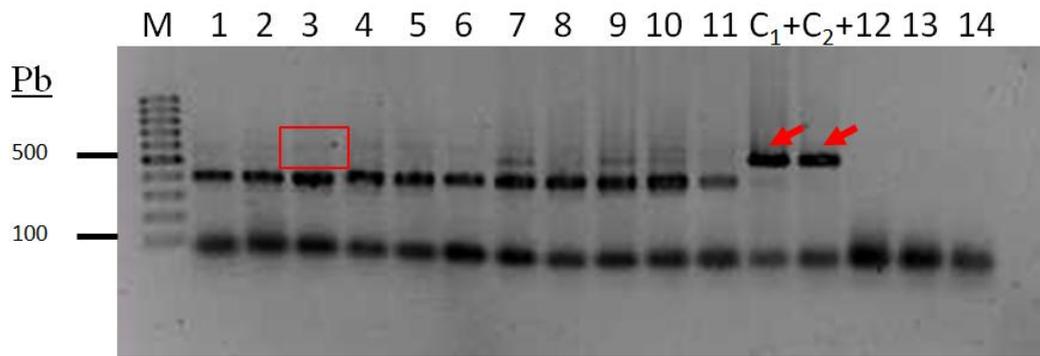


Figura 12. Electroforesis con el resultado de la amplificación a partir del DNA extraído con columna de sílice de diferentes variedades de melón y pepino (carriles 1-11). En este caso, como control interno de amplificación se usó el gen *CIACT* con los cebadores Actina1 Forw-Intrón y Actina Rev-Intrón (393 pb). M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). En este gel se observan unas tenues bandas (como la marcada con un rectángulo rojo de la variedad de Pepino Sacratif en el carril 3), que a priori corresponderían a la amplificación del ToLCNDV. Análisis posteriores confirmaron que se trata de bandas inespecíficas debido al uso de estos cebadores. Con una flecha roja se muestra la banda de amplificación correspondiente al DNA-A del ToLCNDV (504 pb). En el control positivo "C₁+" se amplificó DNA de una semilla de melón procedente de una planta infectada con ToLCNDV en invernadero. En el control positivo "C₂+" se amplificó DNA procedente de hoja de una planta de melón piel de sapo infectada en un invernadero de Almería. En los carriles 12 y 13 se muestran los controles de agua y mezcla de PCR, respectivamente. El carril 14 corresponde a una muestra de melón en la que no se pudo amplificar el control interno.

4.1.5 Análisis de la presencia del ToLCNDV mediante hibridación molecular

Una vez analizada la presencia del ToLCNDV en las semillas de los cuatro cultivos mediante PCR se detectó el virus en tres variedades distintas: una de calabacín (Calabacín Geode), una de pepino (Pepino Jungla) y una de melón (Melón Valderas). Posteriormente, se realizaron tres nuevas extracciones de cada una de estas tres variedades, y tres de la variedad Sacratif de pepino mediante columnas de gel de sílice y las cinco muestras de cada variedad se depositaron en una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda de RNA del ToLCNDV (Figura 13). En este caso, solamente dos de las muestras iniciales de semillas de melón de la variedad Valderas (extraídas con EXTRAzol) mostraron señal de hibridación, siendo el resto de las muestras negativas.

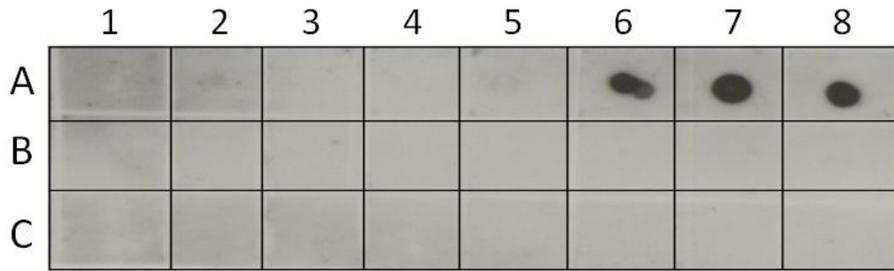


Figura 13. Resultado de la de hibridación *dot-blot* con una sonda específica del ToLCNDV. En la membrana se cargó el DNA extraído de cinco semillas distintas de cada una de las tres variedades comerciales que habían presentado amplificación del ToLCNDV mediante PCR y otras tantas de la variedad de pepino Sacratif que a priori parecía positiva por la presencia de una tenue banda (Figura 12). Las dos muestras de la variedad Melón Valderas extraídas por el método de EXTRAzol fueron colocadas en las casillas 6A y 7A. En la casilla 8A se colocaron 2 μ l de control positivo "C₁+" (DNA de una semilla de melón procedente de una planta infectada con ToLCNDV en invernadero). En la casilla 1C se colocó un control negativo.

4.1.6 Análisis de la presencia del ToLCNDV mediante PCR

Por último, se realizó una nueva comprobación por PCR de todas las muestras analizadas mediante hibridación molecular (Figura 14). En esta ocasión, el ToLCNDV se detectó en una semilla de Pepino Jungla (extraída con EXTRAzol), en las cinco semillas de Melón Valderas (dos extraídas con EXTRAzol y tres mediante columnas de sílice) y en una semilla de Calabacín Geode (extraída mediante EXTRAzol).

