



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

## UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la  
Agrodiversidad Valenciana

### Caracterización genética de la resistencia al *tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) en pepino (*Cucumis sativus*)

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Máster en Mejora Genética Vegetal

Curso: **2020/2021**

Realizado por:

**Silvia María Miguel Montero**

Directores:

**Carmelo López del Rincón**

**María Belén Picó Sirvent**

Directora experimental:

**Cristina Sáez Sánchez**

**Valencia, Julio 2021**

# Resumen

## Caracterización genética de la resistencia al *tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) en pepino (*Cucumis sativus*)

La familia de las cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*) está constituida por una gran diversidad de géneros y especies, entre los que se encuentran cultivos de elevado valor agronómico como el pepino (*Cucumis sativus*). Entre los principales factores que amenazan su cultivo y producción a nivel mundial destacan las enfermedades causadas por virus. En España, el virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) se detectó por primera vez en el sudeste peninsular durante la campaña 2012-2013 infectando sobre todo cultivos de calabacín. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito un incremento de la incidencia de esta virosis en explotaciones intensivas de pepino, mermando las cosechas y su rentabilidad económica. La estrategia de control más efectiva para combatir las enfermedades víricas es el empleo de variedades que incorporen genes de resistencia. En trabajos previos, los grupos de Virología y Mejora Genética de Cucurbitáceas del COMAV-UPV llevaron a cabo un cribado de colecciones de germoplasma de *C. sativus* que incluían accesiones de diversos orígenes geográficos. Estas evaluaciones permitieron identificar tres fuentes de resistencia al virus en pepino, todas ellas procedentes de la India. El objetivo de este Trabajo Final de Máster es el estudio del tipo de herencia que controla la resistencia al ToLCNDV en una de las accesiones de pepino resistentes al virus. Para ello, se ha realizado el cruce entre plantas del genotipo resistente con un genotipo susceptible. Los híbridos F<sub>1</sub> obtenidos se han autofecundado y retrocruzado para generar las poblaciones segregantes F<sub>2</sub> y BCs. Todas las plantas de las diferentes familias obtenidas han sido inoculadas mecánicamente con un clon infeccioso del virus y fenotipadas según su nivel de sintomatología y carga viral por *tissue printing*. La proporción de plantas resistentes:susceptibles observadas en cada población segregante es compatible con un modelo de herencia monogénico recesivo. Para identificar la región o regiones del genoma de pepino involucradas en la resistencia, se ha realizado un genotipado mediante marcadores de tipo SNP repartidos por los siete cromosomas de *C. sativus*. El análisis mediante softwares de cartografía de genes ha permitido identificar un QTL ligado al desarrollo de síntomas y acumulación viral del ToLCNDV en el cromosoma 2 de pepino. No obstante, son necesarios análisis adicionales que permitan acotar este *locus* e identificar los genes candidatos y marcadores moleculares que asistan la transferencia de la resistencia a cultivares élite comerciales.

**Palabras clave:** pepino; ToLCNDV; resistencia; herencia; QTL

# Abstract

## Genetic characterization of resistance to *tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) in cucumber (*Cucumis sativus*)

The cucurbit family (*Cucurbitaceae*) is constituted by diverse genera and species, among which are crops of high agronomic value such as cucumber (*Cucumis sativus*). Among the main factors that threaten its cultivation and production worldwide are diseases caused by viruses. In Spain, *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) was detected for the first time in southern peninsular during the 2012-2013 season, infecting mainly zucchini crops. However, an increase in the incidence of this virus has been described recently in intensive cucumber farms, reducing harvests and their economic profitability. The most effective control strategy to control viral diseases is the use of varieties with resistance genes. In previous works, both Virology and Cucurbit Breeding groups at COMAV-UPV institute carried out a screening of *C. sativus* germplasm collections that included accessions from diverse geographical origins. These evaluations made possible to identify three sources of resistance to the virus in cucumber, all of them original from India. The objective of this Final Master's Thesis is the study of the inheritance that controls resistance to ToLCNDV in one of the virus-resistant cucumber accessions. For this purpose, crosses between resistant and susceptible cucumber plants were carried out. The resulting F<sub>1</sub> hybrids have been selfed and backcrossed to generate the segregating populations F<sub>2</sub> and BCs. All the plants belonging to the different families have been mechanically inoculated with an infectious clone of the virus and phenotyped according to symptom development and viral load by tissue printing. The ratio of resistant:susceptible plants observed in each segregating population is consistent with a recessive monogenic inheritance pattern. A genotyping assay by single nucleotide polymorphism (SNPs) molecular markers, distributed along the seven chromosomes of *C. sativus*, was performed to identify the region or regions of the cucumber genome involved in the resistance. After the analysis by gene mapping softwares, a QTL linked to the development of symptoms and viral accumulation of ToLCNDV was identified on cucumber chromosome 2. However, additional analyzes are required to narrow down this *locus* and identify candidate genes and molecular markers that assist the transference of the resistance to commercial elite cultivars.

**Keywords:** cucumber; ToLCNDV; resistance; inheritance; QTL

# *Agradecimientos*

Al fin llega el apartado que más ilusión me hace escribir. Llegado este punto, solo me queda agradecer a todas las personas que han ido apostando y creyendo en mi durante todo este recorrido.

Con este Trabajo Final de Máster termina una etapa que me ha hecho crecer tanto personalmente como profesionalmente. Por eso quiero dar las gracias, en primer lugar, a mis tutores Carmelo y Belén. Haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo con vosotros, ha sido una experiencia maravillosa. En todo momento, he sentido vuestra confianza y apoyo.

Pero a ti, Cristina, es a quien quiero agradecer la infinita paciencia que has tenido durante todo este tiempo. Por enseñarme, aconsejarme, y por sacar siempre la mejor versión de mi misma en un entorno profesional. Has estado ahí en todo momento, de principio a fin, desde el primer día hasta el último. He aprendido mucho de ti. Por todo ello, gracias.

Agradecer también a mis compañeros del máster. Por amenizar las largas y largas tardes de clases, prácticas, estudio, trabajos, y un sinfín de qué hacer. En especial, quiero dar las gracias a mi amiga Andrea González. Me has acompañado en el grado, y en el máster. No sé qué hubiese hecho sin ti durante este recorrido. Has sido fiel amiga y excelente compañera.

También quisiera dar las gracias a mis padres y mi hermano. Sin vosotros, nada de esto hubiese sido posible. Vuestro apoyo psicológico y moral desde el más profundo de vuestro cariño ha sido necesario para poder afrontar mi día a día.

Y, por último y no menos importante, a ti, Javi. Haces que todo sea mucho más fácil. Gracias por confiar siempre en mí, por escucharme a cualquier hora, por comprenderme cuando algo no va bien, por celebrar todos mis logros y por apoyarme cada caída. Gracias por sacarme una sonrisa día sí y día también. Sacas siempre lo mejor de mí.

Gracias a todos vosotros por hacerme llegar hasta donde estoy hoy.

GRACIAS.

Este trabajo ha sido cofinanciado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y fondos FEDER [Proyecto número RTA2017-00061-C03-03 (INIA)], y por el proyecto PROMETEO para grupos de excelencia (proyecto 2017/078) de la Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esports (Generalitat Valenciana).



# Índice general

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. FAMILIA DE LAS CUCURBITÁCEAS: IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL PEPINO</b>	<b>1</b>
<b>1.2. TOMATO LEAF CURL NEW DELHI VIRUS (ToLCNDV)</b>	<b>3</b>
1.2.1. ORIGEN, DIVERSIDAD GEOGRÁFICA Y GAMA DE HUÉSPEDES	3
1.2.2. TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN DEL VIRUS	5
1.2.3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE ToLCNDV	6
1.2.4. TRANSMISIÓN	7
1.2.5. PROCESO DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN	8
1.2.6. SINTOMATOLOGÍA	10
1.2.7. DIAGNÓSTICO	10
<b>1.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE ToLCNDV</b>	<b>12</b>
<b>1.4. MEJORA GENÉTICA PARA LA RESISTENCIA AL ToLCNDV</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
<b>3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO</b>	<b>15</b>
3.1.1. DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS	15
<b>3.2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO Y PROCESO DE INFECCIÓN</b>	<b>16</b>
3.2.1. FUENTE DE INÓCULO	16
3.2.2. INOCULACIÓN MECÁNICA DEL MATERIAL VEGETAL	16
<b>3.3. ESTUDIO DE LA SINTOMATOLOGÍA Y DETECCIÓN DEL ADN VIRAL</b>	<b>17</b>
3.3.1. EVALUACIÓN VISUAL DE LOS SÍNTOMAS	17
3.3.2. HIBRIDACIÓN MEDIANTE RIBOSONDAS	17
<b>3.4. EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE MÉTODO CTAB</b>	<b>19</b>
<b>3.5. CUANTIFICACIÓN DEL ADN Y AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>3.6. DISEÑO DE LA PLATAFORMA DE GENOTIPADO MEDIANTE SNPs</b>	<b>20</b>
<b>3.7. ANÁLISIS DE QTLs</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>

<b>4.1. RESPUESTA DEL HÍBRIDO F1 A LA TRANSMISIÓN MECÁNICA DE TOLCNDV</b>	<b>21</b>
<b>4.2. RESPUESTA DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES A LA TRANSMISIÓN MECÁNICA DE TOLCNDV</b>	<b>22</b>
<b>4.1. GENOTIPADO POR GBS Y AGENA BIOSCIENCE</b>	<b>23</b>
4.1.1. ANÁLISIS DE QTLs	24
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>32</b>

# Índice de figuras

**Figura 1.** Producción/Rendimiento de pepinos y pepinillos a nivel mundial en el año 2019 (Fuente FAOSTAT, 2019).

**Figura 2.** Valor de la producción bruta mundial (miles de US\$) de pepino y pepinillos (Fuente FAOSTAT, 2018).

**Figura 3.** Producción mundial de pepinos y pepinillos por continentes en 2019 (Fuente FAOSTAT, 2019).

**Figura 4.** Distribución actual de ToLCNDV. Puntos amarillos representan la presencia del ToLCNDV. Se observa en Asia (Bangladesh, India, Indonesia, Irán, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia), Europa (Estonia, Grecia, Italia, Lituania, Portugal, Eslovenia y España) y Africa (Argelia, Marruecos, Islas Seychelles y Túnez) (Fuente: EPPO, Global Database, 2021).

**Figura 5.** Reconstrucción microscópica crioelectrónica 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).

**Figura 6.** Organización del genoma del *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV). Componentes genómicos ADN-A y ADN-B con flechas que muestran sus respectivos genes (Zaidi *et al.*, 2017).

**Figura 7.** Población de *Bemisia tabaci* y detalle del adulto (Otazo *et al.*, 2018).

**Figura 8.** Esquema de adquisición y transmisión de virus mediante el vector *B. tabaci* (Janssen *et al.*, 2014).

**Figura 9.** Ciclo de la vida de los *begomovirus* (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

**Figura 10.** Esquema de obtención de las diferentes poblaciones.

**Figura 11.** Escala de síntomas generados por el ToLCNDV en pepino; 0, planta sana, sin síntomas; 1: síntomas leves; 2: síntomas moderados; 3: síntomas severos; 4: síntomas muy severos o planta muerta.

**Figura 12.** Resultados de hibridación molecular por *tissue printing* con RNA-dig a 15 dpi de algunas muestras de la población F2. A1, A2 y B2 tienen una puntuación de 3; A3, A5, B3 tienen puntuación de 2; A4 tiene una puntuación de 1. El resto tienen una puntuación de 0.

**Figura 13.** (A) Planta asintomática de la accesión resistente CGN23089 15 días después de la inoculación mecánica (dpi) con ToLCNDV. (B) Planta sintomática de la accesión susceptible BGV011742. (C) Síntomas en una planta F<sub>1</sub> procedente del cruce CGN23089 x BGV011742 a 15 dpi.



**Figura 14.** Representación de la intensidad de la señal de hibridación en la membrana de los parentales e híbrido a los 15 dpi. Parental resistente (CGN23089) en color verde, parental susceptible (BGV011742) en color rojo, e híbrido F<sub>1</sub> (CGN23089 x BGV011742) en color azul.

**Figura 15.** A) Plantas de pepino susceptibles a ToLCNDV tras la inoculación mecánica. Individuos con síntomas de puntuación 3 de la población segregante F<sub>2</sub>. B) Membrana a los 15 dpi de individuos de la población segregante F<sub>2</sub>.

**Figura 16.** Promedio de la acumulación viral determinada mediante *tissue printing* al final del experimento en plantas F<sub>2</sub> (CGN23089 x BGV011742) (barras negras oscuras), BC<sub>CGN23089</sub> (barras grises), y BC<sub>BGV011742</sub> (barras más claras) en cada puntuación en la escala de sintomatología. La línea punteada muestra la línea de tendencia ajustada a un modelo exponencial en la población F<sub>2</sub>.

**Figura 17.** Región candidata en el cromosoma 2 de pepino vinculada a la resistencia a ToLCNDV. A: El marcador más cercano a todos los QTLs fue SNPCs2\_3, B: QTL significativo relacionado con el desarrollo de síntomas, C: QTL asociado a la acumulación de ToLCNDV, y D: QTL asociado al carácter cualitativo de resistencia.

