



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**INSTITUTO DE CONSERVACION Y MEJORA DE LA
AGRODIVERSIDAD VALENCIANA**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Búsqueda de fuentes de resistencia al
Tomato leaf curl New Delhi virus
(ToLCNDV) en pepino (*Cucumis
sativus*).**

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2018/19

AUTORA: LAURA GÓMEZ MARTÍN-AMBROSIO

TUTORES: CARMELO LÓPEZ DEL RINCÓN, MARÍA BELÉN PICÓ SIRVENT

DIRECTORA EXPERIMENTAL: CRISTINA SÁEZ SÁNCHEZ

Valencia, junio 2019

Reserva de todos los derechos

Resumen

El virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV, *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus*) se detectó en España, a finales de 2012, causando importantes daños en cultivos de cucurbitáceas (principalmente, en calabacín, melón y pepino). Se trata de un begomovirus (familia *Geminiviridae*) originario de la India, que es transmitido de manera natural por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Como en todas las enfermedades de etiología viral, la mejor estrategia para controlar la enfermedad consiste en el desarrollo de variedades resistentes que ayuden a frenar la infección de este patógeno. Esto requiere la identificación de fuentes naturales de resistencia. Con ese fin, se ha cribado una colección de entradas de pepino (*Cucumis sativus*) de diferentes orígenes geográficos, usando un protocolo de transmisión mecánica puesto a punto en un trabajo anterior. La respuesta al virus se evaluó visualmente a los 15 y 30 días después de la inoculación (dpi) según la escala de 0 (ausencia de síntomas) a 4 (síntomas muy severos) y para determinar el contenido viral se empleó la hibridación de tejido impregnado en membrana (*Tissue printing*) y la PCR semicuantitativa. Todas las entradas evaluadas fueron altamente susceptibles y acumularon una elevada carga viral, excepto algunas accesiones procedentes de la India que permanecieron prácticamente asintomáticas y con una carga viral muy baja 30 dpi. Estas entradas pueden ser utilizadas como fuente de tolerancia a ToLCNDV en programas de mejora genética de pepino que ayuden a reducir las pérdidas causadas por el virus.

Palabras clave

- Begomovirus
- Mosca blanca
- Pepino
- ToLCNDV
- Tolerancia
- Métodos de detección molecular

Abstract

Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV) was detected in Spain at the end of 2012, causing significant damage to cucurbit crops (mainly zucchini, melon and cucumber). It is a *Begomovirus* (*Geminiviridae* family) which is native to India, it is transmitted naturally by the whitefly *Bemisia tabaci*. As in all diseases of viral etiology, the best strategy to control the disease consists of the development of resistant varieties, which help to stop the infection of this pathogen. This requires the identification of natural sources of resistance. With that purpose, a collection of cucumber (*Cucumis sativus*) entries from different geographical origins were screened, using a mechanical transmission protocol developed in previous work. The response to the virus was evaluated visually at 15 and 30 days post-inoculation (dpi) according to a scale that ranges from 0 (absence of symptoms) to 4 (very severe symptoms). To determine the viral content, membrane impregnated tissue hybridization (*Tissue printing*) and semiquantitative PCR were used. All entries evaluated were highly susceptible and accumulated a high viral load, except some accessions from India that remained virtually asymptomatic and with a very low viral load 30 dpi. These inputs can be used as a source of ToLCNDV tolerance in cucumber breeding programs, in order to help reduce the losses caused by the virus.

Key words

- Begomovirus
- Whitefly
- Cucumber
- ToLCNDV
- Tolerance
- Molecular detection methods

Agradecimientos

Con este Trabajo Fin de Grado acaba una etapa que me ha hecho crecer tanto personal como profesionalmente. Por eso quiero darle las gracias, en primer lugar, a mis tutores Carmelo y Belén por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en su equipo. Gracias también a todos los compañeros del laboratorio, que me han apoyado durante estos meses y he podido aprender de ellos.

Gracias especialmente a Cristina por haberme ayudado a lo largo de este proyecto, por su eterna paciencia conmigo y por enseñarme, aconsejarme y guiarme en todo momento.

A mis compañeros de la carrera por amenizarme el día a día en la universidad. Gracias sobre todo a Cris, Adri y Kat por compartir conmigo una infinidad de momentos y experiencias que me acompañarán siempre.

Y, por último, gracias a mis amigos de siempre y a mi familia por apoyarme desde la distancia. A mis padres por ser tan buenos referentes, por su confianza y por animarme a conseguir mis metas.

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 las cucurbitáceas y el género Cucumis.....	1
1.2. Problemas en el cultivo de cucurbitáceas: virosis en la cuenca del mediterráneo...3	3
1.3. Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV).....	3
1.3.1. Descripción y clasificación del virus.....	3
1.3.2. Organización del genoma y replicación del ToLCNDV	4
1.3.3. Mecanismo de transmisión e infección	5
1.3.4. Origen y distribución actual de ToLCNDV.....	7
1.4. Estrategias de control del ToLCNDV.....	9
1.4.1. Resistencia a ToLCNDV en cucurbitáceas	10
1.5. Diagnóstico del virus.....	11
1.5.1. Diagnóstico por evaluación visual de síntomas	11
1.5.2. Detección serológica por ensayo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	12
1.5.3. Hibridación <i>dot blot</i>	12
1.5.4. Hibridación <i>tissue printing</i>	12
1.5.5. Detección de ácidos nucleicos por PCR (Polymerase Chain Reaction)	12
2. Objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Material vegetal: accesiones evaluadas de <i>Cucumis sativus</i>	15
3.2. Fuente de inóculo	17
3.3. Cultivo de plantas.....	17
3.4. Método de inoculación mecánica	18
3.5. Evaluación de síntomas por diagnóstico visual	19
3.6. Detección del DNA viral por inmunosupresión de tejido en membrana o <i>Tissue printing</i>	20
3.6.1. Hibridación, lavados y revelado.....	20
3.7. Extracción y cuantificación del DNA vegetal	21
3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
3.9. Electroforesis en geles de agarosa.....	22
3.10. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	23
3.11. Análisis de datos.....	23
4. Resultados.....	25

4.1. Respuesta de <i>Cucumis Sativus</i> a la transmisión mecánica de ToLCNDV en la colección nuclear del banco de germoplasma de COMAV	25
4.1.1. Respuesta de las accesiones de <i>C.sativus</i> tipo “corto”	26
4.1.2. Respuesta de las accesiones de <i>C. sativus</i> tipo “largo”, “muy largo” y “francés”	29
4.2. Respuesta de accesiones exóticas de <i>Cucumis sativus</i> a la transmisión mecánica deToLCNDV	32
4.2.1. Respuesta de las accesiones exóticas de <i>C. sativus</i> tipo “corto”	32
4.2.2. Respuesta de las accesiones de <i>C. sativus</i> tipo “muy largo”, “medio” y CS6	34
4.3. Confirmación de la resistencia/tolerancia: Resultados de PCR cuantitativa para muestras seleccionadas	36
5. <i>Discusión</i>	38
6. <i>Conclusiones</i>	40
7. <i>Bibliografía</i>	41

1. Introducción

1.1. Importancia económica de las cucurbitáceas y el género *Cucumis*.

La familia de las cucurbitáceas incluye cultivos de gran importancia, tales como el melón y el pepino (género *Cucumis*) la sandía (género *Citrullus*) y las calabazas y los calabacines (género *Cucurbita*). Estos pertenecen a las especies hortícolas más cultivadas en todo el mundo, tanto en superficie de cultivo como en términos de producción (Tabla 1).

Tabla 1. Área cosechada (hectáreas) y producción (toneladas) de hortícolas en 2017 (Datos de FAOSTAT Data).

Ranking	Cultivo	Área cosechada (ha)	Ranking	Cultivo	Producción (t)
1	Tomate	4.848.384	1	Tomate	182.301.395
2	Sandía	3.477.285	2	Sandía	118.413.465
3	Guisante	2.669.305	3	Pepino	83.753.861
4	Haba	2.463.966	4	Berenjena	52.309.119
5	Pepino	2.271.260	5	Pimiento	36.092.631
6	Calabaza	2.078.450	6	Melón	31.948.349
7	Pimiento	1.987.059	7	Calabaza	27.449.481
8	Berenjena	1.858.253	8	Judía verde	24.221.252
9	Judía verde	1.579.971	9	Guisante	20.699.736
10	Melón	1.220.996	10	Haba	4.840.090

En los datos más recientes proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se muestra que en 2017 se cultivaron 2.271.260 hectáreas de pepinos y pepinillos y se obtuvo una producción mundial de casi 84 millones de toneladas (Figura 1). El país que lidera esta producción es China (64.824.643 toneladas). Otros grandes productores son Irán, Rusia, Turquía, EEUU, México, Ucrania, Uzbekistán, España y Japón (Figura 2).

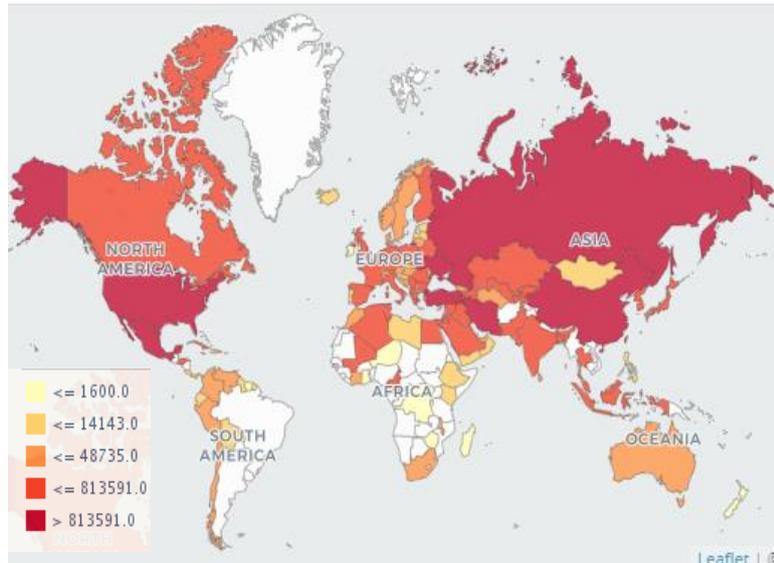


Figura 1. Producción en toneladas de pepinos y pepinillos por países en 2017. La escala de colores indica de amarillo (valores más bajos) a rojo (valores más altos) las toneladas producidas (FAOSTAT Data).

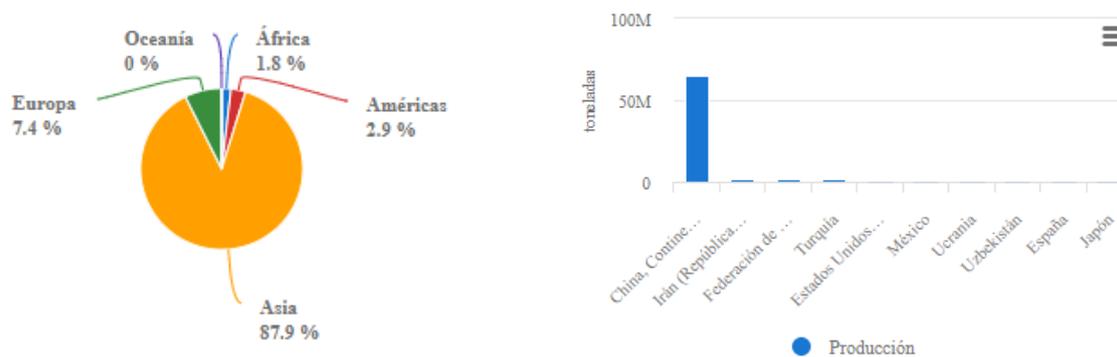


Figura 2. Producción de pepinos y pepinillos por continente (izquierda) y país (derecha) en 2017 (FAOSTAT Data).

En cuanto a España según la FAO, el 2017 el pepino fue cultivado en una superficie de 7510 hectáreas y obtuvo una producción de 634824 toneladas con un rendimiento de 845.305 hg/ha.

Según las estadísticas del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), en España en 2018 se tuvo una producción de pepino de 641.870 toneladas, con 7.482 hectáreas cultivadas. Ésta se concentra mayoritariamente en Almería, con una superficie de 5.099 Ha y una producción de 443.604 t de pepino. También en Granada, Murcia y las Palmas está extendido el cultivo de pepino.

1.2. Problemas en el cultivo de cucurbitáceas: virosis en la cuenca del mediterráneo.

A pesar de que España es uno de los países con mayor producción de cucurbitáceas, son numerosos los factores bióticos y abióticos que pueden afectar a estos cultivos debido a las prácticas de cultivo intensivo y al cambio climático. Los estreses abióticos que más perjudican a esta familia son las sequías y los suelos salinos, mientras que entre los estreses bióticos destacan las plagas y las enfermedades causadas por virus y las infecciones fúngicas.

Las plagas que se dan más frecuentemente son pulgones (*Aphis gossypii*), araña roja (*Oligonychus mexicanus*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), los nematodos y los trips (*Frankliniella occidentalis*). Estos no solo causan daño físico en la planta, sino que también transmiten virus. Destaca por ejemplo el oídio de las cucurbitáceas y el colapso o fusariosis.

Las infecciones víricas son las que más perjuicios causan en la familia de las cucurbitáceas. Existen, en la cuenca del Mediterráneo, 28 virus conocidos. Destacan por su gran extensión los de los géneros *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Comovirus*, *Carmovirus* y *Begomovirus*.

Los *begomovirus* son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Pertenece a este género el virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi (*Tomato Leaf Curl New Delhi Virus*; ToLCNDV), que será el virus objeto de estudio de este Trabajo Final de Grado.

1.3. Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV)

1.3.1. Descripción y clasificación del virus

El género *Begomovirus* comprende más de 320 especies de virus conocidas que infectan a plantas dicotiledóneas y se transmiten por *Bemisia tabaci* (mosca blanca de la batata, tabaco u hoja plateada). Según la organización de su genoma, los *Begomovirus* pueden ser clasificados en dos grupos: monopartitos, aquellos que presenta una única molécula de DNA o bipartitos, los que presenta dos moléculas de DNA. A este último pertenece ToLCNDV (Zaidi *et al.*, 2017; Zerbini *et al.*, 2017).

El virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi es un virus de DNA de cadena sencilla. Su genoma se compone de dos hebras circulares, A y B, cuya longitud es 2,74

kb y 2,68 kb respectivamente. Este virus está incluido en el grupo II de la Clasificación de Baltimore y pertenece a la familia *Geminiviridae* y género *Begomovirus* (Juárez *et al.*, 2014).