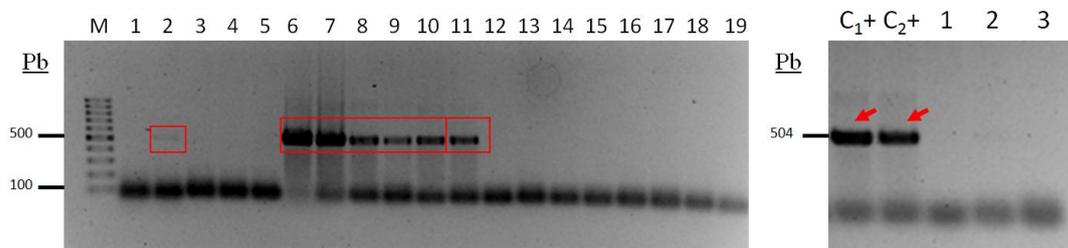


Figura 14. Análisis de la presencia del ToLCNDV mediante PCR. Se analizaron cinco semillas de las tres variedades comerciales que presentaron el virus en un primer análisis (Pepino Jungla, Melón Valderas y Calabacín Geode) (sin control interno). Además, se analizaron también cuatro semillas de pepino de la variedad Sacratif para asegurar la ausencia del virus en esta variedad. **Izquierda**, se muestran las variedades de Pepino Jungla (pocillos 1-5), Melón Valderas (pocillos 6-10), Calabacín Geode (pocillos 11-15), y Pepino Sacratif (pocillos 16-19). Marcadas con un rectángulo rojo se indican las muestras positivas (amplificación de DNA viral, 504 pb), amplificadas a partir de DNA de: una semilla de Pepino Jungla extraída con EXTRAzol (carril 2); dos semillas de Melón Valderas extraídas con EXTRAzol (carriles 6 y 7), así como tres semillas de esta misma variedad extraídas con columnas de sílice (carriles 8-10); y en una semilla de Calabacín Geode extraída con EXTRAzol (carril 11). **Derecha**, se encuentran marcadas con una flecha roja la amplificación de ToLCNDV perteneciente a los controles positivos. En el control positivo "C₁+" se amplificó DNA de una semilla de melón procedente de una planta infectada con ToLCNDV en invernadero. En el control positivo "C₂+" se amplificó DNA procedente de hoja de una planta de melón piel de sapo infectada en un invernadero de Almería. En el carril 1 de este gel, se muestra el control negativo, perteneciente a una planta sana. Los carriles 2 y 3 pertenecen a los controles de agua y mezcla de PCR, respectivamente.

4.1.7 Confirmación de la presencia del ToLCNDV por secuenciación

Para confirmar la identidad del virus se procedió a secuenciar bidireccionalmente el producto de PCR de dos muestras pertenecientes a la variedad de Melón Valderas, tanto de una región del DNA-A (muestras de los carriles 6 y 7 de figura 14) como del DNA-B (fragmento de amplificación de 677 pb obtenido con los cebadores ND-B1d y ND-B1r de la Tabla 3) (resultado no mostrado). El análisis BLAST de las dos secuencias obtenidas de los fragmentos de DNA-A y B mostró una identidad de secuencia superior al 99% entre ellos. En la Figura 15 se muestra el alineamiento de las dos secuencias obtenidas del segmento B. En la figura 16 se aprecia uno de los cambios observados al secuenciar el fragmento B de ToLCNDV en las dos muestras de Melón Valderas, habiéndose producido una sustitución de Timina por Adenina o viceversa. Además, la homología de secuencia fue también superior al 99% con la secuencia de los aislados de ToLCNDV presentes en la cuenca Mediterránea (España, Italia y Marruecos) como puede observarse en la figura 17, mientras que la homología con los aislados de Asia fue de entorno al 91% para el DNA-A (Figura 18) y 88% para el DNA-B (dato no mostrado).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1146 bits(620)	0.0	628/632(99%)	0/632(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATCGTTATAGGACGTCATATGTCACATATCCAGCCAAAACCCGACCCGGAAACGAAACACC	60		
Sbjct 1	ATCGTTATAGGACGTCATATGTCACATATCCAGCCAAAACCCGACCCGGAAACGAAACACC	60		
Query 61	GCSTTCGTTCCCTACATCAGGTTAAAGAGTTTGAGCATATCTGGAACGTTTGCTGTTTCGTA	120		
Sbjct 61	GCSTTCGTTCCCTACATCAGGTTAAAGAGTTTGAGCATATCTGGAACGTTTGCTGTTTCGTA	120		
Query 121	AGTCGGACTTGATGACAGAAGTTGTTCAACAATGGACTTTCACGGAGTGATGCTGTTG	180		
Sbjct 121	AGTCGGACTTGATGACAGAAGTTGTTCAACAATGGACTTTCACGGAGTGATGCTGTTG	180		
Query 181	TAGTAGTCCGGATAAATCGCCAAAGATTTATTCTGCGACCCAAACCGCTAATACCTTTTG	240		
Sbjct 181	TAGTAGTCCGGATAAATCGCCAAAGATTTATTCTGCGACCCAAACCGCTAATACCTTTTG	240		
Query 241	TTGAAATGTTGGATCCGTAATGCCTGCAGGGTAGTCTTAAAGTGGCAGAACGTCATC	300		
Sbjct 241	TTGAAATGTTGGATCCGTAATGCCTGCAGGGTAGTCTTAAAGTGGCAGAACGTCATC	300		
Query 301	AAGAACGTTTGTATTACTGAATCAACATCCATCGTCTCAATACTCCACATCCCACTG	360		
Sbjct 301	AAGAACGTTTGTATTACTGAATCAACATCCATCGTCTCAATACTCCACATCCCACTG	360		
Query 361	CTATCAAGAAGTTCTGCATTGTAAGTGCATACCAAGAAGTACACAACTGGGTAAAGT	420		
Sbjct 361	CTATCAAGAAGTTCTGCATTGTAAGTGCATACCAAGAAGTACACAACTGGGTAAAGT	420		
Query 421	TCAAAGACGAAGAAGATGGCTGACTGGACTATACTCCAAACGCGCCGAAATGC	480		
Sbjct 421	TCAAAGACGAAGAAGATGGCTGACTGGACTATACTCCAAACGCGCCGAAATGC	480		
Query 481	TTATTATATATTTATGTTAAGCGATATATCACAAGTGGATTTTATAGCAATG	540		
Sbjct 481	TTATTATATATTTATGTTAAGCGATATATCACAAGTGGATTTTATAGCAATG	540		
Query 541	TAATTCCTAATTACATGGCTAATCATTAAAGTATTACAACAATTTATTATCTATAA	600		
Sbjct 541	TAATTCCTAATTACATGGCTAATCATTAAAGTATTACAACAATTTATTATCTATAA	600		
Query 601	ATTGCAGTAGTTTTTATTACACGCCCTTAAA	632		
Sbjct 601	ATTGCAGTAGTTTTTATTACACGCCCTTAAA	632		