**Figura 18.** Análisis QTL de la población F<sub>2</sub> (CGN23089 x BGV011742) como caracteres los valores de síntomas, carga viral y resistencia cualitativa.

**Figura 19.** Media de la puntuación sintomatológica (A) y acumulación de la carga viral en BC<sub>BGV011742</sub> dependiendo del marcador (SNPCs2\_2, SNPCs2\_3) en el cromosoma 2. En el eje de la x, el genotipo homocigoto para el alelo CGN23089 se representa como “b”, el genotipo heterocigotos se representa como “h”. Barras con la misma letra muestran medias que no son diferentes significativamente  $p \leq 0,05$ .

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Número de semillas germinadas.

**Tabla 2.** Composición de la solución de prehibridación.

**Tabla 3.** Número de plantas resistentes y susceptibles en cada población segregante según el desarrollo de los síntomas y la acumulación viral de ToLCNDV. La probabilidad del valor  $\chi^2$  se calculó para la proporción esperada de un gen recesivo que controla la resistencia.

**Tabla 4.** Lista de SNPs polimórficos en la población F<sub>2</sub> (CGN23089 x BGV011742), su posición física según la Versión 2 del genoma del pepino Gy14 (<http://cucurbitgenomics.org>), las posiciones en el mapa genético calculadas utilizando la función de Kosambi. y la secuencia de los flaquea.

**Tabla 5.** QTLs identificados en la población segregante F<sub>2</sub> mediante mapeo por intervalos compuestos (CIM) en el cromosoma 2.

# *Lista de abreviaturas*

**ADNs:** ADN *double strand* o bicatenario

**ADNs:** ADN *single strand* o monocatenario

**Bp:** pares de base

**CGMMV:** *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus*

**COMAV:** Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana

**Dpi:** días post infección

**EPPO:** Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

**FAOSTAT:** Base de datos estadísticos corporativos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

**GBS:** Genotyping by sequencing

**IFAPA:** Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica.

**MAPA:** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

**NPGS:** Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas

**ORFs:** Open reading frame

**QTL:** Quantitative trait *loci* o *Loci* de carácter cuantitativo

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism o Polimorfismo de un único nucleótido

**SqMV:** *Squash Mosaic Virus*

**TOLCNDV:** *tomato leaf curl New Delhi virus* o virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi.

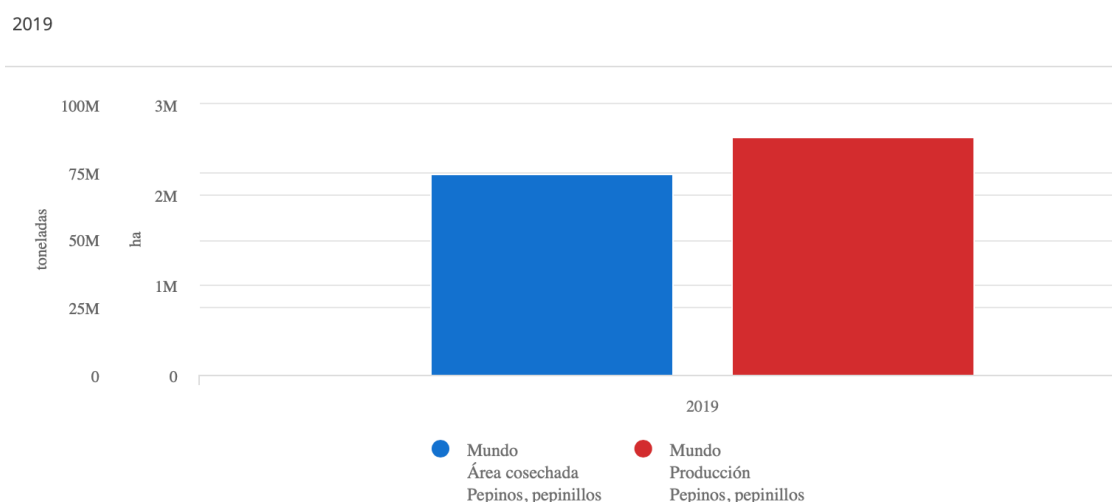
**TYLCV:** *tomato yellow leaf curl virus* o virus de la cuchara del tomate.



## Introducción

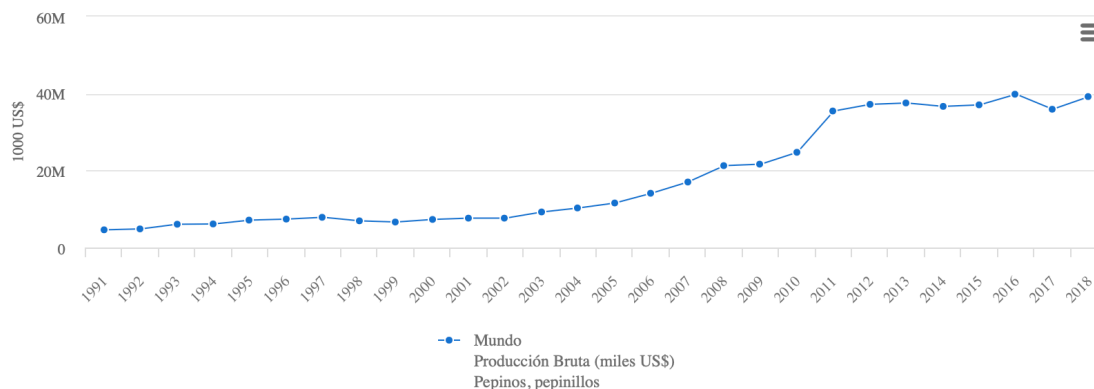
### 1.1. Familia de las cucurbitáceas: importancia económica del pepino

Las cucurbitáceas se cultivan en regiones tropicales, subtropicales y templadas del Nuevo y Viejo mundo. Sus especies comestibles son una importante fuente de alimentos para los seres humanos ya que aportan a las dietas actuales una gran cantidad de vitaminas y minerales esenciales (López *et al.*, 2015). Los cultivos pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas de mayor importancia económica se engloban dentro de los siguientes géneros: *Cucumis*, que incluye el melón (*Cucumis melo* L.) y el pepino (*Cucumis sativus* L.); *Citrullus* como la sandía (*Citrullus lanatus* L.) y *Cucurbita*, dentro del cual se encuentran el calabacín (*Cucurbita pepo* L.) y las calabazas (*Cucurbita máxima* L. y *Cucurbita moschata* L.). Como el pepino es el cultivo objeto de este trabajo, nos centraremos en describir su importancia económica (**Figura 1**).



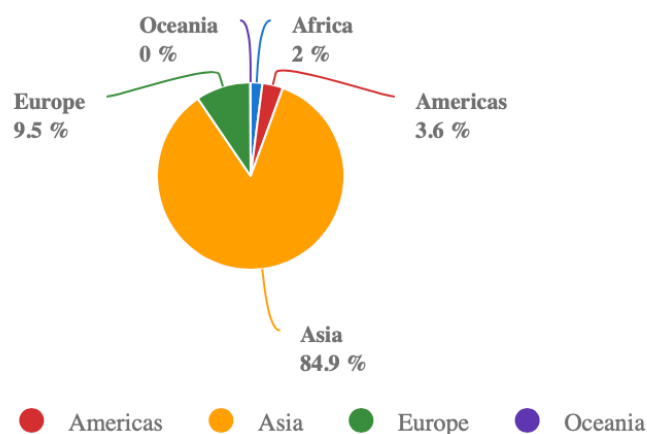
**Figura 1.** Producción/Rendimiento de pepinos y pepinillos a nivel mundial en el año 2019 (Fuente FAOSTAT, 2019).

Los datos más recientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), indican que en 2019 se cultivaron mundialmente más de 2 millones de hectáreas de pepinos y pepinillos, obteniéndose una producción de alrededor de 87 millones de toneladas. Además, la estima del valor económico mundial del cultivo del pepino ha ido aumentando cada año. En el último año registrado (2018) la producción bruta de este cultivo generó un valor de 40 millones de dólares (**Figura 2**).



**Figura 2.** Valor de la producción bruta mundial (miles de US\$) de pepino y pepinillos (Fuente FAOSTAT, 2018).

El continente que lidera la producción de esta especie hortícola es Asia con casi un 85% del total, siendo China el principal productor mundial. Le sigue el continente europeo con una producción del 9,5%, América del 3,6% y finalmente África, con solo un 2% de la producción mundial (**Figura 3**).



**Figura 3.** Producción mundial de pepinos y pepinillos por continentes en 2019 (Fuente FAOSTAT, 2019).

A nivel europeo, España es uno de los principales productores de cucurbitáceas, siendo además el primer país exportador de Europa. Según los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), durante el año 2018 se cultivaron unas 7.500 hectáreas de pepino con una producción de alrededor de 640.000 toneladas, y según datos de la FAO, en España se cultivaron durante el año 2019 más de 7.000 hectáreas de pepino, con una producción de casi 740.000 toneladas (FAOSTAT, 2019). La producción de este cultivo se centra principalmente en Almería y destacan también las provincias de Granada, Murcia y las Palmas, donde el cultivo de esta especie hortícola se encuentra muy extendido.

Sin embargo, debido a las prácticas de cultivo intensivo y al cambio climático, son muchos los factores bióticos y abióticos que pueden afectar a estos cultivos. Entre los factores abióticos que más pérdidas ocasionan se encuentran las sequías y los suelos salinos, mientras que entre los estreses bióticos destacan las plagas y enfermedades

causadas por virus y hongos. Entre las plagas más frecuentes destacan los pulgones (*Aphis gossypii*), araña roja (*Oligonychus mexicanus*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), los nematodos y los trips (*Frankliniella occidentalis*), que no solo ocasionan daños a nivel físico en la planta, sino que algunas también son transmisoras de enfermedades. Entre estas últimas, destacan las enfermedades de etiología viral que afectan gravemente a su producción (Lecoq *et al.*, 2014; Martín-Hernández y Picó, 2021). En la cuenca del Mediterráneo son numerosos los virus que se han descrito afectando al cultivo del pepino, pero por su gran expansión y daño que ocasionan, destacan los virus de los géneros *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Comovirus*, *Carmovirus* y *Begomovirus*.

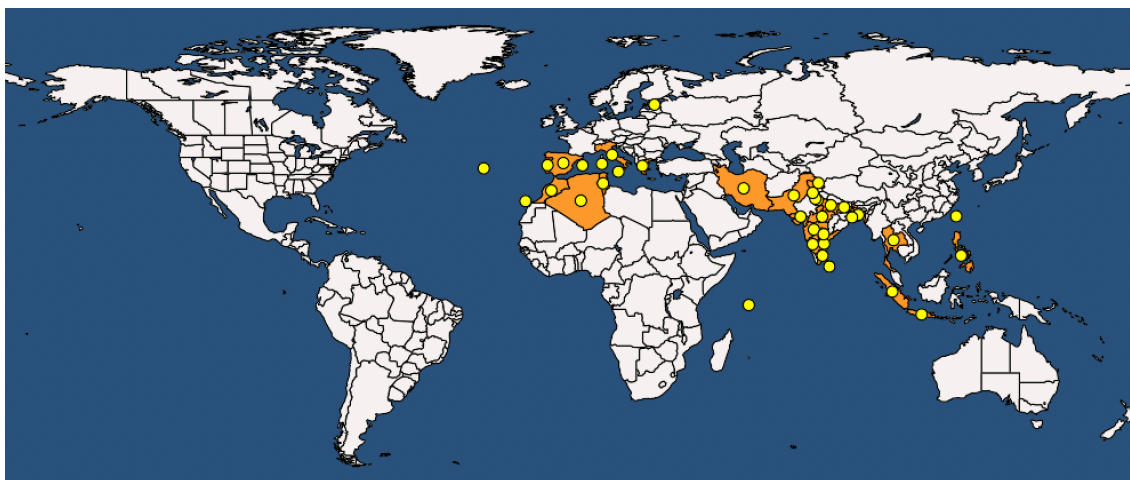
Uno de los virus más recientes descritos en el sur de España ha sido el virus de la hoja rizada del tomate del Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV, género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*). Su primera detección fue en 2012 y, actualmente, supone una amenaza importante en la producción de calabacín, melón y pepino.

## 1.2. *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV)*

### 1.2.1. Origen, diversidad geográfica y gama de huéspedes

El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV) se describió, por primera vez, en 1995 como una variante del complejo de virus causante del rizado amarillo de la hoja del tomate afectando a cultivos de tomate en India. Posteriormente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus lo catalogó como especie viral independiente.

En India, el ToLCNDV afecta principalmente a tomate y se ha extendido por otras regiones (**Figura 4**) de Asia como Pakistán, Bangladesh, Tailandia, Taiwán, Sri Lanka, Indonesia, China y Oriente medio (Juárez *et al.*, 2013).



**Figura 4.** Distribución actual de ToLCNDV. Puntos amarillos representan la presencia del ToLCNDV. Se observa en Asia (Bangladesh, India, Indonesia, Irán, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia), Europa (Estonia, Grecia, Italia, Lituania, Portugal, Eslovenia y España) y África (Argelia, Marruecos, Islas Seychelles y Túnez) (Fuente: EPPO, Global Database, 2021).