El genoma del ToLCNDV es DNA monocatenario (DNAss o DNA single strand), de DNA circular con dos segmentos encapsidados en dos partículas icosaédricas incompletas unidas por sus respectivas caras interiores. Su tamaño es de 18 x 30 nm² y tienen 22 capsómeros pentaméricos (Figura 3). (Silva *et al.*, 2017; Zaidi *et al.*, 2017).

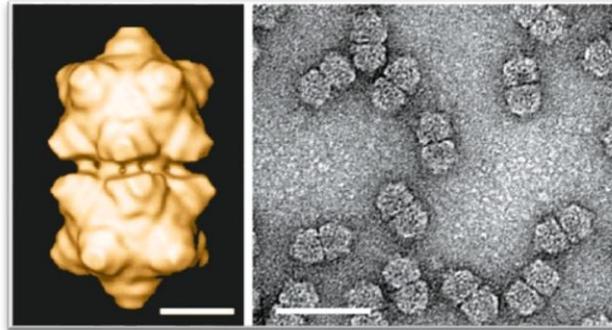


Figura 3. Reconstrucción microscópica crio-electrónica de un begomovirus. La barra representa 10 nm (izquierda). Partículas purificadas de begomovirus teñidas con acetato de uranilo. La barra representa 50 nm (derecha) (Zerbini *et al.*, 2017).

1.3.2. Organización del genoma y replicación del ToLCNDV

El genoma completo del virus consta de 9 marcos de lectura abierta u ORFs. Siguiendo la nomenclatura aceptada internacionalmente en la que las letras A o B indican al componente genético al que pertenece cada ORF (DNA-A o DNA-B, respectivamente) y las letras V y C indican si el ORF codifica una proteína que forma parte del virión (V) o tiene una función complementaria (C), los distintos ORFs son nombrados: AV1, AV2, AC1, AC2, AC3, AC4, BV1 y BC2. Algunos genes pertenecientes al componente DNA-A solapan entre sí, no ocurriendo lo mismo en los genes incluidos en el DNA-B (Figura 4) (Zaidi *et al.*, 2017).

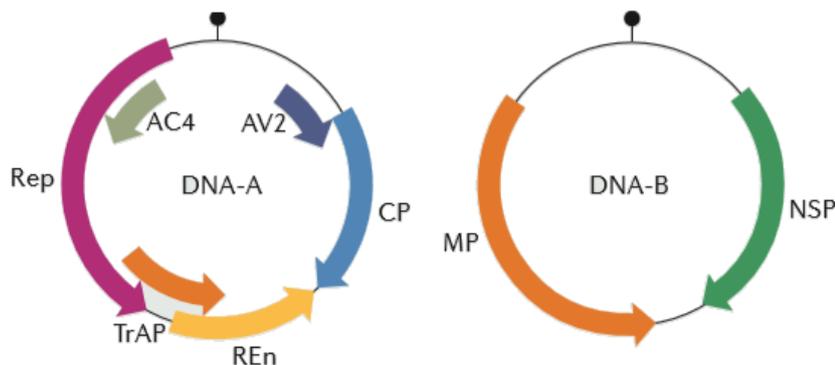


Figura 4. Organización del genoma del Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV). Componentes genómicos DNA-A y DNA-B con flechas que muestran sus respectivos genes (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

El DNA-A tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma y sus genes codifican una serie de proteínas: la proteína CP o de cubierta (codificada por AV1), V2 o precápsida (AV2), Rep o proteína de la replicación (AC1), TrAp o proteína activadora de la transcripción (AC2), REn o proteína potenciadora de la replicación (AC3) y C4 cuya función es la de servir como silenciador de RNA (AC4). Por otra parte, los genes BV1 y BC2 del componente DNA-B codifican dos proteínas: NSP, una lanzadera nuclear y MP involucrada en el movimiento del virus, respectivamente (Zaidi *et al.*, 2017).

Las dos partes del genoma viral están separadas por una región común que se encuentra entre ambos fragmentos de DNA circular. Este fragmento intergénico consta de 200 nucleótidos y tiene un 85% de identidad entre el DNA-A y el DNA-B. La región común tiene una estructura de horquilla altamente conservada entre todos los geminivirus, con una secuencia de nueve nucleótidos característica (TAATATT++AC) que marca el origen de replicación de la secuencia de DNA del virión (ori-V). Además, en la región 5' de la horquilla hay una secuencia repetida de 5-7 nucleótidos de largo, conocidas como iterones, requeridas para la unión de la proteína de replicación del virus (Rep). Por tanto, la función de la región común es mantener la integridad del genoma dividido y asegurar la replicación de ambos componentes (Venkataravanappa *et al.*, 2015).

Algunos aislados de ToLCNDV tienen asociados β satélites de DNA circular de cadena sencilla y de aproximadamente 1,3 kb. Estos satélites poseen solo un gen (β C1), que codifica un determinante patogénico, una región poliA y una región conservada en todos los β satélites de 150 nucleótidos (Zaidi *et al.*, 2017).

1.3.3. Mecanismo de transmisión e infección

El ToLCNDV, al igual que la gran mayoría de los *begomovirus*, se transmite por la mosca blanca del tabaco (*Bemisia tabaci*). El ciclo infectivo comienza cuando la mosca al alimentarse de una planta infectada, succiona el virus. Este alcanza el intestino y penetran en los tejidos de la mosca. Después de un periodo de latencia se produce una circulación efectiva del virus hasta acumularse en grandes cantidades en las glándulas salivares del insecto, a partir de las cuales los viriones se inoculan directamente en los tubos cribosos de la planta, durante los procesos de salivación y alimentación de plantas sanas (Janssen *et al.*, 2014).

El tiempo de latencia dura 17-20 horas y puede tener tiempos de persistencia de más de 20 días, es decir, lo que dura la vida de la mosca blanca. La eficiencia de transmisión

del ToLCNDV por un adulto de *B. tabaci* es muy elevada. En estudios realizados con calabacines, encontraron porcentajes de infección del 95% con un sólo individuo de mosca blanca por planta. En tomate, este porcentaje fue más bajo (30% de infección con 20 moscas) (Janssen *et al.*, 2014).

La infección de los begomovirus comienza cuando una mosca blanca (vector) portadora del virus se alimenta de la planta y transmite las partículas virales al citoplasma de sus células. El virión se desensambla y el genoma viral es transportado al núcleo celular. Para introducir el material genético viral en el núcleo no es necesaria la ruptura de la envoltura nuclear como la que tiene lugar en la mitosis, por lo que pueden infectar células que no están en división (Nagar *et al.*, 1995).

Dentro de la célula vegetal, el DNAss sale del virión y pasa a ser bicatenario (DNAds o DNA double strand). Esto ocurre aprovechando las DNA polimerasas del hospedador y oligonucleótidos de RNA como cebadores. También la RNA polimerasa II del hospedador lleva a cabo la transcripción. Se sintetiza Rep, una proteína que se unirá al interón (IRD), una región de Ori-V, y comenzará la replicación del DNA viral mediante el mecanismo de círculo rodante y recombinación dependiente de replicación. El recién polimerizado DNA de cadena simple puede seguir replicándose o ser encapsidado en partículas virales por la proteína de cubierta (CP), empaquetándose en viriones para propagar la infección.

Por otra vía, el DNA viral se mueve desde el núcleo a las células que lo rodean. Para ello actúan las proteínas virales de movimiento: NSP lo transporta fuera de la envoltura nuclear y MP a través de los plasmodesmos (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Zaidi *et al.*, 2017; Rojas *et al.*, 2001)

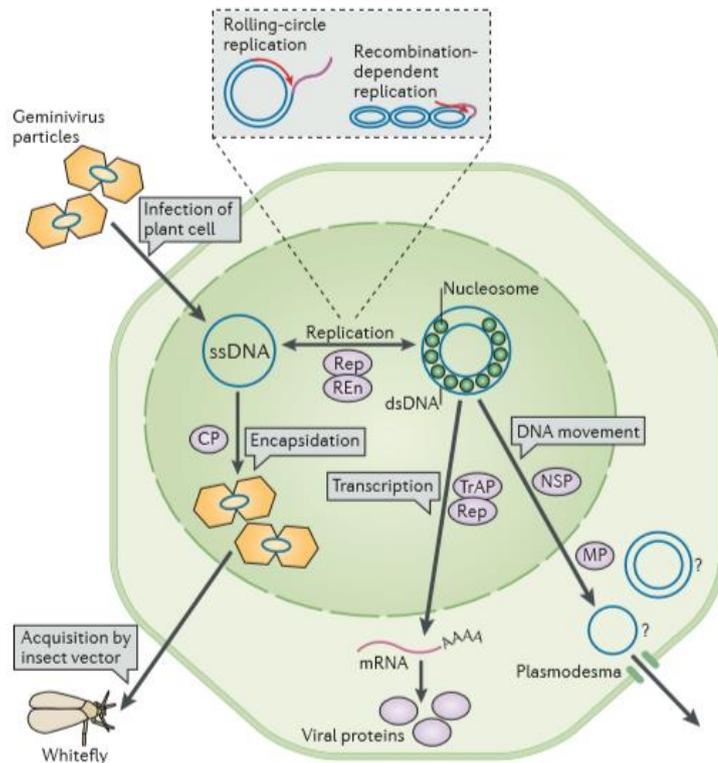


Figura 5. Esquema del proceso de replicación de geminivirus. (Hanley- Bowdoin et al., 2013).

Además de la transmisión natural previamente descrita, algunos aislados de ToLCNDV pueden ser transmitidos de forma mecánica. Un ejemplo sería el del aislado español ToLCNDV-ES, habiéndose confirmado la transmisión mecánica en diferentes especies de los géneros: *Citrullus*, *Cucumis* y *Cucurbita*. Esta capacidad de transmisión mecánica presenta una fuerte relevancia a la hora de hacer grandes cribados en búsqueda de fuentes de resistencia en programas de mejora, evitando las dificultades que presenta el manejo de la mosca (López *et al.*, 2015). Sin embargo, el virus no puede ser transmitido por contacto directo.

1.3.4. Origen y distribución actual de ToLCNDV

En el año 1995 el ToLCNDV fue detectado por primera vez en tomates cultivados (*Solanum lycopersicum*) al norte de la india, como una variante del *Tomato yellow leaf curl virus* causante de la enfermedad del rizado amarillo del tomate. Se extendió por todo el país y más tarde también a países al oeste como Pakistán, Bangladesh o Irán y al este a Tailandia, Indonesia, Sri Lanka o Taiwán. Posteriormente este virus ha ampliado sus hospedadores, no solo a otras especies de solanáceas como berenjena (*Solanum melargoena*), patata (*Solanum tuberosum*), pimiento (*Capsicum annuum*) y

chile (*Capsicum frutescens*) sino también a la familia de las cucurbitáceas. (Srivastava *et al.*, 1995, Moriones *et al.*, 2017).

El ToLCNDV alcanzó los cultivos españoles de Almería y Murcia, tanto en campo abierto como en invernadero en la cosecha de 2012-2013. Aparecieron síntomas tanto en cultivos de cucurbitáceas (calabacines, melones y pepinos) como en tomate. (Juárez *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015). Los resultados de pruebas moleculares recientes indican que los aislados españoles del virus han evolucionado a una cepa propia, denominada ToLCNDV-ES, cuya capacidad de infección resulta mayor en cucurbitáceas que en tomate (Fortes *et al.*, 2016). Las altas tasas de mutación y de recombinación de los *begomovirus* hacen que éstos tengan gran diversidad y, como resultado, gran adaptación a nuevos entornos. (Juárez *et al.*, 2014). El virus se extendió por países de la cuenca del Mediterráneo como Túnez, Italia, Grecia y Marruecos en los últimos años (Mnari-Hattab *et al.*, 2015; Panno *et al.*, 2016; Sifres *et al.*, 2018). El ToLCNDV fue incluido por la organización europea y mediterránea de protección fitosanitaria (EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organisation) en la lista de alertas fitosanitarias en el año 2015 para controlar y prevenir su dispersión (EPPO, 2019).

Actualmente, el ToLCNDV está presente en India, Indonesia, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia, Eslovenia, España, Estonia, Italia, Grecia, Marruecos y Túnez (Figura 6) (EPPO Global Database 2019).

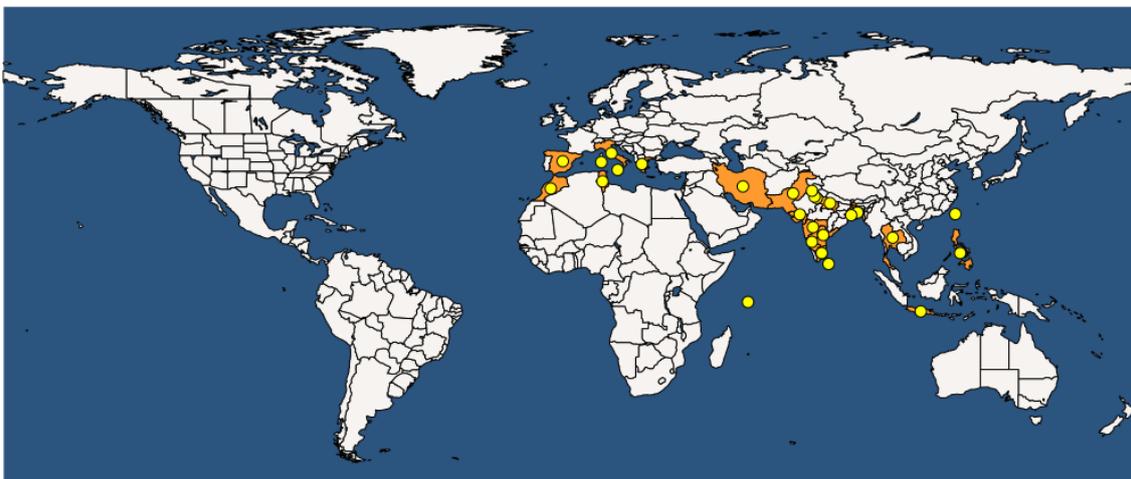


Figura 6. Distribución global del ToLCNDV. Se muestran en amarillo los puntos en los que está presente (EPPO Global Database, 2019).

