



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Caracterización de la resistencia al virus de Nueva Delhi
(Tomato leaf curl New Delhi Virus, ToLCNDV) derivada de
la entrada PI 414723 de melón

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Martínez Ortega, Eva

Tutor/a: Pérez de Castro, Ana María

Cotutor/a: Picó Sirvent, María Belén

Director/a Experimental: PEREZ MORO, CLARA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad
Valenciana

*Caracterización de la resistencia al virus de
Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi Virus,
ToLCNDV) derivada de la entrada PI 414723 de
melón*

Trabajo Fin de Máster

Realizado por:

Eva Martínez Ortega

Directores:

Ana María Pérez de Castro

María Belén Picó Sirvent

Directora experimental:

Clara Pérez Moro

Valencia, Julio 2022

Resumen

El melón (*Cucumis melo*) pertenece a la familia de las Cucurbitáceas y tiene una gran importancia económica a nivel mundial. España es la novena potencia en cuanto a producción y exportaciones de melón. Aun así, anualmente se producen pérdidas provocadas por estreses abióticos y bióticos y esto conlleva la reducción de la producción y rendimiento. Entre los principales factores que amenazan su cultivo y producción a nivel mundial destacan las enfermedades causadas por virus. El virus de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi Virus, ToLCNDV*) afecta a la familia tanto de las Solanáceas como las Cucurbitáceas y entre esta última al melón. Entre las estrategias más efectivas de control de la enfermedad se encuentra la identificación e introgresión de genes de resistencia. La accesión de melón PI 414723, procedente de la India, presenta resistencia a ToLCNDV entre otros patógenos. En este trabajo (enmarcado en los proyectos de investigación PID2020-116055RB-C21 y PROMETEO/2021/072) se fenotiparon por resistencia a ToLCNDV generaciones segregantes desarrolladas a partir del cruce entre PI 414723 y un parental susceptible del tipo 'Piel de Sapo' (11PS) y otro tipo blanco (26BL). Tras inocular mecánicamente el virus, el seguimiento de la enfermedad se llevó a cabo mediante la evaluación visual de síntomas y *tissue printing* seguido de hibridación molecular para determinar la presencia de DNA viral. La cuantificación de la carga viral se realizó mediante PCR cuantitativa. Además, las plantas se genotiparon empelando un marcador descrito como ligado a la resistencia a ToLCNDV derivada de otras fuentes. Los resultados obtenidos en cuanto a la segregación de las generaciones parecían indicar que el control de la resistencia es poligénico. El marcador 13bis previamente identificado asociado a la resistencia en WM-7, parece estar asociado a la resistencia frente a ToLCNDV derivada de la accesión PI414723. El hecho de que la entrada PI414723 presente resistencia frente a distintas enfermedades víricas (CABYV, WMV, ZYMV y PRSV) y a oídio, junto con ToLCNDV, hace que su utilización en programas de mejora sea de gran interés, ya que facilitará la obtención de variedades de melón con resistencia a los distintos patógenos.

Palabras clave: *Cucumis melo*; introgresión; MAS; mejora; geminivirus

Abstract

Melon (*Cucumis melo*) belongs to the *Cucurbitaceae* family and is of great economic importance worldwide. Spain is the ninth- largest producer and exporter of melons. Even so, there are annual losses caused by abiotic and biotic stresses and this leads to a reduction in production and yield. Among the main factors threatening melon cultivation and production worldwide are virus diseases. The *Tomato leaf curl New Delhi Virus* (ToLCNDV) affects both the *Solanaceae* and *Cucurbitaceae* families, including melons. Among the most effective disease control strategies is the identification and introgression of resistance genes. Melon accession PI 414723 from India shows resistance to ToLCNDV among other pathogens. In this work (within the framework of research projects PID2020-116055RB-C21 and PROMETEO/2021/072), segregating generations developed from the cross between PI 414723 and a susceptible parental of the 'Piel de Sapo' type (11PS) and another white type (26BL) were phenotyped for resistance to ToLCNDV. After mechanical inoculation of the virus, monitoring of the disease was carried out by visual assessment of symptoms and tissue printing followed by molecular hybridization to determine the presence of viral DNA. Quantification of viral load was performed by quantitative PCR. In addition, plants were genotyped using a marker described as linked to ToLCNDV resistance derived from other sources. The results obtained in terms of segregation of generations seemed to indicate that the control of resistance is polygenic. The 13bis marker previously identified as being associated with resistance in WM-7 appears to be associated with resistance to ToLCNDV derived from accession PI414723. The fact that the PI414723 accession shows resistance to different virus diseases (CABYV, WMV, ZYMV y PRSV) and powdery mildew, together with ToLCNDV, makes its use in breeding programs of great interest, as it will facilitate the breeding of melon varieties with resistance to the different pathogens.

Key words: *Cucumis melo*; introgression; MAS; breeding; geminivirus.

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, gracias, Ana por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en tu equipo. Por toda la ayuda y la paciencia lo largo de este proyecto.

A ti, Clara, te quiero agradecer la infinita paciencia que has tenido durante todo este tiempo. Por haberme ayudado en todo lo que has podido en todo momento.

Gracias Fran por ser un gran compañero de laboratorio, mis días se han llenado de risas, nos hemos ayudado y aconsejado en todo lo que hemos podido y sin ti esta experiencia hubiese sido muy diferente.

A mis amigos Carmen Mari y Ricardo, esta experiencia me ha hecho teneros en mi vida y espero que consigáis todo lo que deseáis en el futuro.

Por último, a mi familia porque gracias a su apoyo me ha permitido estar donde estoy hoy. Por vuestros consejos y el esfuerzo que habéis hecho siempre para que no hubiese ningún impedimento que no nos permitiera conseguir nuestras metas.

Muchas gracias.

Índice general

Resumen	i
Abstract	ii
Índice general	iv
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vi
1. Introducción	1
1.1 Origen y domesticación del melón (<i>Cucumis melo</i> L)	1
1.2 Importancia económica	1
1.3 <i>Tomato Leaf Curl New Delhi Virus</i> (ToLCNDV)	3
1.3.1 Origen, diversidad geográfica y gama de hospedadores	3
1.3.2 Taxonomía y descripción del virus	4
1.3.3 Transmisión	5
1.3.4 Especies hospedantes y sintomatología	6
1.4 Diagnóstico del virus	8
1.4.1 Detección por ELISA (<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	8
1.4.2 Hibridación molecular	8
1.4.3 Detección de ácidos nucleicos por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	8
1.4.4 Diagnóstico por evaluación visual de síntomas	8
1.5 Estrategias de control de ToLCNDV	9
1.6 Mejora genética para la resistencia a ToLCNDV	9
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	12
3.1.1 Desinfección y germinación de las semillas	12
3.1.2 Condiciones de cultivo	13
3.2 Método de inoculación mecánica	13
3.2.1 Fuente de inóculo	13
3.2.2 Inoculación mecánica del material vegetal	13
3.3 Seguimiento de la enfermedad	14
3.3.1 Evaluación visual de los síntomas	14
3.3.2 Detección mediante <i>tissue printing</i> e hibridación molecular	14
3.4 Extracción de DNA mediante el método CTAB	15
3.5 Cuantificación del DNA y ajuste de concentración	16
3.6 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	16
3.7 Genotipado mediante <i>High-Resolution Melting</i> (HRM)	16
3.8 Análisis estadístico	17
4. Resultados	18
4.1 Respuesta de las poblaciones segregantes a la inoculación mecánica	18
4.1.1 Fenotipado visual por síntomas	18
4.1.2 Análisis de la presencia del virus mediante <i>tissue printing</i> e hibridación molecular	19
4.1.3 Segregación de la resistencia	20
4.1.4 Estudio de la acumulación de la carga viral mediante PCR cuantitativa	22
4.2 Genotipado de las generaciones derivadas del cruce PI 414327 x 11PS	23
5. Discusión	25
6. Conclusiones	28
7. Bibliografía	29
Anexos	33

Índice de figuras

Figura 1. Producción y área cosechada en el mundo en la última década (2010-2020) (FAOSTAT, 2022).

Figura 2.A) Producción de melón (millones de toneladas) en los 5 continentes en el año 2021. **B)** Área cosechada (miles de hectáreas) de melón en los 5 continentes en 2021 (FAOSTAT, 2022)

Figura 3. Distribución de la producción en España (miles de toneladas) por comunidades autónomas (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2022))

Figura 4. Distribución del virus ToLCNDV a nivel mundial. En azul los países donde apareció antes del 2012. En amarillo aparición del virus a partir del 2012 en la cuenca mediterránea (EPPO, 2022).

Figura 5. Organización de los ADNs A y B que forman el genoma de ToLCNDV (Zerbini et al., 2017).

Figura 6. Bemisia tabaci (estado adulto. En hojas A) tomate y B) calabacín (Janssen et al., 2022).

Figura 7. A) Mosaico amarillo producido por ToLCNDV. B) Acucharamiento de la hoja.

Figura 8. Representación de los cruces realizados para la obtención de las poblaciones segregantes que se van a analizar (F_2 , BC_{11PS}).

Figura 9. Plantas de calabacín de cada uno de los inóculos utilizados (control positivo), a los 30 días después de la inoculación (dpi).

Figura 10. Hojas que representan los diferentes niveles de gravedad según la escala de sintomatología, siendo 0 ausencia de síntomas, 1 síntomas leves, 2 síntomas moderados, 3 síntomas severos y 4 síntomas muy graves o planta muerta (López et al. 2015).

Figura 11. Representación de los diferentes niveles de intensidad de carga viral que se obtuvieron en la membrana de hibridación por tissue printing en la población BC_{11PS} .

Figura 12 Plantas según su puntuación en la evaluación visual de los síntomas (ver apartado 3.3.1 para descripción de la escala) en las distintas fechas de muestreo (días post inoculación, dpi). A, B, C) Planta de la generación F_2 a 15, 21 y 30 dpi, respectivamente. D, E, F) Planta de la generación BC a 15, 21 y 30 dpi, respectivamente.

Figura 13. Autorradiografía de la exposición de membranas hibridadas con sondas marcadas con digoxigenina para detección de ToLCNDV (ver apartado 3.3.1 para la descripción de las puntuaciones asignadas) en distintas fechas de muestreo (días post inoculación, dpi). A) Población F_2 a los 9 dpi. B) Población BC_{11PS} a los 30 dpi (en azul se señalan individuos con un nivel de carga viral de 3). C) Población F_2 a 30 dpi (se indican individuos valorados con cada una de las puntuaciones: 0 (amarillo), 1 (naranja), 2 (rojo), 3 (verde) y 4 (azul).

Figura 14. Promedio de la acumulación de ToLCNDV (calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) en plantas según la presencia de síntomas a 30 dpi tras la inoculación mecánica, en las poblaciones F_2 y BC_{11PS} .

Figura 15. Representación del porcentaje de individuos de la población F_2 con ausencia o presencia de síntomas según su genotipo para el marcador 13bis. Presencia de síntomas (síntomas de 0 y 1), ausencia de síntomas (síntomas ≥ 2).

Índice de tablas

Tabla 1. Número de plantas según su puntuación en la evaluación visual de los síntomas (ver apartado 3.3.1 para descripción de la escala) en las distintas fechas de muestreo (días post inoculación, dpi).

Tabla 2. Número de plantas según su puntuación en la evaluación de carga viral por tissue printing e hibridación molecular (ver apartado 3.3.2 para descripción puntuación) a 30 días post inoculación, dpi..

Tabla 3. Número de plantas resistentes y susceptibles en las generaciones estudiadas (ver texto para la descripción del criterio empleado. Comprobación estadística del ajuste de los datos a un modelo de control monogénico recesivo o monogénico dominante mediante el test χ^2 con un valor de probabilidad de 0,05.

Tabla 4. Número de plantas resistentes y susceptibles en cada población segregante (PI_{414723x26BL}) según la presencia de síntomas de ToLCNDV. La probabilidad del valor χ^2 se calculó para la proporción esperada de un gen dominante que controla la resistencia.

Tabla 5. Promedio (\pm error estándar) de la acumulación de ToLCNDV detectada mediante PCR cuantitativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) en las plantas resistentes y susceptibles de las generaciones F₂ PI_{414723x11PS} y BC_{11PS}.