En Asia, el ToLCNDV afecta principalmente a cultivos de Solanáceas, como pimiento, tomate y patata y a especies de malas hierbas de la misma familia como *Solanum nigrum*. Sin embargo, la gran diversidad genética del ToLCNDV junto con su gran capacidad de adaptación hacen que su gama de huéspedes no solo se limite a solanáceas, sino que también se han encontrado cepas infectando a cucurbitáceas. Entre los cultivos de cucurbitáceas más afectados por este virus, destacan calabacín, calabazas (*Cucurbita spp.*), calabaza china (*Benincasa hispida*), pepino, melón, balsamina (*Momordica charantia*), sandía, calabaza del peregrino (*Lagenaria siceraria*), esponja vegetal (*Luffa cylindrica*) y chayote (*Sechium edule*) (Moriones *et al.*, 2017).

El virus estuvo confinado en el continente asiático hasta el año 2012, que fue cuando se empezó a detectar en distintos países de Europa y África. Por orden cronológico, fue en España, y concretamente en la provincia de Murcia, donde se observó por primera vez en el año 2012. El cultivo donde se observaron los primeros síntomas fue en calabacín. En mayo de 2013, se detectó en la provincia de Almería y ya en el otoño de este mismo año la enfermedad estaba muy extendida en calabacín tanto en Murcia como en Almería. Posteriormente, el virus se fue detectando en otros cultivos como melón, pepino, tomate y pimiento y en diferentes países de la cuenca mediterránea. En enero de 2015, el virus se detectó vez en Túnez, causando una enfermedad grave en melón, pepino y calabacín cultivados bajo túneles de plástico en la región Kébili (sudeste de Túnez) (Mnari-Hattab *et al.*, 2015). En ese mismo año, también se observó huella del virus en Italia; en 2018 en Argelia y Grecia; y más recientemente se detectó en países vecinos como Portugal en 2019 y Francia en 2020. En estos últimos países se detectó principalmente en cultivos de calabacín (EPPO, Global Database, 2021).

En España, durante el otoño de 2011 se observaron en determinadas plantas de calabacín “mosaicos” en hojas, compatible con una infección viral. Los análisis ELISA no detectaron virus de la familia *Potyviridae*, ni de otros virus conocidos, como el virus del mosaico de la calabaza (SqMV, *Squash Mosaic Virus*) o el virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV, *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus*). Un año después, esta misma situación se repitió con una incidencia variable, de entre un 2% y un 80% en al menos 12 parcelas y distribuidas por toda la Comarca de Campo de Cartagena (Juárez *et al.*, 2013).

Durante el año 2013, en el Campo de Cartagena (Murcia) y de Almería (regiones como Berja, Dalías, El Ejido, Roquetas y Adra), se observaron síntomas de la nueva enfermedad viral en calabacín, tanto en campo como en invernadero. Durante este año, los síntomas se extendieron ampliamente, ya no solo afectando cultivos de calabacín sino también a cultivos tardíos de melón, ocasionando grandes pérdidas y provocando una gran alarma en el sector agrícola.

Desde su primera detección, la incidencia del virus en cultivos de la familia de cucurbitáceas se ha incrementado de forma aparentemente exponencial. La Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization) consideró que el ToLCNDV es un virus emergente en las regiones europeas del Mediterráneo y por ello, en junio de 2015 decidió incluirlo en su Lista de Alerta “EPPO Alert List” ([http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert\\_List/viruses/ToLCNDV.htm](http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/viruses/ToLCNDV.htm)).

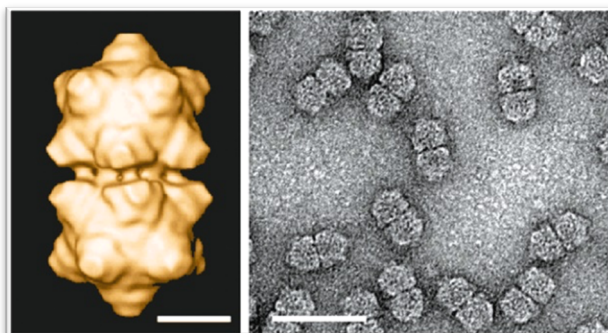
En España y en los países de la Cuenca Mediterránea, los daños mayores se producen en calabacín y a continuación en pepino, melón y calabaza y puntualmente se ha citado en sandía y en tomate y pimiento (Otazo *et al.*, 2018). Al ser un virus transmitido por un insecto vector polífago, es decir que se puede alimentar y reproducir en un amplio número de plantas (tanto cultivadas como silvestres), es muy importante conocer aquellas en las que el virus pueda quedar actuando como fuente de inóculo. En las zonas afectadas, se ha detectado en diferentes especies pertenecientes a familias cultivadas (Otazo *et al.*, 2018):

- *Cucurbitaceae*: *Ecballium elaterium* (pepinillo del diablo)
- *Solanaceae*: *Solanum nigrum* (hierba mora), *Datura stramonium* (estramonio);
- *Asteraceae*: *Taraxacum officinale* (diente de león), *Sonchus oleraceus* (serraja);
- *Chenopodiaceae*: *Chenopodium album* (cenizo) y *Chenopodium murale* (salado);
- *Urticaceae*: *Parietaria judaica* (ratonera)
- *Malvaceae*: *Malva sylvestris* (malva común)

Además, no solo se ha visto que infecta a especies de cierto interés agronómico y/o mediterráneo, sino que también ha sido 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).

### 1.2.2. Taxonomía y descripción del virus

El género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) comprende más de 320 especies de virus conocidas que infectan a plantas dicotiledóneas. Según la organización de su genoma, los *Begomovirus* pueden ser clasificados en dos grupos: monopartitos, aquellos que presentan una única molécula de ADN, o bipartitos, los que presenta dos moléculas de ADN (**Figura 5**) (Silva *et al.*, 2017; Zaidi *et al.*, 2017)

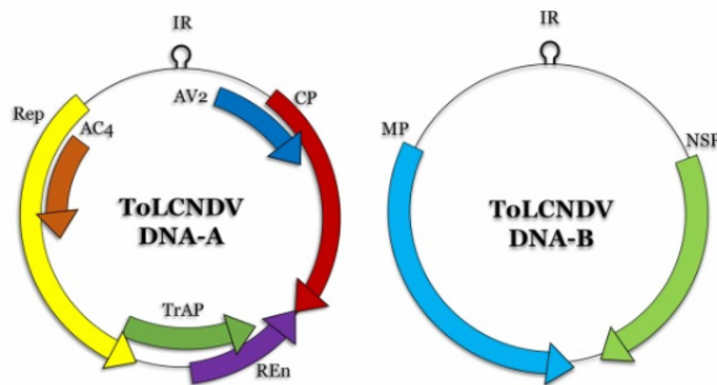


**Figura 5.** Reconstrucción microscópica crioelectrónica de un *begomovirus*. La barra representa 10 nm (izquierda). Partículas purificadas de *begomovirus* teñidas con acetato de uranilo. La barra representa 50 nm (derecha) (Zerbini *et al.*, 2017).

El ToLCNDV es un geminivirus bipartito formado por dos moléculas de ADN circular de cadena sencilla, de aproximadamente 2,7 kb cada una, denominadas ADN-A y ADN-B, que se encapsidan en dos partículas icosaédricas unidas (Zaidi *et al.*, 2017; Zerbini *et al.*, 2017). Cada partícula tiene un tamaño de 18 x 30 nm<sup>2</sup> y la componen 22 capsómeros pentaméricos. 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 (ADN-A o ADN-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. Los genes pertenecientes al componente ADN-A solapan entre sí, no ocurriendo lo mismo en los genes incluidos en el ADN-B (**Figura 6**) (Zaidi *et al.*, 2017).



**Figura 6.** Organización del genoma del *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV). Componentes genómicos ADN-A y ADN-B con flechas que muestran sus respectivos genes (Zaidi *et al.*, 2017).

El ADN-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 (AC4). Por otra parte, los genes BV1 y BC2 del componente ADN-B codifican dos proteínas: NSP, involucrada en el movimiento intracelular y MP involucrada en el transporte intercelular del virus, respectivamente (Venkataravanappa *et al.*, 2015; Zaidi *et al.*, 2017).

### 1.2.3. Diversidad genética de ToLCNDV

De acuerdo con las directrices de la ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) para begomovirus, aislados con más de un 91% de identidad de secuencia en el segmento de ADN-A pertenecerían a la misma especie y con más de un 94% a la misma cepa. Hasta la fecha, con los aislados del ToLCNDV disponibles en la base de datos del NCBI/ICTV se han establecido al menos siete cepas diferentes. La aparición de nuevas cepas suele ocurrir por procesos de recombinación, que son frecuentes en begomovirus. Además, esta recombinación adaptativa al huésped suele ser bastante eficiente en los virus de la familia de los geminivirus, dando lugar a casos de epidemias graves. Así, los distintos aislados están más o menos adaptados a los diferentes huéspedes y la infección de estos será distinta en función de la especie infectada.

La secuencia de nucleótidos de los segmentos de ADN-A y ADN-B de todos los aislados del ToLCNDV identificados en la cuenca mediterránea presentan una identidad de secuencia superior al 98 y 97%, respectivamente, mientras que con los aislados asiáticos la identidad es, respectivamente, inferior al 93 y 82%, lo que pone de manifiesto que se trata de una población genéticamente muy homogénea a la que se ha denominado ToLCNDV-ES (Fortes y col., 2016; Juárez y col., 2019).

La cepa ToLCNDV-ES infecta con relativa facilidad a las diferentes especies de cucurbitáceas cultivadas, causándoles por lo general graves síntomas, pero presenta dificultad a la hora de infectar tomate y otras especies de solanáceas (Fortes *et al.*, 2016; Moriones *et al.*, 2017).

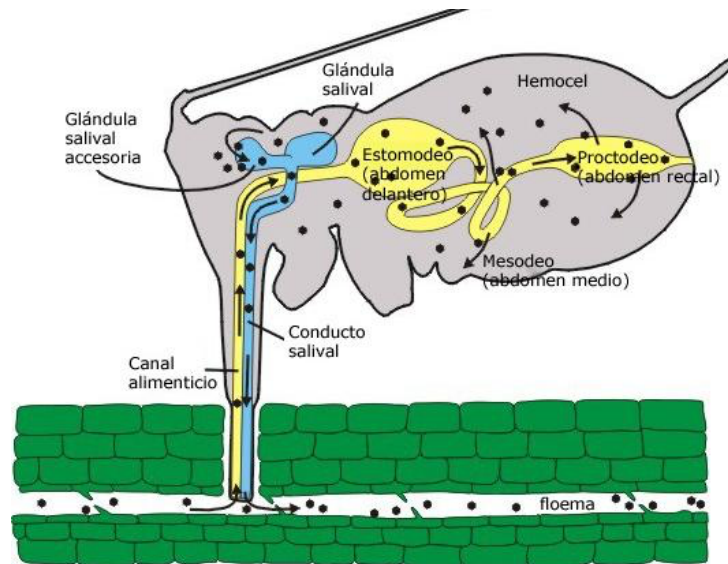
#### 1.2.4. Transmisión

Al igual que la gran mayoría de los *begomovirus*, el ToLCNDV, se transmite por la mosca blanca del tabaco (*Bemisia tabaci*). Se trata de un insecto que pertenece al orden *Homoptera* y a la familia *Aleyrodidae*. Se describió por primera vez sobre plantas de tabaco en Grecia en 1889 (Gennadius, 1889), pero actualmente está presente en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde es una amenaza considerable para muchos cultivos. Según los resultados de análisis moleculares de la secuencia de la enzima citocromo oxidasa I del ADN mitocondrial (mtCO1), se trata de un complejo de 11 grupos bien definidos que contienen al menos 24 especies con características biológicas distintas, pero morfológicamente indistinguibles, dentro de las cuales Asia 1, Asia II 1/5/7 y Middle East-Asia Minor 1 o MEAN1 son las responsables de transmitir el virus por toda Asia (De Barro *et al.*, 2011) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Población de *Bemisia tabaci* y detalle del adulto (Otazo *et al.*, 2018).

La mosca transmite al virus de forma persistente y circulativa. Esto quiere decir que después de alimentarse de una planta infectada la mosca adquiere el virus y transcurrido un periodo de latencia, donde se produce una circulación efectiva del virus hasta las glándulas salivares de la boca del insecto, pasa a ser mosca virulífera y permanece así toda su vida, infectando a otras plantas sanas con periodos de alimentación de unos minutos (Janssen *et al.*, 2014) (**Figura 8**). El tiempo de persistencia del virus en el insecto es de más de 20 días, por lo que, a efectos prácticos, el insecto puede transmitir el virus durante toda su vida adulta.



**Figura 8.** Esquema de adquisición y transmisión de virus mediante el vector *B. tabaci* (Janssen *et al.*, 2014).

El ciclo de vida completo de *B. tabaci* es de unos 30 días cuando las temperaturas se encuentran entre 22°C y 25°C. Las temperaturas letales se sitúan por debajo de los 9°C y por encima de los 40°C. El rango óptimo para su desarrollo se encuentra entre 16°C y 34°C. Esto significa que, en el sureste de España y la cuenca Mediterránea, donde se producen la mayoría de las especies hortícolas de la familia de las cucurbitáceas, tiene las condiciones ideales para su desarrollo durante todo el año.