Además, el virus no sólo infecta cultivos de las solanáceas, sino que afecta a cultivos de las cucurbitáceas. Concretamente, se han encontrado cepas infectando cucurbitáceas como calabacín (*Cucurbita pepo*), calabazas (*Cucurbita spp.*), calabaza china (*Benincasa hispida*), pepino (*Cucumis sativus*), melón (*Cucumis melo*),

balsamina (*Momordica charantia*), sandía (*Citrullus lanatus*), calabaza del peregrino (*Lagenaria siceraria*), esponja vegetal (*Luffa cylindrica*) y chayote (*Sechium edule*) (Moriones *et al* 2017). Entre las especies de interés agronómico que puede infectar el ToLCNDV se encuentran representantes de las siguientes familias:

- Familia *Papaveraceae* como *Papaver somniferum* (opio);
- Familia *Malvaceae* como *Hibiscus cannabinus* y *Gossypium hirsutum* (algodón)
- Familia *Fabaceae* como *Glycine max* (soja)
- Familia *Asteraceae* como *Eclipta prostrata*
- Familia *Caricaceae* como *Carica papaya*
- Familia *Apocynaceae* como *Calotropis procera* (manzano de Sodoma)

Además, el virus también se ha detectado en especies de plantas silvestres como: *Abelmoschus esculentus*, *Ageratum spp.*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Daucus carota*, *Jatropha spp.*, *Benincasa hispida*, *Catharanthus roseus*, *Chenopodium album*, *Coccinia grandis*, *Jasminum multiflorum*, *Sauropus androgynus* y *Trichosanthes cucumerina*, (Zaidi *et al.*, 2017; Moriones *et al.*, 2017; EPPO, Global Database, 2019).

1.4. Estrategias de control del ToLCNDV

Controlar las enfermedades vegetales producidas por virus supone una gran dificultad, especialmente en el caso del ToLCNDV ya que su detección en España es reciente, y no existen medidas eficaces para su control, aunque sí que se conocen muchas para controlar los virus transmitidos por mosca blanca. La mejor estrategia consiste en llevar a cabo un control integrado del vector *B. tabaci* que incluye medidas fitosanitarias, estructurales e higiénicas. (Janssen *et al.*, 2014). Sin embargo, los complejos factores epidemiológicos asociados con las enfermedades ocasionadas por los *begomovirus*, así como la dinámica de la migración de la mosca blanca, la rápida evolución del virus y las expansiones impredecibles en el rango de huéspedes, han hecho que sea muy difícil desarrollar estrategias efectivas de manejo de este tipo de enfermedades a largo plazo (Loebenstein y Katis 2014). La forma más efectiva de lograrlo será el desarrollo de genotipos de plantas resistentes a este virus.

Las medidas fitosanitarias no pueden limitarse a tratamientos químicos, ya que dan lugar a resistencias en los vectores. Se tienen que utilizar numerosas trampas cromotrópicas para capturar y hacer un seguimiento de la presencia de mosca blanca. Hay que asegurar la hermeticidad de los invernaderos de cultivo, incluyendo mallas anti-insectos en las ventanas para impedir la entrada del vector, así como tener doble puerta de entrada. Adicionalmente se puede colocar una manta térmica sobre los cultivos libres

del vector, y ha de garantizarse que el material vegetal utilizado esté sano y libre de vector. Por otro lado, es importante mantener la higiene eliminando todos los restos del cultivo anterior y de las malas hierbas, así como la destrucción de plantas infectadas en cuanto sean detectadas (Janssen y Ruíz, 2014).

Además de esto, hay que tener en cuenta que la mejor y principal herramienta para el control frente a un virus es el desarrollo de cultivares resistentes. Estos ahorrarán al productor costes en medidas de control ya que la eficacia de las resistencias es mucho mayor que el resto de medidas de control (Picó *et al.*, 1996). La mayoría de los genes de resistencia conocidos no inhiben completamente la replicación viral, sino que dificultan la acumulación viral en diversos grados (Verlaan *et al.*, 2013). Un enfoque racional sería utilizar múltiples genes para producir una resistencia duradera y de amplio espectro, un proceso conocido como piramidalización (Zaidi *et al.*, 2017). El primer paso en un programa de mejora genética vegetal implica la búsqueda de fuentes de resistencia. En el caso de este estudio, la búsqueda se realizará en pepino (*Cucumis sativus*).

1.4.1. Resistencia a ToLCNDV en cucurbitáceas

Puesto que el ToLCNDV fue detectada primero en tomate y otras solanáceas, en esta familia las búsquedas de resistencias están más avanzadas (Kushwaha *et al.*, 2015). En cuanto a la familia de las cucurbitáceas, la primera fuente de resistencia se identificó en *Luffa cylindrica*. En el caso de melón, se dispone ya de tolerancia en cinco accesiones indias de la ssp. *agrestis*; tres de la variedad cultivada *momordica* y dos de tipo silvestre. Las dos accesiones del tipo silvestre fueron completamente asintomáticas, mientras que las tres accesiones restantes mostraron síntomas ligeros (López *et al.*, 2015). En todos los casos la presencia del virus se confirmó mediante PCR, por lo que estas entradas se consideran parcialmente resistentes o tolerantes al virus. La caracterización de la resistencia de una de las dos entradas silvestres determinó que la resistencia estaba controlada por tres regiones genómicas, un locus principal en el cromosoma 11 y dos regiones adicionales en los cromosomas 12 y 2. Para conferir la resistencia es necesario el genotipo de tipo silvestre en homocigosis en la región del cromosoma 11 (Sáez *et al.*, 2017).

En el caso del género *Cucurbita*, no se ha encontrado resistencia ni en calabacín (*C. pepo*) ni en *C. maxima*, pero sí se ha encontrado resistencia en cuatro accesiones de la especie *Cucurbita moschata* procedentes de diferentes centros de diversificación, una de ellas también procedentes de la India. La especie *C. moschata* es parcialmente

compatible con el calabacín (*C. pepo*), lo que facilitará la transferencia a este cultivo, que es el más severamente afectado por el ToLCNDV. En cuanto a pepino, actualmente no se ha descrito ninguna tolerancia por lo que es necesario buscar fuentes de resistencia en pepino (*C. sativus*).

1.5. Diagnóstico del virus

1.5.1. Diagnóstico por evaluación visual de síntomas

Entre los síntomas que se pueden identificar visualmente y que nos indican que la planta podría estar infectada por el virus destacan el rizado, filimorfismo apical y mosaico amarillo en las hojas. También se puede observar acucharamiento de las hojas hacia el haz o envés siguiendo el nervio principal, deformaciones en las hojas por fruncimiento de los nervios, acortamiento de los entrenudos y reducción del tamaño de la planta, ralentizando o parando por completo su desarrollo en casos graves (Figura 7).

Sin embargo, dependiendo de factores ambientales y de la precocidad e intensidad de la infección los síntomas en pepino pueden variar.



Figura 7. Izquierda: ejemplos de plantas sintomáticas. Derecha: comparación con sus respectivos controles sanos.

1.5.2. Detección serológica por ensayo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

El Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima es una técnica de inmunoensayo en la que un antígeno inmovilizado (proteína codificada por el virus, por ejemplo, la proteína de la cápsida viral), es detectado mediante un anticuerpo ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable por cambio de color, al leer su absorbancia en un espectrómetro. Esta técnica tiene la ventaja de poder detectar un gran número de muestras de forma sencilla, rápida y económica. Sin embargo, los anticuerpos empleados para identificar la presencia del ToLCNDV pueden dar reacciones cruzadas con las proteínas de cubierta de otros *begomovirus* (Figas *et al.*, 2016).

1.5.3. Hibridación *dot blot*

Para poder realizar esta técnica de hibridación molecular, se deben de extraer primero los ácidos nucleicos (DNA o RNA). Posteriormente, esos ácidos nucleicos se han de depositar en forma de gota (*dot*) en una membrana de nylon cargada positivamente y comenzar la hibridación con una sonda marcada de DNA o RNA y de polaridad complementaria al ácido nucleico que se desea reconocer. Se trata de un método sensible y rápido, que no fue utilizado en este estudio por la dificultad que supone la extracción previa del DNA (Saeed *et al.*, 2007). Su ventaja es la gran sensibilidad en la hibridación, que se traduce en una señal más clara y específica.

1.5.4. Hibridación *tissue printing*

Consiste en la hibridación de un extracto crudo de tejido vegetal impregnado en una membrana de nylon cargada positivamente e hibrida con sondas marcadas. Este método fue utilizado en este trabajo por su sensibilidad y rapidez (Alfaro *et al.*, 2016).

1.5.5. Detección de ácidos nucleicos por PCR (Polymerase Chain Reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa (La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación del DNA del virus *in vitro* con la ayuda de una DNA polimerasa, mediante ciclos cortos de desnaturalización y renaturalización. Para ello, se necesita diseñar unos cebadores con la secuencia complementaria al fragmento del DNA viral que se quiere amplificar, que funcionan como iniciadores de la replicación. Para la visualización del producto de PCR, se combina con electroforesis con fluoróforos

o técnicas colorimétricas para ver los fragmentos amplificados en tiempo real (Pasic *et al.*, 2014). Esta es una de las herramientas más empleada para diagnosticar el ToLCNDV por su rapidez y alta sensibilidad. La principal desventaja es que se requiere una rigurosa manipulación de las muestras, ya que puede dar lugar a falsos positivos por contaminación de muestras o por uniones inespecíficas de los cebadores, o a falsos negativos por inhibición de la DNA polimerasa por inhibidores presentes en la muestra (Llácer *et al.*, 1996; Islam *et al.*, 2011).

2. Objetivos

Las enfermedades producidas por virus de plantas ocasionan graves pérdidas económicas en todo el mundo y son uno de los principales factores limitantes para la producción en la agricultura intensiva (Monci, 2004). El virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi se ha convertido en un gran peligro para los cultivos de cucurbitáceas (calabacín, melón y pepino), no solo en su lugar de origen, sino también en España desde que se detectó en 2012. La gran gama de hospedadores (ver 1.3), así como la eficiencia de su transmisión por mosca blanca hacen de este virus uno de los patógenos incluidos en la lista de alerta de la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).

Las estrategias de control que se están utilizando son preventivas, centrándose principalmente en reducir las poblaciones de su vector de propagación la mosca blanca *B. tabaci* y en eliminar las fuentes de inóculo. Estas resultan insuficientes y es por ello que se necesita buscar fuentes de resistencia/tolerancia en las diferentes especies de la familia de las cucurbitáceas. Actualmente, se dispone de fuentes de resistencia en diferentes accesiones de melón (*Cucumis melo*) y calabaza (*Cucurbita moschata*) (López *et al.*, 2015; Sáez *et al.*, 2016) pero no en pepino (*Cucumis sativus*).

La gran diversidad dentro de la especie *Cucumis sativus* ofrece grandes posibilidades a la hora de identificar variantes naturales que presenten resistencia a este virus. Por ello, el objetivo general del presente TFG consistió en identificar fuentes de resistencia al ToLCNDV en pepino, Para conseguirlo se propusieron los siguientes objetivos parciales:

1. Cribar las accesiones procedentes de la colección nuclear de pepino del banco de germoplasma, así como accesiones exóticas, empleando el método de inoculación mecánica, tomando como inóculo viral un aislado procedente de un clon infeccioso de ToLCNDV.
2. Cuantificar la carga viral de aquellas accesiones identificadas como resistentes/tolerantes.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal: accesiones evaluadas de *Cucumis sativus*

Para la búsqueda de fuentes de resistencia a ToLCNDV se realizó un cribado de las 40 accesiones de la especie *Cucumis Sativus* procedente del banco de germoplasma del COMAV (Tabla 2). Las accesiones seleccionadas constituyen la colección nuclear de semillas de dicho centro. La colección de germoplasma comprende un conjunto de entradas conservadas cuyo acervo genético o *gene pool* incluye cultivares primitivos, materiales de mejora y especies silvestres relacionadas con el cultivo (Treuren *et al.*, 2009). La colección cribada en este trabajo es nuclear en tanto que está constituida por un grupo reducido de entradas, seleccionadas por representar el espectro genético de la colección completa (Brown y Schoen, 1994). Esta colección fue construida por Valcárcel (2017) y contiene los subconjuntos de entradas que colectivamente maximicen la variación genotípica y fenotípica, minimizando su número. Además, fueron evaluadas 24 accesiones exóticas, cuyas procedencias aparecen en la tabla 3.

También se evaluaron las accesiones CAC1 (Islas canarias, Tenerife) y AN-C-106 (Andalucía, Jaén). Estas fueron probadas con anterioridad para el Virus de las venas amarillas del pepino (CVYV) y se encontró que AN-C-106 era resistente y CA-C 1 susceptible. Se cruzaron entre sí y a partir de la población F1 se generaron poblaciones segregantes. Adicionalmente, se quiso evaluar su respuesta a ToLCNDV adicionalmente. Sin embargo, ninguna de las dos resultó resistente.

Tabla 2. Nomenclatura, Origen y clasificación de las entradas de la colección nuclear de pepino del COMAV seleccionadas para estudiar su respuesta a ToLCNDV.

Nº accesión	Código	Procedencia	Fenotipo
BGV010301	360	Guadalajara	
BGV011582	2735	Teruel	
BGV000047	A-C-15	Zaragoza	
BGV000479	AN-C-125	Córdoba	
BGV000408	AN-C-54	Cádiz	Corto típico
BGV015469	BGHZ4943	Cáceres	
BGV003714	CM-C-46/1	Cuenca	
BGV011742	F4	Albacete	
BGV004304	MU-C-50/1	Murcia	
BGV011736	NC068253	Ávila	
BGV002495	CA-C-23	Tenerife	Corto pelos y espinas
BGV011734	NC068251	Valladolid	
BGV010314	426	Guadalajara	
BGV010636	2437	Soria	
BGV000467	AN-C-113	Jaén	
BGV000512	AN-C-158	Huelva	Corto tubercular pronunciado
BGV000437	AN-C-83	Jaén	
BGV014959	BGHZ2360	Huesca	
BGV004026	E-C-56	Cáceres	
BGV008299	IVIA-044	Valencia	
BGV000381	AN-C-27/1	Málaga	
BGV004851	V-C-16	Castellón	Largo pelos y espinas
BGV004926	V-C-94/2	Valencia	
BGV011724	2444	Teruel	
BGV000372	AN-C-18	Granada	
BGV001310	AS-C-1	Asturias	
BGV015229	BGHZ4778	Vizcaya	Largo no tubercular pronunciado
BGV002494	CA-C-22	Tenerife	
BGV015700	C-C-49	Girona	
BGV004936	V-C-104	Valencia	
BGV011586	2457	Orense	
BGV000416	AN-C-62	Cádiz	
BGV014967	BGHZ2387	Guadalajara	Largo tubercular pronunciado
BGV004309	MU-C-55	Murcia	
BGV015696	NC094818	Alicante	
BGV004305	MU-C-51	Murcia	Muy Largo
BGV010290	NC019552	Granada	Francés atípico
BGV014961	BGHZ2362	Castellón	
BGV014969	BGHZ2389	Cantabria	Francés
BGV011735	NC068252	Zaragoza	

Tabla 3. Nomenclatura, origen y clasificación de las entradas de la especie *Cucumis sativus* seleccionadas para estudiar su respuesta a ToLCNDV ("CGN Germplasm Search", 2019).