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del segmento B del ToLCNDV procedentes de dos muestras positivas de Melón Valderas.

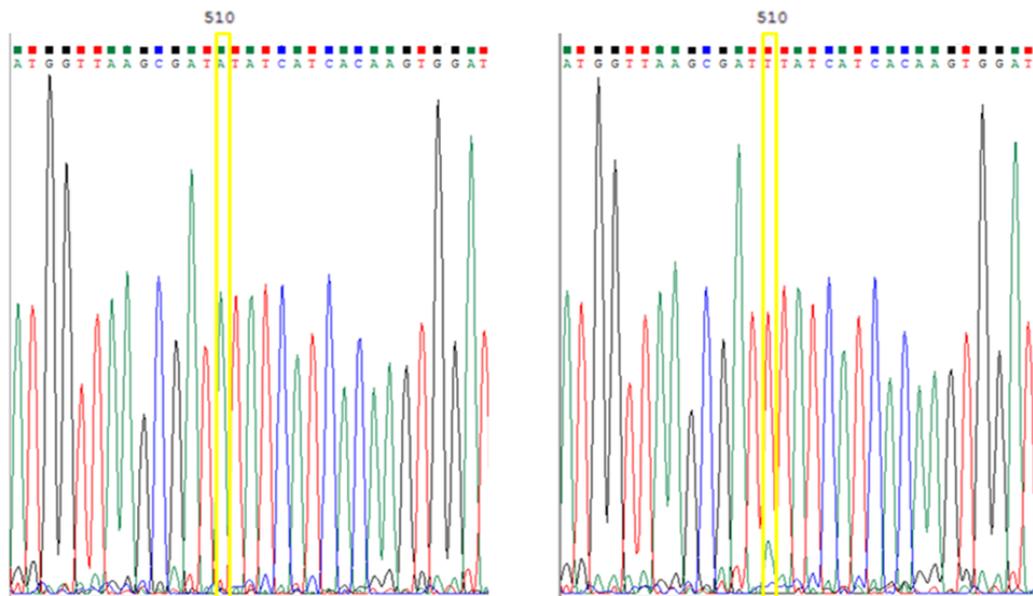


Figura 16. Cromatogramas de la secuenciación del segmento B de TolCNDV de las dos muestras de Melón Valderas. Se encuentra marcado el cambio de la posición 510 (A/T).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
833 bits(451)	0.0	453/454(99%)	0/454(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATGCTCGCATATTGGCAAAGTCATGTGTGTAGTGTATGTTACTCGAGGCACCTGGACT	60		
Sbjct 521	CGATGCTCGCATATTGGCAAAGTCATGTGTGTAGTGTATGTTACTCGAGGCACCGGACT	580		
Query 61	CACACATCGCGTAGGCAAGCGATTTTGTGTGAAATCTGTCTATGTACTGGGAAAATATG	120		
Sbjct 581	CACACATCGCGTAGGCAAGCGATTTTGTGTGAAATCTGTCTATGTACTGGGAAAATATG	640		
Query 121	GATGGATGAAAATATCAAACATAAAATCATACTAATAGTGTATGTTCTTTCTTGTTCG	180		
Sbjct 641	GATGGATGAAAATATCAAACATAAAATCATACTAATAGTGTATGTTCTTTCTTGTTCG	700		
Query 181	TGACCGCGTCCAACCGGAACCCCTCAAGATTTGGGGAAGTTTCAATATGTTGATAA	240		
Sbjct 701	TGACCGCGTCCAACCGGAACCCCTCAAGATTTGGGGAAGTTTCAATATGTTGATAA	760		
Query 241	TGAACCTAGCACAGCCACGGTGAAGAATGCAATCGTATCGTTATCAAGTCTTACGGAA	300		
Sbjct 761	TGAACCTAGCACAGCCACGGTGAAGAATGCAATCGTATCGTTATCAAGTCTTACGGAA	820		
Query 301	GTGGCATGCTACTGTGACGGGAGGAACGTATGCATCAAGGGAGCAAGCATTAGTTAGGAA	360		
Sbjct 821	GTGGCATGCTACTGTGACGGGAGGAACGTATGCATCAAGGGAGCAAGCATTAGTTAGGAA	880		
Query 361	GTTTGTAGGGTTAATAATTATGTTGTTTACAATCAACAAGAGCCGGCAAGTATGAGAA	420		
Sbjct 881	GTTTGTAGGGTTAATAATTATGTTGTTTACAATCAACAAGAGCCGGCAAGTATGAGAA	940		
Query 421	TCATACTGAAAATGCATTATGTTGTATATGGCC	454		
Sbjct 941	TCATACTGAAAATGCATTATGTTGTATATGGCC	974		