1. Introducción

1.1 Origen y domesticación del melón (*Cucumis melo* L)

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie diploide con $2n=2x=24$ cromosomas, que pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, la cual incluye casi 200 géneros y alrededor de 800 especies (Renner et al., 2007). Dentro del género *Cucumis*, se incluye también otro cultivo importante, el pepino (*Cucumis sativus* L.) (Pitrat, 2008).

Existen diversas teorías sobre el origen y domesticación del melón. Durante mucho tiempo se pensó que la forma silvestre del melón procedía de África, ya que algunos grupos de cucúrbitas ancestrales se dispersaron por este continente. Además, el ancestro silvestre se distribuyó por Oriente Medio y la India, siendo estos centros de domesticación (Kistler et al., 2014). La identificación de ancestros silvestres en Asia, África y Australia, determinaron que pudieron producirse varios eventos de domesticación independientes (Pitrat, 2008; Endl et al., 2018). Endl et al. (2018) describieron la existencia de tres linajes de melón silvestre con diferencias genéticas entre sí, uno de origen asiático, otro australiano y otro africano. Los cultivados o modernos derivan de dos linajes, el asiático (*ssp. melo f. agrestis*) y el africano (*ssp. meloides*). Aunque se han identificado posibles lugares arqueológicos donde se domesticó esta especie, no se conoce con exactitud cuando se inició la domesticación, debido a la dificultad de encontrar registros arqueológicos en un buen estado de conservación y de identificar la antigüedad entre diferentes tipos. Existen registros que sugieren que la domesticación surgió en África hace al menos 5000-6000 años, quizá antes que en Asia (Endl et al., 2018). También hay registros del cultivo de melones hace 3000 años en China en los que se describen como pertenecientes al tipo *Conomon* (Pitrat et al., 2000). Los melones que conocemos con forma redondeada y sabor dulce se describieron por primera vez en la primera mitad del siglo XIV en Asia (Pitrat, 2003), se expandieron mediante rutas comerciales hacia Europa del este, los Balcanes e Italia, donde tuvieron muy buena aceptación (Szabó et al., 2005). Se cree que los melones de tipo *Ameri*, cuyo origen es Oriente Próximo y Asia Central, serían los ancestros de las variedades dulces modernas como los de tipo *Inodorus*, como sería 'Piel de Sapo', y *Cantalupensis*, como 'Charentais' (Ríos, 2015).

1.2 Importancia económica

La familia *Cucurbitaceae* es la segunda más importante a nivel económico después de la familia *Solanaceae*. El melón es muy importante dentro de las cucurbitáceas por su alto valor económico y por ser una especie modelo (García-Mas et al., 2012).

La producción mundial de melón se ha ido incrementando regularmente pasando de 8,8 a 13,5, para terminar en 19,8 millones de toneladas en 1980, 1990 y 2000, respectivamente, (Pitrat, 2008). En la última década, desde 2010 hasta 2020, se ha incrementado la producción, pasando de 26 a 28,47 millones de toneladas, mientras que el área de cosecha se ha visto disminuida en 58.054 hectáreas en estos 10 años (Figura 1) (FAOSTAT, 2022). Asia es el principal productor a nivel mundial (Figura 2).

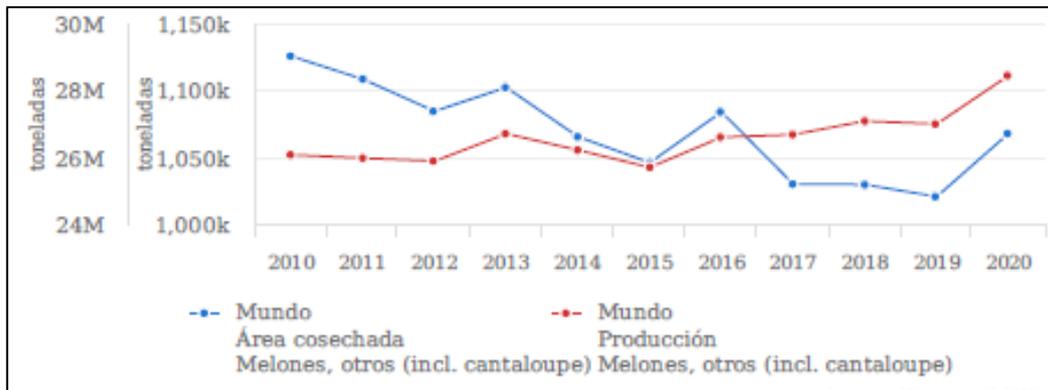


Figura 1. Producción y área cosechada en el mundo en la última década (2010-2020) (FAOSTAT, 2022).

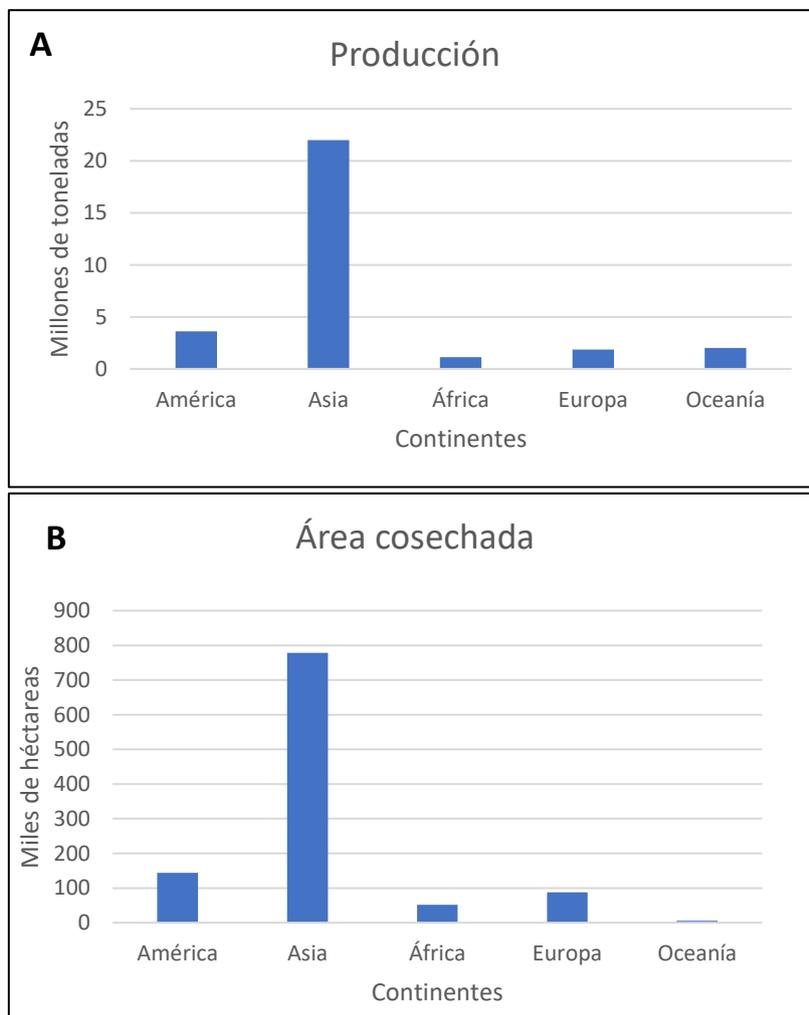


Figura 2.A) Producción de melón (millones de toneladas) en los 5 continentes en el año 2021. B) Área cosechada (miles de hectáreas) de melón en los 5 continentes en 2021 (FAOSTAT, 2022).

El melón se sitúa el noveno en cuanto a los cultivos más importantes por producción total a nivel mundial, siendo China el país que encabeza la lista seguido por países de Oriente medio como Turquía e Irán. España se sitúa nivel mundial el octavo con mayor producción, siendo el primer país a nivel europeo, con 660.178 toneladas en 2019 (FAOSTAT, 2022).

La mayor parte de la producción de melón en España se exporta a países europeos, siendo los principales destinos Francia, Alemania y Reino Unido, con 122,97; 98,98 y 45,97 toneladas en el año 2021, respectivamente. Por tanto, España no es el principal productor de melón a nivel mundial, pero si uno de los principales exportadores. Las principales comunidades autónomas productoras son Castilla la Mancha, la región de Murcia y Andalucía (MAPA, 2022) (Figura 3).

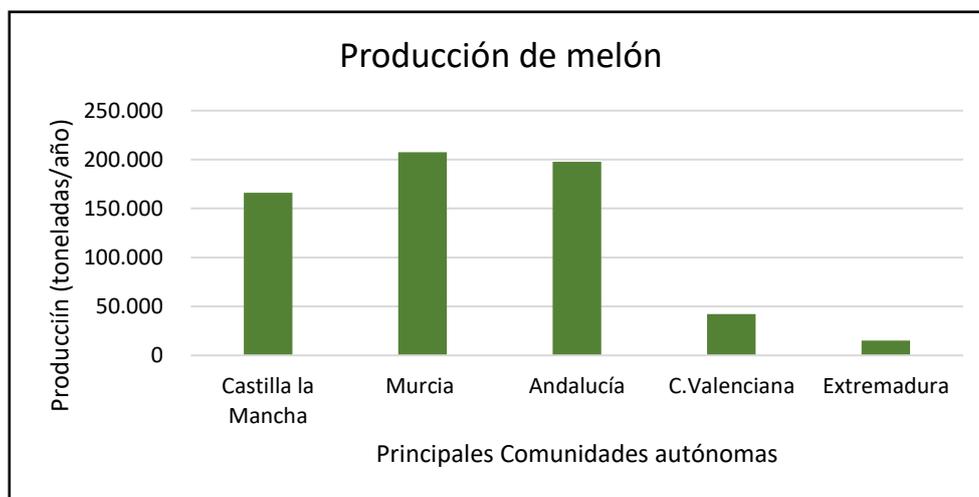


Figura 3. Distribución de la producción en España (miles de toneladas) por comunidades autónomas (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2022)).

1.3 Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV)

La producción tanto de melón como de otros cultivos se ve afectada por factores bióticos o abióticos. Entre los factores que conllevan grandes pérdidas destacan las enfermedades virales, uno de los virus que actualmente supone una amenaza a la gran mayoría de los cultivos de cucurbitáceas tanto en España como a nivel mundial es el virus de la hoja rizada del tomate del Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV). Su primera detección fue en Solanáceas, pero actualmente supone una amenaza para calabacín, melón y pepino (Juárez et al., 2013).

1.3.1 Origen, diversidad geográfica y gama de hospedadores

El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV) se describió por primera vez en 1995 en la India, donde principalmente afectaba al tomate. Rápidamente se extendió por otras regiones del sur y suroeste de Asia como Pakistán, Bangladesh, Tailandia, Indonesia y Oriente medio (Figura 4) (Srivastava et al., 1995; Moriones et al., 2017; Sáez et al., 2021).

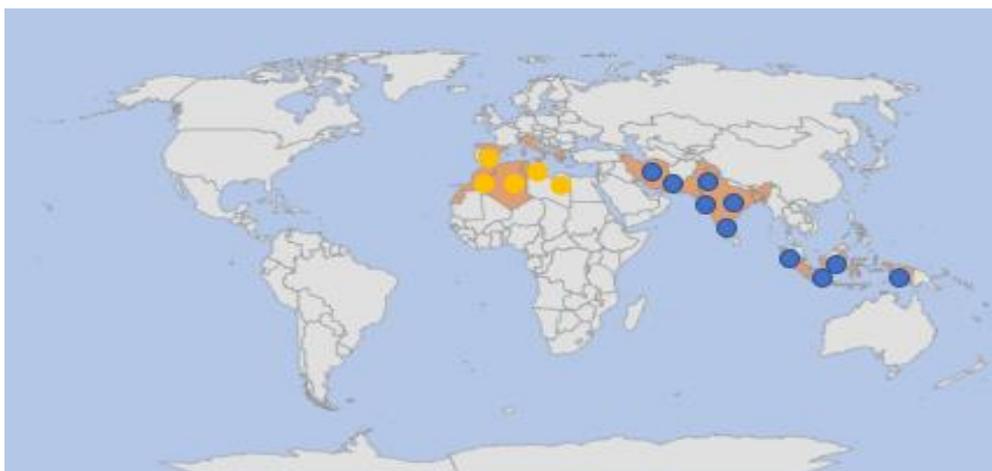


Figura 4. Distribución del virus ToLCNDV a nivel mundial. En azul los países donde apareció antes del 2012. En amarillo aparición del virus a partir del 2012 en la cuenca mediterránea (EPPO, 2022).