Nº accesión	Código	Procedencia	Fenotipo
CGN20512	CS7	P. Bajos	
CGN20517	CS8	Turquía	
CGN21691	CS11	R.D. Congo	
CGN19748	CS12	India	
CGN19817	CS13	India	
CGN21585	CS15	India	Corto
CGN22280	CS16	India	
CGN22986	CS19	India	
CGN23089	CS20	India	
CGN23411	CS21	India	
CGN23423	CS22	India	
CGN23633	CS23	India	
CGN20853	CS9	Japón	
CGN21616	CS10	Irán	Medio
CGN19819	CS14	India	
CGN22297	CS18	India	
CGN22281	CS17	India	
BGV015107	CS1	China	
BGV015113	CS2	China	Muy largo
BGV015115	CS3	China	
BGV015116	CS4	China	
BGV015118	CS5	China	
CGN19655	CS6	EEUU	-

3.2. Fuente de inóculo

En este trabajo se utilizó como fuente de inóculo un clon infeccioso de ToLCNDV con más del 99% de identidad nucleotídica con el aislado español KF749224 (DNA-A) y KF749225 (DNA-B) (Juárez *et al.*, 2014). El clon se agroinfiltró en plantas MU-CU-16 de *C. pepo* subsp. *pepo* (*Zucchini*) (Sáez *et al.*, 2016), y 15 días después de la agroinfiltración las plantas con síntomas se emplearon como fuente de inóculo para la inoculación mecánica de las plantas a evaluar (López *et al.*, 2015).

3.3. Cultivo de plantas

Con el fin de realizar los ensayos de búsqueda de resistencia a ToLCNDV se utilizaron 6 semillas de cada accesión (5 para ser inoculadas y una como control sin virus inoculado). En primer lugar, se abrieron pequeños huecos en la parte superior de las semillas mediante una leve presión lateral con pinzas para facilitar su germinación. A continuación, se desinfectaron siendo sumergidas en una solución de NaClO (lejía) al

10% durante 5 minutos y, posteriormente, se realizaron dos lavados consecutivos con agua destilada, durante 5 y 7 minutos respectivamente. Seguidamente se dispusieron las semillas de cada accesión en una placa Petri de 9 cm de diámetro en las que previamente se había colocado una capa de unos 2 cm de algodón humedecido en agua y dos discos de papel de filtro. Las semillas se pusieron entre los discos y se humedecieron con agua.

Las placas se dejaron incubar 8h a 37° C en oscuridad, y después se aclimataron durante un día en cámara, exponiéndolas a la luz y a temperatura ambiente para así propiciar la germinación uniforme de las semillas. Una vez germinadas, se trasplantaron a macetas de plástico rellenas de turba enriquecida (Humin-substrat, N-3) como sustrato. Las macetas se colocaron en bandejas en una cámara climática bajo condiciones controladas (fotoperiodo con 16 h de luz a 25° C y 8 h de oscuridad a 18° C y humedad relativa del 70%). Se realizó un riego periódico de las plantas según su necesidad.

Las plántulas se dejaron crecer hasta un estado de 1-2 hojas verdaderas y se inocularon mecánicamente. Se mantuvieron en las cámaras en las mismas condiciones de crecimiento hasta pasados 30 días post-inoculación (dpi).

3.4. Método de inoculación mecánica

Para preparar el inóculo se utilizó 1 g de tejido de hoja infectada de MU-CU-16 (*Cucurbita pepo* subesp. *pepo*, morfotipo Zucchini); y se trituró junto con tampón de inoculación (50 mM fosfato potásico pH 8,0, 1% polyvinylpyrrolidone-10, 1% polietilenglicol-6000, 10 mM 2- mercaptoetanol y 1% carbón activo) en una proporción 1:5 de hojas infectadas: tampón (w:v). Este proceso se realizó en hielo para que el virus no perdiese infectividad.

De cada planta a evaluar, se inocularon un cotiledón y la primera hoja verdadera, los cuales fueron previamente espolvoreados con carborundum, un abrasivo que facilita la entrada del virus al interior de las células vegetales. La inoculación se realiza frotando un bastoncillo impregnado con el inóculo en el cotiledón y la hoja mencionados. De las 6 plantas germinadas de cada accesión, se inoculaban 5 y 1 se dejó como control negativo, para poder comparar los síntomas producidos por la infección del virus con una planta sana que ha crecido en las mismas condiciones de cultivo en cámara.

En algunas variedades exóticas, se germinaron e inocularon menos semillas ya que se disponía de una pequeña cantidad y había que preservar algunas para reproducirlas

más adelante. En otros casos se inocularon 5 plantas, pero no hubo seguimiento de su control negativo sin inocular porque se utilizó para reproducir esa variedad en invernaderos.

3.5. Evaluación de síntomas por diagnóstico visual

Se realizó una evaluación visual de los síntomas de las plantas inoculadas a los 15 y a los 30 días después de la inoculación (dpi). Se usó una escala numérica del 0 al 4 en función de la severidad de los síntomas, (López *et al.*, 2015). Según se muestra en la Figura 8.

0. ausencia de síntomas
1. síntomas leves
2. síntomas moderados
3. síntomas severos
4. síntomas muy severos o planta muerta.

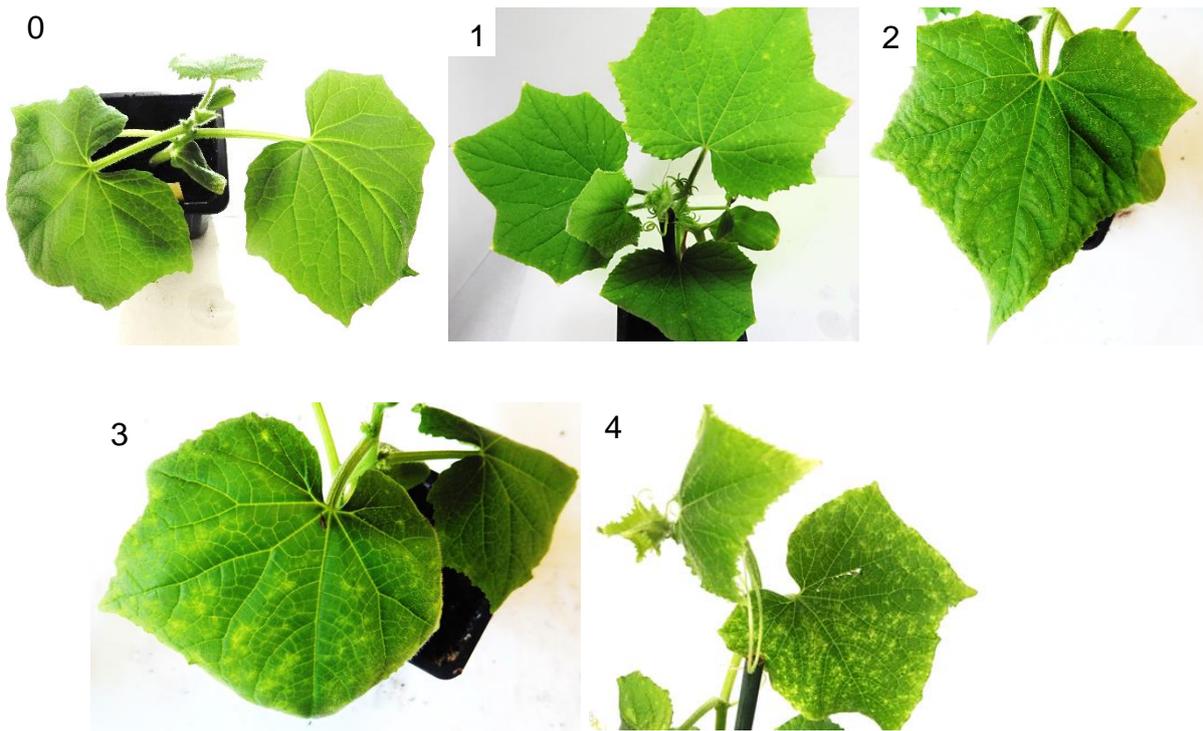


Figura 8. Escala de síntomas del ToICNDV: 0, ausencia de síntomas; 1, síntomas leves; 2, síntomas moderados; 3, síntomas severos; y 4, síntomas muy severos o planta muerta. Las hojas que se muestran corresponden a pepino a los 15 dpi.

3.6. Detección del DNA viral por inmunosupresión de tejido en membrana o *Tissue printing*

Esta técnica se basa en la hibridación molecular de los ácidos nucleicos procedentes de tejido vegetal, que están fijados sobre una membrana de nylon, con sondas marcadas con moléculas radiactivas o fluorescentes. Para ello, el peciolo de una hoja joven de cada planta se presionó ordenadamente sobre una membrana de nylon cargada positivamente (Roche). Posteriormente, se fijó con luz UV a 120 mJ/cm² por ambas caras y se guardó en papel de filtro para su posterior hibridación.

3.6.1. Hibridación, lavados y revelado.

Las membranas se introdujeron en un tubo y todas las soluciones tanto de prehibridación e hibridación como de lavado, al añadirse al tubo, se mantuvieron en hornos de hibridación, con rotación horizontal para que el líquido mojara toda la superficie.

Las membranas se prehibridaron durante 2 h a 68° C con 10 mL de solución de prehibridación (Tabla 4). Pasado ese tiempo, se eliminó la solución de prehibridación y se añadió la misma solución con la sonda de RNA (25 ng/ml) marcada con digoxigenina. La solución de hibridación se mantuvo durante toda la noche (16 h) a 56° C en el horno de hibridación. Tras sacar la sonda, la membrana se lavó 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%, 0.1% (w/v) SDS a 68° C durante 15 min.

A partir de aquí, los lavados y el revelado de la hibridación se realizaron a temperatura ambiente. La membrana se incubó con 30 mL de Buffer TL (Buffer T1 (0,1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl a pH 7,5) y 0.3% (w/v) Tween 20) durante 5 min y posteriormente se bloqueó con 30 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 incubó la membrana durante 30 min con 30 mL de Buffer T2 conteniendo el anticuerpo antidigoxigenina (dilución 1:10.000). Seguidamente se hicieron 2 lavados de 15 min cada uno con Buffer TL, seguido de un último lavado en buffer T3 (0,1 M Tris-HCl a pH 9,5 y 0,1 M NaCl) durante 5 min. Finalmente, la membrana se incubó durante 5 min con buffer T3 conteniendo CSPD (Chemiluminescence substrate) (dilución 1:100) 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 4. Composición de la solución de prehibridación.

Concentraciones	Compuestos
50%	Formamida
5X	SSC (NaCl 3M, citrato de sodio 0,3 M)
0.1%	SLS 1:10
0.02%	SDS (sodio dodecil sulfato)100 g/l
2%	Blocking reagent (Roche) 1:10
	H ₂ O estéril miliQ

3.7. Extracción y cuantificación del DNA vegetal

El DNA vegetal se extrajo con el método de CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) adaptado de Doyle y Doyle (1990). En un tubo Eppendorf de 2 mL al cual se le había introducido previamente una bola de acero de 2 mm de diámetro, se añadió 0.1 g de tejido foliar de la hoja apical de cada planta (inoculadas y controles sin inocular). El tubo se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y, posteriormente se trituró con ayuda de un homogeneizador Retsch (MM300) durante 1 min a 30 s-1.

A cada eppendorf con tejido triturado se le añadieron 700 µl de tampón de extracción (2% CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8,0, 1,42 M NaCl) con 1,4 µl de β-mercaptoetanol y se incubó durante 30 min a 65°C. Después se añadieron 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 min. El DNA se precipitó con 500 µl de isopropanol, manteniéndolo durante 10 minutos a -20°C. Seguidamente se lavó con etanol al 70% y el DNA se resuspendió en 50 µl de agua ultra pura y se almacenó temporalmente a 4°C para facilitar la resuspensión.

El DNA extraído se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies). Se usaron alícuotas de 2 µl de cada muestra para obtener la concentración de DNA y las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm que indican la calidad. Las muestras se diluyeron con agua ultra pura hasta alcanzar 50 ng/µl como concentración final.

3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, (polymerase chain reaction, PCR) se realizó para amplificar una región de 504 pb del DNA-A del virus. Se utilizaron los cebadores: ND-A1F (5'-GGGTTGTGAAGGCCCTTGTAAAGGTGC-3') y ND-A1R (5'-

AGTACAGGCCATATACAACATTAATGC-3'). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 µl, con los reactivos (Thermo Scientific) que se muestran en tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes por cada muestra de PCR

Reactivo	Volumen
DreamTaq Green Buffer 10X	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,6 µl
Cebador ND-A1F (10 mM)	0,6 µl
Cebador ND-A1R (10 mM)	0,6 µl
Dream Taq Polymerase(5 U/µL)	0,12 µl
H ₂ O	10,88 µl
DNA (50 ng/µl)	0,7 µl
Total	15 µl

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

3.9. Electroforesis en geles de agarosa

El DNA amplificado por PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (40 mM Tris pH 7,5, 20 mM acetato sódico, 1 mM EDTA). Se cargaron 10 µl de cada producto de PCR en el gel, junto con el marcador de pesos moleculares DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). Se aplicó una potencia de 100 V durante 45 min aproximadamente. Para visualizar el DNA, los geles se sumergieron durante 15 min en bromuro de etidio (10 mg/ml). Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se iluminaron con un transiluminador de luz UV para visualizar y fotografiar los resultados.

3.10. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Se realizó un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en muestras seleccionadas para estimar el contenido viral en las accesiones más resistentes. Se analizaron tres réplicas técnicas por cada muestra a 30 dpi. Las amplificaciones se realizaron con cebadores diseñados a partir del DNA-A: ToLCNDVF1 (5'-AATGCCGACTACACCAAGCAT-3', posiciones 1145–1169) y ToLCNDVR1 (5'-GGATCGAGCAGAGAGTGGCG-3', posiciones 1399–1418), amplificando un fragmento de 274 pb (Sáez *et al.*, 2017).

La qPCR se realizó en un termociclador Roche Lightcycler 480. La mezcla de reacción contenía por 15 µl: 7,5 µl de FastStart Essential DNA Green Master 2x (ROCHE), 1,5 µl de cada cebador, 1,5 µl de agua y 3 µl del DNA correspondiente. Las condiciones de la amplificación fueron: 5 min a 95° C y 45 ciclos de 5 s a 95° C y 30 s a 72° C.

La acumulación relativa de ToLCNDV en las plantas se calculó mediante el método de comparación Ct (Cycle Threshold), utilizando como gen de referencia el gen CIACT que codifica la β-actina de *C. sativus*. A partir de los cebadores CIACT-F 5'-CCATGTATGTTGCCATCCAG-3' y CIACT-R 5'-GGATAGCATGGGGTAGAGCA – 3', se amplificó un fragmento de 221 pb de este gen, siguiendo los parámetros de amplificación anteriormente descritos.