La eficiencia de transmisión del ToLCNDV se ha demostrado que es alta, en estudios preliminares del IFAPA de Almería se observaron ratios del 96% en la transmisión entre calabacines con una única mosca blanca. Estos ratios son bastante mayores a los encontrados para el virus de la cuchara del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), que van de un 40 a un 50% (Janssen y Ruiz, 2014).

Por otra parte, se ha determinado que algunos virus de la misma familia pueden transmitirse de generación en generación de mosca, como estas glándulas se conservan durante la muda, el insecto puede infectarse en estado juvenil y transmitir la enfermedad en estado adulto, aunque este aspecto se desconoce para ToLCNDV.

Es muy importante destacar que para que se extienda la enfermedad en un cultivo debe haber una combinación de plantas infectadas que actúan como fuente de inóculo, y de la presencia del vector de transmisión (*B. tabaci*). Como fuente de inóculo pueden actuar los cultivos afectados (con síntomas o incluso asintomáticos), pero también especies de malas hierbas que pueden actuar como reservorio del virus y del vector hasta la siguiente plantación.

### 1.2.5. Proceso de infección y replicación

El éxito del proceso de infección del virus ocurre con el resultado del debilitamiento de la respuesta de defensa de la planta, seguido de una replicación, empaquetamiento y diseminación eficiente de los viriones. El proceso de infección de los *begomovirus* se inicia cuando una mosca virulífera se alimenta de la savia de una planta sana y transmite las partículas virales al citoplasma. En la célula de la planta, el ADN viral de simple

cadena (ADNss, ADN single strand) se desencapsida y es replicado a ADN bicatenario (ADNds, ADN double strand) gracias a las ADN polimerasas del huésped, usando oligonucleótidos de ARN como cebadores. Además, la infección puede darse en células que no están en división, ya que 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 (Nagar *et al.*, 1995).

Posteriormente, el ADNds será transcrito por la ARN polimerasa de tipo II del hospedador. Esto permite la síntesis de la proteína Rep, la cual se unirá a una región específica del origen de replicación del ADN (Ori-V) e iniciará la replicación viral mediante un doble mecanismo de círculo rodante y recombinación dependiente de replicación (Figura 9). Es la propia proteína Rep la que reprime la replicación para dar paso a la transcripción y síntesis de las proteínas de la mano de TrAP. El ADNss circular naciente podrá tomar dos caminos, reingresar en el ciclo de replicación o empaquetarse en viriones, después de que se haya sintetizado la proteína de cubierta (CP).

La infección se propaga dentro de la planta por el movimiento del ADN viral desde el núcleo a la siguiente célula o al floema mediante la acción de las proteínas virales de movimiento NSP y MP. Además, las proteínas codificadas por el virus, influirán en varias vías celulares del hospedador como: silenciamiento de RNA, diferenciación celular, control del ciclo celular y la función de los plasmodesmos. Al parecer, NSP también funciona como determinante de avirulencia, desencadenando la respuesta hipersensible (HR) dentro de la planta, mientras que TrAP está involucrada en la inhibición de esa HR (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Zaidi *et al.*, 2017).

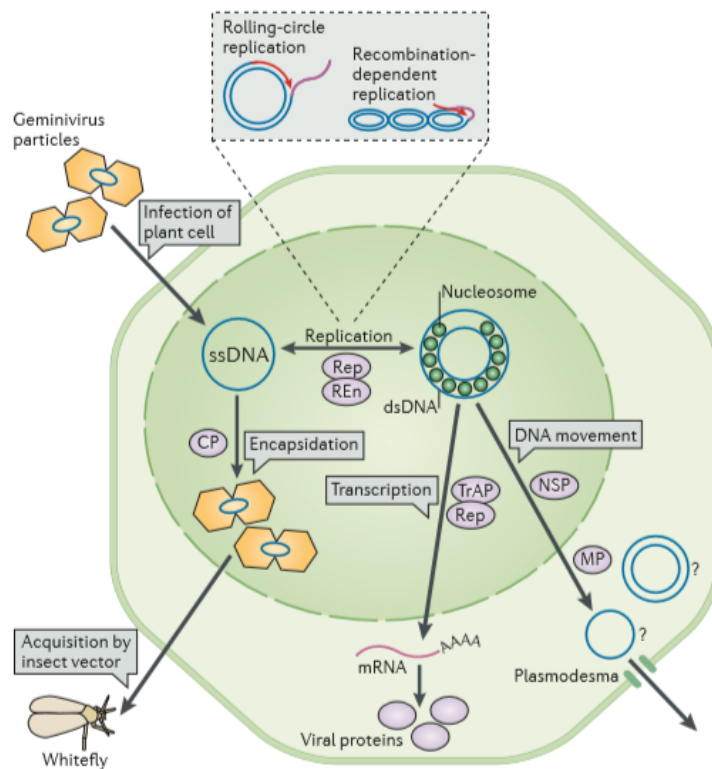


Figura 9. Ciclo de vida de los begomovirus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

## 1.2.6. Sintomatología

En cuanto a la sintomatología, la mayoría de las plantas susceptibles infectadas por el virus tienen un cuadro sintomatológico común, lo que varía en cada especie es la severidad con la que el virus se manifiesta en diferentes partes de la planta. Los síntomas son aquellos efectos visuales del daño causado por un patógeno sobre su hospedante. Este tipo de síntomas son los más importantes y se clasifican en primarios y secundarios. Los síntomas primarios son aquellos que se manifiestan inicialmente en la planta y se dan en el lugar de la inoculación del virus, dando lugar en muchos casos a reacciones de hipersensibilidad. Estos síntomas carecen de importancia a nivel de campo, pero son muy importantes a nivel experimental (Mena *et al.*, 2010). Los secundarios ocurren posteriormente, y se presentan en partes no inoculadas de las plantas.

En el caso de ToLCNDV los síntomas locales o primarios son leves punteaduras en las hojas que se relacionan con las picaduras del vector, acompañadas de un enroscamiento de las hojas hacia el haz o el envés y ligeros abullonamientos. Los síntomas secundarios o sistémicos son aquellos que se manifiestan lejos del punto de inoculación y en el caso del ToLCNDV incluyen:

- Mosaicos y amarillos foliares y apicales.
- Clorosis internerviar, caracterizada por la decoloración de los nervios, este síntoma se aprecia con más frecuencia en la fase inicial de la infección.
- Enanismo, las plantas infectadas se ven afectadas por una limitación en su crecimiento.
- Rizado foliar, se provocan diversas deformaciones en las hojas, deformándose hacia el haz o el envés provocando acucharamientos.
- Falta de vigor, la planta se encuentra debilitada lo que conlleva reducción o parada del crecimiento y ausencia de frutos.
- Filimorfismo apical y reducción de la superficie foliar, causando la reducción del área fotosintética activa.
- Abullonamientos

La manifestación de todos estos síntomas en las plantas se ve influenciada por diversos factores entre los que se destacan, el ambiente, tipo de virus, edad de la planta y hospedante. Dentro de las condiciones ambientales el factor más importante es la temperatura ya que influye de forma directa en la variación de los síntomas que manifiestan los virus. Otro factor ambiental que influye es la luz. En cuanto a la edad de la planta, de forma general cuando son más jóvenes, son más susceptibles al ataque de los virus. Finalmente, el hospedante es un factor que está muy relacionado con la susceptibilidad y/o resistencia del hospedante al patógeno. En el caso de ToLCNDV, el cultivo más susceptible y en el que causa mayores pérdidas en la producción es el calabacín.

## 1.2.7. Diagnóstico

### 1.2.7.1. Detección serológica de ToLCNDV por ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) y dispositivos de flujo lateral (LFD)

Estos ensayos inmunológicos están basados en la reacción antígeno-anticuerpo. Se trata de ensayos de inmunoabsorción ligados a un enzima en la que un antígeno

inmovilizado (proteína codificada por el virus, como puede ser la cápsida viral), es detectado mediante un anticuerpo ligado a un enzima capaz de generar un producto detectable por cambio de color. Estos métodos son muy utilizados ya que son sencillos, rápidos, económicos y en algunos casos, como en el ELISA, cuantificables. Sin embargo, los anticuerpos empleados para identificar la presencia de ToLCNDV pueden dar reacciones cruzadas con las proteínas de cubierta de otros *Begomovirus* (Figas *et al.*, 2016).

#### **1.2.7.2. Hibridación molecular**

Este diagnóstico se basa en la capacidad de apareamiento específico entre dos cadenas sencillas de ADN y ARN. Permite detectar una cadena sencilla de cualquiera de estos ácidos nucleicos con una sonda de ADN o ARN (fragmento marcado *in vitro* radiactivamente o conjugado con un fluoróforo o con enzimas que den reacciones colorimétricas o quimioluminiscentes) para su posterior detección. Para ello, los ácidos nucleicos (ADN o/y ARN) se unen covalentemente a una membrana de nylon cargada positivamente y se hibridan con la sonda de polaridad complementaria al ácido nucleico que se desea reconocer. Este método destaca por su sencillez y rapidez. Además, su gran sensibilidad en la hibridación permite una visualización de la señal de forma muy clara y específica.

#### **1.2.7.3. Detección de ADN por PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de un fragmento de ADN del virus con la ayuda de una ADN polimerasa, mediante ciclos cortos de desnaturalización y renaturalización. Para ello, se necesita disponer de cebadores con la secuencia complementaria al fragmento del ADN viral que se quiere amplificar, que funcionan como iniciadores de la replicación. La visualización del producto de PCR amplificado, se puede realizar mediante electroforesis en geles de agarosa tras tinción con bromuro de etidio o en tiempo real (Pasic *et al.*, 2014).

Es una técnica muy empleada para diagnosticar el ToLCNDV por su rapidez y alta sensibilidad. Además, complementada con otras técnicas moleculares como clonación, restricción o secuenciación, permite hacer estudios de diversidad e incluso caracterización genómica de nuevos aislados. Por otra parte, 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 ADN polimerasa por inhibidores presentes en la muestra (Llácer *et al.*, 1996; Islam *et al.*, 2011).

#### **1.2.7.4. Diagnóstico por evaluación visual de síntomas**

Esta técnica se basa en observar la sintomatología de plantas infectadas con ToLCNDV bajo las mismas condiciones y compararla con una escala de síntomas previamente establecida. Es una técnica simple y rápida, pero con la desventaja de que los síntomas pueden ser confundidos fácilmente con los de otros patógenos (López *et al.*, 2015).

### 1.3. Estrategias de control de ToLCNDV

Los métodos de lucha contra la enfermedad se basan fundamentalmente en la disminución de la cantidad de inóculo, en el control del vector por métodos físicos, químicos, biológicos o mediante prácticas culturales y en el empleo de variedades resistentes (Picó *et al.*, 1996).

Las medidas adoptadas para disminuir la cantidad de inóculo consisten en la protección de los semilleros con el objeto de realizar los trasplantes con material sano. Asimismo, es conveniente eliminar, antes del trasplante, los restos del cultivo anterior y las malas hierbas que pueden actuar como reservorios del virus.

Por otra parte, se ha comprobado que la dispersión del virus está correlacionada con el tamaño de la población del vector en campo (Cohen *et al.*, 1988), por lo que las medidas encaminadas a eliminar el vector contribuyen a controlar la enfermedad. En este sentido los tratamientos insecticidas no suelen resultar efectivos si no se combinan con otras medidas, dado que la eficacia de la transmisión es elevada y un número pequeño de individuos es capaz de iniciar una epidemia. Otras alternativas útiles consisten en la utilización de trampas cromotrópicas (Chu *et al.*, 2000) o la protección de los cultivos con redes de malla densa (Arsénio *et al.*, 2002). El control biológico con enemigos naturales es otra de las medidas empleadas, fundamentalmente con parasitoides de los géneros *Eretmocerus* (Urbaneja *et al.*, 2007) o *Encarsia* (Gerling *et al.*, 2001).

Algunas de estas medidas pueden ser útiles en cultivo protegido, mientras que en cultivo al aire libre para que resulten eficaces es necesario que se adopten de forma generalizada en toda el área productora. En cualquier caso, estas estrategias no resultan suficientes por sí mismas en condiciones de elevada presión de inóculo o infecciones tempranas.

Otra estrategia para obtener plantas resistentes a enfermedades de etiología viral es mediante técnicas de ingeniería genética, empleando la expresión de distintas partes del genoma viral. El diseño de micro-ARNs artificiales (amiRs) específicos, basados en la secuencia del genoma viral, para silenciar genes esenciales de la replicación, transmisión y desarrollo de síntomas se ha convertido en una solución viable. Se han obtenido plantas transgénicas de tomate resistentes al ToLCNDV mediante la expresión de amiRNAs dirigidos a inhibir la expresión de la proteína de la cápsida (AV1) y la proteína pre-cápsida (AV2) (Van Vu *et al.*, 2013).