En la India, el virus ToLCNDV afectaba principalmente a Solanáceas, pero en los años posteriores a su identificación se registraron una gran variedad de gama de hospedadores, entre ellos una gran variedad de cucurbitáceas. Entre los cultivos más afectados están el calabacín (*Cucurbita pepo*), calabaza (*Cucurbita moschata*), pepino, melón, sandía (*Citrullus lanatus*) y chayote (*Sechium edule*).

Estuvo confinado en Asia hasta el año 2012 (Figura 4), en el que apareció por primera vez en la zona del Mediterráneo concretamente en España, donde se observaron los primeros síntomas en calabacín en Murcia. En 2013 se detectó en Almería y a finales de año estaba muy extendido por ambas zonas. En el año 2013 se extendió tanto que ya no solo afectaba a cultivos de calabacín, sino que también estaba presente en melón, pepino y también en cultivos bajo invernadero de tomate, produciendo grandes pérdidas.

El virus se fue expandiendo, en 2015 se detectó por primera vez en Túnez, afectando a los cultivos de melón, pepino y calabacín bajo túneles de plástico. Al año estaba presente en Italia y en los años sucesivos se identificó en Marruecos, Argelia o Grecia (Sifres et al., 2018; Orfanidou et al., 2019; Kheireddine et al., 2019). Recientemente el virus se ha encontrado en plantas de pepino en Portugal y Estonia, además de en especies de la familia Solanáceas en Italia, siendo esto indicativo de la rápida dispersión de ToLCNDV (Mnari-Hattab et al., 2015; Panno et al., 2016; Sifres et al., 2018; Sáez et al., 2021).

1.3.2 Taxonomía y descripción del virus

El virus ToLCNDV es miembro de la familia *Geminiviridae*, que se caracterizan por la presencia de partículas gemelas cuasi-icosaedricas. Pertenece al género *Begomovirus*, el género de geminivirus con mayor impacto económico,

ToLCNDV es un geminivirus bipartito, es decir, contiene dos moléculas de DNA de cadena sencilla que serían el DNA-A y DNA-B (Figura 5). Ambos tienen un tamaño entre 2,5 y 2,7kb y se encuentran en dos cápsides idénticas entre sí o gemelas. El DNA-A tiene

la capacidad de replicarse de forma autónoma, ya que codifica una proteína de replicación (AC1), además de una proteína activadora de la transcripción (AC2), una proteína potenciadora de la replicación (AC3) y la proteína de cubierta (AV1). Por otro lado, en el DNA-B se encuentran los genes BV1 y BC1, que codifican la proteína asociada al movimiento intracelular y al transporte intercelular, respectivamente (Zaidi et al., 2017).



Figura 5. Organización de los ADNs A y B que forman el genoma de ToLCNDV (Zerbini et al., 2017).

Se ha demostrado que algunos aislados tienen asociados DNAs satélites o betasatelites que dependen de los DNAs A y B para su replicación y contienen una secuencia conservada. Los betasatelites tiene propiedades importantes relacionadas con el desarrollo de síntomas, acumulación de DNA viral y extendiendo la gama de hospedadores (Juárez et al., 2014).

Hasta el momento, los estudios realizados sobre la secuencia del genoma de los aislados españoles de ToLCNDV evidencian que se trata de una nueva cepa, distinta a la que se identificó en los países asiáticos. Se le ha denominado ToLCNDV-ES y se cree que todos los aislados de la cuenca mediterránea pertenecen a esta cepa que tiene mayor preferencia por huéspedes de la familia *Cucurbitaceae* (Otazo y Espino de Paz, 2018).

1.3.3 Transmisión

Como la gran mayoría de los begomovirus, el virus ToLCNDV es transmitido por la mosca blanca del tabaco (*Bemisia tabaci*) (Figura 6). Se encuentra en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, donde es una amenaza para cultivos de gran importancia económica. A parte de producir daños en la planta debido a que se alimenta de ella, actúa como vector de más de 120 virus de plantas, como es el caso del virus del rizado de las hojas del tomate de Nueva Delhi (Janssen et al., 2017).

Se han descrito 24 especies con características que las diferencian biológicamente. Entre ellas están las formas que transmiten el virus en Asia: Asia1, Asia II 5, Asia II 7 y MEAM1. Las especies invasoras MEAM1 y MED son las responsables de la transmisión en Europa (Janssen et al., 2017).

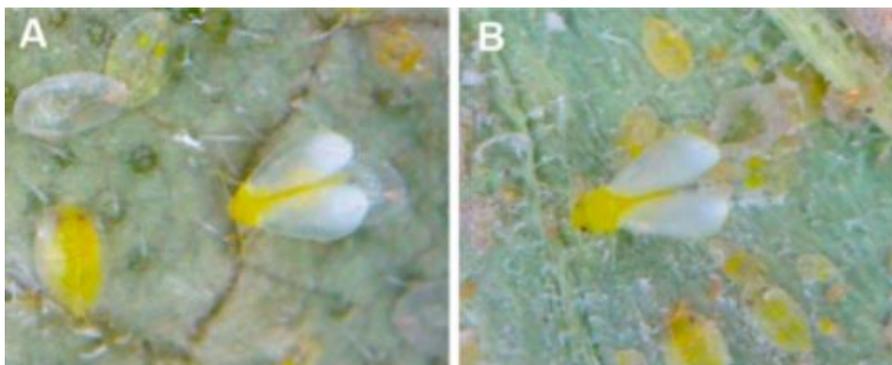


Figura 6. *Bemisia tabaci* (estado adulto. En hojas A) tomate y B) calabacín (Janssen et al., 2022).

Se considera que los virus que pertenecen a las especies miembros del género *Begomovirus* se transmiten de forma no propagativa, persistente y circulativa en *Bemisia tabaci*. ToLCNDV es circulativo y persistente, es decir, una vez que la mosca tanto en estado de larva como adulto se alimenta del floema y adquiere el virus, este atraviesa el intestino del insecto y llega a las glándulas salivales, pasando entonces la mosca a ser virulenta. Cada vez que se alimenta de una planta sana va a inyectar los viriones presentes en su saliva. El virus puede detectarse durante toda la vida de la mosca blanca, ya que la persistencia en el *B. tabaci* es de 20 días, coincidiendo con la duración de un adulto de *B. tabaci*. La eficiencia de transmisión es muy alta, habiéndose encontrado ratios del 95% de infección con una mosca por planta (Janssen et al., 2014; Janssen et al., 2017; Janssen et al., 2022).

Algunas malas hierbas, tales como *Malva sylvestris* o *Taraxacum officinale*, pueden actuar como reservorio de virus hasta la siguiente plantación (Otazo y Espino de Paz, 2018).

Aunque la manera habitual de transmisión es mediante mosca blanca, se ha conseguido inocular de manera mecánica el aislado ToLCNDV-ES en cultivos como melón, calabacín o pepino, lo cual permite realizar cribados para la identificación de fuentes de resistencia (López et al., 2015). Se ha identificado transmisión del virus en calabacín mediante semilla; es la primera identificación de transmisión vertical por semilla hasta el momento (Kil et al., 2020). En estudios posteriores en melón donde se ha querido estudiar la transmisión vertical mediante semilla, han llegado a la conclusión de que no existen evidencias de dicha transmisión vertical, ya que las progenies que obtuvieron se presentaron libres de virus (Fortes et al., 2022).

1.3.4 Especies hospedantes y sintomatología

Actualmente ToLCNDV es capaz de infectar un total de 43 especies pertenecientes a las familias: *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae* y *Malvaceae*. Es el único begomovirus bipartito que puede infectar a plantas de distintas familias (Moriones et al., 2017). Cuando apareció en la India solo afectaba a tomate (*Solanum lycopersicum*), patata (*Solanum tuberosum*), pimiento (*Capsicum annum*) y berenjena (*Solanum melon-*

gena). Conforme pasaban los años su rango de hospedantes se ampliaba, viéndose afectada la familia de las cucurbitáceas, produciendo grandes pérdidas económicas (Ruiz et al., 2016). El aislado español ToLCNDV-ES, se cree que debido a su adaptación a nuevos huéspedes y a las condiciones climáticas hizo que afectará principalmente a cucurbitáceas (Simón et al., 2018).

En cuanto a los síntomas que se presentan en melón, se pueden dividir en primarios y secundarios. Los primarios son aquellos que se identifican inicialmente en la planta y resultan de las inoculaciones. Los secundarios se presentan en el resto de la planta. Los síntomas primarios que produce ToLCNDV son punteado en las hojas, debido a que la mosca se ha alimentado de la planta, y un enroscamiento y ligero abullonado de las hojas. Los síntomas sistémicos o secundarios se encontrarían en el resto de las zonas de la planta, excluyendo donde se ha producido la inoculación, estos serían (Figás et al., 2017):

- Mosaicos, amarilleo foliares y apicales.
- Clorosis internervial, se produce una decoloración de los nervios, es más frecuente al principio de la infección.
- Enanismo, la infección por el virus limita su crecimiento.
- Rizado foliar, debido a la infección las hojas presentan deformaciones hacia el haz y el envés, lo que conlleva la presencia de acucharamiento en las hojas.
- Falta de vigor, el virus es capaz de reducir el rendimiento, delimitarlo e incluso pararlo.
- Filimorfismo apical, se reducen los folíolos y, por tanto, esto conlleva la reducción del área fotosintética.
- Reducción de la superficie foliar
- Abullonado

Los síntomas que se describen son amarilleo internerviales y marginales, acucharamiento en los brotes jóvenes con el borde amarillento, pero en general las hojas se enrollan hacia el envés (Figura 7) (Otazo y Espino de Paz, 2018).

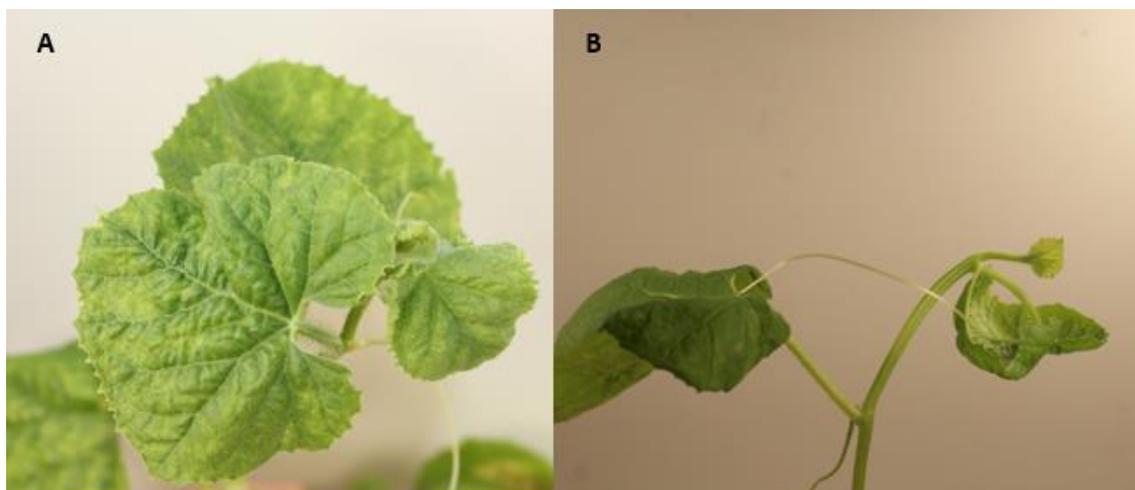


Figura 7. A) Mosaico amarillo producido por ToLCNDV. B) Acucharamiento de la hoja.

La presencia de síntomas en la planta no solo se ve afectada por el virus, sino que también influye el ambiente, y el hospedante. En España los mayores daños en cuanto a la producción se han obtenido en calabacín y a continuación en pepino, melón y calabaza (Otazo y Espino de Paz, 2018).

1.4 Diagnóstico del virus

1.4.1 Detección por ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

Esta es una técnica serológica basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Se trata de inmovilizar un anticuerpo ligado a una enzima que cuando entra en contacto con el antígeno inmovilizado (proteína codificada por el virus, como sería la proteína de la cápsida viral), la enzima es capaz de producir un producto que vira y produce un color determinado. Esta técnica es sencilla, se puede estudiar un gran número de muestras, es económica y rápida. Sin embargo, como indica el estudio de Figas et al. (2016) los anticuerpos empleados para identificar ToLCNDV pueden producir una respuesta cruzada con otros begomovirus.