La acumulación relativa del virus se calculó usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre el ΔCt ($\Delta Ct_{\text{sample}}: Ct_{\text{ToLCNDV}} - Ct_{\text{gen de referencia}}$) de cada muestra y el ΔCt de la muestra de calibrado. (Sáez *et al.*, 2016).

3.11. Análisis de datos

Para cuantificar la acumulación viral de los fragmentos de DNA amplificados según las bandas del gel de electroforesis, se siguió una escala de 0 a 3, siendo 0 ausencia de banda y 3 una banda de máxima intensidad (figura 9).

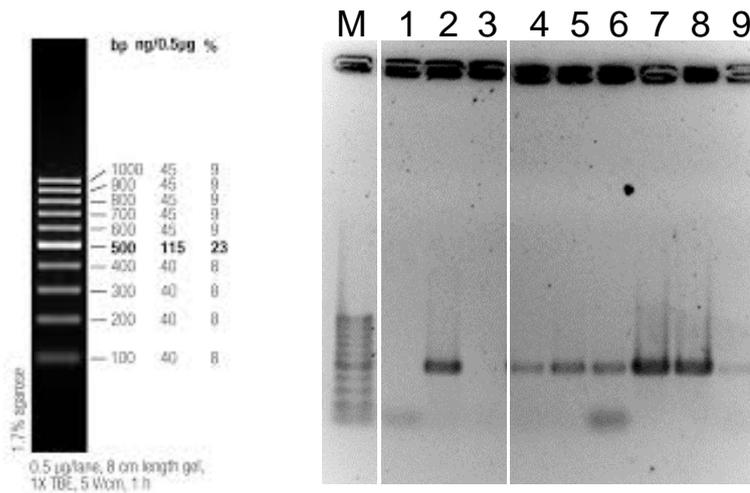


Figura 9. Izquierda: marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (Fermentas). Derecha: Análisis semicuantitativo de los fragmentos de DNA amplificados con los cebadores ND-A1F/R del ToLCNDV (504 bp). M, marcador de peso molecular, Carriles 1 y 2, control negativo y positivo de la PCR. Carril 3, carga viral 0. Carriles 4 y 9, carga viral 1, Carriles 5 y 6, carga viral 2. Carriles 7 y 8, carga viral 3.

Se aplicó la misma escala para evaluar la carga viral a partir de las membranas de hibridación por *tissue printing* que fueron realizadas a los 15 y 30 dpi. La intensidad de las manchas realizadas por impregnación de tejido se cuantificó como se muestra en la figura 10.

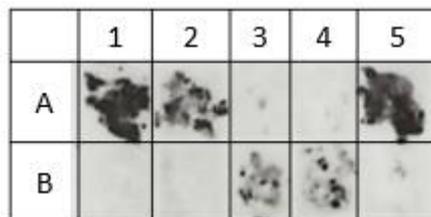


Figura 10. Resultados de hibridación molecular por *tissue printing* con RNA-dig a 30 dpi de algunas muestras de la colección nuclear de germoplasma de pepino del COMAV. A1 y A5 tienen una puntuación de 3, A2 tiene una puntuación de 2, B3 y B4 tienen una puntuación de 1. El resto tienen una puntuación de 0.

4. Resultados

4.1. Respuesta de *Cucumis sativus* a la transmisión mecánica de ToLCNDV en la colección nuclear del banco de germoplasma de COMAV.

En este trabajo se han probado un total de 40 accesiones de diferentes procedencias en España. Partiendo del conocimiento que se tiene de la diversidad genética de la especie, las accesiones probadas se seleccionaron de manera que representaban la diversidad genética que la especie alberga en España.

Por lo general, la mayoría de las accesiones resultaron susceptibles a la transmisión mecánica del ToLCNDV, mostrando síntomas severos y contenido viral elevado, tanto a los 15 como a los 30 dpi. Los síntomas observados incluían mosaico que cubría las hojas jóvenes, hojas amarillentas y crecimiento ralentizado en algunos casos.

La respuesta a la inoculación mecánica del ToLCNDV se ha clasificado atendiendo a la longitud del fruto de cada accesión (Figura 11).

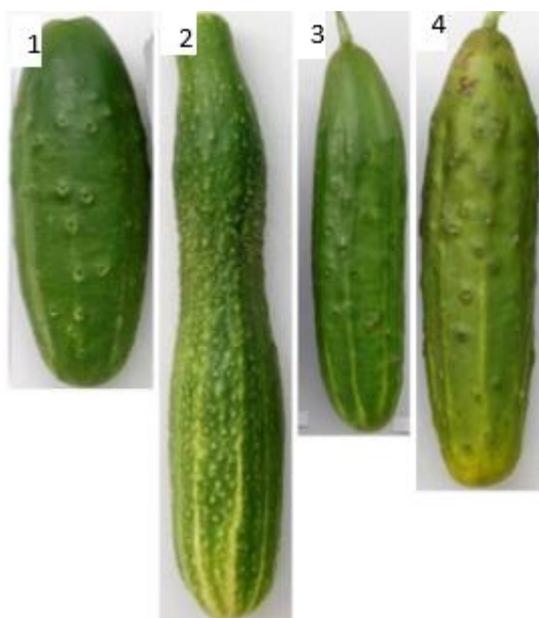


Figura 11. 1. A-C-15 “corto” 2. MU-C-51 “muy largo” 3. NC019552 “francés” 4. AN-C-18 “largo” (Valcárcel, 2017).

La evaluación sintomatológica de las plantas se realizó siguiendo la escala de 0 a 4 previamente descrita en el apartado 3.5. la cuantificación de la carga viral por *tissue printing* y por PCR se hizo siguiendo una escala de 0 a 3 según se describe en el apartado 3.10.

4.1.1. Respuesta de las accesiones de *C. sativus* tipo “corto”

Dentro del grupo de entradas de *C. sativus* de tipo “corto”, la mayoría de las 20 accesiones evaluadas tanto de fenotipo Corto Típico, Corto pelos y espinas y Corto tubercular pronunciado mostraron, en promedio, síntomas moderados o severos a los 30 dpi, con una puntuación media de 2,1 en un rango de 0 a 4 (Tabla 6).

Cuatro de las accesiones sólo mostraron síntomas leves a los 15 dpi, con algunas plantas asintomáticas. En tres de los casos, las accesiones 2735, AN-C-113 y AN-C-158 acabaron desarrollando síntomas moderados a los 30 dpi. En cambio, las accesiones AN-C-125 y CA-C-23 sólo desarrollaron síntomas leves al finalizar el ensayo (Figura 12).



Figura 12. Plantas altamente sintomáticas de las accesiones E-C-56 (izquierda), IVIA-044 (centro) y NC068253 (derecha).

Tabla 6. Media y rango de la puntuación de síntomas en cinco plantas por genotipo inoculadas mecánicamente con el clon infeccioso de ToLCNDV, a 15 y 30 dpi de las accesiones tipo “corto”. Las celdas coloreadas en verde indican las accesiones con una media ≤ 1 , consideradas con respuesta resistente a ToLCNDV, y en rojo las entradas con media > 1 , con comportamiento susceptible.

Fenotipo	Código	Síntomas 15 dpi	Síntomas 30 dpi
Corto típico	360	1,4 (0-3)	1,6 (0-3)
	2735	0,8 (0-2)	1,75 (1-2)
	A-C-15	1,2 (1-2)	1,8 (1-2)
	AN-C-125	1 (1)	1 (0-2)
	AN-C-54	1,6 (1-2)	1,6 (1-3)
	BGHZ4943	1,6 (0-2)	2,8 (2-4)
	CM-C-46/1	2 (1-3)	1,7 (1-2)
	F4	3,4 (3-4)	3,8 (3-4)
	MU-C-50/1	-	2 (1-3)
	NC068253	2,6 (0-4)	2,8 (2-4)
Corto pelos y espinas	CA-C-23	-	0,6 (0-2)
	NC068251	2 (0-4)	3,2 (3-4)
Corto tubercular pronunciado	426	1,7 (1-2)	1,2 (0-2)
	2437	2,4 (1-4)	3,4 (2-4)
	AN-C-113	1 (0-2)	1,4 (0-3)
	AN-C-158	1 (0-2)	1,4 (1-2)
	AN-C-83	1,2 (0-3)	1,8 (1-2)
	BGHZ2360	3,8 (3-4)	3,6 (3-4)
	E-C-56	1,4 (1-2)	2,5 (1-3)
	IVIA-044	2 (1-3)	2,4 (2-3)

Para profundizar en la caracterización de la respuesta a ToLCNDV, se evaluó, mediante hibridación molecular por *tissue printing*, la carga viral de todas las plantas a 15 y 30 dpi. Para llevar a cabo una confirmación más precisa, se determinó la acumulación viral mediante PCR semicuantitativa a 30 dpi de al menos una planta de genotipos seleccionados. Los resultados obtenidos a partir de las dos técnicas se muestran en la figura 13.

En la mayoría de accesiones la concentración viral fue acorde con los síntomas observados, aumentando o manteniéndose constante de los 15 a los 30 dpi. En muchos casos, la acumulación viral detectada por *tissue printing* a 30 dpi fue inferior a la detectada mediante PCR. Estos resultados se deben a la mayor sensibilidad de la PCR frente a hibridación molecular (Sánchez-Navarro *et al.*, 1998; 1999), que permite amplificar el DNA viral, aunque la carga viral de partida sea baja.

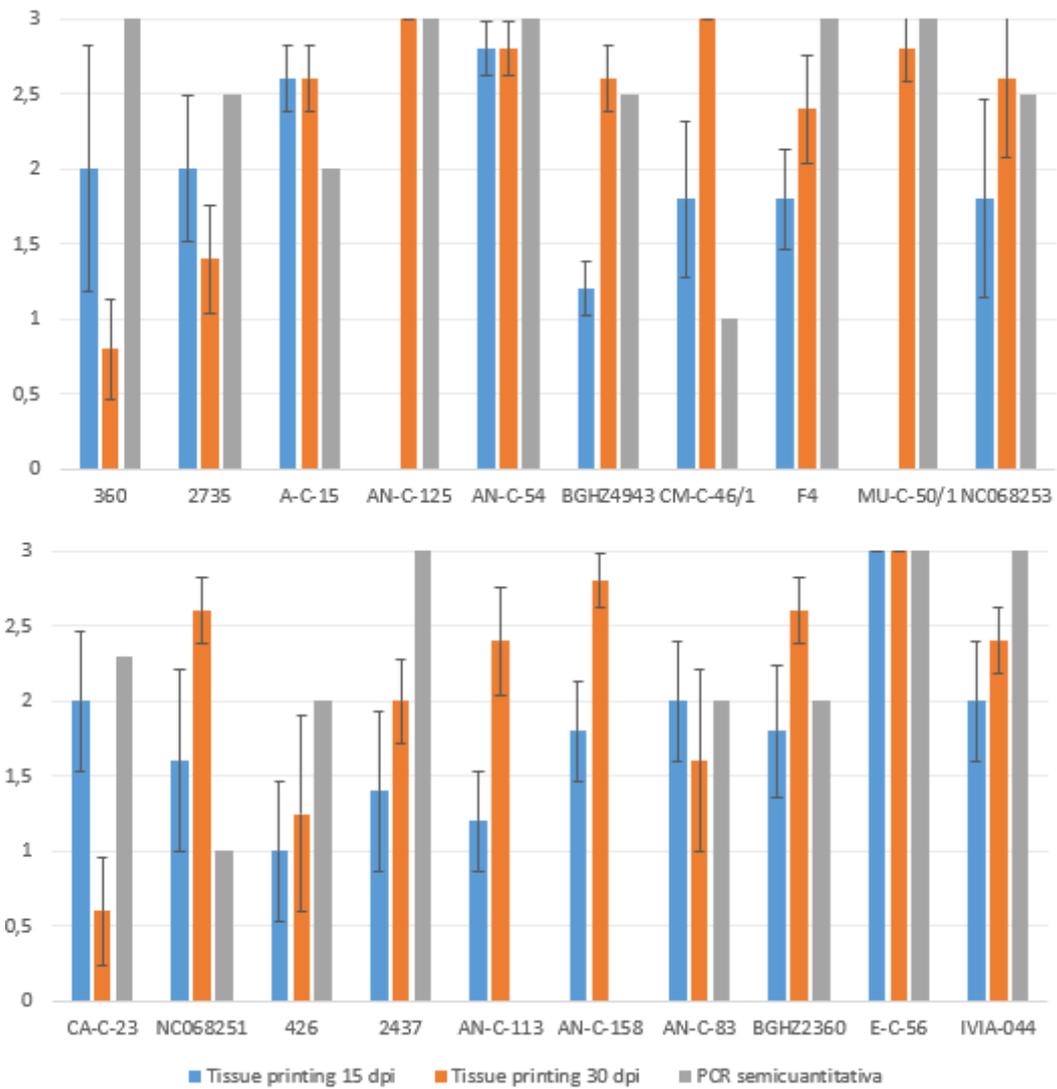


Figura 13. Media y error estándar de la acumulación viral de las accesiones de *C. sativus* tipo “Corto”. Las dos primeras columnas corresponden a los resultados obtenidos a partir de hibridación por *tissue printing* a 15 dpi (columnas de color azul) y 30 dpi (columnas de color naranja). La tercera columna (gris) corresponde a los resultados obtenidos a partir de PCR semicuantitativa a 30 dpi.

4.1.2. Respuesta de las accesiones de *C. sativus* tipo “largo”, “muy largo” y “francés”

La mayoría de accesiones evaluadas tipo “largo”, tanto de fenotipo largo pelos y espinas, largo tubercular no pronunciado y largo tubercular pronunciado han mostrado, en promedio, síntomas moderados o severos a los 15 y 30 dpi, con una puntuación media de 1,92 a los 30 dpi, en un rango comprendido de 0 a 4 (Tabla 7) (Figura 14).



Figura 14. Plantas altamente sintomáticas de las accesiones BGHZ4778 (izquierda), NC068252 (centro) y NC094818 (derecha).

Las entradas AN-C-27/1, AN-C-18 y AS-C-1, que fueron asintomáticas o mostraron síntomas leves a los 15 dpi, desarrollaron síntomas moderados y severos a los 30 dpi. Las plantas de las accesiones 2457 y V-C-16 sólo desarrollaron, en promedio, síntomas leves durante todo el ensayo, aunque algunas de las plantas de estas accesiones sí desarrollaron síntomas moderados y severos a 30 dpi.