Figura 17. Alineamiento de la secuencia del segmento A de TolCNDV de una muestra de Melón Valderas, con la secuencia del aislado A-MU.12.ZU/1.2 de Murcia.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
606 bits(328)	3e-177	412/454(91%)	0/454(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATGCTCTCGCATATTGGCAAGTCATGTGTGTAGTGATGTTACTCGAGGCCTGGACT			60
Sbjct 522	CGATGTATCGCACATTGGCAAGTCATGTGTGTAGTGATGTTACTCGAGGCCTGGACT			581
Query 61	CACACATCGCGTAGGCAAGCGATTTTGTGTGAATCTGTCTATGTACTGGGAAAAATATG			120
Sbjct 582	CACACATCGCGTAGGCAAGCGATTTTGTGTGAATCTGTCTATGTACTGGGAAAAATATG			641
Query 121	GATGGATGAAAATATCAAACATAAAATCATACTAATAGTGTATGTTCTTCTTGTTCG			180
Sbjct 642	GATGGATGAAAACATCAAGACGAAAAACACACTAACAGTGTAAATGTTTTTTTAGTTCG			701
Query 181	TGACCGGCGTCCAACCGAACCCTCAAGATTTGGGGAAGTTTCAATATGTTTGATAA			240
Sbjct 702	AGATCGTCTCTACAGGAACACCCCAAGATTTGGGGAAGTTTCAATATGTTTGACAA			761
Query 241	TGAACCTAGCACAGCCACGCTGAAGAATGCATCGTGATCGTTATCAAGTCTTACGGAA			300
Sbjct 762	TGAACCGAGCACAGCAACGCTGAAGAATGCATCGTGATCGTTATCAAGTCTTACGGAA			821
Query 301	GTGGCATGCTACTGTGACGGGAGGAACGTATGCATCAAGGAGCAAGCATTAGTTAGGAA			360
Sbjct 822	GTGGCATGCGACTGTGACGGGAGGAACCTATGCATCGAGGAGCAAGCATTAGTTAGAAA			881
Query 361	GTTTGTAGGGTTAATAATTATGTTGTTTACAATCAACAAGAGGCCGGCAAGTATGAGAA			420
Sbjct 882	GTTTGTAGGGTCAATAATTATGTTGTTTATAATCAACAAGAGGCCGGCAAGTATGAGAA			941
Query 421	TCATACTGAAAATGCATTAATGTTGTATATGGCC		454	
Sbjct 942	TCATACTGAAAATGCATTGATGTTGTATATGGCC		975	

Figura 18. Alineamiento de la secuencia del segmento A de ToLCNDV de una muestra de Melón Valderas, con la secuencia del aislado IN:JV:Luf:17 de Indonesia.

Además de secuenciar el producto de PCR de los segmentos A y B, también se clonó el segmento A de una de las muestras en un vector de clonación. La secuenciación de los clones obtenidos confirmó la elevada homología (superior al 99%) con los aislados de la cuenca mediterránea (dato no mostrado), lo que nuevamente pone de manifiesto la uniformidad de este aislado como ya se había descrito anteriormente (Fortes et al., 2016).

4.2 Detección del CGMMV en semillas de cucurbitáceas

Para analizar la presencia del CGMMV lo primero que se hizo fue extraer el RNA de las semillas. Inicialmente la extracción se realizó con EXTRAzol, pero posteriormente se decidió realizar las extracciones con las columnas de gel de sílice, debido a la mayor calidad del RNA extraído por este método. En total, se extrajo el RNA de semillas procedentes de 126 variedades (Tabla 1), analizando en casi todas las variedades dos semillas. La detección del CGMMV se llevó a cabo mediante *dot-blot* con sondas de RNA del CGMMV marcadas con digoxigenina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 19 y como puede observarse, en los controles positivos se detectó una fuerte señal de hibridación, mientras que en resto de las muestras la señal fue inexistente y en 11 variedades muy débil (2 de sandía, 2 de calabacín, 6 de pepino y 1 de melón, marcadas con un círculo verde en la figura 19).