No obstante, hoy en día esta opción no tiene una utilidad práctica, a pesar de estar muy desarrollada y del gran potencial que ofrece. Las reservas existentes en la sociedad actual y las trabas legales para la comercialización de productos transgénicos, en especial los dedicados al consumo humano, no favorecen su implantación y no parece probable que lo hagan a corto o medio plazo. Por tanto, la utilización de resistencias naturales parece la solución más práctica para combatir la enfermedad.

### 1.4. Mejora genética para la resistencia al ToLCNDV

El método más eficiente para combatir las enfermedades causadas por virus, como el ToLCNDV, es la obtención de variedades resistentes. Para ello, es necesario identificar

genotipos dentro de la especie o especies relacionadas, que presenten tolerancia o resistencia frente al virus. Una vez ha sido identificada una fuente de resistencia/tolerancia, el próximo objetivo consiste en caracterizarla e introgresar el gen o genes que confieren la resistencia en una variedad cultivada de élite susceptible a la enfermedad.

Dentro de la familia de las cucurbitáceas, la primera fuente de resistencia fue identificada en *Luffa cylindrica* (Islam *et al.*, 2010). Como resultado de la primera detección del virus en España (Juárez *et al.*, 2014), se desarrollaron estrategias para facilitar el cribado de colecciones de germoplasma de cultivos de cucurbitáceas (López *et al.*, 2015). Para ello, desarrollaron un método de inoculación mecánica que ha facilitado la identificación de fuentes de resistencia a ToLCNDV en melón y calabaza.

Hasta el momento, se han identificado cinco accesiones tolerantes de *Cucumis melo*, con distintos niveles de tolerancia, procedentes de la India. Tres de estas accesiones se corresponden al grupo *momordica* y las otras dos a accesiones silvestres del grupo *agrestis* (López *et al.*, 2015). Por otro lado, a pesar de que el calabacín es la especie más susceptible al ToLCNDV, no se ha encontrado ninguna resistencia en esta especie, pero sí se ha encontrado resistencia en cuatro accesiones de la especie *Cucurbita moschata* que está estrechamente relacionada (Sáez *et al.*, 2016). El hecho de que este virus fuese detectado inicialmente en la India y que estas cinco accesiones de melón y una de las cuatro accesiones descritas en calabaza procedan de allí, puede hacer pensar en la existencia de una co-evolución entre la planta y ToLCNDV en esa área (Dhillon *et al.*, 2012).

Una vez identificadas las fuentes de resistencia en *C.melo*, se llevó a cabo en la accesión silvestre WM-7 un fenotipado por sintomatología y acumulación viral y un genotipado empleando una colección de marcadores moleculares de tipo SNP. Los datos fueron analizados utilizando softwares de cartografía genética que permitieron la identificación de un QTL de efecto mayor ligado a la resistencia a ToLCNDV presente en el cromosoma 11 del genoma de melón. Esta resistencia se vio que estaba influenciada por efectos epistáticos de dos modificadores menores en los cromosomas 2 y 12 (Sáez *et al.*, 2017).

Posteriormente, en una accesión resistente de *Cucurbita moschata* se identificó otro QTL en el cromosoma 8 que controla la resistencia genética al virus en cuestión. Cabe destacar, que esta región candidata del cromosoma 8 de *C.moschata* es sinténica a la región del cromosoma 11 de melón. Los genes comunes en las regiones candidatas de ambas cucurbitáceas, con SNPs polimórficos entre accesiones resistentes y susceptibles, son interesantes para estudiar los mecanismos implicados en este tipo de resistencia recesiva (Sáez *et al.*, 2020).

Finalmente, en trabajos anteriores (Sáez *et al.*, 2021) se identificaron también tres accesiones indias de *C. sativus* altamente resistentes al virus, las cuales permanecieron asintomáticas y mostraron una acumulación viral reducida. En este Trabajo Final de Máster se pretende estudiar la herencia genética de una de estas accesiones.



# 2

## Objetivos

En trabajos previos realizados en el COMAV, se llevó a cabo un cribado de colecciones de germoplasma de *C. sativus* en los que se identificaron tres fuentes de resistencia al ToLCNDV en pepino, todas ellas procedentes de la India. El objetivo de este Trabajo Final de Máster es el estudio del tipo de herencia que controla la resistencia al ToLCNDV en una de estas accesiones. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos:

- I. Creación de poblaciones segregantes F<sub>2</sub> y BCs, a partir de autofecundación y retrocruce de híbridos F<sub>1</sub> obtenidos tras el cruce de la accesión de *C. sativus* subsp. *sativus* CGN23089, resistente al ToLCNDV, con la accesión susceptible BGV011742.
- II. Fenotipado según evaluación sintomatológica y del contenido viral por *tissue printing* de las poblaciones segregantes obtenidas, previamente inoculadas con un clon infeccioso del ToLCNDV.
- III. Desarrollo de un panel de marcadores tipo SNP que permita el genotipado de las poblaciones segregantes, así como el posterior análisis e identificación de QTLs ligados a la resistencia al ToLCNDV en pepino.

# 3

## Materiales y Métodos

### 3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

En la búsqueda de fuentes de resistencia contra ToLCNDV en pepino, los grupos de mejora genética de Cucurbitáceas y Virología del COMAV realizaron un cribado de una colección de accesiones representativas de las zonas de origen y diversificación de la especie *C. sativus* (Sáez *et al.*, 2021). Estas evaluaciones previas permitieron identificar tres accesiones con elevado nivel de resistencia al virus, todas ellas originarias de la India. En este Trabajo Fin de Máster, plantas de la accesión con mejor comportamiento resistente, CGN23089, se llevaron a un invernadero del COMAV-UPV y se cruzaron con plantas de la accesión BGV011742, una variedad tradicional de pepino altamente susceptible a ToLCNDV. A partir de la semilla híbrida generada (F<sub>1</sub>) se obtuvieron poblaciones segregantes, mediante autofecundación, para obtener la población (F<sub>2</sub>) y por retrocruzamiento con plantas CGN23089 y BGV011742, para obtener las poblaciones BC<sub>CGN23089</sub> y BC<sub>BGV011742</sub>, respectivamente.

Para la obtención de las poblaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y BCs se siguió el esquema que se muestra en la **Figura 10**. Como parental resistente al ToLCNDV se empleó la accesión CGN2089 y como parental susceptible la accesión BGV011742.

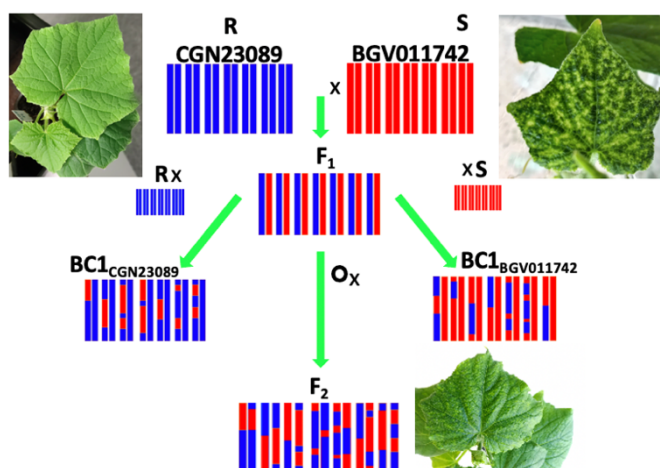


Figura 10. Esquema de obtención de las diferentes poblaciones.

#### 3.1.1. Desinfección y germinación de las semillas

Las testas de las semillas de pepino se abrieron para facilitar y homogenizar la germinación mediante una leve presión lateral con pinzas. A continuación, las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico al 10% durante 5 minutos y, seguidamente, se realizaron dos lavados consecutivos con agua destilada, el primero

durante 5 minutos y el segundo durante 7 minutos. Tras la desinfección, las semillas se colocaron en placas de 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. Entre los discos se colocaron las semillas y se humedecieron con agua sin llegar al encharcamiento de la placa. Las plantas se incubaron a 37° C en oscuridad durante 8 h, y posteriormente se aclimataron durante un día exponiéndolas a una fuente natural de luz y temperatura ambiente, proceso que además facilita la germinación. El número de semillas empleadas de cada población es el que se indica en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Número de semillas germinadas.

Genotipo	Nº de semillas
Población F <sub>2</sub>	100
BC hacia parental resistente (BC <sub>CGN23089</sub> )	55
BC hacia parental susceptible (BC <sub>BGV011742</sub> )	14
Control resistente (CGN23089)	4
Control susceptible (BGV011742)	5

### 3.1.1.1. Condiciones de cultivo

Tras la germinación de las semillas, las plántulas 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.

## 3.2. Material microbiológico y proceso de infección

### 3.2.1. Fuente de inóculo

Como fuente de inóculo, un clon infeccioso de ToLCNDV se agroinfiltró en plantas de la accesión 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 inóculo para transferir mecánicamente el virus a las plantas a evaluar (López *et al.*, 2015).

### 3.2.2. Inoculación mecánica del material vegetal

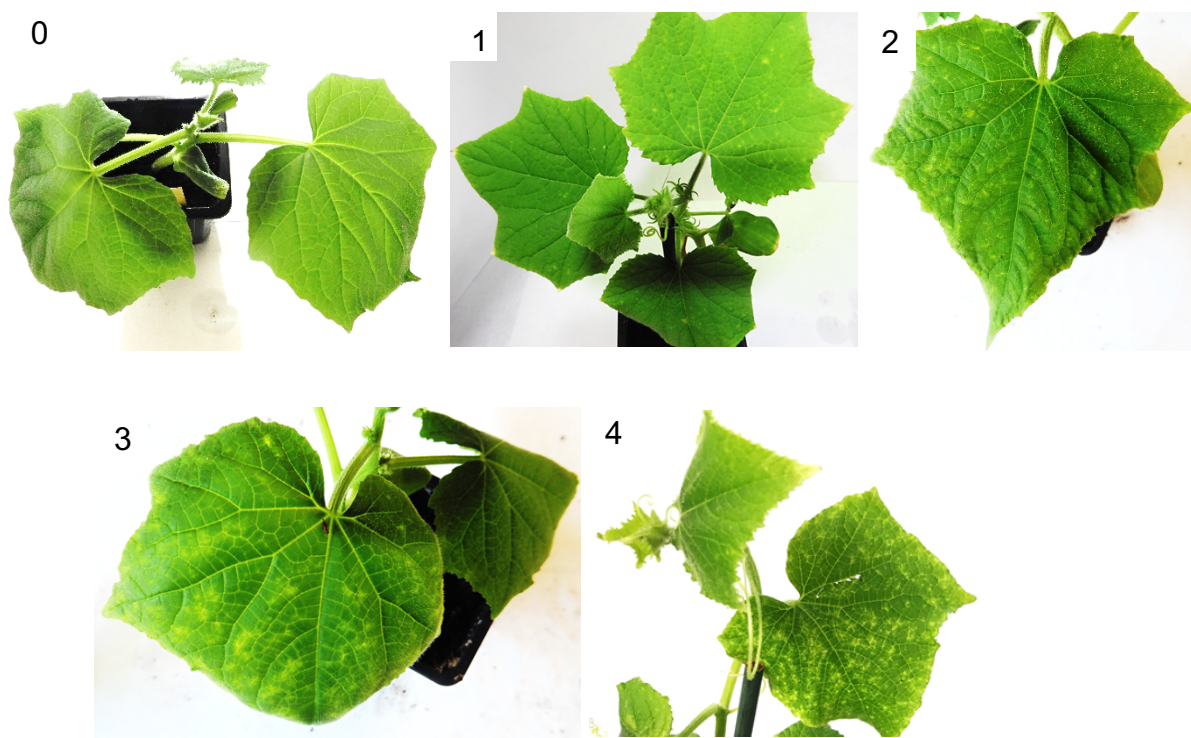
Para preparar el inóculo, 1 g de tejido de hoja infectada de MU-CU-16 se trituró junto con tampón de inoculación (50 mM fosfato potásico pH 8,0, 1% polyvinylpyrrolidone-10, 1% polietilenglycol-6000, 10 mM 2- mercaptoetanol y 1% carbón activo) en una proporción 1:5 de hojas infectadas:tampón (*w:v*). Este proceso se realizó en hielo para que el virus no perdiese infectividad. En las plantas a evaluar se inoculó 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 realizó frotando un bastoncillo impregnado con el inóculo en el cotiledón y la hoja mencionados. Se utilizaron cinco plantas de ambos

parentales y diez de una entrada de calabacín muy susceptible a la inoculación mecánica con el fin de comprobar que tanto la preparación del inóculo como el proceso de inoculación se habían realizado correctamente. Las plantas inoculadas se mantuvieron en las cámaras en las mismas condiciones de crecimiento hasta pasados 30 días post-inoculación (dpi).

### 3.3. Estudio de la sintomatología y detección del ADN viral

#### 3.3.1. Evaluación visual de los síntomas

Se realizó una evaluación visual de los síntomas de las plantas inoculadas a 15 y 30 dpi. Se usó una escala numérica del 0, ausencia de síntomas al 4, síntomas muy severos o planta muerta (López *et al.*, 2015). Las diferentes clases según la severidad de los síntomas de esta escala se puede observar en la **Figura 11**.



**Figura 11.** Escala de síntomas generados por el ToLCNDV en pepino; 0, planta sana, sin síntomas; 1: síntomas leves; 2: síntomas moderados; 3: síntomas severos; 4: síntomas muy severos o planta muerta.