La única accesión evaluada del tipo “muy largo” fue MU-C-51 y mostró alta susceptibilidad. Las accesiones tipo “francés” fueron también todas susceptibles al ToLCNDV, con una media de síntomas a 30 dpi de 2,8. NC068252 fue la entrada más susceptible (Figura 14).

Tabla 7. Media y rango de la puntuación de síntomas en cinco plantas por genotipo inoculadas mecánicamente con el clon infeccioso de ToLCNDV, a 15 y 30 dpi de las accesiones tipos “largo”, “muy largo” y “francés”. Las celdas coloreadas en verde indican las accesiones con una media ≤ 1 , consideradas con respuesta resistente a ToLCNDV, y en rojo las entradas con media > 1 , con comportamiento susceptible.

Fenotipo	Código	Síntomas 15 dpi	Síntomas 30 dpi
Largo pelos y espinas	AN-C-27/1	0,6 (0-1)	2,4 (2-3)
	V-C-16	0 (0)	1 (0-2)
	V-C-94/2	2 (2)	2 (2)
Largo no tuberculoso pronunciado	2444	1,8 (0-4)	1,8 (0-4)
	AN-C-18	0,6 (0-1)	1,2 (0-2)
	AS-C-1	1 (0-2)	1,6 (1-2)
	BGHZ4778	2,5 (1-3)	2,5 (2-3)
	CA-C-22	2 (2)	1 (0-2)
	C-C-49	2,8 (1-4)	3,4 (2-4)
	V-C-104	1,4 (1-2)	1,3 (1-2)
Largo tuberculoso pronunciado	2457	0,6 (0-3)	0,6 (0-3)
	AN-C-62	1,4 (0-2)	2 (1-3)
	BGHZ2387	2,2 (0-4)	2,4 (1-4)
	MU-C-55	1,4 (1-2)	3 (3)
	NC094818	2,4 (0-4)	2,6 (0-4)
Muy largo	MU-C-51	1,6 (1-2)	1,2 (1-2)
Francés atípico	NC019552	2,8 (0-4)	3,8 (3-4)
	BGHZ2362	3 (0-4)	2,6 (0-4)
Francés	BGHZ2389	1,6 (0-3)	2,4 (0-4)
	NC068252	2,25 (0-3)	2,75 (0-4)

De manera paralela a la sintomatología, la acumulación viral comenzó siendo moderada en muchos casos, incrementándose significativamente de 15 a 30 dpi, como se pudo observar tras la hibridación mediante *tissue printing* fundamentalmente en las entradas más susceptibles (Figura 15). En todos los casos la acumulación viral detectada por PCR fue de moderada a muy elevada (Figura 15).

Destaca el caso de la accesión 2457, con promedio de síntomas y carga viral leves a 15 y a 30 dpi (Figura 15), pero acompañados de valores de error estándar elevados entre las plantas evaluadas. Este error estándar de la media se genera al ser cuatro plantas de la accesión asintomáticas durante todo el ensayo, y una de ellas mostrar síntomas muy intensos (3) a los 15 y 30 dpi. Con el fin de confirmar si este comportamiento se debía a escapes en la inoculación y no una accesión resistente, se incluyeron muestras de esta accesión en un ensayo de comprobación por PCR cuantitativa (apartado 4.3.). CA-C 22 mostró un comportamiento anómalo por haber reducido sus síntomas y carga viral entre 15 dpi y 30 dpi. Ese hecho podría estar relacionado con que las plantas

de esta accesión no tuvieron un buen desarrollo en cámara, lo que dificultaría el desarrollo de síntomas más severos.

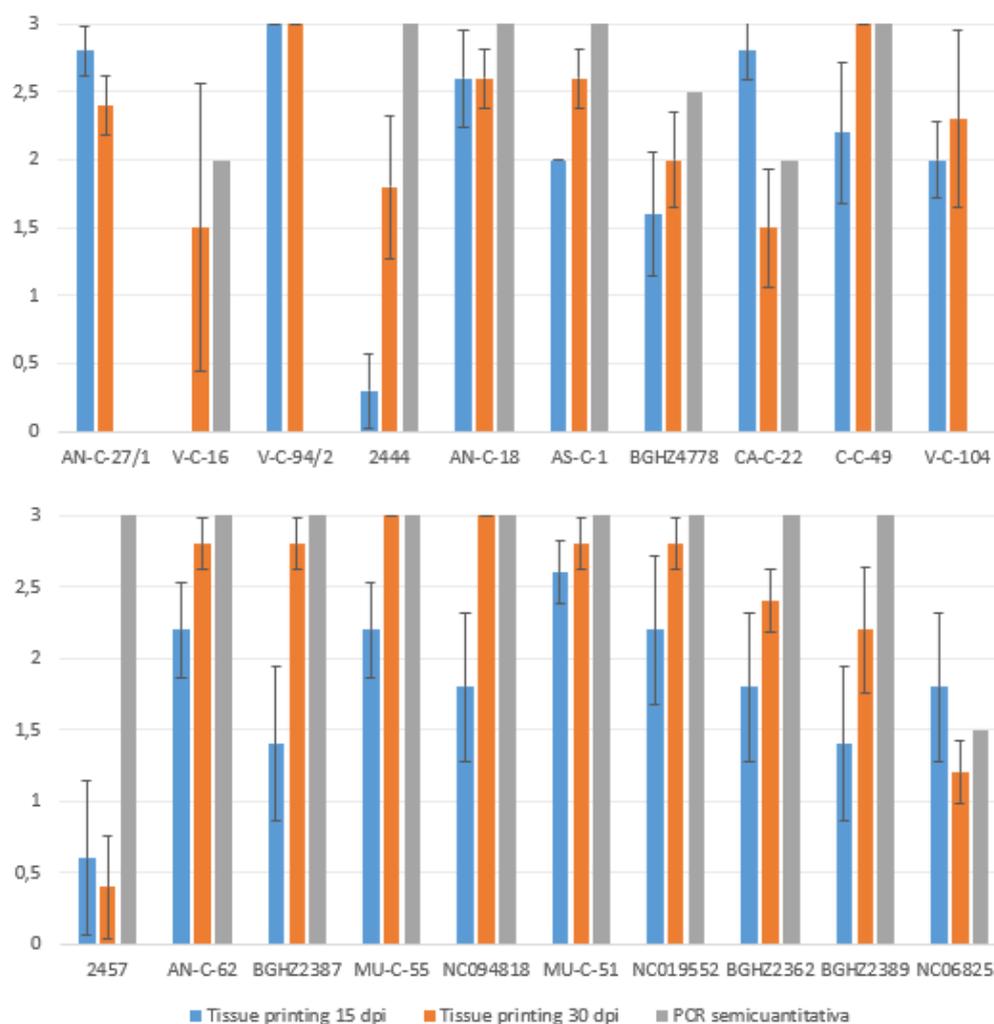


Figura 15. Media y error estándar de la acumulación viral de las accesiones de *C. sativus* tipos “largo”, “muy largo” y “francés” Las dos primeras columnas corresponden a los resultados obtenidos a partir de hibridación por *tissue printing* a 15 dpi (columnas de color azul) y 30 dpi (columnas de color naranja). La tercera columna (gris) corresponde a los resultados obtenidos a partir de PCR semicuantitativa a 30 dpi.

Las accesiones CAC1 y AN-C-106, resistentes al virus de las venas amarillas del pepino (CVYV), se comportaron también como altamente susceptibles al ToLCNDV y mostraron elevada carga viral tanto por hibridación molecular como por PCR (datos no mostrados). Por tanto, a pesar de la diversidad de la colección nuclear evaluada, no se encontró resistencia total o parcial, ni tolerancia utilizable comercialmente en estas variedades. De todas formas, todas las entradas que a 30 dpi mostraron síntomas muy reducidos, se evaluarán en un nuevo ensayo con el fin de confirmar su comportamiento frente a ToLCNDV.

4.2. Respuesta de accesiones exóticas de *Cucumis sativus* a la transmisión mecánica de ToLCNDV.

Las entradas seleccionadas procedían de su centro de origen, India, países cercanos como China o Irán y de zonas de diversificación secundaria. Los resultados de la inoculación mecánica a especies exóticas de *C. sativus* se han clasificado atendiendo a la longitud del fruto de estas plantas (Figura 16).

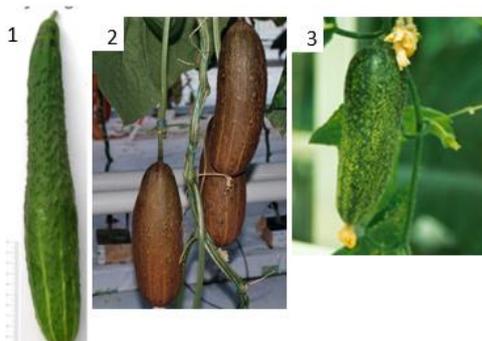


Figura 16. 1. BGV015107 “muy largo” 2. CS18 “medio” 3. CS16 “corto” (“CGN Germplasm Search”, 2019; Valcárcel, 2017).

4.2.1. Respuesta de las accesiones exóticas de *C. sativus* de tipo “corto”

Al final del ensayo de inoculación mecánica en las variedades exóticas de tipo “corto”, la incidencia de la enfermedad fue considerablemente menor que en las procedentes de España. Los síntomas fueron leves en los casos de las entradas procedentes de la India CS16, CS19 y CS20, y ausentes en CS22 y CS23, por lo que a priori podría tratarse de entradas resistentes al ToLCNDV. El resto de plantas mostraron la sintomatología característica de la enfermedad en esta especie, que incluye mosaico, amarillamiento y decaimiento de las hojas (Figura 17).



Figura 17. Planta sintomática CS12 (izquierda). Planta asintomática CS23 (derecha).

Tres de las accesiones (CS8, CS15 y CS21) sólo mostraron síntomas leves a los 15 dpi, pero acabaron desarrollando síntomas moderados a los 30 dpi (Tabla 8).

Tabla 8. Media y rango de la puntuación de síntomas en plantas inoculadas mecánicamente con el clon infeccioso de ToLCNDV, a 15 y 30 dpi de las accesiones tipo “corto”. Las celdas coloreadas en verde indican las accesiones con una media ≤ 1 , consideradas con respuesta resistente a ToLCNDV, y en rojo las entradas con media >1 , con comportamiento susceptible.

Fenotipo	Código	Síntomas 15 dpi	Síntomas 30 dpi
Corto	CS 7	2,5 (2-3)	2,8 (2-3)
	CS 8	1 (0-2)	1,3 (0-2)
	CS 11	2,8 (0-4)	3,2 (1-4)
	CS 12	3,5 (3-4)	3 (3)
	CS 13	1,4 (0-3)	3 (2-4)
	CS 15	0,3 (0-1)	3,5 (1-4)
	CS 16	1 (0-3)	1 (1)
	CS19	0,4 (0-1)	0,4 (0-1)
	CS 20	0,2 (0-1)	0 (0)
	CS 21	0,6 (0-2)	2 (0-3)
	CS 22	0 (0)	0,3 (0-1)
	CS 23	0 (0)	0,7 (0-1)

La evaluación de las variedades exóticas también se complementó mediante hibridación molecular por *tissue printing* a los 15 y 30 dpi y se confirmó la acumulación viral mediante PCR semicuantitativa a 30 dpi de al menos una planta de cada genotipo. En el caso de las accesiones resistentes, se incluyeron muestras de todas las plantas que había (Figura 18). En la mayoría de accesiones la concentración viral fue acorde con los síntomas observados, aumentando o manteniéndose constante de los 15 a los 30 dpi. Destaca el caso de la entrada CS16, que, aunque sus síntomas fueron leves, su promedio de carga viral mediante hibridación molecular hace que no se pueda considerar como resistente a ToLCNDV.

La acumulación viral detectada por PCR fue moderada en los genotipos resistentes, pese a haber mostrado una carga viral baja o nula por *tissue printing*. Esto se debe a que la PCR es una técnica más sensible que la hibridación molecular y detecta el DNA viral, aunque el número de copias sea bajo. Los resultados de la PCR, que indican una acumulación viral de moderada a alta, tanto en las accesiones sintomáticas como las asintomáticas, confirman que el virus es capaz de multiplicarse y difundirse por las plantas de las accesiones resistentes de *C. sativus*, como sucede en las accesiones resistentes de melón (López *et al.*, 2015) y calabaza (Sáez *et al.*, 2016; 2017)

Las entradas CS19 y CS20 mostraron una gran tolerancia al ToLCNDV y la media de su carga viral fue moderada, tanto por *tissue printing*, como por PCR (carga viral de 1 en CS19 y de 1,8 en CS20). Estas dos accesiones junto con las entradas asintomáticas CS22 y CS23 fueron consideradas como resistentes/tolerantes al virus, por lo que posteriormente se analizaron mediante PCR cuantitativa para estimar la cantidad de copias de DNA viral acumuladas en relación con las entradas susceptibles.

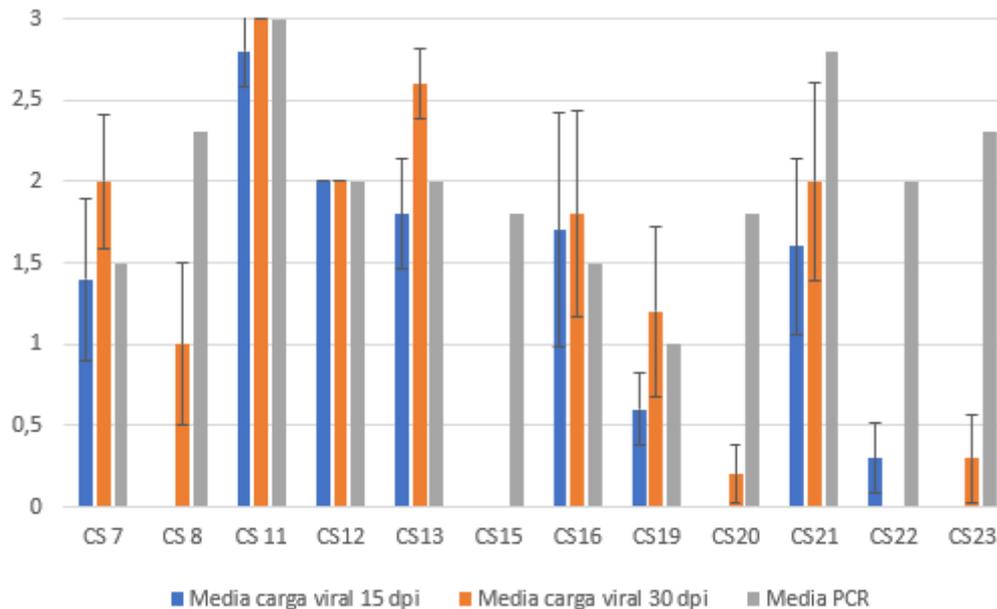


Figura 18. Media y error estándar de la acumulación viral de las accesiones de *C. sativus* tipo “corto”. Las dos primeras columnas corresponden a los resultados obtenidos a partir de hibridación por *tissue printing* a 15 dpi (columnas de color azul) y 30 dpi (columnas de color naranja). La tercera columna (gris) corresponde a los resultados obtenidos a partir de PCR semicuantitativa a 30 dpi.