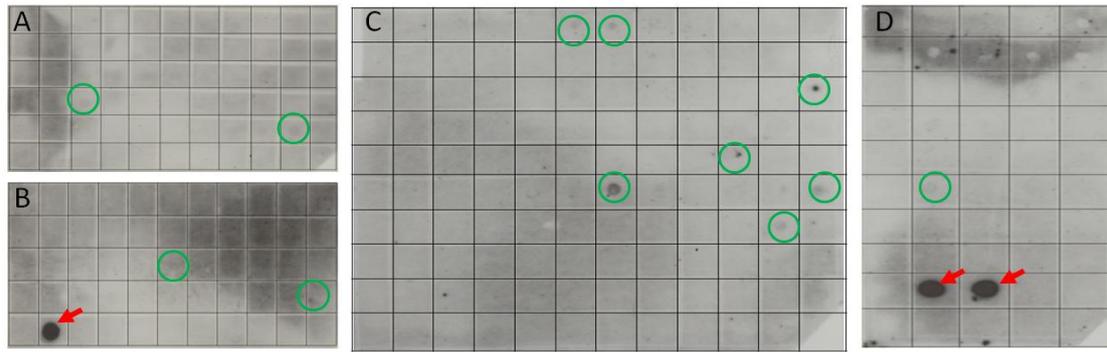


Figura 19. Resultados del análisis *dot-blot* para detectar la presencia del CGMMV. En cada cuadro de la membrana se aplicaron directamente 2 μ l del RNA purificado. (A), 32 variedades de sandía; (B), 25 variedades de calabacín; (C) 49 variedades de pepino; y (D) 20 variedades de melón. Se indican con flechas rojas los controles positivos de hibridación (RNA procedente de una planta infectada con CGMMV) y con círculos verdes las muestras que dieron una ligera señal de hibridación y que se seleccionaron para comprobar la presencia del virus mediante RT-PCR: variedades de sandía Motril y Premium (membrana A); variedades de calabacín Aloha y Vitulia (membrana B); variedades de pepino Jungla (dos muestras), Pradera, Braganza, Nibali, y Sacratif (membrana C); y la variedad de melón Júcar (membrana D).

Para tratar de confirmar la presencia del CGMMV en las semillas de estas 11 variedades que a priori parecían positivas, se realizó una RT-PCR, pero como puede observarse en la figura 20, todos los resultados fueron negativos. Estos resultados apoyan la idea de que todas las semillas analizadas estaban libres del CGMMV.

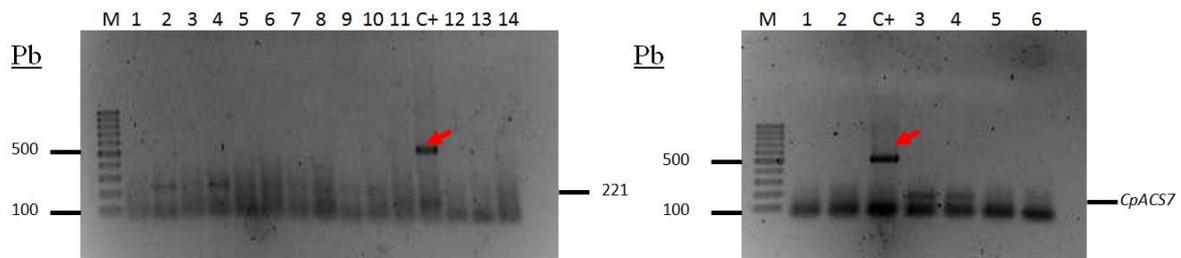


Figura 20. Análisis electroforético mediante RT-PCR de las muestras que a priori presentaban CGMMV. En el gel de la izquierda se representan las variedades seleccionadas de pepino (carriles del 1 al 7), melón (carril 8) y sandía (carriles 9 y 10). En este caso, como control interno de amplificación se usó el gen *CIAct* (221 pb). M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). Se observa marcado con una flecha roja el control positivo (RT-PCR a partir del RNA procedente de una planta infectada con CGMMV). En los pocillos 12, 13 y 14 se muestran controles negativos de planta sana, agua y mezcla de PCR, respectivamente. En el gel de la derecha, se muestran las dos variedades de calabacín seleccionadas (carriles 1 y 2), utilizando en este caso el gen *CpACS7* como control interno. El carril "C+" es el control positivo y los carriles 3-6 son dos controles negativos de plantas libres de virus, agua y mezcla de PCR, respectivamente.

5. Discusión

En este Trabajo Final de Grado se ha detectado la presencia del ToLCNDV en lotes de semillas comerciales, aunque solo se ha podido confirmar en tres de las variedades analizadas, una de calabacín, una de pepino y una de melón. El análisis de las secuencias ha puesto de manifiesto que el aislado de ToLCNDV detectado pertenece a la cepa europea ToLCNDV-ES. Esta cepa se detectó inicialmente en España en el año 2013 (Juárez et al., 2014; Ruiz et al., 2015) y más tarde en otros países de la cuenca mediterránea como Túnez, Italia y Marruecos (Mnari et al., 2015; Panno et al., 2016; Sifres et al., 2018). Los aislados pertenecientes a esta cepa son muy uniformes genéticamente, algo que probablemente se deba a un efecto de cuello de botella asociado a la transmisión del virus a una nueva zona (Fortes et al., 2016). El ToLCNDV es principalmente transmitido a través de la mosca blanca del tabaco (*Bemisia tabaci*), un vector que ha causado la dispersión de este virus en varios territorios (Moriones et al., 2017). Hasta hace poco tiempo, se consideraba que los virus de la familia *Geminiviridae*, no eran transmitidos por semilla. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la transmisión por semilla de los siguientes virus pertenecientes a la familia *Geminiviridae*; *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) (Kim et al., 2015) y *Beet curly top virus* (BCTV) (Anabestani et al., 2017); y más concretamente, dentro del género de los *Begomovirus*, se ha demostrado la presencia y transmisión por semilla del *Yellow mosaic virus* (YMV) (Kothandaraman et al., 2015) y el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Kil et al., 2016; 2017a,b). Además de todos estos relevantes casos, entre finales de 2018 y principios de 2019 se publicaron dos importantes artículos que acercaban aún más la posibilidad de la transmisión por semilla del ToLCNDV. En el primero de ellos, se describió una nueva especie viral *Bitter gourd yellow mosaic virus* (BgYMV), cuya infectividad en semilla se dató en un 79,16%, mientras que la transmisión a plántula fue del 32,05%, resultados que apoyan claramente la transmisión por semilla por parte de los begomovirus (Manivannan et al., 2019). El segundo artículo, se trata del primer informe en el que se demuestra la dispersión por semilla de una nueva raza de ToLCNDV que tendría un origen común con la descrita en España. En este estudio, no solo se comprobó la presencia del virus en diferentes partes de la semilla, sino que también se confirmó su transmisión a la plántula en un 25% de los casos (Sangeetha et al., 2018). Por otro lado, es sabido que la presencia de un virus en una semilla, incluso en el embrión, no siempre da lugar a una infección en las plántulas, ya que esta puede verse reducida por el vigoroso entorno metabólico de una plántula en crecimiento, pudiendo llegar este a inhibir la acumulación y la translocación del virus (Kothandaraman et al., 2015). Además, las diferencias en los hospedadores y las distintas condiciones experimentales pueden tener también cierta influencia en este proceso (Rosas-Díaz et al., 2017).