1.4.2 Hibridación molecular

Las técnicas de hibridación molecular se basan en el apareamiento entre las cadenas de ácidos nucleicos. Permite detectar una cadena sencilla de DNA o RNA mediante una sonda (es un fragmento de ácido nucleicos marcado de forma radioactiva o con un fluoróforo o enzima que de reacciones colorimétricas o quimiluminiscencia). Para que se de este apareamiento los ácidos nucleicos se unen a una membrana de nylon que está cargada positiva y posteriormente se hibrida empleando una sonda. Dentro de la hibridación molecular se puede diferenciar en dot blot, en el cual se extraen los ácidos nucleicos para colocarlos en la membrana, y el *tissue printing*, en el cual se utiliza tejido crudo vegetal (Chia et al., 2017).

1.4.3 Detección de ácidos nucleicos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la amplificación del DNA del virus mediante una polimerasa de DNA, se llevan a cabo ciclos cortos de desnaturalización y renaturalización. Es necesario utilizar cebadores específicos a la secuencia que se quiere amplificar. Para visualizar los resultados de la amplificación se puede hacer mediante geles de agarosa o, en el caso de que sea una qPCR, se obtienen a tiempo real.

Para el virus ToLCNDV es una metodología muy utilizada para conocer la presencia del virus o la carga viral en la muestra. Además, permite realizar estudios de diversidad o caracterización genómica de nuevos aislados. Los principales inconvenientes son los falsos positivos y negativos, que se pueden obtener por: contaminación de muestra, uniones inespecíficas de los cebadores y por inhibidores presentes de la DNA polimerasa (Llacér et al., 2011).

1.4.4 Diagnóstico por evaluación visual de síntomas

En el seguimiento visual de síntomas se evalúan aquellos que indicarían que la planta puede estar infectada con el virus, entre los que se encuentran el rizado, filmorfismo

apical y mosaico amarillo, acucharamiento de las hojas hacia el envés, acortamiento de entrenudos y reducción del tamaño de la planta o parado por completo de su desarrollo. Es una técnica sencilla y rápida, pero pueden producirse confusiones al tomar síntomas que pueden ser debidos a otros patógenos o a problemas nutricionales (López et al., 2015).

1.5 Estrategias de control de ToLCNDV

Existen tres elementos que intervienen en la infección viral: el virus, el vector y la planta hospedante, además de sus interacciones. Las medidas de control se adoptan según los siguientes pasos: disminuir la cantidad de inóculo mediante la eliminación de las plantas infectadas, el control de la transmisión mediante el control del vector utilizando métodos físicos, químicos o biológicos y algunas prácticas culturales y el desarrollo de variedades tolerante o resistentes.

Por tanto, para disminuir la cantidad de inóculo se deben eliminar restos de cultivos anteriores y hierbas que pueden actuar como reservorio para el vector. Además, es importante incorporar plantas procedentes de semilleros que estén libres de *Bemisia tabaci* (Otazo y Espino de Paz, 2018).

En cuanto al control de la transmisión del vector, el problema del control químico reside en la utilización de productos químicos puede conllevar el desarrollo de vectores con resistencia a ellos. Por otro lado, el control biológico es una buena alternativa; ya que se basa en la utilización de enemigos naturales como el ácaro *Amblyseius swirskii* (Otazo y Espino de Paz, 2018). Las barreras físicas, como trampas cromotropicas o redes de malla, pueden reducir la presencia de *B.tabaci* en el cultivo.

En cultivos al aire libre las estrategias tienen que utilizarse de forma generalizada en las áreas productoras, ya que sino la eficacia se reduce. En todo caso, la mejor herramienta para el control del virus ToLCNDV es la obtención de variedades resistentes, ya sea mediante la introgresión de resistencias naturales o la utilización de ingeniería genética. Esta última presenta varias trabas legales y sociales, por tanto, el método ahorraría costes en medidas de control y sería el más viable hoy en día es el desarrollo de cultivares resistentes. Una estrategia factible podría ser la piramidalización de genes de resistencia, pero para ello lo primero es identificar material resistente y que tipo de resistencia presenta (Zaidi et al., 2017).

1.6 Mejora genética para la resistencia a ToLCNDV

Como se ha nombrado antes la principal forma de combatir la enfermedad causada por ToLCNDV, y en general para las enfermedades causadas por virus, es la obtención de variedades resistentes. Para ello es necesario identificar fuentes de resistencia o tolerancia frente al virus. Una vez identificada, el próximo objetivo es caracterizarla e introgresarla en una variedad de élite susceptible a la enfermedad. Como el virus se identificó antes en solanáceas, en esta familia hay más información en cuanto a fuentes de resistencia. En cuanto a la familia de las cucurbitáceas, la primera fuente de resistencia que se identificó fue en *Luffa cylindrica* (Saéz et al., 2017).

En melón se han identificado cinco accesiones, tres pertenecientes a la subespecie *agrestis* variedad *momordica* (PI 414723, PI 124112, Kharbuja) y dos a la subespecie *agrestis* (WM-9, WM-7) (López et al., 2015).

Se ha caracterizado la resistencia derivada de WM-7, identificándose un QTL con efecto mayor en el cromosoma 11 del melón (Sáez et al., 2017). En el estudio de Romay et al. (2019) se identificó en melón una accesión (IC-274014) con una alta resistencia a ToLCNDV y también frente al virus *Melon chlorotic Mosaic virus* (MeCMV), por tanto, presenta una gran oportunidad de introducir ambas resistencias en cultivares.

La accesión PI 414723 perteneciente a subespecie *agrestis* variedad *momordica* y cuyo origen se establece en la India, se ha utilizado en diversos estudios para la identificación de resistencias frente a distintos patógenos. En el trabajo de Gilbert et al. (1994) se identificaba la resistencia frente a *Watermelon Mosaic Virus* (WMV), donde se caracterizó como una resistencia monogénica y dominante. Esta accesión también presenta resistencia frente a *Zucchini yellow Mosaic virus* (ZYMV), con una resistencia monogénica dominante (*Zym*) o oligogénica con tres genes dominantes complementarios: *Zym-1*, *Zym-2*, *Zym-3* (Pitrat y Lecoq, 1984; Danin-Poleg et al., 1997). Contiene también resistencia frente a *Papaya ringspot virus* (PRSV) y *Cucurbit aphid-borne yellow virus* (CABYV) (Pitrat y Lecoq, 1984; Dogimont et al., 1996).

En este trabajo se pretende caracterizar la resistencia a ToLCNDV derivada de PI 414723.

2. Objetivos

En trabajos previos realizados en el COMAV, se hizo un cribado de colección de germoplasma de *Cucumis melo L.*, en el que se identificaron distintas fuentes de resistencia frente al *virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)*. Entre las que mostraron resistencia se encontraba la entrada PI 414723 procedente de la India y que ha sido descrita como resistentes a otros virus tales como *Watermelon mosaic virus (WMV)* o *Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)*, entre otros.

En este contexto, el objetivo general de este Trabajo Final de Máster es la caracterización de la resistencia a ToLCNDV en esta accesión. Para ello se han abordado los siguientes objetivos:

- I. Fenotipado por resistencia a ToLCNDV de las generaciones de autofecundación (F_2) y retrocruce hacia el parental susceptible. obtenidas a partir de los cruces entre PI 414723 y dos entradas susceptibles, (11PSy 26BL).
- II. Confirmación de los síntomas obtenidos por evaluación visual mediante *tissue printing* e hibridación molecular y qPCR en las generaciones derivadas del cruce PI 414723 x 11PS.
- III. Comprobación del ligamiento entre la resistencia a ToLCNDV y un marcador molecular descrito como asociado a la resistencia derivada de otras fuentes en las generaciones derivadas del cruce PI 414723 x 11PS.

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Como parental resistente se empleó la entrada PI 414723, identificada como resistente en un ensayo de cribado llevado a cabo por el grupo de mejora genética de Cucurbitáceas (López et al., 2015; Saéz et al., 2017). Se trata de un melón de tipo *momordica*, cuyo origen es la India. Se ha descrito en diferentes estudios que tiene u resistencias frente a diferentes patógenos (López-Martín et al., 2020; López et al., 2015).

Como parental susceptible se empleó la variedad cultivada Piel de Sapo (11PS-BGV013188). A partir del cruce inicial entre estas dos entradas, se autofecundó una planta de la generación F₁ y se obtuvo la población segregante F₂. Además, se obtuvo el retrocruce hacia el parental susceptible, BC_{11PS} (Figura 8).

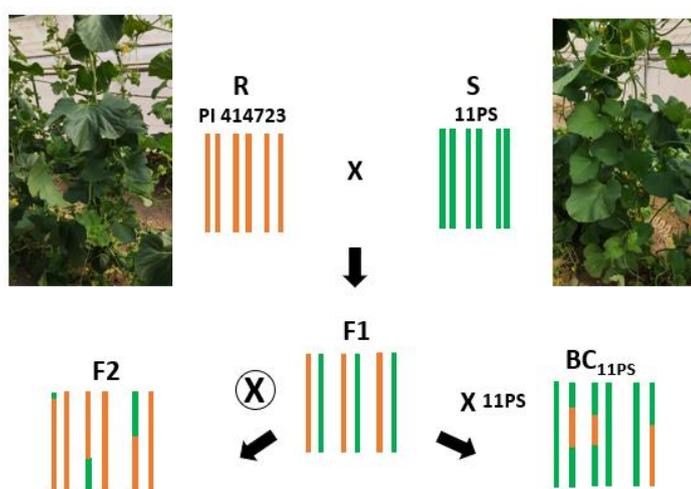


Figura 8. Representación de los cruces realizados para la obtención de las poblaciones segregantes que se van a analizar (F₂, BC_{11PS}).

En un segundo ensayo se emplearon las mismas poblaciones segregantes, pero utilizando como parental susceptible una variedad cultivada de tipo melón blanco (26BL-BGV000444). En este segundo ensayo se llevó a cabo únicamente el seguimiento de la enfermedad mediante la evaluación visual de síntomas

Se evaluaron 150 plantas de cada generación F₂ y 90 de cada generación retrocruce. Se emplearon como control susceptible 10 plantas de la entrada de calabacín (*Cucurbita pepo* L.), MU-CU-16.

3.1.1 Desinfección y germinación de las semillas

En primer lugar, se abrió la testa de las semillas de melón con pinzas para favorecer la germinación y tener una mayor homogeneidad en la fecha de germinación. A continua-

ción, para la desinfección, las semillas se sumergieron en hipoclorito sódico al 10% durante 5 minutos; posteriormente se realizaron dos lavados en agua de 5 minutos cada uno.

Las semillas desinfectadas se introdujeron en placas Petri en las que previamente se había colocado algodón cubierto con un disco de papel de filtro humedecido con agua. Una vez colocadas las semillas, se cubrieron con otro disco de papel de filtro. Las placas se incubaron a 37°C en oscuridad durante 48 horas. Trascorrido ese tiempo, las placas se mantuvieron en cámara climática con condiciones de fotoperíodo 16 horas de luz a 25°C y 8 horas de oscuridad a 18°C.

3.1.2 Condiciones de cultivo

Una vez las semillas presentaban la radícula e hipocótilo lo suficientemente largo se trasplantaron a macetas rellenas de turba enriquecida con sustrato.

Las plántulas se dejaron crecer y cuando presentaban 1-2 hojas verdaderas se procedió a la inoculación mecánica del virus. Se mantuvieron en la cámara en las mismas condiciones de crecimiento hasta el final de la evaluación.

3.2 Método de inoculación mecánica

3.2.1 Fuente de inóculo

Se utilizó como fuente de inóculo tejido de hoja de plantas previamente infectadas con ToLCNDV de forma mecánica de MU-CU-16 (*Cucurbita pepo* subesp. *pepo*, morfotipo *Zucchini*). Tras 15 días después de la inoculación se utilizaron como inóculo hojas jóvenes de las plantas que presentaban mayor gravedad de síntomas (López et al., 2015).

3.2.2 Inoculación mecánica del material vegetal

Para la preparación del inóculo se cogió 1 gramo de tejido joven infectado de MU-CU-16 y se trituró con el tampón de inoculación (50 mM fosfato potásico pH 8,0, 1% polivinilpirrolidona-10, 1% polietilenglicol-6000, 10 mM 2-mercaptoetanol y 1% carbón activo), siguiendo una proporción de 5:1 de tampón: hojas infectadas. A continuación, para poder infectar las plantas, se espolvoreó carborundum sobre el cotiledón y la primera hoja. A continuación, se realizó la inoculación, empleando un bastoncillo impregnado en el inóculo. Se inoculó de cada preparación de inóculo, una planta de calabacín altamente susceptible a ToLCNDV para saber si se había realizado correctamente la inoculación (Figura 9). Las plantas inoculadas mecánicamente se mantuvieron en la cámara en las mismas condiciones hasta 36 dpi.