4.2.2. Respuesta de las accesiones de *C. sativus* de los tipos “muy largo”, “medio” y CS6

Las cinco accesiones exóticas de fenotipo “muy largo” eran genotipos procedentes de China y todas mostraron alta susceptibilidad a ToLCNDV, con síntomas y carga viral moderada y severa tras la inoculación con el virus (Tabla 10 y Figura 20). Destaca la accesión CS 4 con el promedio de síntomas más elevado a 30 dpi y carga viral muy alta (Figura 19).



Figura 19. Planta altamente sintomática CS4 (izquierda). Planta asintomática CS18 (derecha).

Tabla 10. Media y rango de la puntuación de síntomas en plantas inoculadas mecánicamente con el clon infeccioso de ToLCNDV, a 15 y 30 dpi de las accesiones tipo “muy largo”, “medio” y CS6. Las celdas coloreadas en verde indican las accesiones con una media ≤ 1 , consideradas con respuesta resistente a ToLCNDV, y en rojo las entradas con media > 1 , con comportamiento susceptible.

Fenotipo	Código	Síntomas 15 dpi	Síntomas 30 dpi
Muy largo	CS1	1,2 (0-2)	1,6 (1-3)
	CS2	2 (1-3)	1,6 (1-2)
	CS3	1,3 (0-4)	1,6 (1-3)
	CS4	1,8 (0-3)	2,6 (1-4)
	CS5	3 (0-4)	3,3 (1-4)
Medio	CS9	1,3 (0-2)	1,5 (1-2)
	CS10	3 (2-4)	3,7 (3-4)
	CS14	0,5 (0-1)	1 (1-2)
	CS18	0,4 (0-1)	0,8 (0-2)
	CS17	0,8 (0-2)	1,5 (0-2)
Sin datos	CS6	1,4 (0-4)	3,7 (0-4)

Dentro del grupo de las accesiones de longitud media, CS9, CS10 y CS14 mostraron por lo general síntomas severos y elevada carga viral, mientras que el genotipo CS17 mostró síntomas y carga viral muy bajos a 15 dpi, aunque aumentaron ligeramente a los 30 dpi. Finalmente, el genotipo CS18 se comportó como resistente ya que sus síntomas fueron bajos a 15 y 30 dpi, aunque la carga viral por PCR fue bastante elevada (Figura 19).

Por lo general, la concentración viral concuerda con los síntomas observados en la mayoría de genotipos, siendo más elevada cuanto más susceptible es el genotipo. Además, salvo algunas excepciones la acumulación viral a 30 dpi fue mayor que a 15 dpi y la carga viral detectada por PCR fue también mayor que la detectada por *tissue printing* a 30 dpi debido a alta sensibilidad de esta técnica.

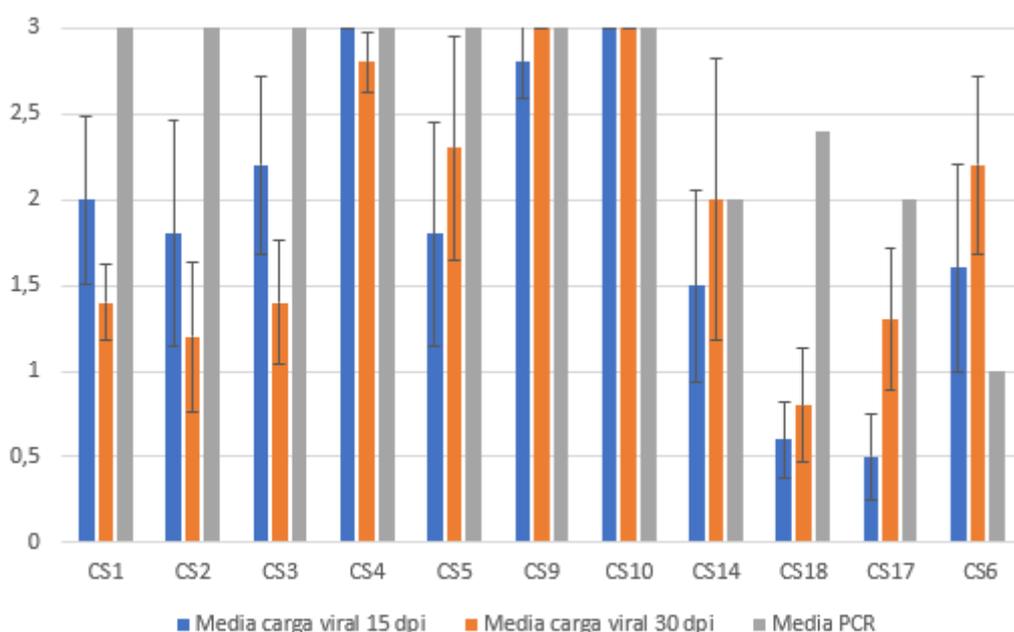


Figura 20. Media y error estándar de la acumulación viral de las accesiones de *C. sativus* tipos “muy largo” “medio” y CS6 (de la cual no se dispone de información de su tipo). Las dos primeras columnas corresponden a los resultados obtenidos a partir de hibridación por tissue printing a 15 dpi (columnas de color azul) y 30 dpi (columnas de color naranja). La tercera columna (gris) corresponde a los resultados obtenidos a partir de PCR semicuantitativa a 30 dpi.

4.3. Confirmación de la resistencia/tolerancia por PCR cuantitativa

La selección de muestras se hizo en base a la resistencia de cada genotipo. Se evaluó por PCR cuantitativa la acumulación del ToLCNDV en las 5 plantas de la accesión CS18, 3 de CS19, 5 de CS20, 3 de CS22 y 3 de CS23, ya que en promedio mostraron síntomas leves o muy leves y baja carga viral en los ensayos de hibridación molecular por *tissue printing*. Con el fin de comparar y comprobar su carga viral, también se incluyeron dos plantas del genotipo 2457, una susceptible y otra asintomática. Además, se introdujeron tres plantas altamente susceptibles como controles positivos: BGHZ2360, F4 y CA-C-22.

Como se puede observar en la figura 21 y anexo 1, las muestras seleccionadas como resistentes mostraron una acumulación viral relativa inferior a la de los controles susceptibles BGHZ2360, F4, y CA-C-22, exceptuando la muestra CS19 5, cuya carga viral sobrepasa a la de uno de los controles susceptibles.

Por otra parte, en la accesión 2457, tanto la planta sintomática (1) como la asintomática (3), mostraron una carga viral comparable a la de los controles susceptibles, por lo que fue descartada como posible fuente de resistencia a ToLCNDV.

En el caso de CS18, aunque ninguna de las 5 plantas superó la carga viral de las susceptibles, tres de ellas presentaron una carga viral superior a 1.000. Algo similar sucedió en CS19. Ninguna de estas dos accesiones ha mostrado síntomas tras la infección. No obstante, se observa una gran variación de la acumulación viral entre plantas. Esto puede ser debido a que la resistencia en este genotipo de origen exótico no se encuentra fijada y el carácter de resistencia segrega entre plantas de la misma accesión.

En las entradas CS20, CS22 y CS23 se han identificado los mejores valores de resistencia, con un valor promedio de acumulación viral relativa de 61,16; 5,86 y 15,67, respectivamente. La entrada con menos copias de DNA viral, y por tanto, con la mayor resistencia a ToLCNDV identificada en este trabajo fue CS22.

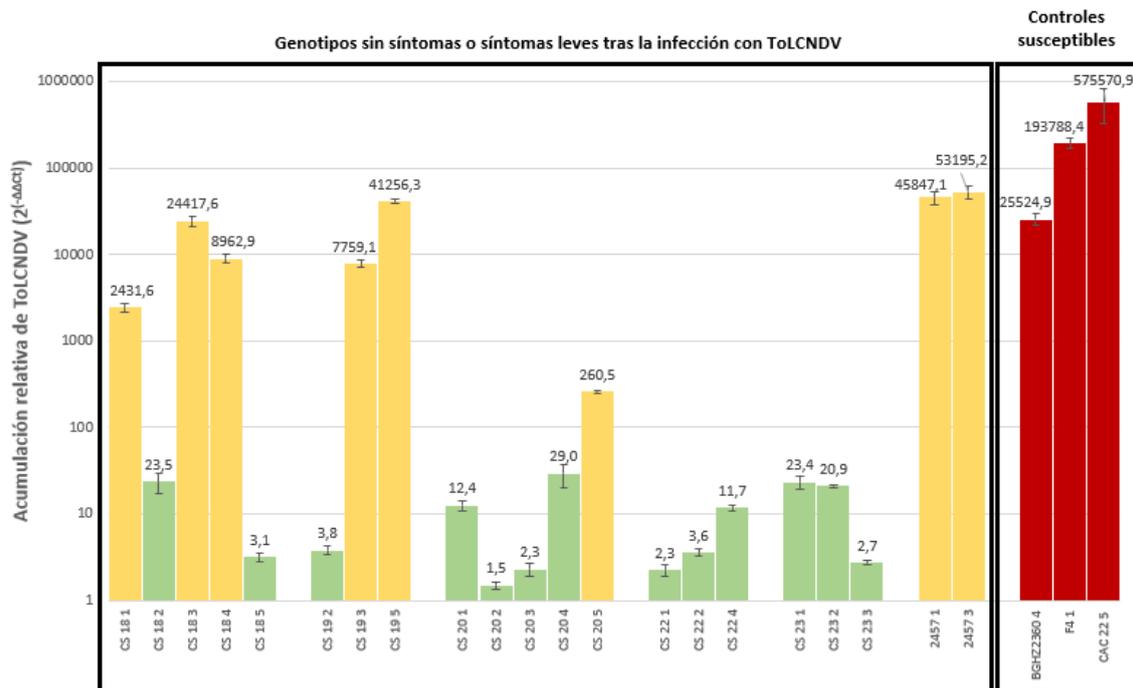


Figura 21. Media y error estándar de la acumulación viral de las accesiones de *C. sativus* seleccionadas por ser asintomáticas o con síntomas leves y baja carga viral (izquierda). Media y error estándar de la acumulación viral de 3 de las accesiones de *C. sativus* altamente susceptibles (derecha). Resultados obtenidos a partir de PCR cuantitativa relativa.

5. Discusión

En este TFG se ha evaluado la resistencia a ToLCNDV de una colección de entradas de pepino. La mayoría de los genotipos fueron muy sensibles al virus tras la inoculación mecánica. La alta susceptibilidad observada a lo largo de la gran diversidad evaluada de esta especie confirma que este virus representa una importante amenaza al cultivo del pepino. De las 40 accesiones evaluadas de la colección nuclear del COMAV, 35 mostraron síntomas de moderados a severos y elevada carga viral a 30 dpi, sólo cinco accesiones (AN-C-125, CA-C-23, V-C-16, CA-C-22 y 2457) mostraron síntomas suaves, lo que podría sugerir un cierto nivel de tolerancia. Curiosamente, de las 20 entradas exóticas evaluadas, identificamos 5 genotipos, todos originarios de la India, que mostraron sólo síntomas leves después de la inoculación con ToLCNDV (CS18, CS19 y CS20) o que fueron totalmente asintomáticas (CS22 y CS23), por lo que pueden tener un elevado nivel de resistencia. Esta resistencia podría estar relacionada con la coevolución del hospedador y el patógeno en esta parte del mundo, como ha sucedido ya con las resistencias encontradas anteriormente frente al ToLCNDV en accesiones indias de melón (López *et al.*, 2015; Sáez *et al.*, 2017) y de calabaza (Sáez *et al.*, 2016) y en el patosistema CGMMV pepino (Crespo *et al.*, 2018).

Diferentes cultivares pueden acumular diferentes cantidades de virus cuando se infectan con ToLCNDV, y las plantas con carga viral restringida pueden ser consideradas como fuentes potenciales de resistencia (Cech y Branisova 1976). En el caso de la colección nuclear de pepino del COMAV, de las 5 entradas que mostraron síntomas leves sólo la entrada 2457 fue analizada mediante qRT-PCR y la carga viral fue elevada, y comparable a la del control susceptible BGHZ2360. Por el contrario, las 5 accesiones silvestres de la India pueden ser potenciales fuentes de resistencia a ToLCNDV debido a que, además de no desarrollar síntomas tras la inoculación, permanecieron prácticamente libres de virus cuando se evaluaron mediante qRT-PCR, lo que confirmaría su resistencia. Es importante destacar que los genotipos indios descritos como tolerantes cruzan perfectamente con pepinos comerciales por lo que, tras la caracterización de algunas de estas resistencias, podrían usarse para obtener variedades de pepino resistentes.

Aunque no existe necesariamente una relación directa entre síntomas y concentración viral (Crespo *et al.*, 2018), la resistencia al ToLCNDV en pepino podría estar asociada con diferencias en la concentración de virus. De ahí que la evaluación de la resistencia deba incluir análisis de síntomas y de carga viral (Cech y Branisova 1976). La baja concentración viral en el desarrollo de la infección indicaría que el mecanismo de

resistencia al virus en estos genotipos puede estar relacionado con la prevención de la acumulación viral, como limitación de la replicación o el movimiento (López *et al.*, 2015; Sáez *et al.*, 2016; 2017). En el presente estudio hemos encontrado una relación significativa entre los síntomas y las concentraciones del virus. Por otra parte, algunas plantas con síntomas muy leves mostraron cantidades significativas del virus, que podrían aumentar la posibilidad de una mayor propagación en los cultivos. En solanáceas se ha observado que diferencias en la expresión de genes implicados en el desencadenamiento de un silenciamiento postranscripcional, así como la respuesta de defensa del hospedante, determinaría el nivel de acumulación del ToLCNDV y el grado de desarrollo de los síntomas (Kushwaha *et al.*, 2015).

En este trabajo se ha puesto a punto también una RT-PCR en tiempo real para la detección rutinaria del ToLCNDV, que permite detectar bajas cantidades de ToLCNDV lo puede ser de gran ayuda en la prevención y control de la enfermedad causada por este virus (Chen *et al.*, 2008). La qRT-PCR desarrollada usa un control interno basado en el gen de la actina para normalizar la cuantificación de la secuencia viral (Sáez *et al.*, 2016, 2017), por lo que se podrá utilizar en programas de mejora de pepino para estimar las cantidades de ToLCNDV en las plantas inoculados.

6. Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

- 1- La transmisión del ToLCNDV a las diferentes variedades de la especie *Cucumis sativus* se ha realizado eficazmente mediante inoculación mecánica.
- 2- A pesar de la gran diversidad fenotípica, todas las accesiones procedentes de la colección nuclear de pepino del banco de germoplasma del COMAV han mostrado una sintomatología de moderada a severa, por lo que pueden ser consideradas como susceptibles al ToLCNDV.
- 3- Las variedades de pepino de procedencia exótica han mostrado una respuesta variable, pero se han identificado como fuentes de resistencia/tolerancia al ToLCNDV las entradas precedentes de la India CS20, CS22 y CS23 puesto que fueron asintomáticas o mostraron síntomas leves.
- 4- El virus es capaz de replicarse en las accesiones catalogadas como resistentes, pero la acumulación viral es muy inferior a la de las variedades susceptibles.
- 5- Las entradas asintomáticas CS20, CS22 y CS23 serán utilizadas para generar poblaciones segregantes en cruces con otras accesiones susceptibles de *C. sativus*, que permitan estudiar el control genético de la resistencia.

7. Bibliografía

- Alfaro-Fernández, A., Sánchez-Navarro, J. A., Landeira, M., Font, M. I., Hernández-Llópis, D., & Pallás, 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*, 245-254.
- Pasic, M., Hojilla, C., & Yousef, G. M. (2014). Polymerase chain reaction. In *Molecular Testing in Cancer* (pp. 39-54). Springer, New York, NY.
- Brown, A.H.D., Schoen, D.J., 1994. Optimal sampling strategies for core collections of plant genetic resources, en: Loeschke, V., Tomiuk, J., Jain, S.K. (Eds.), *Conservation Genetics*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 357–369
- Cech, M., Branisova, H. (1976) Non relatedness between symptoms and cucumber virus 4 content in different cucumber cultivars. *Biol Plant (Praha)* 18:58–62
- CGN Germplasm Search. (2019). Visto el 30 de mayo de 2019. Disponible en <https://cgngenis.wur.nl/>
- Crespo, O., Janssen, D., Robles, C. And Ruiz, L. (2018). Resistance to Cucumber green mottle mosaic virus in *Cucumis sativus*. *Euphytica*, 214(11).
- EPPO Global Database. (2019). Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) [Host plants]. Visto el 5 de mayo de 2019. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/TOLCND/hosts>
- FAOSTAT. 2019. Departamento de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Sitio web visitado el 3 de mayo de 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Figàs, M., Alfaro-Fernández, A., Font, M., Borràs, D., Casanova, C., & Hurtado, M. et al. (2017). Inoculation of cucumber, melon and zucchini varieties with Tomato leaf curl New Delhi virus and evaluation of infection using different detection methods. *Annals Of Applied Biology*, 170(3), 405-414. doi: 10.1111/aab.12344
- Fortes, I. M., Sánchez-Campos, S., Fiallo-Olivé, E., Díaz-Pendón, J. A., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2016). A novel strain of tomato leaf curl New Delhi virus has spread to the mediterranean basin. *Viruses*, 8(11), 307.

Gil-Salas FM, Colyer A, Boonham N, Cuadrado IM, Janssen D (2009) Resistance screening against Cucumber vein yellowing virus using a real-time (Taqman_) RT-PCR assay in cucumber (*Cucumis sativus*). *Crop Prot* 28:109–112

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

Islam, S., Anilabh Das, M., Verma, M., Arya, L., Mandal, B., Tusar Kanti, B., & Sanjay Kumar, L. (2011). Screening of *Luffa cylindrica* Roem. for resistance against Tomato Leaf Curl New Delhi Virus, inheritance of resistance, and identification of SRAP markers linked to the single dominant resistance gene. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(6), 661-667.

Janssen D. Y Ruiz L. 2014. ToLCNDV: un nuevo virus de cucurbitáceas en España transmitido por mosca blanca. *Almería en VERDE*, 116, pp 12-15.

Janssen D., Ruiz L., Simón A. Y García C. 2014. Control en invernadero del virus de Nueva Delhi de la hoja rizada del tomate. *INNOVAGRI, cultivar innovando*. <http://www.innovagri.es/control-biologico/control-en-invernadero-del-virus-de-nueva-delhi.html>

Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M. A., Gosálvez, B., Castillo, P., & Navas-Castillo, J. (2014). First detection of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Spain. *Plant Disease*, 98(6), 857-857.

Kushwaha, N., Singh, A. K., Basu, S., & Chakraborty, S. (2015). Differential response of diverse solanaceous hosts to tomato leaf curl New Delhi virus infection indicates coordinated action of NBS-LRR and RNAi-mediated host defense. *Archives of virology*, 160(6), 1499-1509

Sáez, C., Esteras, C., Martínez, C., Ferriol, M., Dhillon, N. P., López, C., & Picó, B. (2017). Resistance to tomato leaf curl New Delhi virus in melon is controlled by a major QTL located in chromosome 11. *Plant cell reports*, 36(10), 1571-1584.

Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. & Bello, A. (1996). *Patología vegetal. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología*. Phytoma-España, 263-274.

Verlaan et al., 2013

Loebenstein, G. y Katis, N. (2014). Control of plant virus diseases seed-propagated crops. Preface. *Advances in virus research*. Vol 90.

López C., Ferriol M., Picó B., 2015. Mechanical transmission of Tomato leaf curl New Delhi virus to cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in Cucumis melo. *Euphytica*, 204, pp 679-691.

MAPA. 2019. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Producciones agrícolas. (2019). Sitio web visitado el 4 de mayo de 2019. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/>

Mnari-Hattab, M., Zammouri, S., Belkadhi, M. S., Doña, D. B., Ben Nahia, E., & Hajlaoui, M. R. (2015). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucurbits in Tunisia. *New Dis. Rep*, 31(21), 2044-0588.

Monci F., 2004. Búsqueda de estrategias de control frente a los begomovirus que afectan a tomate y judía en España. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes.

Moriones, E., Praveen, S., & Chakraborty, S. (2017). Tomato Leaf Curl New Delhi Virus: An Emerging Virus Complex Threatening Vegetable and Fiber Crops. *Viruses*, 9(10), 264

Nagar, S., Pedersen, T. J., Carrick, K. M., Hanley-Bowdoin, L. & Robertson, D. (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *The Plant Cell*, 7(6), 705-719.

Panno, S., Iacono, G., Davino, M., Marchione, S., Zappardo, V., Bella, P., ... & 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(6), 1-1.

Picó B., Diez, M. J. Y Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop .2. The Tomato yellow leaf curl virus - A review. *Scientia Horticulturae* 67, 151-196.

Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite Begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 291(1), 110-125.

Ruiz, M. L., Simón, A., Velasco, L., García, M. C., & Janssen, D. (2015). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain. *Plant Disease*, 99(6), 894-894.

Saeed, M., Zafar, Y., Randles, J. W., & Rezaian, M. A. (2007). A monopartite begomovirus-associated DNA β satellite substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. *Journal of General Virology*, 88(10), 2881-2889.

Sáez, C., Martínez, C., Ferriol, M., Manzano, S., Velasco, L., Jamilena, M., & Picó, B. (2016). Resistance to Tomato leaf curl New Delhi virus in Cucurbita spp. *Annals of Applied Biology*, 169(1), 91-105.

Sánchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Rowhani, A., & Pallás, V. (1998). Comparative analysis of DNA, nonradiative molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathology*, 47, 780-786. 48)

Sánchez-Navarro, J. A., Cañizares, M. C., Cano, E. A., & Pallás, V. (1999). Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *Journal of virological methods*, 82(2), 167-175.

Sifres, A., Sáez, C., Ferriol, M., Selmani, E. A., Riado, J., Picó, B., & López, C. (2018). First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Zucchini in Morocco. *Plant Disease*, 102(5), 1045-1045.

Silva, J. C. F., Carvalho, T. F., Fontes, E. P., & Cerqueira, F. R. (2017). Fangorn Forest (F2): a machine learning approach to classify genes and genera in the family Geminiviridae. *BMC bioinformatics*, 18(1), 431.

Srivastava, K. M., Hallan, V., Raizada, R. K., Chandra, G., Singh, B. P., & Sane, P. V. (1995). Molecular cloning of Indian tomato leaf curl vims genome following a simple method of concentrating the supercoiled replicative form of viral DNA. *Journal of Virological Methods*, 51(2-3), 297-304.

Valcárcel Germes, J. (2017). Racionalización de la colección de pepino (*Cucumis sativus* L.) Del banco de germoplasma del COMAV Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.

van Treuren, R., Engels, J., Hoekstra, R., & Van Hintum, T. (2009). Optimization of the composition of crop collections for ex situ conservation. *Plant Genetic Resources*, 7(2), 185-193.

Venkataravanappa, V., Lakshminarayana, C. R., Jalali, S., & Krishna, M. R. (2015). Association of tomato leaf curl New Delhi virus DNA-B with bhendi yellow vein mosaic virus in okra showing yellow vein mosaic disease symptoms. *Acta virologica*, 59(2), 125-139.

Zaidi, S. S. E. A., Martin, D. P., Amin, I., Farooq, M., & Mansoor, S. (2017). Tomato leaf curl New Delhi virus: a widespread bipartite begomovirus in the territory of monopartite begomoviruses. *Molecular plant pathology*, 18(7), 901-911

Zerbini, F.M., Briddon, R.W., Idris, A., Martin, D.P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., and ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile:Geminiviridae. *Journal of General Virology*, 98:131–133.

Anexo 1

Tabla 1. *Cycle threshold* (Ct o ciclo umbral) obtenido mediante qPCR de cada planta seleccionada. Se muestran tres repeticiones por cada planta y los valores para el fragmento viral y el gen control. El valor Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial.

Lugar en placa	Código planta	Ct New Delhi		Lugar en placa	Código planta	Ct Actina
A2	CS 18 1	18.73		A2	CS 18 1	27,15
A2	CS 18 1	17.71		H1	CS18 1	26,94
A2	CS 18 1	17.96		A2	CS 18 1	26,96
B2	CS 18 2	22.77		B2	CS 18 2	25,89
B2	CS 18 2	25.05		A5	CS 18 2	25,64
B2	CS 18 2	23.95		B2	CS 18 2	26,1
C2	CS 18 3	9.76		C2	CS 18 3	26,64
C2	CS 18 3	13.89		B5	CS 18 3	26,29
C2	CS 18 3	14.74		C2	CS 18 3	26,63
D2	CS 18 4	11.49		D2	CS 18 4	27,9
D2	CS 18 4	16.75		C5	CS 18 4	27,85
D2	CS 18 4	17.58		D2	CS 18 4	28,05
E2	CS 18 5	26.00		E2	CS 18 5	25,78
E2	CS 18 5	26.17		D5	CS 18 5	25,71
E2	CS 18 5	27.12		E2	CS 18 5	25,63
A3	CS 19 2	27.75		A3	CS 19 2	27,49
A3	CS 19 2	27.49		A3	CS 19 2	27,46
A3	CS 19 2	28.59		E5	CS 19 2	27,56
B3	CS 19 3	17.79		B3	CS 19 3	28,79
B3	CS 19 3	18.64		B3	CS 19 3	28,83
B3	CS 19 3	18.20		F5	CS 19 3	28,75
C3	CS 19 5	16.06		C3	CS 19 5	28,74
C3	CS 19 5	15.62		C3	CS 19 5	29
C3	CS 19 5	15.91		G5	CS 19 5	28,9
D3	CS 20 1	23.87		D3	CS 20 1	25,52
D3	CS 20 1	25.02		D3	CS 20 1	25,62
D3	CS 20 1	23.77		H5	CS 20 1	25,19
E3	CS 20 2	27.61		E3	CS 20 2	26,22
E3	CS 20 2	27.71		A6	CS 20 2	26,06
E3	CS 20 2	28.52		E3	CS 20 2	26,25
A4	CS 20 3	25.63		A4	CS 20 3	25,19
A4	CS 20 3	26.66		A4	CS 20 3	25,17
A4	CS 20 3	26.92		B6	CS 20 3	25,2
B4	CS 20 4	23.65		B4	CS 20 4	27,12
B4	CS 20 4	25.78		B4	CS 20 4	27,36
B4	CS 20 4	25.79		C6	CS 20 4	27,27
C4	CS 20 5	19.57		C4	CS 20 5	25,49
C4	CS 20 5	19.71		C4	CS 20 5	25,46
C4	CS 20 5	19.95		D6	CS 20 5	25,43
D4	CS 22 1	27.14		D4	CS 22 1	26,72
D4	CS 22 1	27.86		D4	CS 22 1	26,56
D4	CS 22 1	28.49		E6	CS 22 1	26,51
E4	CS 22 2	27.12		E4	CS 22 2	27,07
E4	CS 22 2	27.58		E4	CS 22 2	27,09
E4	CS 22 2	27.92		F6	CS 22 2	26,98
F4	CS 22 4	26.75		F4	CS 22 4	28,46
F4	CS 22 4	27.10		F4	CS 22 4	28,22
F4	CS 22 4	27.33		G6	CS 22 4	28,18

G2	CS 23 1	23.02		G2	CS 23 1	25,96
G2	CS 23 1	24.28		G2	CS 23 1	25,91
G2	CS 23 1	24.12		B2	23-1	25,94
G3	CS 23 2	26.95		C2	CS23-2	29,19
G3	CS 23 2	26.97		D3	CS23-2	29,22
G3	CS 23 2	27.30		G3	CS 23 2	29,04
G4	CS 23 3	26.92		G4	CS 23 3	26,08
G4	CS 23 3	26.72		G4	CS 23 3	26,07
G4	CS 23 3	27.27		E3	23-3	26,15

F2	2457 1	13.29		F2	2457 1	26,1
F2	2457 1	13.75		F2	2457 1	26,13
F2	2457 1	13.07		F2	2457-1	27,11
F3	2457 3	13.42		F3	2457 3	27,12
F3	2457 3	14.99		F3	2457 3	27,05
F3	2457 3	13.52		G2	2457-3	27,46

H2	60 4	15.24		F3	60-4	26,98
H2	60 4	13.99		H2	60 4	26,5
H2	60 4	14.05		H2	60-4	26,45
H3	F4 1	10.86		H3	F4 1	26,54
H3	F4 1	11.75		H3	F4 1	26,37
H3	F4 1	11.53		E2	F4-1	26,83
H4	CAC 22 5	9.84		H4	CAC 22 5	27,85
H4	CAC 22 5	13.56		H4	CAC 22 5	28,01
H4	CAC 22 5	12.86		C3	CAC22-5	28,12