Existen varios mecanismos que pueden haber desencadenado la presencia del virus en el tejido embrionario, tales como la infección a través de gametos o la infección directamente después de la fertilización (Kothandaraman et al., 2015). Otro posible mecanismo sería la existencia de una columna de células similar al suspensor, que facilitaría el movimiento del virus desde el tejido de la madre a las células embrionarias (Kothandaraman et al., 2015). La detección del virus en semilla sería solo el primer paso del estudio para determinar la transmisión del ToLCNDV a través de semilla. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto lo importantes que son los controles rutinarios de las semillas que salen al mercado. Intensificándolos, se podría evitar la dispersión de este virus que tantas pérdidas causa en los cultivos españoles.

Por otro lado, no se detectó la presencia del CGMMV en ninguna de las semillas analizadas. No se conocen insectos transmisores de este virus (Li et al., 2015a), pero se sabe que su transmisión es muy eficaz por contacto directo con plantas infectadas, la transmisión por suelo contaminado, o a través de semilla (Okada, 1986). Este virus presenta unos viriones muy estables, y puede permanecer infeccioso en distintas superficies durante largos periodos de tiempo, lo que hace aún más factible su dispersión. Aunque en este estudio no se ha detectado el CGMMV en ninguna semilla sí que suelen darse casos de detección en semillas listas para su distribución (Constable et al., 2018). Por lo tanto, se deben aumentar los análisis previos para evitar que se disperse a otras regiones. Además, conviene profundizar en estudios basados en tratamientos de desinfección. Los tratamientos térmicos o químicos de desinfección de semillas pueden dar lugar a resultados y conclusiones inciertas, pues su efectividad depende de varios factores (Reingold et al., 2014). No obstante, recientemente se ha descrito un tratamiento efectivo basado en el uso de *Pseudomonas oleovorans* como agente antivírico, siendo capaz de reducir en un 40% la presencia de CGMMV en semillas de melón (Kim et al., 2017), lo que pone de manifiesto la importancia de la búsqueda de protocolos efectivos con los fines antes mencionados.

6. Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son:

- Hemos puesto a punto un protocolo óptimo para la extracción de DNA y RNA a partir de semillas de cucurbitáceas.
- Se ha demostrado la presencia del ToLCNDV en lotes de semillas comerciales de tres especies: calabacín, pepino y melón. Aunque el porcentaje de semillas infectadas es bajo, este hecho epidemiológicamente podría ser importante si se demuestra la transmisión del virus desde la semilla a la plántula.
- El análisis informático de la secuencia de nucleótidos confirma la elevada homología (superior al 99%) con los aislados del mismo virus de todos los países de la cuenca mediterránea.
- El CGMMV no se ha detectado en ninguno de los lotes de semillas analizados.
- La técnica de detección viral basada en la hibridación molecular (*dot-blot*) es muy poco sensible debido, posiblemente, a la escasa cantidad de virus presente en las semillas. Es necesario emplear PCR y RT-PCR para clarificar falsos negativos y falsos positivos, al ser estas técnicas mucho más sensibles y específicas.

7. Bibliografía

ADAMS, M., ANTONIW, J. and KREUZE, J. (2009). Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Archives of Virology*, 154(12), pp.1967-1972.

AINSWORTH, G. (1935). Mosaic diseases of the cucumber. *Annals of Applied Biology*, 22(1), pp.55-67.

ALFARO-FERNANDEZ, A., SANCHEZ-NAVARRO, J. A., LANDEIRA, M., FONT, M. I., HERNANDEZ-LLOPIS, D., and PALLAS, V. (2016). Evaluation of PCR and non-radioactive molecular hybridization techniques for the routine diagnosis of Tomato leaf curl New Delhi virus, Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus. *Journal of Plant Pathology*, 98(2), pp.245-254.

ANABESTANI, A., BEHJATNIA, S., IZADPANA, K., TABEIN, S. and ACCOTTO, G. (2017). Seed Transmission of Beet Curly Top Virus and Beet Curly Top Iran Virus in a Local Cultivar of Petunia in Iran. *Viruses*, 9(10), pp.299-311.

CELIX, A., LUIS-ARTEAGA, M. and RODRÍGUEZ-CEREZO, E. (1996). First Report of Cucumber Green Mottle Mosaic Tobamovirus Infecting Greenhouse-Grown Cucumber in Spain. *Plant Disease*, 80, p.1303.