#### 3.3.2. Hibridación mediante ribosondas

Esta técnica fue la que se utilizó en este trabajo para la detección del ADN viral. Consiste en una inmunopresión de tejido en membrana, comúnmente se conoce como técnica “*tissue printing*”. 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 digoxigenina. 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/cm<sup>2</sup> por ambas caras y se guardó en papel de filtro para su posterior hibridación.

### 3.3.2.1. Hibridación, lavados y revelado

Las membranas impregnadas con las muestras vegetales, se introdujeron con mucho cuidado, en tubos de vidrio. Una vez inmersas en las distintas soluciones de prehibridación e hibridación se mantuvieron en hornos de rotación horizontal para que la solución mojara continuamente toda la superficie.

Las membranas se sometieron a un proceso de prehibridación durante 2 h a 68° C utilizando 10 ml de la solución detallada en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** 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 <sub>2</sub> O estéril miliQ

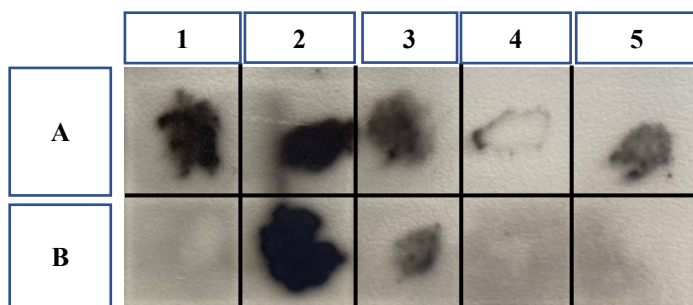
A continuación, se eliminó la solución de prehibridación y se añadió la misma solución con la sonda de RNA (25 ng/ml) marcada con digoxigenina. Esta sonda corresponde al gen AV1 del ADN-A del virus que codifica la proteína de la cápsida. Las sondas de ARN son preferibles respecto a las de ADN debido a que las hibridaciones ADN:ARN tienen lugar a 56° C, mientras que las hibridaciones ADN:ADN se realizan a 42° C, aumentando en este caso las hibridaciones inespecíficas y la aparición de falsos positivos.

La solución de hibridación se mantuvo durante toda la noche (16 h) a 56° C en el horno de rotación. Tras sacar la sonda, la membrana se lavó dos veces durante 5 minutos 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 minutos.

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 minutos 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 minutos. A continuación, se incubó la membrana durante 30 minutos con 30 ml de Buffer T2 conteniendo el anticuerpo antidigoxigenina (dilución 1:10.000). Seguidamente se hicieron 2 lavados de 15 minutos 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 minutos. Finalmente, la membrana se incubó durante 5 minutos 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 en la cámara oscura del COMAV.

### 3.3.2.2. Análisis de datos

Para evaluar la carga viral a partir de las membranas de hibridación por *tissue printing* se siguió una escala de 0 a 3, siendo 0 ausencia de señal y 3 presencia intensa de señal. La intensidad de las señales detectadas se cuantificó como se muestra en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Resultados de hibridación molecular por *tissue printing* con RNA-dig a 15 dpi de algunas muestras de la población F2. A1, A2 y B2 tienen una puntuación de 3; A3, A5, B3 tienen puntuación de 2; A4 tiene una puntuación de 1. El resto tienen una puntuación de 0.

### 3.4. Extracción de ADN mediante método CTAB

La extracción del ADN de las plantas se realizó mediante el método de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) adaptado (Doyle y Doyle, 1991). En un tubo Eppendorf de 2 ml se introdujeron 50-100 mg de tejido vegetal procedente de la hoja apical de cada una de las plantas a analizar y se añadió una bola de vidrio de 3 mm de diámetro. El tubo se congeló rápidamente con nitrógeno líquido y posteriormente el tejido se trituró con un homogeneizador Retsch (MM300) durante 1 minuto a  $30 \text{ s}^{-1}$ .

A cada Eppendorf con tejido triturado se añadieron 700  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción (CTAB-Lysis buffer BioChemica, PanReac) y 1,4  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y se incubó a  $65^\circ \text{C}$  durante 30 minutos. Seguidamente, se añadieron 700  $\mu\text{l}$  de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó de forma vigorosa en un vórtex y la mezcla se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 minutos, para recuperar la fase acuosa. Luego se añadió 1  $\mu\text{l}$  de RNAsa y se mantuvo durante 25 minutos a  $37^\circ \text{C}$  en estufa. El ADN se precipitó con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío, se incubó a  $-20^\circ \text{C}$  durante 15 minutos y el ADN se recuperó por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de Tris 5 mM pH 8,5, y se almacenó temporalmente a  $4^\circ \text{C}$  para facilitar la resuspensión.

### 3.5. Cuantificación del ADN y ajuste de la concentración

Para cuantificar el ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Nanodrop Technologies), en el que se usaron alícuotas de 2  $\mu\text{l}$  por muestra para conocer la concentración de ADN. Se confirmó la calidad y pureza del extracto mediante valores de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm en torno a dos. La relación 260/280 indica la cantidad de proteína, es decir, la relación de absorbancia de la cantidad de ADN medida a 260 nm sobre la cantidad de proteína media a 280 nm. Mientras que los valores de absorbancia 260/230 Relación de absorbancia de la cantidad de ADN medida a 260 nm sobre la cantidad de ARN medida a 230 nm. Las muestras de diluyeron a una concentración final 14 ng/  $\mu\text{l}$ .

### 3.6. Diseño de la plataforma de genotipado mediante SNPs

Para genotipar las poblaciones segregantes se seleccionaron marcadores de tipo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) a partir de dos fuentes: un ensayo de genotipado por secuenciación (GBS) llevado a cabo por los grupos de mejora genética de cucurbitáceas-virología del COMAV, en el que se incluía la accesión BGV011742, y los datos disponibles de un ensayo de GBS realizado para caracterizar la colección de pepino del Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas (NPGS) de Estados Unidos (Wang *et al.*, 2018).

Entre las accesiones analizadas, el genotipo indio PI 197087 es el mismo que la accesión CGN23089 guardada en la colección de germoplasma de CGN, como se describe en los datos de pasaporte de ambos bancos de germoplasma (<https://cgngenis.wur.nl> (consultado el 28 de febrero de 2021) ; <https://www.ars-grin.gov/> (consultado el 14 de febrero de 2021). Ambas secuencias se alinearon con el genoma del pepino Gy14 v.2 disponible en Cucurbit Genomics Database (<http://cucurbitgenomics.org>; (consultado el 15 de marzo de 2021) utilizando la herramienta Bowtie2, y mediante Freebayes versión 1.0.2 (Garrison *et al.*, 2012) se identificaron las variantes de tipo SNP.

Se diseñó un panel de 47 SNPs repartidos por los siete cromosomas del genoma de pepino que se usaron para genotipar los parentales utilizados en este trabajo y las poblaciones segregantes F<sub>2</sub> y BCs, utilizando el sistema Agena Bioscience iPLEX® Gold MassARRAY (Agena Biosciences, CA, EE. UU) en el sistema de epigenética y genotipado de la Unidad de la Universidad de Valencia (Unitat Central d'Investigació en Medicina (UCIM), Facultad de Medicina, Málaga, España).

### 3.7. Análisis de QTLS

Los resultados del genotipado de la población F<sub>2</sub> se utilizaron para construir un mapa genético utilizando la función de mapa de Kosambi en MAPMAKER 3.0 (Lincoln *et al.*, 1992), y se realizó un análisis de QTLS aplicando el método de mapeo por intervalos compuestos (CIM) en Qgene 4.0 (Joehanes *et al.*, 2008).

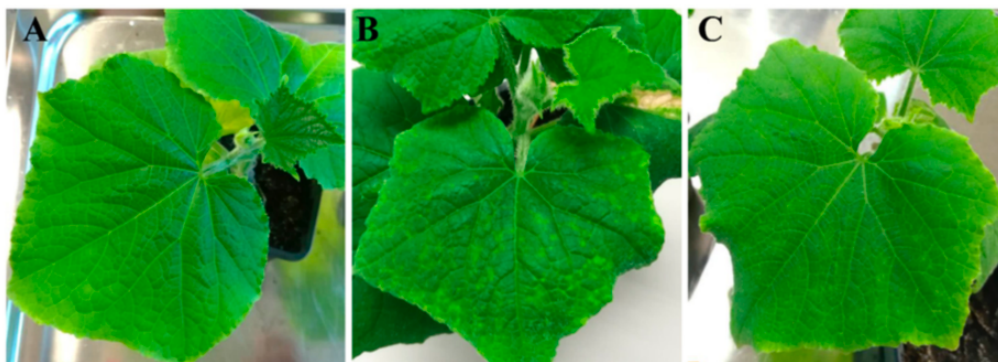
La puntuación de síntomas, la carga viral de ToLCNDV a 15 dpi y el carácter cualitativo de resistencia, asignando a cada planta una categoría global de, 0 si el fenotipo era susceptible y 1 si era resistente, se utilizaron para identificar marcadores ligados a la resistencia a ToLCNDV. El umbral del LOD se calculó mediante un test de 1000 permutaciones por carácter, con  $p < 0.05$ . El porcentaje de la varianza fenotípica explicada ( $R^2$ ), los efectos de aditividad y dominancia y la posición del intervalo del QTL, con un valor LOD superior a la del LOD umbral significativo, se calcularon para el pico con mayor valor de LOD en cada QTL.

Se calcularon las medias de las puntuaciones de los síntomas y *tissue printing* a 15 dpi de las plantas BC<sub>CGN23089</sub> para los SNP más cercanos al pico del QTL, de acuerdo con cada clase genotípica (b y h). Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre medias ( $p \leq 0,05$ ), se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de rango múltiple (LSD) utilizando el software estadístico STATGRAPHIC 18™ (Statgraphics Technologies).

En el presente trabajo Final de Máster se pretende estudiar la herencia genética de la resistencia al virus ToLCNDV en pepino mediante el fenotipado, según sintomatología y acumulación viral, y el genotipado de poblaciones segregantes tipo  $F_2$  y retrocruce BC.

#### 4.1. Respuesta del híbrido $F_1$ a la transmisión mecánica de ToLCNDV

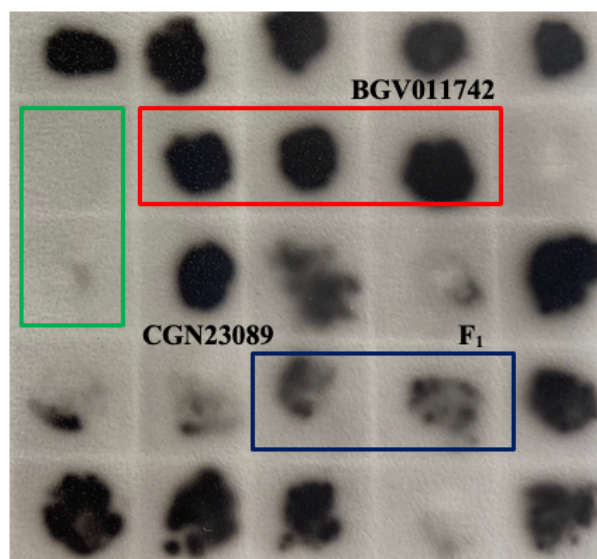
El híbrido  $F_1$  derivado del cruce CGN23089 x BGV011742, se inoculó mecánicamente con ToLCNDV. Las plantas  $F_1$  (CGN23089 x BGV011742) desarrollaron una sintomatología moderada (dos en la escala de síntomas) a 15 dpi y se observó el mismo comportamiento hasta el final del ensayo (**Figura 13**).



**Figura 13.** (A) Planta asintomática de la accesión resistente CGN23089 15 días después de la inoculación mecánica (dpi) con ToLCNDV. (B) Planta sintomática de la accesión susceptible BGV011742. (C) Síntomas en una planta  $F_1$  procedente del cruce CGN23089 x BGV011742 a 15 dpi.

La carga viral promedio en el híbrido  $F_1$  fue menor que en las accesiones susceptibles, con un valor 1 o 2 en la escala de concentración viral. En la **Figura 14** se muestra una representación de la intensidad de señal de hibridación en la membrana. En el parental resistente se observa escasa o nula intensidad de señal (color verde), con un valor en la escala de 0. En cambio, en el parental susceptible, se observa una intensidad de señal alta (color rojo); con un valor en la escala de 3. En el caso del híbrido  $F_1$ , se observa una intensidad de señal media, oscilando en la escala entre valores 1 o 2. Estos resultados, sugieren que la resistencia identificada en la accesión CGN23089 se hereda siguiendo un control genético de carácter recesivo.