Figura 9. Plantas de calabacín de cada uno de los inóculos utilizados (control positivo), a los 30 días después de la inoculación (dpi).

3.3 Seguimiento de la enfermedad

3.3.1 Evaluación visual de los síntomas

Se hizo una evaluación de los síntomas de las plantas inoculadas a los 9, 15, 21, 30 y 36 días post-inoculación (dpi). Se usó la escala descrita en López et al. (2015), que va de 0 a 4: 0 (ausencia de síntomas), 1 (síntomas leves), 2 (síntomas moderados), 3 (síntomas graves) y 4 (síntomas muy graves) (Figura 10).

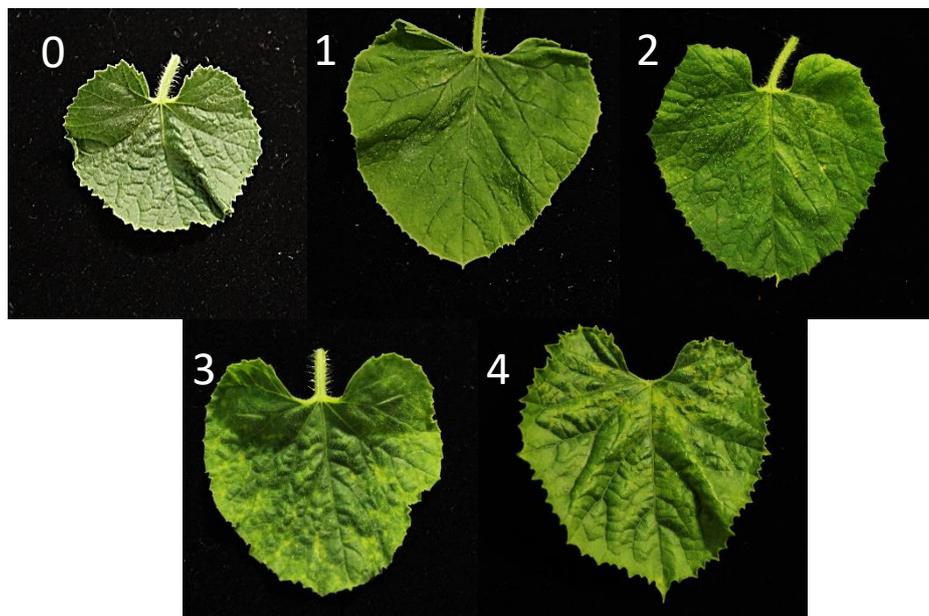


Figura 10. Hojas que representan los diferentes niveles de gravedad según la escala de sintomatología, siendo 0 ausencia de síntomas, 1 síntomas leves, 2 síntomas moderados, 3 síntomas severos y 4 síntomas muy graves o planta muerta (López et al. 2015).

3.3.2 Detección mediante *tissue printing* e hibridación molecular

Esta técnica se utilizó para detectar el DNA viral de ToLCNDV mediante la utilización de tejido en crudo. Se cortaron los pecíolos de las hojas superiores a los 9 dpi y 30 dpi y se

colocaron en la membrana de nylon cargada positivamente. Las membranas se secaron al aire y se fijaron mediante UV (700x100mJ/cm²).

Para la prehibridación, las membranas se introdujeron en un tubo en horno de hibridación con la solución de prehibridación (ANEXO I) durante 2 horas a 68 °C. Posteriormente se hibridaron con tampón de hibridación que incluía la sonda de RNA marcada con digoxigenina (25 ng/mL) durante 16 horas a 56°C.

A continuación, se recuperó el tampón de hibridación con la sonda y se realizaron dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con tampón 2XSSC y 0,1% (peso/volumen) SDS y otros dos lavados a 68°C de 15 min con tampón 0,5 x SSC y 0,1% (peso/volumen) SDS.

A continuación, llevó a cabo un lavado con tampón TL durante 5 minutos. Para el bloqueo de la membrana se empleó el tampón T2 durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo se incorporó tampón T2 con el anticuerpo antidigoxigenina. Seguidamente se realizaron dos lavados con tampón de lavado de 5 minutos cada uno y a continuación las membranas se mantuvieron en agitación durante 5 minutos con tampón T3. Por último, las membranas se pusieron en casetes y se les incorporó el sustrato CSPD (Chemiluminescence substrate) (dilución 1:100 en tampón T3) en oscuridad y se colocó una película de revelado (Amersham). Pasados 45 minutos incubando con el sustrato se procedió a hacer el revelado de la película en cámara oscura (Sáez et al., 2021).

Una vez se reveló la película se procedió a evaluar la carga viral de forma visual, siguiendo una escala del 0 al 4, siendo 0 ausencia de señal y 4 presencia intensa de señal (Figura 11).

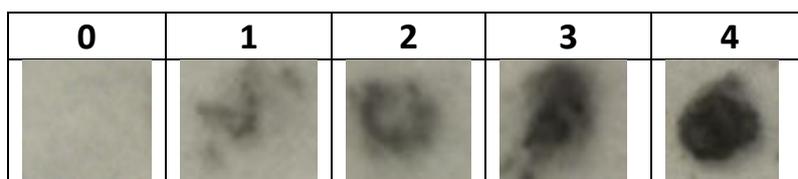


Figura 11. Representación de los diferentes niveles de intensidad de carga viral que se obtuvieron en la membrana de hibridación por tissue printing en la población BC_{11PS}.

3.4 Extracción de DNA mediante el método CTAB

Se realizaron extracciones de DNA de los días 9 y 30 dpi mediante el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1991). Aproximadamente entre 50-70 mg de tejido vegetal de la hoja más joven que presentara síntomas, se congelaron en microtubos de 2 ml donde previamente se había incluido una bola de vidrio. El tejido congelado se trituró en un homogeneizador Retsch (mm300).

La extracción se inició añadiendo 700 µl de tampón de extracción (CTAB-Lysis buffer BioChemica, PanReac) y 1,4 µl de β-mercaptoetanol a cada microtubo, que se incubó

durante 30 minutos a 65°C. Trascurrido el tiempo, se añadieron a cada tubo 100 µl de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se realizó una centrifugación de 5 minutos a 13552 rcf tras la cual se recuperó la fase acuosa. Luego se añadieron 500 µl de isopropanol frío y se incubó a -20°C durante mínimo 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 18928 rcf durante 5 minutos. Se eliminó el isopropanol y se añadieron 200 µl de alcohol al 70%, seguido de una centrifugación a 18928 rcf durante 5 minutos. Una vez eliminado el alcohol se obtuvo el DNA en forma de pellet. El DNA se resuspendió en 100 µl de agua miliQ y se almacenó a 4°C.

3.5 Cuantificación del DNA y ajuste de concentración

Una vez extraídas las muestras se cuantificaron con ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop-1000, en el que se utilizó una alícuota de 2 µl de cada una de las muestras.

Una vez cuantificadas se hicieron diluciones para concentración final de 50 µl y 5 µl, de cada una de las muestras, para su uso en el genotipado mediante HRM (apartado 3.7) y para la cuantificación mediante qPCR (apartado 3.6).

3.6 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La carga viral se determinó mediante PCR cuantitativa en las muestras de 30 dpi. Las amplificaciones se realizaron con cebadores diseñados a partir del DNA-A: ToLCNDVF1 5'-AATGCCGACTACACCAAGCA-3' y ToLCNDVR1 ALMERIA 5'-GGATCGAGAAGAGA-GTGGCG-3' (Sáez et al., 2017).

La qPCR se realizó en un termociclador Roche LightCycler 480. La reacción contenía 15 µl: 7,5 µl de Fast Start Essential DNA Green Master 2x (Roche), 1,5 µl de cada uno de los primers (a una concentración de 10 µM), 1,5 µl de agua y 3 µl de DNA (a una concentración de 5 µM). Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95°C, 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 (k), utilizando un gen que actuaría como referencia, en este caso para melón se utiliza el gen *CmWIP1*, es un gen con expresión constitutiva. Para la amplificación de este gen endógeno se utilizaron los siguientes primers: *CmWIP1F* (5'-TAGGGCTTCCAACTCCTCCTT-3') y *CmWIP1R* (5'-TAGGGCTTCCAACTCCTCCTT-3'), siguiendo los parámetros de amplificación nombrados anteriormente (Sáez et al., 2017).

Para obtener la acumulación relativa de virus de cada muestra se utilizó 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., 2017).

3.7 Genotipado mediante *High-Resolution Melting* (HRM)

Se realizó un genotipado de las plantas mediante *High Resolution Melting* (HRM) utilizando el marcador de tipo SNP 13bis cuyos primers son los siguiente: SNPcMND13bis-F 5'-GGGTAGCAGCCATTGAGTTC3' y SNPcMND13bis-R 5'-GCCCTGTGAGAGTTTGTCC 3'

(Sáez et al., 2017). Este marcador ha sido descrito como ligado a la región del cromosoma 11 asociada a la resistencia a ToLCNDV derivada de la entrada WM-7.

La amplificación del SNP 13bis se realizó en un termociclador Roche LightCycler 480. La reacción contenía 10 µl por muestra: 2 µl del mix (HOT FIREpol EvaGREEN hrmmIX (NO rox.5X), 0,3 µl de cada uno de los primers (a una concentración de 10 µM), 5,4µl de agua y x microL de DNA (a una concentración de 50 µM). Las condiciones de amplificación fueron: 12 min a 95°Cmin, 45 ciclos de 15 s a 95°C, 20 s a 60°C y 20 s a 72°C.

3.8 Análisis estadístico

Se realizaron correlaciones entre las puntuaciones de síntomas, carga viral obtenidas por hibridación molecular y por PCR cuantitativa y genotipo. Se calcularon utilizando el coeficiente r de Pearson. Por otra parte, se realizaron pruebas de significancia estadística mediante la prueba ANOVA, con un nivel de significancia $\alpha > 0,05$.

El ajuste de la segregación obtenida y esperada para cada uno de los modelos planteados en cuanto al modo de herencia de la resistencia se determinó mediante una prueba chi-cuadrado (χ^2).

4. Resultados

4.1 Respuesta de las poblaciones segregantes a la inoculación mecánica

4.1.1 Fenotipado visual por síntomas

Se realizó un seguimiento de la evolución de síntomas en diferentes fechas después de la inoculación (9, 15, 21 y 30 días post inoculación, dpi). Todas las plantas del control susceptible (MU-CU-16) presentaron síntomas graves o muy graves (3-4) desde los 9 dpi, que consistían en abullonado, acucharado y mosaico en las hojas. Una de las plantas control no presentó síntomas en ninguna de las fechas de evaluación, siendo, por tanto, un escape en la inoculación. En la primera fecha de muestreo, en ambas generaciones derivadas del cruce PI 414723 x 11PS un porcentaje elevado de plantas permanecieron asintomáticas, siendo valoradas algunas de ellas con una puntuación de 1 (resistente) al presentar indicios de abullonado o presencia de puntos amarillos aislados en las hojas apicales (Tabla 1). A los 15 dpi la población F₂ presentó una mayoría de plantas clasificadas como resistentes, excepto por una valorada con puntuación 3. La BC_{11PS} también presentó una mayoría de individuos resistentes, si bien algunas plantas empezaron a presentar mosaico amarillo en las hojas apicales (síntomas 3 figura 12A)

Tabla 1. Número de plantas según su puntuación en la evaluación visual de los síntomas (ver apartado 3.3.1 para descripción de la escala) en las distintas fechas de muestreo (días post inoculación, dpi).

Número de plantas con la puntuación asignada								
Generación	Nº plantas	dpi	0	1	2	3	4	Promedio
F ₂ PI414723x11PS	150	9	113	37	0	0	0	0,25
		15	95	54	0	1	0	0,38
		21	58	29	20	5	2	0,69
		30	35	26	36	15	10	1,42
BC _{11PS}	90	9	19	71	0	0	0	0,79
		15	17	69	1	1	2	0,92
		21	32	24	10	9	3	1,01
		30	13	27	19	10	13	1,80

Para fechas posteriores de muestreo se incrementó el porcentaje de individuos con síntomas graves, tales como un mayor mosaico de punteado amarillo en las hojas. En la población BC_{11PS} los síntomas también se fueron agravando, siendo el porcentaje de plantas con síntoma de esta generación superior. Los síntomas identificados consistieron fundamentalmente en, mosaico, abullonado y acucharado en las hojas apicales (Figura 12C, E y F).