COEXPHAL, (2019). Asociación de Organizaciones de Productores de Frutas y Hortalizas de Almería. Sitio web visitado el 21 de marzo de 2019. <https://coexphal.wordpress.com/2017/01/09/todo-sobre-el-virus-del-mosaico-verde-jaspeado-del-pepino-cgmmv/>

CONSTABLE, F., DALY, A., TERRAS, M., PENROSE, L. and DALL, D. (2018). Detection in Australia of Cucumber green mottle mosaic virus in seed lots of cucurbit crops. *Australasian Plant Disease Notes*, 13(1).

CRESPO, O., JANSSEN, D., ROBLES, C. and RUIZ, L. (2018). Resistance to Cucumber green mottle mosaic virus in *Cucumis sativus*. *Euphytica*, 214(11).

DOMBROVSKY, A., TRAN-NGUYEN, L. and JONES, R. (2017). Cucumber green mottle mosaic virus: Rapidly Increasing Global Distribution, Etiology, Epidemiology, and Management. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), pp.231-256.

FAOSTAT, (2019). Departamento de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Sitio web visitado el 16 de marzo de 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>

FERROL M., and PICÓ B. (2008). Pumpkin and winter squash, in: *Handbook of Plant Breeding. Vegetables I*. Springer. Heidelberg, pp 317-349.

FORTES, I., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., FIALLO-OLIVÉ, E., DÍAZ-PENDÓN, J., NAVAS-CASTILLO, J. and MORIONES, E. (2016). A Novel Strain of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus Has Spread to the Mediterranean Basin. *Viruses*, 8(11), pp.307-326.

GHANIM, M. and CZOSNEK, H. (2016). Interactions Between the Whitefly *Bemisia tabaci* and Begomoviruses: Biological and Genomic Perspectives, in: *Management of Insect Pests to Agriculture*. Springer. Cham, pp.181-200.

GRKRAJ.org, (2019). GRKRAJ.org - Tobacco Mosaic Virus. Sitio web visitado el 12 de marzo de 2019. http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Genetic_RNA2-Tobacco_Mosaic_Virus.htm

HANLEY-BOWDOIN, L., BEJARANO, E., ROBERTSON, D. and MANSOOR, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), pp.777-788.

ICTV, (2019). ICTV reports. ssDNA Viruses, Geminiviridae. Sitio web visitado el 1 de marzo de 2019. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae

INNOVAGRI, (2019). Control en invernadero del virus de Nueva Delhi de la hoja rizada del tomate. Sitio web visitado el 11 de abril de 2019. <https://www.innovagri.es/control-biologico/control-en-invernadero-del-virus-de-nueva-delhi.html>

JUAREZ, M., LEGUA, P., MENGUAL, C., KASSEM, M., SEMPERE, R., GÓMEZ, P., TRUNIGER, V. and ARANDA, M. (2013). Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Annals of Applied Biology*, 162(3), pp.362-370.

- JUÁREZ, M., TOVAR, R., FIALLO-OLIVÉ, E., ARANDA, M. A., GOSÁLVEZ, B., CASTILLO, P., and NAVAS-CASTILLO, J. (2014). First detection of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Spain. *Plant Disease*, 98(6), pp. 857-858.
- KIL, E., KIM, S., LEE, Y., BYUN, H., PARK, J., SEO, H., KIM, C., SHIM, J., LEE, J., KIM, J., LEE, K., CHOI, H. and LEE, S. (2016). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports*, 6(1).
- KIL, E., PARK, J., CHOI, E., BYUN, H., LEE, K., AN, C., LEE, J., LEE, G., CHOI, H., KIM, C., KIM, J. and LEE, S. (2017b). Seed transmission of Tomato yellow leaf curl virus in sweet pepper (*Capsicum annuum*). *European Journal of Plant Pathology*, 150(3), pp.759-764.
- KIL, E., PARK, J., CHOI, H., KIM, C. and LEE, S. (2017a). Seed Transmission of Tomato yellow leaf curl virus in White Soybean (*Glycine max*). *The Plant Pathology Journal*, 33(4), pp.424-428.
- KIM, J., KIL, E., KIM, S., SEO, H., BYUN, H., PARK, J., CHUNG, M., KWAK, H., KIM, M., KIM, C., YANG, J., LEE, K., CHOI, H. and LEE, S. (2015). Seed transmission of Sweet potato leaf curl virus in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Pathology*, 64(6), pp.1284-1291.
- KIM, N., SEO, E., HAN, S., GONG, J., PARK, C., PARK, H., DOMIER, L., HAMMOND, J. and LIM, H. (2017). *Pseudomonas oleovorans* Strain KBPF-004 Culture Supernatants Reduced Seed Transmission of Cucumber green mottle mosaic virus and Pepper mild mottle virus, and Remodeled Aggregation of 126 kDa and Subcellular Localization of Movement Protein of Pepper mild mottle virus. *The Plant Pathology Journal*, 33(4), pp.393-401.
- KONG, Q., YUAN, J., GAO, L., ZHAO, L., CHENG, F., HUANG, Y. and BIE, Z. (2015). Evaluation of Appropriate Reference Genes for Gene Expression Normalization during Watermelon Fruit Development. *PLOS ONE*, 10(6), p.e0130865.
- KOTHANDARAMAN, S., DEVADASON, A. and GANESAN, M. (2015). Seed-borne nature of a begomovirus, Mung bean yellow mosaic virus in black gram. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), pp.1925-1933.
- LI, J., LIU, S. and GU, Q. (2015a). Transmission Efficiency of Cucumber green mottle mosaic virus via Seeds, Soil, Pruning and Irrigation Water. *Journal of Phytopathology*, 164(5), pp.300-309.
- LI, R., ZHENG, Y., FEI, Z. and LING, K. (2015b). First Complete Genome Sequence of an Emerging Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Isolate in North America. *Genome Announcements*, 3(3).
- LIU, H., LUO, L., LI, J., LIU, P., CHEN, X. and HAO, J. (2013). Pollen and seed transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in cucumber. *Plant Pathology*, 63(1), pp.72-77.
- LÓPEZ, C., FERRIOL, M. and PICÓ, M. (2015). Mechanical transmission of Tomato leaf curl New Delhi virus to cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in Cucumis melo. *Euphytica*, 204(3), pp.679-691.
- MAGRAMA, (2019). Estadísticas. Superficies y producciones anuales de cultivo de acuerdo con el Reglamento (CE) 543 / 2009 en España en 2018. Sitio web visitado el 29 de marzo de 2019. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- MANIVANNAN, K., RENUKADEVI, P., MALATHI, V., KARTHIKEYAN, G. and BALAKRISHNAN, N. (2019). A new seed-transmissible begomovirus in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Microbial Pathogenesis*, 128, pp.82-89.
- MNARI-HATTAB, M., ZAMMOURI, S., BELKADHI, M., BELLON DOÑA, D., BEN NAHIA, E. and HAJLAOUI, M. (2015). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucurbits in Tunisia. *New Disease Reports*, 31, p.21.
- MORIONES, E., PRAVEEN, S. and CHAKRABORTY, S. (2017). Tomato Leaf Curl New Delhi Virus: An Emerging Virus Complex Threatening Vegetable and Fiber Crops. *Viruses*, 9(10).
- OKADA, Y. (1986). Cucumber Green Mottle Mosaic Virus. In: *The Plant Viruses*. Plenum Press, New York pp.267-281.
- PADIDAM, M., BEACHY, R. and FAUQUET, C. (1995). Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *Journal of General Virology*, 76(1), pp.25-35.