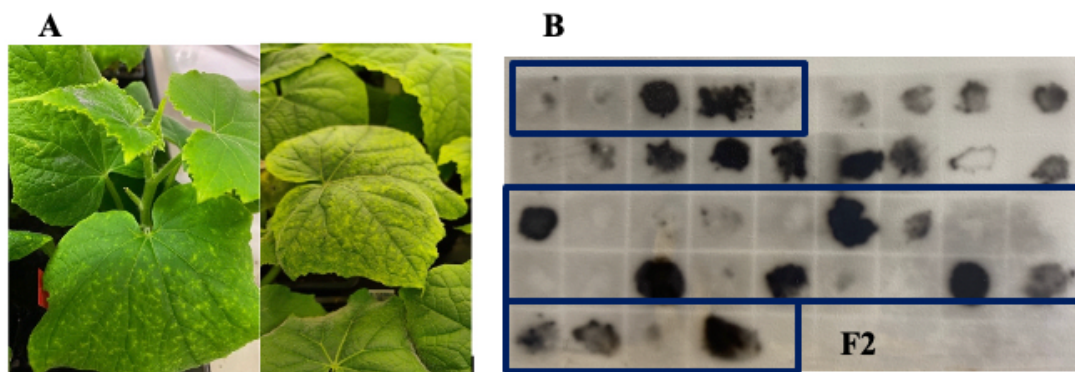




**Figura 14.** Representación de la intensidad de la señal de hibridación en la membrana de los parentales e híbrido a los 15 dpi. Parental resistente (CGN23089) en color verde, parental susceptible (BGV011742) en color rojo, e híbrido  $F_1$  (CGN23089 x BGV011742) en color azul.

## 4.2. Respuesta de las poblaciones segregantes a la transmisión mecánica de ToLCNDV

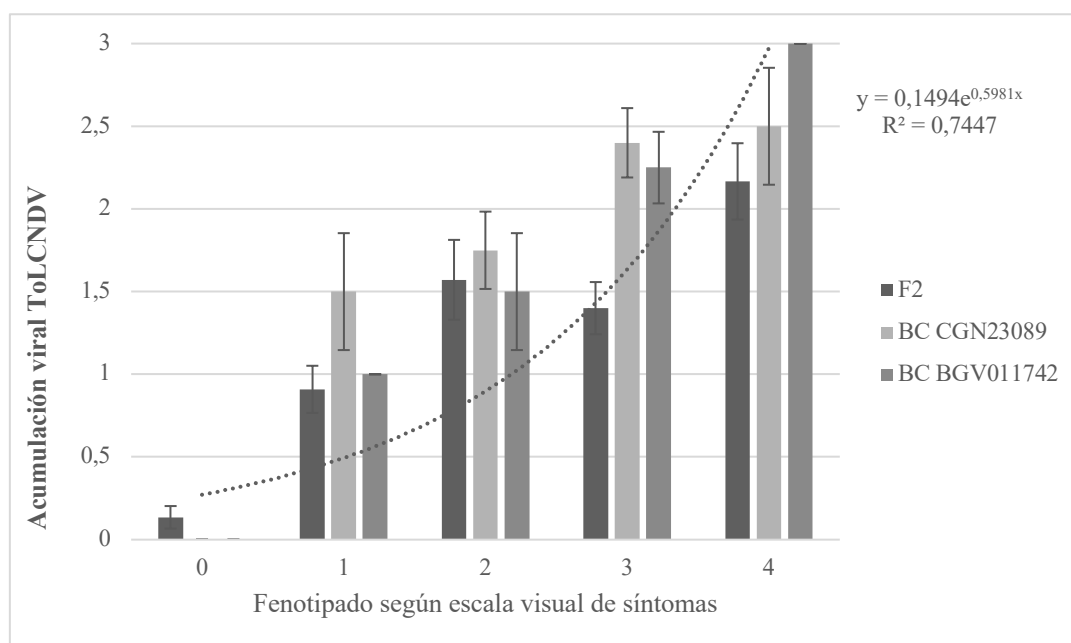
Después de la inoculación mecánica del ToLCNDV, tanto en la población  $F_2$  como en la población  $BC_{CGN23089}$  se observó segregación para el desarrollo de síntomas (**Figura 15A**) y carga viral (**Figura 15B**), mientras que todas las plantas analizadas de la población  $BC_{BGV011742}$  desarrollaron síntomas severos y una alta acumulación viral (datos no mostrados).



**Figura 15.** A) Plantas de pepino susceptibles a ToLCNDV tras la inoculación mecánica. Individuos con síntomas de puntuación 3 de la población segregante  $F_2$ . B) Membrana a los 15 dpi de individuos de la población segregante  $F_2$ .

El número de plantas resistentes y susceptibles observadas en cada población segregante según sintomatología y carga viral se muestra en la **Tabla 3**. Al final del ensayo, 30 plantas de la población  $F_2$  permanecieron asintomáticas y no se detectó acumulación viral (puntuaciones de 0) y 70 mostraron sintomatología de moderada a grave (puntuaciones de 1 a 4). Esta segregación se ajusta a una relación esperada de 1:3 (resistente:susceptible), compatible con un sólo gen recesivo que controla la resistencia ( $p=0,109$ ) (**Tabla 3**). En promedio, la acumulación viral se correlacionó con la gravedad

de los síntomas siguiendo un modelo exponencial ( $y=0,1494e^{0,5981x}$ ,  $R^2= 0,7447$ ) con valores de carga viral máxima (puntuación 3 en la escala) en plantas susceptibles (**Figura 16**). En la población BC<sub>CGN23089</sub>, 33 plantas mostraron un comportamiento resistente (puntuaciones de 0) y 22 desarrollaron síntomas muy severos (puntuaciones de 1 a 4), ajustándose a la segregación esperada de 1:1 para un control monogénico recesivo ( $p = 0,08$ ) (**Tabla 3**).



**Figura 16.** Promedio de la acumulación viral determinada mediante *tissue printing* al final del experimento en plantas F<sub>2</sub> (CGN23089 x BGV011742) (barras negras oscuras), BC<sub>CGN23089</sub> (barras grises), y BC<sub>BGV011742</sub> (barras más claras) en cada puntuación en la escala de sintomatología. La línea punteada muestra la línea de tendencia ajustada a un modelo exponencial en la población F<sub>2</sub>.

**Tabla 3.** Número de plantas resistentes y susceptibles en cada población segregante según el desarrollo de los síntomas y la acumulación viral de ToLCNDV. La probabilidad del valor  $\chi^2$  se calculó para la proporción esperada de un gen recesivo que controla la resistencia.

Poblaciones	Resistentes	Susceptibles	Frecuencias Esperadas	$\chi^2$
F <sub>2</sub>	30	70	1:3	1,332 ( $p=0,239$ )
BC <sub>CGN23089</sub>	33	22	1:1	2,2 ( $p=0,128$ )
BC <sub>BGV015107</sub>	0	14	-	

#### 4.1. Genotipado por GBS y Agena Bioscience

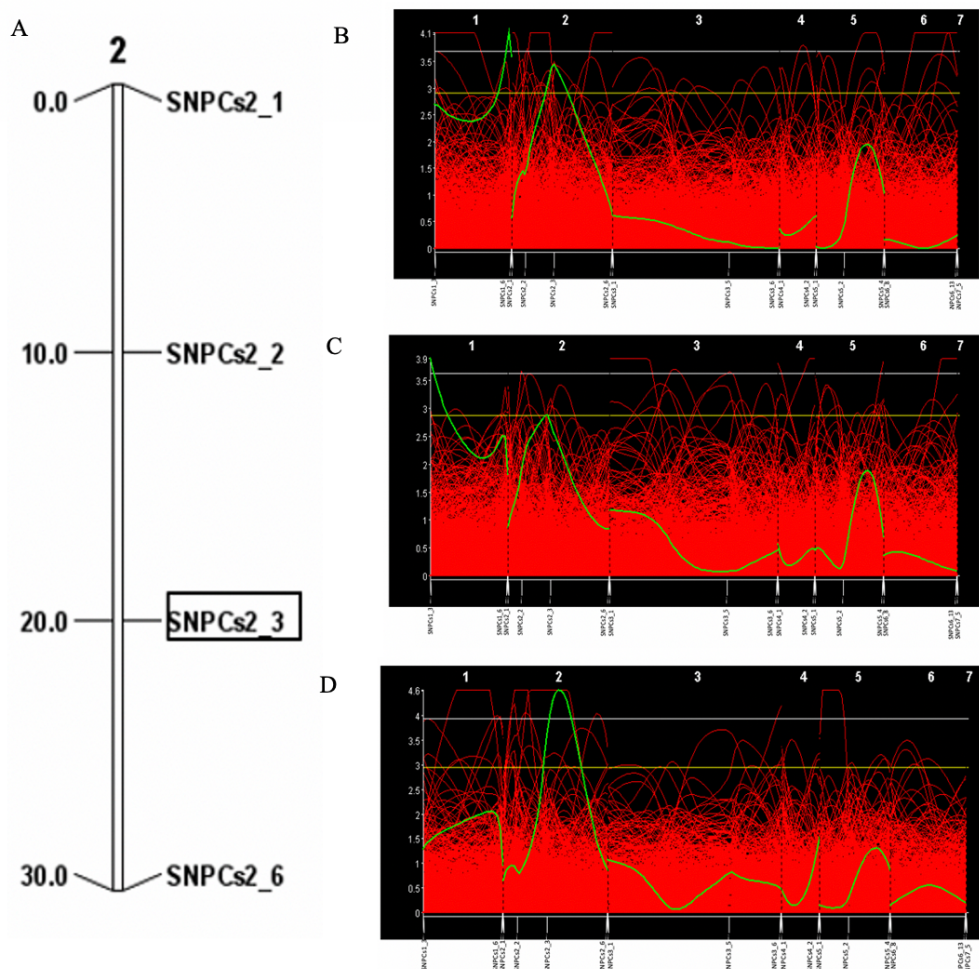
Después de genotipar las poblaciones F<sub>2</sub> y BC<sub>CGN23089</sub> con los 47 marcadores SNP distribuidos uniformemente por el genoma de *C. sativus*, sólo 17 SNP resultaron polimórficos entre las accesiones CGN23089 y BGV011742. Los resultados genotípicos de F<sub>2</sub> se utilizaron para construir un mapa de ligamiento de los siete cromosomas del pepino, abarcando un total de 554 cM de distancia genética con una media de 34,67 cM entre marcadores (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Lista de SNPs polimórficos en la población F<sub>2</sub> (CGN23089 x BGV011742), su posición física según la Versión 2 del genoma del pepino Gy14 (<http://cucurbitgenomics.org>), las posiciones en el mapa genético calculadas utilizando la función de Kosambi, y la secuencia de los flaquea.

SNP	Chromosome	Genomic position	Genetic position	Flanking sequence
SNPCs1_3	Chr1	10.533.072	0	...TTGATGACAACCAA[C/G]TAAATAAACGA...
SNPCs1_6	Chr1	32.977.672	59,1	...AAATTTTTAACGAT[C/A]ATTTATATTAG...
SNPCs2_1	Chr2	3.292.488	0	...ATTGAGGTGAAGTT[T/G]GTTATTTGACT...
SNPCs2_2	Chr2	7.621.439	10,8	...GATGAAATTTACTC[C/T]TTTTTCGACTTT...
SNPCs2_3	Chr2	12.760.375	32,7	...TTCATATTATTCTA[G/C]GAGCTTGACAA...
SNPCs2_6	Chr2	32.006.615	77,1	...TCACAATGCTTACC[A/G]AATAAGCAATG...
SNPCs3_1	Chr3	268.497	0	...ACAATGAATCATT[A/C]GGAATTTGTGA...
SNPCs3_5	Chr3	30.060.899	89,5	...AGTTGACCAAGCCC[A/T]TGCAAGGTAT...
SNPCs3_6	Chr3	38.387.600	127,7	...AGTTGAGCTCGTTT[A/T]TGGGAGATTGA...
SNPCs4_1	Chr4	1.196.307	0	...ACTTTGATCAAAGG[G/T]ATTCGTTTGAG...
SNPCs4_2	Chr4	6.322.800	28,3	...ATTATTATCTTCTT[A/G]TGCTATTATTA...
SNPCs5_1	Chr5	1.927.666	0	...TCAAACAAAATTTG[A/G]AAGAAGACGA...
SNPCs5_2	Chr5	5.406.277	21,9	...ATCATGAAATGATC[G/A]CTACCCTTGG...
SNPCs5_4	Chr5	23.243.492	52,3	...CTAAAAACCAGCAG[A/C]TTCATCGTCCA...
SNPCs6_8	chr6	6.705.461	0	...CATTAAAAGAATCA[C/T]ACAACCTTGACGT...
SNPCs6_13	Chr6	28.011.458	55,8	...GGGATTCCTTTTTG[G/C]CCTATAAAGTTG...
SNPCs7_5	Chr7	19.195.878	0	...GTATGTTGATCTAC[A/T]TAAATCTCCTCCT...

#### 4.1.1. Análisis de QTLs

Para identificar las regiones genómicas vinculadas a la resistencia a ToLCNDV en pepino se realizó un análisis de QTLs. Los caracteres analizados de síntomas, acumulación viral y el carácter cualitativo de resistencia, mostraron una asociación significativa con tres QTLs localizados en la misma región del cromosoma 2 (**Figura 17**), con valores de pico LOD comprendidos entre 2.88 y 4.43 y valores de varianza fenotípica explicada por el QTL ( $R^2$ ) comprendidos entre 13% y 20% (**Tabla 5**). Se identificaron dos QTLs adicionales en el cromosoma 1, pero al no ser significativos en el análisis de todos los caracteres, en este TFM nos hemos centrado en el estudio del QTL identificado en el cromosoma 2.