Se llevó a cabo un segundo ensayo en el que se incluyeron las generaciones F_2 y BC_1 derivadas del cruce entre PI 414723 y la entrada susceptible 26BL. El número de plantas resistentes (síntomas 0 ó 1) en la generación F_2 fue superior en todas las tomas de síntomas. En ninguna de las fechas se identificó ningún individuo con síntomas valorados con 4. Los síntomas se agravaron en los muestreos más tardíos pero los promedios que se presentaron en las distintas tomas de síntomas fueron inferiores (15 dpi: 0,52; 21 dpi: 0,75 y 30 dpi: 1,04). El máximo de gravedad que se obtuvo fue mosaico y abullonamiento (síntomas 2 y 3). La evolución de los síntomas en la generación BC_{1PS} fue similar a la descrita para el primer ensayo.

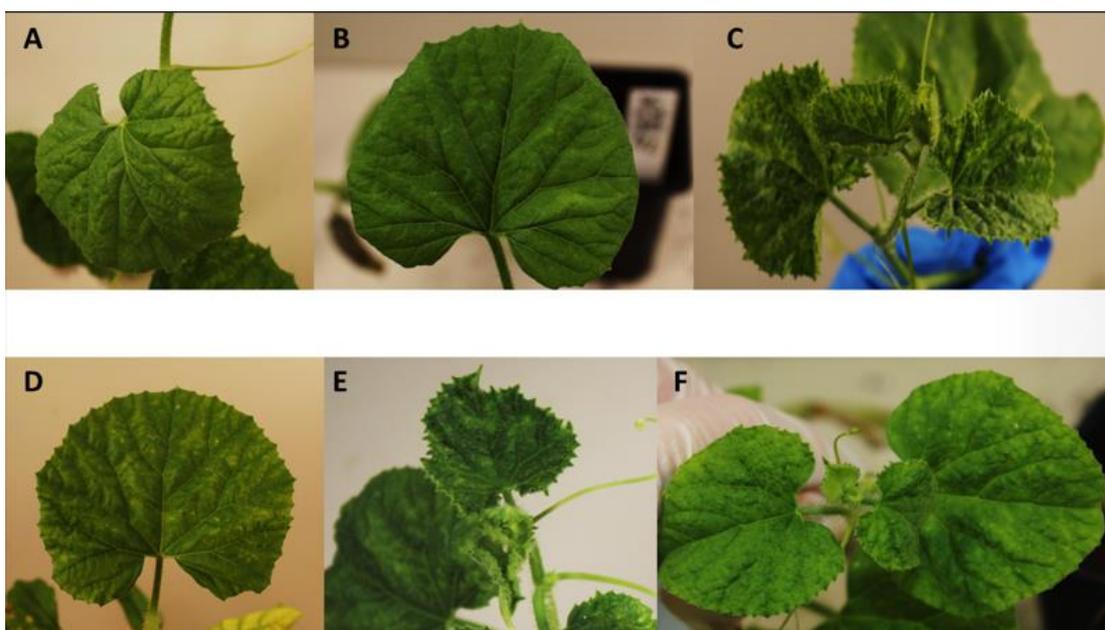


Figura 12. Plantas según su puntuación en la evaluación visual de los síntomas (ver apartado 3.3.1 para descripción de la escala) en las distintas fechas de muestreo (días post inoculación, dpi). A, B, C) Planta de la generación F_2 a 15, 21 y 30 dpi, respectivamente. D, E, F) Planta de la generación BC a 15, 21 y 30 dpi, respectivamente.

4.1.2 Análisis de la presencia del virus mediante *tissue printing* e hibridación molecular

Para las fechas de evaluación de 9 dpi y 30 dpi se determinó la presencia del virus mediante *tissue printing* e hibridación molecular. A los 9 dpi, tanto en la F_2 como en la BC_{1PS} , solo en alguna de las plantas se detectó el virus mediante esta técnica, siendo en todos los casos valorada la señal obtenida con puntuaciones de 1 ó 2 (Figura 13A).

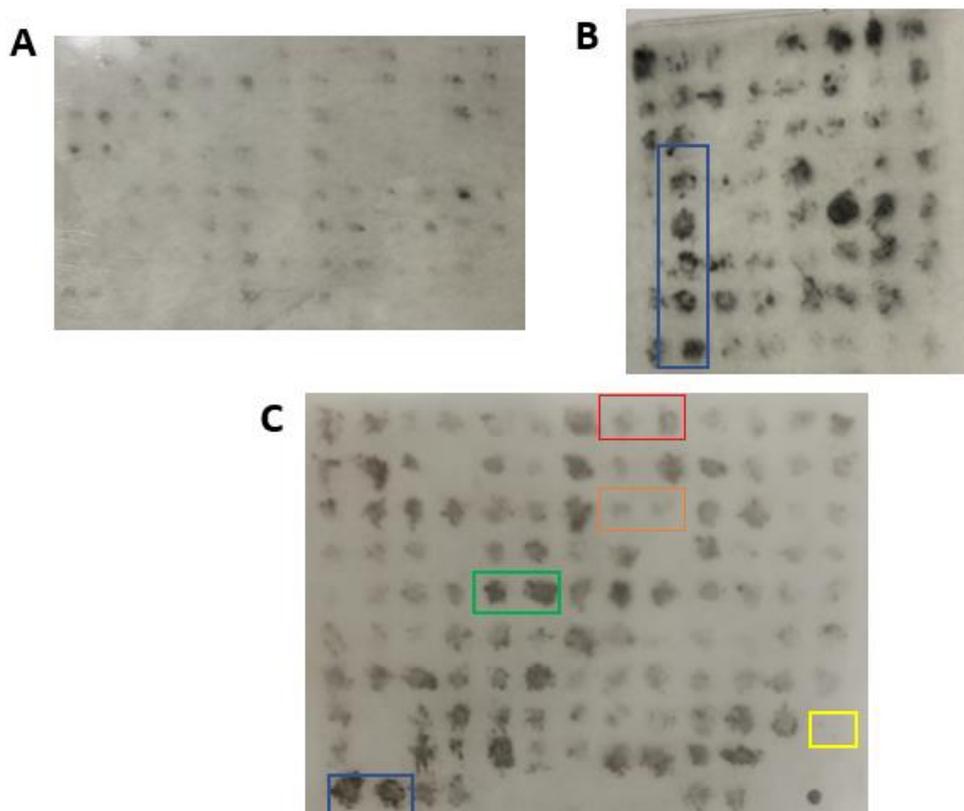


Figura 13. Autorradiografía de la exposición de membranas hibridadas con sondas marcadas con digoxigenina para detección de ToLCNDV (ver apartado 3.3.1 para la descripción de las puntuaciones asignadas) en distintas fechas de muestreo (días post inoculación, dpi). A) Población F₂ a los 9 dpi. B) Población BC_{11PS} a los 30 dpi (en azul se señalan individuos con un nivel de carga viral de 3). C) Población F₂ a 30 dpi (se indican individuos valorados con cada una de las puntuaciones: 0 (amarillo), 1 (naranja), 2 (rojo), 3 (verde) y 4 (azul)).

La gran mayoría de las plantas analizadas de la BC_{11PS} presentaban una elevada acumulación viral a los 30 dpi (Tabla 2) (Figura 13B). En la población F₂ se observó una mayor variabilidad en cuanto a la acumulación de ToLCNDV (Figura 13C).

Tabla 2. Número de plantas según su puntuación en la evaluación de carga viral por tissue printing e hibridación molecular (ver apartado 3.3.2 para descripción de puntuación) a 30 días post inoculación,

Generación	Nº Plantas	dpi	Número de plantas con la puntuación asignada					Promedio
			0	1	2	3	4	
F ₂ PI414723x11PS	150	30	14	39	26	27	20	0,29
BC _{11PS}	90	30	7	23	22	14	16	0,79

En las plantas de las dos generaciones en las que se observaron pocos síntomas a 30 dpi bien no se detectó el virus en la hibridación, bien la señal fue valorada con una puntuación de 1. De hecho, se observó correlación significativa positiva entre la puntuación de la evaluación visual de síntomas y la puntuación asignada a la puntuación de la hibridación a 30 dpi ($r=0,48$).

4.1.3 Segregación de la resistencia

Las plantas de cada una de las generaciones se clasificaron como resistentes y susceptibles siguiendo el criterio de la evaluación visual de síntomas y la detección del virus. Se consideraron resistentes las plantas valoradas con 0 y 1 en la escala de síntomas a los 30 dpi y en las que, además, no se detectó el virus o la señal era con una intensidad 1 en esta fecha de muestreo (Tabla 3).

Tabla 3. Número de plantas resistentes y susceptibles en las generaciones estudiadas (ver texto para la descripción del criterio empleado. Comprobación estadística del ajuste de los datos a un modelo de control monogénico recesivo o monogénico dominante mediante el test χ^2).

Modelo	Población	Resistentes	Susceptibles	Relación esperada	Chi-cuadrado χ^2 (valor.p)
Monogénico recesivo	F ₂ PI414723x 11PS	57	84	1:3	17,89 (<0,0001)
	BC _{11PS}	26	49	0:1	-
Monogénico dominante	F ₂ PI414723x 11PS	57	84	3:1	89,9 (<0,0001)
	BC _{11PS}	26	49	1:1	7,05 (0,0079)
Tres genes dominantes complementarios	F ₂ PI414723x 11PS	57	84	27:37	0,179 (0,67)
	BC _{11PS}	26	49	3:5	0,25 (0,65)

La segregación obtenida no se ajustó en ninguna de las generaciones a un control monogénico de la resistencia (p -valor<0,0001). Se probó el ajuste de otros modelos considerando más de un gen responsable de la resistencia e incluyendo relaciones de epistasia (datos no mostrados). En la generación F₂ la segregación obtenida se ajustó a la proporción 27:37, asociada a tres genes dominantes complementarios ($p=0,67$) (Tabla 3). Este modelo de tres genes complementarios no se ajustó a la segregación obtenida en la generación BC_{11PS}, considerando que la planta empleada del parental susceptible en el retrocruce no fuese portadora de ninguno de los genes de resistencia. Sin embargo, la segregación observada se ajustó a una proporción 3:5 (resistentes: susceptibles), que se presentaría en el caso de que el parental susceptible fuese portador de un gen que confiera resistencia ($p=0,65$). Este modelo ha sido propuesto por otros autores en el caso de la resistencia a ZYMV derivada de esta fuente (ver discusión).

En el segundo ensayo llevado a cabo con poblaciones obtenidas del cruce entre el parental PI 414723 y el parental susceptible 26BL, se obtuvo en la población segregante F₂ un porcentaje de plantas resistentes superior (Tabla 4). Esta población se ajustó a la proporción esperada de 3:1 correspondiente con un gen dominante (p -valor=0,145). Este resultado podría explicarse si la planta F₁ empleada para la obtención de la generación F₂ segregase únicamente para uno de los tres genes, como consecuencia de nuevo de que la planta susceptible empleada en el cruce fuese portadora de alguno de los genes de resistencia. Sin embargo, la segregación obtenida en la generación BC_{26BL} no se ajustó a este modelo (Tabla 4). Los resultados en la BC, al igual que en la población

con el parental susceptible 11PS, se ajustó a la relación de 3:5 (resistentes: susceptibles) ($p=0,95$).

Tabla 4. Número de plantas resistentes y susceptibles en cada población segregante ($PI_{414723 \times 26BL}$) según la presencia de síntomas de ToLCNDV. La probabilidad del valor χ^2 se calculó para la proporción esperada de un gen dominante que controla la resistencia.