PANNO, S., IACONO, G., DAVINO, M., MARCHIONE, S., ZAPPARDO, V., BELLA, P., TOMASSOLI, L., ACCOTTO, G. and DAVINO, S. (2016). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus affecting zucchini squash in an important horticultural area of southern Italy. *New Disease Reports*, 33, p.6.

REINGOLD, V., LACHMAN, O., BLAOSOV, E. and DOMBROVSKY, A. (2014). Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) on cucurbit seeds. *Plant Pathology*, 64(2), pp.245-255.

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

ROSAS-DÍAZ, T., ZHANG, D. and LOZANO-DURÁN, R. (2017). No evidence of seed transmissibility of Tomato yellow leaf curl virus in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 18(5), pp.437-440.

RUIZ, M. L., SIMÓN, A., VELASCO, L., GARCÍA, M. C., and JANSSEN, D. (2015). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain. *Plant Disease*, 99(6), pp.894-894.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press. New York.

SANGEETHA, B., MALATHI, V., ALICE, D., SUGANTHY, M. and RENUKADEVI, P. (2018). A distinct seed-transmissible strain of tomato leaf curl New Delhi virus infecting Chayote in India. *Virus Research*, 258, pp.81-91.

SHARMA, A., KATOCH, V. and RANA, C. (2016). Important Diseases of Cucurbitaceous Crops and Their Management. In: *Handbook of Cucurbits Growth, Cultural Practices and Physiology*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton, pp.301-324.

SIFRES, A., SÁEZ, C., FERRIOL, M., SELMANI, E. A., RIADO, J., PICÓ, B., and LÓPEZ, C. (2018). First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Zucchini in Morocco. *Plant Disease*, 102(5), pp.1045-1045.

SRIVASTAVA, K., HALLAN, V., RAIZADA, R., CHANDRA, G., SINGH, B. and SANE, P. (1995). Molecular cloning of Indian tomato leaf curl virus genome following a simple method of concentrating the supercoiled replicative form of viral DNA. *Journal of Virological Methods*, 51(2-3), pp.297-304.

TIAN, T., POSIS, K., MAROON-LANGO, C., MAVRODIEVA, V., HAYMES, S., PITMAN, T. and FALK, B. (2014). First Report of Cucumber green mottle mosaic virus on Melon in the United States. *Plant Disease*, 98(8), pp.1163-1163.

UGAKI, M., TOMIYAMA, M., KAKUTANI, T., HIDAKA, S., KIGUCHI, T., NAGATA, R., SATO, T., MOTOYOSHI, F. and NISHIGUCHI, M. (1991). The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, 72(7), pp.1487-1495.

VIRALZONE, (2019a). ViralZone - Geminiviridae. Sitio web visitado el 27 de abril de 2019. https://viralzone.expasy.org/109?outline=all_by_species

VIRALZONE, (2019b). ViralZone - Tobamovirus. Sitio web visitado el 28 de abril de 2019. https://viralzone.expasy.org/51?outline=all_by_species

ZAIDI, S., MARTIN, D., AMIN, I., FAROOQ, M. and MANSOOR, S. (2017). Tomato leaf curl New Delhi virus: a widespread bipartite begomovirus in the territory of monopartite begomoviruses. *Molecular Plant Pathology*, 18(7), pp.901-911.