Modelo	Población	Resistentes	Susceptibles	Relación esperada	Chi-cuadrado χ^2 (valor p)
Monogénico dominante	$F_2 PI_{414723 \times 26BL}$	92	50	3:1	2,12 (0,145)
	BC 26BL	37	61	1:1	5,87 (0,015)
Tres genes dominantes complementarios	$F_2 PI_{414723 \times 26BL}$	92	50	27:37	29,74 (<0,0001)
	BC 26BL	37	61	3:5	0,002 (0,95)

4.1.4 Estudio de la acumulación de la carga viral mediante PCR cuantitativa

Mediante PCR cuantitativa se detectó la acumulación viral, confirmándose que el valor promedio era significativamente superior en las plantas susceptibles en la BC ($p=0,002$) (Tabla 5). La acumulación viral fue significativamente muy superior en la generación BC frente a la F_2 . En la generación F_2 las diferencias entre la acumulación en las plantas clasificadas como resistentes y las clasificadas como susceptibles no fue significativa.

Tabla 5. Promedio (\pm error estándar) de la acumulación de ToLCNDV detectada mediante PCR cuantitativa (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) en las plantas resistentes y susceptibles de las generaciones $F_2 PI_{414723 \times 11PS}$ y BC_{11PS}

Generación	Promedio acumulación ToLCNDV	
	Resistentes	Susceptibles
$F_2 PI_{414723 \times 11PS}$	365223,56 (\pm 95118,06)	633683,31 (\pm 100719,08)
BC _{11PS}	4195681,51 (\pm 237392,12)	14437773,39 (\pm 2469930,21)

En el caso de la generación BC se observó correlación positiva significativa entre la acumulación viral detectada mediante PCR cuantitativa y la valoración visual de síntomas ($r = 0,62$). En la F_2 no se detectaron diferencias significativas en la acumulación de carga viral entre las plantas resistentes (síntomas 0 ó 1) y las susceptibles (síntomas ≥ 2) ($p=0,12$) y la correlación entre la severidad de los síntomas y la acumulación de ToLCNDV no fue significativa (Figura 14).

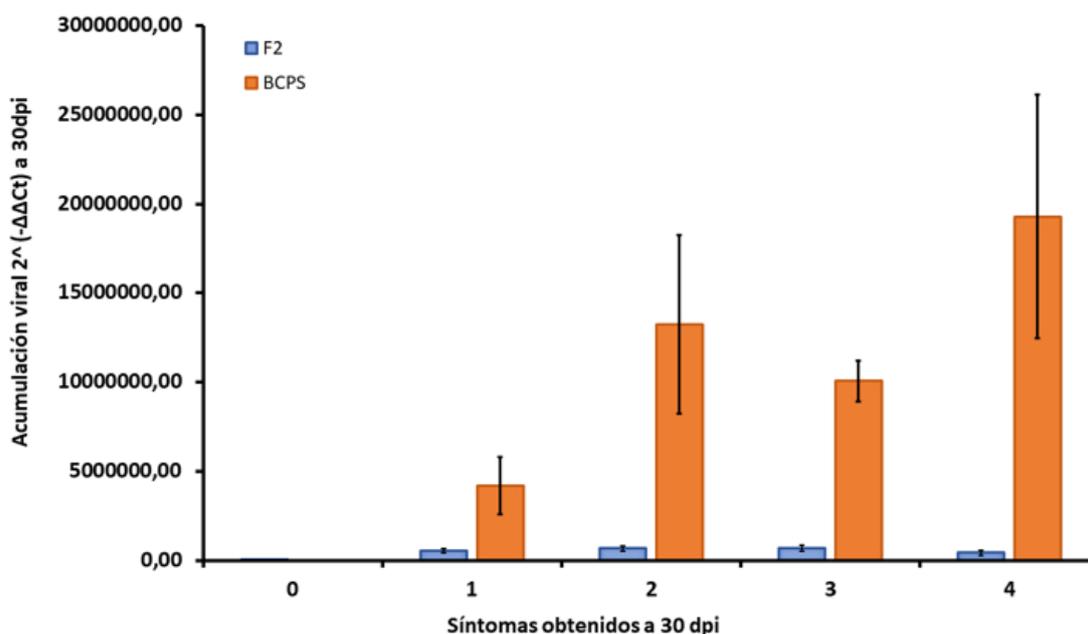


Figura 14. Promedio de la acumulación de ToLCNDV (calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) en plantas según la presencia de síntomas a 30 dpi tras la inoculación mecánica, en las poblaciones F_2 y BC_{11PS} .

4.2 Genotipado de las generaciones derivadas del cruce PI 414327 x 11PS

Las plantas de las dos generaciones derivadas del cruce entre PI 414723 y 11PS se genotiparon con el marcador 13 bis, que ha sido descrito como asociado a la resistencia a ToLCNDV derivada de WM-7. Además, la región donde se localiza este marcador ha sido identificada en trabajos previos desarrollados por el grupo como asociada a la resistencia a ToLCNDV derivada de PI 414723 (datos no publicados). Se observó la segregación esperada en cuanto a genotipos tanto en la generación F_2 (1:2:1) ($p=0,269$) como en la BC (1:1) ($p=0,651$).

Se observó asociación entre la resistencia a ToLCNDV y el genotipo para el marcador. En la generación F_2 , para los individuos que presentaban homocigosis para el alelo del parental resistente un 70,8% fueron clasificados como resistentes (Figura 15A), mientras que un 29,2% de las plantas con este genotipo presentaron síntomas iguales o superiores a 2. El 69,4% de plantas homocigotas para el alelo del parental susceptible fueron clasificadas como susceptibles y un 30,6% se clasificaron como resistentes a los 30 dpi. Un resultado cercano se obtuvo para los individuos heterocigotos (Figura 15B y C).

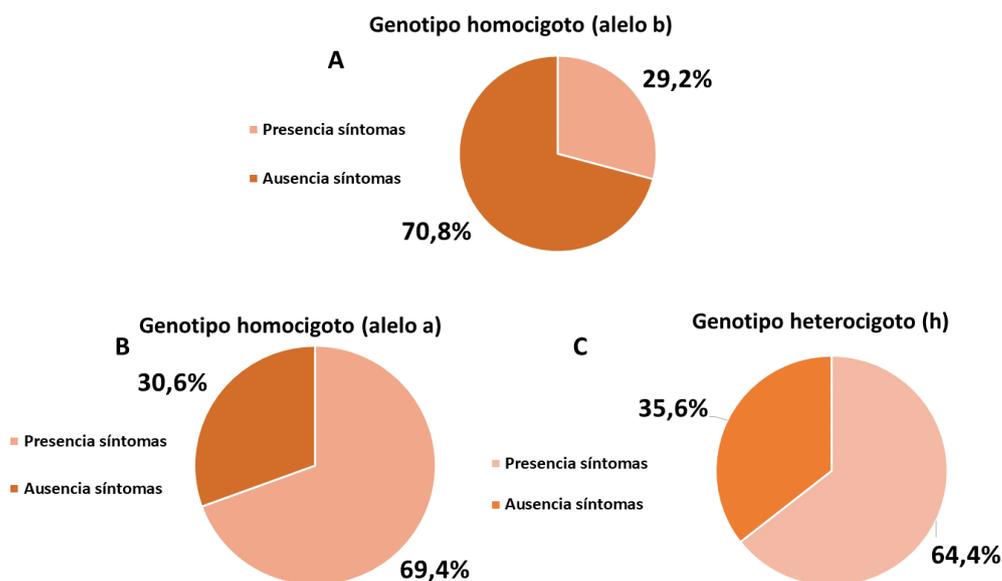


Figura 15. Representación del porcentaje de individuos de la población F2 con ausencia o presencia de síntomas según su genotipo para el marcador 13bis. Presencia de síntomas (síntomas de 0 y 1), ausencia de síntomas (síntomas ≥ 2).

En el caso de la generación BC1, el porcentaje de plantas homocigotas para el alelo del parental susceptible y heterocigotas, clasificadas como susceptibles fue del 64,3 y 59,9, respectivamente.

En cualquier caso, dado que parece que el control genético de la resistencia es complejo, sería necesario disponer de la información de las otras regiones asociadas a la resistencia para poder explicar el fenotipo observado en función del genotipo de las plantas.

5. Discusión

Para desarrollar nuevas variedades un paso fundamental es la introgresión de resistencia a los patógenos que más afectan a los distintos cultivos. Los genotipos de melón procedentes de la India presentan resistencia frente a distintos begomovirus. En un estudio de cribado llevado a cabo por el grupo de “Mejora genética de cucurbitáceas” del COMAV se identificó resistencia a ToLCNDV en cuatro accesiones (López et al., 2015). Una de ellas era la accesión PI 414723 resulta de interés porque además de que las plantas F1 derivadas del cruce de esta con una entrada susceptible no presentaron síntomas tras inocularlas con ToLCNDV, la accesión presenta resistencia viral múltiple, además de resistencia a oídio.

En este estudio se ha evaluado la segregación en cuanto a resistencia de las generaciones F2 y BC derivadas del cruce entre la entrada PI 414723 y dos entradas susceptibles, 11PS y BL26.

Las segregaciones obtenidas no se ajustaron a un control monogénico recesivo o dominante. Estos mismos resultados se obtuvieron en trabajos anteriores realizados por el grupo en generaciones segregantes derivadas de esta misma fuente de resistencia (datos no publicados). Por un lado, estos resultados podrían explicarse como consecuencia de la existencia de escapes a la infección o factores ambientales que hubiesen afectado a la incidencia del virus en las plantas. Otros autores han obtenido resultados similares al estudiar la resistencia a WMV derivada de TGR-151, no siendo posible identificar un control genético sencillo a partir de las segregaciones observadas (Díaz-Pendón et al., 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro trabajo se ajustan en la generación F₂ a una segregación 27:37 que correspondería con tres genes dominantes complementarios (Danin-Poleg et al., 1997). En el segundo ensayo de este trabajo, llevado a cabo con las generaciones derivadas del cruce entre PI 414723 y 26BL, la segregación obtenida en la generación F₂ se ajustaba a un control monogénico dominante. Sin embargo, en el resto de los ensayos previos realizados por el grupo, incluidos los presentados en este trabajo, la proporción de plantas susceptibles en la F₂ fue superior; es posible que en este segundo ensayo se hayan producido escapes a la infección en esta generación. Sin embargo, también podría deberse a que la F₁ empleada en la obtención de esta generación F₂ solo haya segregado para uno de tres genes que controlan la resistencia (Danin-Poleg et al., 1997)

La segregación en las dos generaciones BC analizadas en este trabajo se ajustó a una proporción 3:5. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores al estudiar la resistencia frente a ZYMV en la misma accesión (PI 414723), habiendo concluido en el trabajo citado que esta dependía de tres genes complementarios dominantes y que la segregación se debía a que el parental susceptible fuera portador de alguno de los genes de resistencia (Danin-Poleg et al., 1997).

La resistencia a ToLCNDV ha sido descrita con controles complejos para otras entradas de melón. Como ejemplo, la resistencia al virus del mosaico clorótico del melón (*Melon chlorotic mosaic virus*, MeCMV) y ToLCNDV derivada de IC 274014 ha sido descrita como

controlada por un gen recesivo y dos dominantes (Romay et al., 2019). En el trabajo de Sáez et al. (2017) se determinó que la resistencia a ToLCNDV derivada de la entrada WM-7 dependía de 3 regiones, un QTL mayor y dos menores. Un control similar podría ser el responsable de la resistencia derivada de PI 414723. Trabajos en curso realizados por el grupo, mediante RNAseq, han permitido identificar otras regiones como posibles candidatas a estar asociadas a la resistencia a ToLCNDV derivada de esta entrada (comunicación personal de la Dr. Sáez).

Se han descrito otros ejemplos de resistencia a virus en melón con control poligénico, tales como la resistencia a CMV derivada de la entrada PI 161375 (Guiu-Aragonés et al., 2014) o la resistencia frente a CGMMV derivada de la entrada Phoot (More et al., 1993).

En cualquier caso, en distintos trabajos se ha descrito que la resistencia a ToLCNDV que presenta esta entrada no es completa, se trata de una resistencia parcial (López et al., 2015; Romay et al., 2019; Martín-Hernández & Picó, 2021), lo que podría explicar los resultados obtenidos.

En cuanto a la acumulación viral a los 30 dpi cuantificada mediante qPCR se observó que la población BC_{11PS}, acumulaba carga viral muy superior a la de la generación F2. Esta tendencia ya se observaba con la intensidad de señal de los resultados mediante hibridación molecular. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente para la resistencia a ToLCNDV derivada de WM-7 (Sáez et al., 2017).

En trabajos anteriores del grupo de “Mejora genética de cucurbitáceas” del COMAV, se identificó una región del cromosoma 11 asociada a la resistencia a ToLCNDV derivada de PI 414723 (datos no publicados). Esta región es la misma que la identificada para el QTL mayor responsable de la resistencia a ToLCNDV derivada de WM-7. El marcador 13bis empleado en este trabajo está localizado en esta región.

La región candidata donde se encuentra el marcador 13bis del cromosoma 11, contiene varios genes que podrían estar relacionados con la resistencia. Uno de ellos es una DNA primasa (MELO3C022319.2.1, 30343831-30353980 pb en la v4.0 del genoma). Este gen tiene además sintenia con una DNA primasa en el cromosoma 8 de *Cucurbita moschata* donde se ha identificado un QTL de efecto mayor que controla la resistencia a ToLCNDV derivada de la entrada WM-7 (Sáez et al., 2020).

El estudio de las correlaciones entre los métodos de fenotipado que se ha realizado nos ayuda a determinar la robustez de los datos obtenidos por las distintas técnicas. La evaluación de los síntomas obtenidos de forma visual y la detección del virus mediante hibridación molecular y de una forma cuantitativa por PCR, están correlacionados positivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos en el estudio de la resistencia a otros virus en melón como, por ejemplo, frente a CYSDV o WMV (Marco et al. 2003; Díaz-Pendón et al. 2005).

Los resultados de este trabajo proporcionan información sobre la resistencia derivada de PI 414723, siendo esta probablemente controlada por varios genes. Está previsto

realizar ensayos que permitan determinar qué otras regiones del genoma están controlando la resistencia que presenta PI 414723. Esto a su vez permitirá obtener marcadores moleculares que faciliten la introgresión en el desarrollo de líneas de mejora.

Tal y como se ha comentado previamente, el interés de la entrada PI 414723 es que presenta resistencia a otros patógenos. Su empleo en programas de mejora facilitaría la introgresión de la resistencia a todos ellos.

6. Conclusiones

Las conclusiones que podemos extraer de los distintos estudios del presente trabajo Fin de Máster serían las siguientes:

- I. Los resultados obtenidos en cuanto al control genético de la resistencia a ToLCNDV de la entrada PI 414723 parecen indicar que se trata de un control poligénico. Estos resultados apoyan los obtenidos previamente por el grupo de “Mejora genética de cucurbitáceas” del COMAV.
- II. De forma similar a lo descrito previamente, la región del cromosoma 11 donde está localizado el marcador 13bis parece asociada a la resistencia a ToLCNDV derivada de PI 414723. Será necesario identificar el resto de regiones asociadas a la resistencia para poder explicar la resistencia en función del genotipo de las plantas.
- III. A pesar del control genético complejo de la resistencia a ToLCNDV de la entrada PI 414723, esta entrada multirresistente resulta de interés para su uso en programas de mejora frente a ToLCNDV. PI 414723 ha sido descrita como resistente a distintas enfermedades virales (CABYV, WMV, ZYMV y PRSV), además de como resistente a oídio. Su uso como fuente de resistencia en programas de mejora facilitará la obtención de variedades de melón con resistencia a los distintos patógenos.

7. Bibliografía

- Alberter, B., Rezaian, M. A., & Jeske, H. (2005). Replicative intermediates of Tomato leaf curl virus and its satellite DNAs. *Virology*, 331(2), 441-448.
- Chia, T. F., Chan, Y. S., & Chua, N. H. (2017). Tissue-print hybridization for the detection and localization of plant viruses. In *Molecular Methods in Plant Pathology*. 145-149.
- Danin-Poleg, Y., Paris, H.S., Cohen, S., Rabinowitch, H.D. & Karchi, Z. (1997). Oligogenic inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in melons. *Euphytica*
- Díaz-Pendón, J. A., Fernández-Muñoz, R., Gómez-Guillamón, M. L., & Moriones, E. (2005). Inheritance of resistance to Watermelon mosaic virus in Cucumis melo that impairs virus accumulation, symptom expression, and aphid transmission. *Phytopathology*, 95(7), 840-846.
- Dogimont, C., Slama, S., Martin, J., Lecoq, H. & Pitrat, M. (1996). Sources of resistance to Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus in a melon germ plasm collection. *Plant Disease.*, 80, 1379–1382.
- Endl, J., Achigan-Dako, E. G., Pandey, A. K., Monforte, A. J., Picò, B., & Schaefer, H. (2018). Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. *American Journal of Botany*, 105(10), 1662–1671.
- EPPO (2022). European and Mediterranean Plant Protection Organization <https://gd.eppo.int/taxon/TOLCND/distribution> (Acesso 27 de Abril 2022).
- FAOSTAT. (2022). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Recuperado de: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize> (Acesso el 25 de abril de 2022).
- Figàs, M., Alfaro-Fernández, A., Font, M., Borràs, D., Casanova, C., & Hurtado, M. (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.
- Fortes, M.I., Pérez-Padilla, V., Romero-Rodríguez, B., Fernández- Muñoz, R., Moyano, C. & Castell G.A. (2022). The begomovirus *Tomato leaf curl New Delhi virus* is not seed-transmitted in melon. *III Reunión de Red Nacional de Virología de plantas*. 68
- García-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., & Alioto, T. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11872–11877.
- Gilbert, R.Z., Kyle, M. & Munger, H.M. (1994). Inheritance of Resistance to *Watermelon Mosaic Virus* in *Cucumis melo* L. *HortScience*, 29, 107–110.
- Guiu-Aragonés, C., Monforte, A. J., Saladié, M., Corrêa, R. X., García-Mas, J., & Martín-Hernández, A. M. (2014). The complex resistance to cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in the melon accession PI161375 is governed by one gene and at least two quantitative trait loci. *Molecular Breeding*, 34(2), 351-362.
- Janssen D., Ruiz L., Simón A. & García C. (2014). Control en invernadero del virus de Nueva Delhi de la hoja rizada del tomate. *Vida Rural*, 378, 32-36.

- Janssen, D., Simon, A., Crespo, O., & Ruiz, L. (2017). Genetic population structure of *Bemisia tabaci* in Spain associated with *Tomato leaf curl New Delhi virus*. *Plant Protection Science*, 53, 25-31.
- Janssen, D., Simón, A., Boulares, M., & Ruiz, L. (2022). Host Species-Dependent Transmission of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus-ES by *Bemisia tabaci*. *Plants*, 11(3), 390.
- Juárez, M., Gosálvez, B. & Aranda M. (2013). Virus del rizado amarillo del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV): Un nuevo virus que afecta gravemente cucurbitáceas en Almería y Murcia. Ciencia para todos desde el CEBAS.
- Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M., Gosálvez, B., Castillo, P., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2014) First detection of tomatoleaf curl New Delhi virus infecting Zucchini in Spain. *Plant Disease*, 98,857–858.
- Kheireddine, A., Sifres, A., Sáez, C., Picó, B., & López, C. (2019). First report of tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucurbit plants in Algeria. *Plant Disease*, 103, 3291.
- Kil, E. J., Vo, T. T. B., Fadhila, C., Ho, P. T., Lal, A., Troiano, E., Parrella, G. & Lee, S. (2020). Seed Transmission of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus from Zucchini Squash in Italy. *Plants*, 9(5), 563.
- Kistler, L., Montenegro, A., Smith, B. D., Gifford, J. A., Green R. E., Newsom L. E., & Shaprito, B. (2014). Transoceanic drift and the domestication of African bottle gourds in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(8), 2937–2941.
- Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. & Bello, A. (1996). Patología vegetal. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología. *Phytoma-España*, 263-274.
- López-Martín, M., López, C., Sifres, A., Picó, B., Pérez-de-Castro, A., & Dhillon, N.(2020). P.t Genetic Control of the Resistance to Zucchini yellow mosaic virus Derived from Melon Accession IC 274006.
- MAPA. (2022). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Recuperado de: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/estadisticas/> (Aceso 25 de abril de 2022).
- Martín-Hernández, A. M., & Picó, B. (2020). Natural resistances to viruses in cucurbits. *Agronomy*, 11(1), 23.
- McCreight, J. D., Wintermantel, W. M., Natwick, E. T., Sinclair, J. W., Crosby, K. M., & Gómez-Guillamón, M. L. (2015). Recessive resistance to CYSDV in melon TGR 1551. *In V International Symposium on Cucurbits 1151*, 101-108.
- Mnari-Hattab, M., Zammouri, S., Belkadhi, M. S., Bellon Doña, D., ben Nahia, E., & Hajlaoui, M. R. (2015). First report of tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucurbits in Tunisia. *New Disease Reports*, 31, 21.
- More, T. A., Varma, A., Seshadri, V. S., Somkuwar, R. G., & Rajamony, L. (1993). Breeding and development of cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) resistant lines in melon (*Cucumis melo L.*). *Report-Cucurbit Genetics Cooperative*, 16, 44-46.
- 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

- Otazo González, H. & Espino de Paz, A., (2018). Virus de Nueva Delhi (ToLCNDV) en cucurbitáceas. Agrocabildo publicaciones. Información técnica.
- Orfanidou, C. G., Malandraki, I., Beris, D., Keksidou, O., Vassilakos, N., Varveri, C., Katis, N., & Maliogka, N. I. (2019). First report of tomato leaf curl New Delhi virus in zucchini crops in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 101, 799.
- Panno, S., Iacono, G., Davino, M., Marchione, S., Zappardo, V., Bella, P., Tomassoli, L., Accotto, G. 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.
- Picó B., Díez, M. J. & 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.
- Pitrat, M., Hanelt, P., & Hammer, K. (2000). Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. *Acta Horticulturae*, 510, 29–36
- Pitrat, M. (2003). Melons, concombres et pastèques. In: M. Pitrat & C. Foury (Eds). *Histoires de légumes*, 291–309.
- Pitrat, M. (2008). Melon (*Cucumis melo* L.) In: J. Prohens, & F. Nuez (Eds.), *Hand-book of crop breeding vegetables*, 1, 283-315.
- Pitrat, M., Lecoq, H. (1984). Inheritance of zucchini yellow mosaic virus resistance in *Cucumis melo* L. *Euphytica*, 33, 57–61.
- Renner, S. S., Schaefer, H., & Kocyan, A. (2007). Phylogenetics of *Cucumis* (*Cucurbitaceae*): *Cucumber* (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 58.
- Ríos, P. (2015). Clonaje posicional y validación de un gen candidato para eth6.3, un QTL implicado en la maduración climatérica del fruto del melón (Tesis Doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. Recuperado de <https://ddd.uab.cat/record/166043>.
- Ruiz, M. L., Simón, A., Velasco, L., García, M. C., & Janssen, D. (2016). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain. *Plant Disease*, 99(6), 894-894.
- Sáez, C., Esteras, C., Martínez, C., Ferriol, M., Dhillon, N., 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.
- Sáez, C., Flores-León, A., Montero-Pau, J., Sílfres, A., Dhillon, N. P. S., López, C., & Picó, B. (2021). RNA-seq transcriptome analysis provides candidate genes for resistance to tomato leaf curl New Delhi virus in melon. *Frontiers in Plant Science*, 3039.
- Sáez Sánchez, C. (2021). *Mejora Genética de la Resistencia al tomato leaf curl New Delhi virus en Cucurbitaceas* (Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València). Recuperado de: <https://riunet.upv.es/handle/10251/153801>

- 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, 1045.
- Srivastava, K. M., Hallan, V., Raizada, R. K., Chandra, G., Singh, B. P., & Sane, P. V. (1995). Molecular cloning of Indian tomato leaf curl virus genome following a simple method of concentrating the supercoiled replicative form of viral DNA. *Journal of Virological Methods*, 51(2-3), 297-304.
- Szabó, Z., Gyulai, G., Humphreys, M., Horváth, L., Bittsánszky, A., Lágler, R., & Heszky, L. (2005). Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica*, 146(1-2), 87-94.
- 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., & Consortium, I. R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology*, 98(2), 131.

Anexos

Anexo I

Solución con formamida/ prehibridación

50 % formamida

5xSSC

0,1% SLS

7 % SDS

2 % blocking (de la solución 10%)

Buffer T1

0,1 M ácido maleico

0,15 M NaCl

pH 7

Buffer TL

Añadir 0,3 % (w/v) Tween 20 a T1

Buffer T2

18 ml de buffer T1

2 ml blocking 10%

Buffer T3

0,1 M Tris-HCl, pH 9,5

0,1 M NaCl

SSC 20x

3m NaCl

0,3M citrato sódico 2 hidrato, pH 7