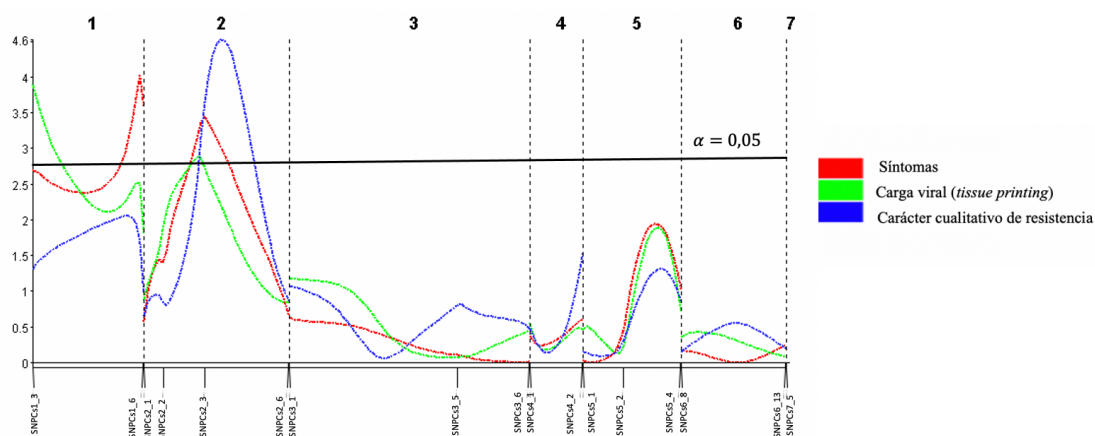
**Figura 17.** Región candidata en el cromosoma 2 de pepino vinculada a la resistencia a ToLCNDV. A: El marcador más cercano a todos los QTLs fue SNPCs2\_3, B: QTL significativo relacionado con el desarrollo de síntomas, C: QTL asociado a la acumulación de ToLCNDV, y D: QTL asociado al carácter cualitativo de resistencia.

**Tabla 5.** QTLs identificados en la población segregante  $F_2$  mediante mapeo por intervalos compuestos (CIM) en el cromosoma 2.

Tratamiento	Cr <sup>a</sup>	Marcador más cercano <sup>b</sup>	CIM				
			Intervalo del QTL (cM) <sup>c</sup>	Efecto aditivo <sup>d</sup>	Efecto dominante <sup>e</sup>	LOD <sup>f</sup>	R <sup>2g</sup>
Síntomas	2	SNPCs2_3	24-44	0.51	0.65	3.145	0.14
Carga viral (semicuantitativa)	2	SNPCs2_2	28-30	0.22	0.73	2.88	0.13
Resistencia (carácter cualitativo)	2	SNPCs2_3	30-56	-0.23	-0.57	4.52	0.20

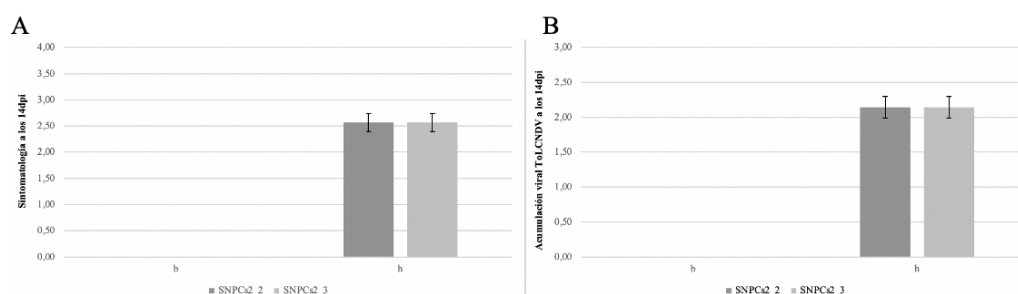
<sup>a</sup>Cromosoma; <sup>b</sup>marcador más cercano al pico LOD; <sup>c</sup> posiciones entre las que se encuentra comprendido el QTL en cM; <sup>d</sup>efecto aditivo del alelo BGV011742; <sup>e</sup> efecto dominante del alelo BGV011742; <sup>f</sup> LOD: logaritmo mas alto de la puntuación de probabilidades; <sup>g</sup>R<sup>2</sup> porcentaje de la varianza fenotípica explicada por el QTL.

El marcador más cercano a todos los QTLs identificados fue SNPCs2\_3 (posición física 12,760,375 pb). Considerando las regiones con un valor significativo de LOD, el intervalo del QTL fue delimitado entre 15,312,450 pb y 35,729,050 pb posiciones genómicas (**Figura 18**).



**Figura 18.** Análisis QTL de la población  $F_2$  (CGN23089 x BGV011742) como caracteres los valores de síntomas, carga viral y resistencia cualitativa.

Para validar el efecto del QTL identificado en el cromosoma 2 en la población  $BC_{CGN23089}$ , la puntuación media de la sintomatología y la acumulación de la carga viral se calcularon para los dos marcadores SNPs más cercanos al intervalo QTL identificado (SNPCs2\_2 y SNPCs2\_3). El nivel más bajo de síntomas y carga viral se observó en plantas con genotipo homocigótico (b) para ambos marcadores, mientras que en plantas heterocigotas (h) para cualquiera de estos marcadores se observaron síntomas más severos, así como mayor carga viral de ToLCNDV (**Figura 19**).



**Figura 19.** Media de la puntuación sintomatológica (A) y acumulación de la carga viral en  $BC_{BGV011742}$  dependiendo del marcador (SNPCs2\_2, SNPCs2\_3) en el cromosoma 2. En el eje de la x, el genotipo homocigoto para el alelo CGN23089 se representa como “b”, el genotipo heterocigotos se representa como “h”. Barras con la misma letra muestran medias que no son diferentes significativamente  $p \leq 0,0$

# 5

## Discusión

En este Trabajo Final de Máster se ha estudiado el modelo de herencia que controla la resistencia al virus de ToLCNDV en la accesión CGN23089 de pepino.

El primer paso para la producción de cultivares resistentes es la búsqueda de fuentes de resistencia. Encontrar resistencias en *C. sativus* no es raro, ya que esta especie se ha utilizado con frecuencia para la búsqueda de diferentes fuente de resistencia a diferentes virus en cucurbitáceas. Trabajos previos han examinado el germoplasma de pepino para determinar su resistencia a enfermedades virales como varios *potyvirus* (Provvidenti 1985). Por ejemplo, se han identificado genes de resistencia a diferentes *potyvirus* principalmente en tres accesiones de pepino: "Suriman", "Taichung Mou Gua" (TMG-1) y "Dina-1" (Weng y Wehner 2017). En la línea endogámica del pepino "02245", Tian *et al.*, encontraron un locus que controla la resistencia al virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) (2015) y otro que controla la resistencia al virus del mosaico de la sandía (WMV) (2016), ambos recesivos. En la misma línea, la resistencia al *cucumovirus* (CMV) se hereda cuantitativamente (Shi *et al.* 2018) y en *C. sativus* var. *hardwickii* Munshi *et al.*, (2008) identificaron la resistencia al CMV controlada por un solo gen recesivo. Además, se ha informado de resistencia al CVYV en la variedad local española C.sat-10 (Picó *et al.* 2003), al CYSDV controlado por más de un gen recesivo (Aguilar *et al.* 2006) y en dos accesiones indias de *C. sativus*. a CGMMV (Crespo *et al.* 2018).

Este trabajo se centra en la búsqueda de la región de la resistencia genética a ToLCNDV en pepino, para poder crear así variedades resistentes a la enfermedad con un importante valor comercial. Por ello, a partir de las poblaciones segregantes generadas, se estudió su fenotipado y su acumulación viral tal y como se procedió en estudios anteriores en melón (Sáez *et al.*, 2017) y calabaza (Sáez *et al.*, 2020).

Normalmente, los parámetros de fenotipado visual y de acumulación de carga viral, estaban correlacionados; es decir, plantas que mostraban altos síntomas del virus con valor 3-4 dentro de la escala (López *et al.*, 2015), también mostraban valores altos en la acumulación de la carga viral mediante la metodología empleada *tissue printing*. Pero es cierto, que no siempre se daba el caso. Curiosamente, había individuos en la población segregante F<sub>2</sub> que fenotípicamente no mostraban una sintomatología severa, pero sí se mostraba una alta acumulación viral en el revelado de membrana. Esto puede ser así ya que diferentes individuos 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).

Por tanto, aunque no exista en algunos casos 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. 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). Esto podría explicar lo que ocurre en cuanto a la relación de individuos con síntomas muy leves de virus pero con cantidades significativas del virus tras su estudio en el revelado de membrana. Esto podría aumentar la posibilidad de una mayor propagación del virus en los cultivos, ya que las plantas aparentan estar sanas, pero en su genoma esta realmente presente el virus.

El análisis de la generación F<sub>1</sub> derivada de la accesión resistente CGN23089 sugiere que la resistencia al ToLCNDV que se encuentra en el pepino también es recesiva. Es interesante notar que el control recesivo de la resistencia es frecuente en varios sistemas de resistencia a virus. Los genes de resistencia recesiva interfieren en el ciclo de vida viral a diferentes niveles: movimiento unicelular, de célula a célula, transporte a larga distancia a través de la planta y / o evitando altos niveles de acumulación de virus (Díaz-Pendón *et al.* 2003). En el pepino, el mecanismo de resistencia al ToLCNDV se caracteriza por una reducción drástica y significativa de la acumulación del virus y las plantas infectadas son asintomáticas o presentan síntomas leves de la enfermedad. Este tipo de resistencias es similar al observado en el resto de las resistencias identificadas en el patosistema ToLCNDV

Nuestros análisis de herencia indican que la resistencia a ToLCNDV en la accesión CGN23089 está controlada principalmente por un gen recesivo, y esto fue apoyado por la detección de un QTL en el cromosoma 2 del genoma de *C. sativus*. A pesar de que esta región se vinculó significativamente con el desarrollo de síntomas y la carga viral de ToLCNDV en pepino, el porcentaje de varianza fenotípica explicada por el QTL ( $R^2$ ) es moderado. Una densidad más alta de SNPs que cubra todo el genoma permitiría un mapeo más fino de la región candidata y probablemente podría aumentar este porcentaje. Sin embargo, los resultados obtenidos aquí, incluso con un número reducido de marcadores, contribuyen significativamente a obtener información preliminar sobre el *locus* implicado en la resistencia a ToLCNDV en pepino, y son similares a los resultados obtenidos en estudios previos de control genético de la resistencia a ToLCNDV en cucurbitáceas. En melón, se encontró un *locus* principal en el cromosoma 11 y dos regiones adicionales en los cromosomas 2 y 12 que controlan la resistencia de la accesión silvestre WM-7 del grupo Kachri (Sáez *et al.*, 2017). En una publicación reciente, (Romay *et al.* 2019) identificaron en la misma accesión india WM-7 un gen recesivo (*bgm-1*) y dos genes dominantes (*Bgm-2* y *Tolcndv*) controlando la resistencia al ToLCNDV. En *Cucurbita moschata*, se encontró un gen recesivo de efecto mayor localizado en el cromosoma 8 que controlaba la resistencia en una accesión india. Esta región candidata de *C. moschata* es sinténica a la región responsable de la resistencia a ToLCNDV en el cromosoma 11 del melón (Sáez *et al.*, 2020). Dado que ambos *loci* para la resistencia a ToLCNDV son sinténicos y comparten un grupo común de genes, buscamos este grupo con el genoma del pepino, que estaba localizado en el cromosoma 6 (de 6,527,862 pb a 6,756,572 pb posiciones genómicas). Dos SNP utilizados en este trabajo se localizan próximamente a esta región (SNPCs6\_8 y SNPCs6\_7, a 6.705.461pb y 7.276.564 pb, respectivamente), pero ninguno de ellos se asoció significativamente con la resistencia a ToLCNDV.

Nuestros datos pueden ser validados debido a la existencia de una patente publicada en febrero de 2021, acerca de la resistencia genética de ToLCNDV en pepino. La invención se refiere a *Cucumis sativus* var. *sativus* tolerante al virus ToLCNDV, que comprende en su genoma la combinación de un primer locus de rasgos cuantitativos

(QTL1) en el cromosoma 1, y un segundo QTL en el cromosoma 2 en el que confiere a la planta tolerancia a ToLCNDV (Paz *et al.*, 2021). Como se ha visto en el presente Trabajo Final de Máster, la resistencia al ToLCNDV viene explicada por la región cromosómica 2 (QTL2). Por lo que, cabe destacar, que dos equipos de investigación diferentes han llegado a los mismos resultados. De esta manera, podríamos asegurarnos de que estamos en lo cierto, es decir, que la resistencia genética al virus en cuestión se encuentra en el cromosoma 2.

Esta región identificada de resistencia genética a ToLCNDV en este trabajo, se ve asociada con diferentes genes de resistencia. Entre la lista de genes en la región candidata del cromosoma 2 del pepino, hay tres serina / treonina-proteína quinasas similares al receptor LRR (CsGy2G012160, CsGy2G015920 y CsGy2G016150) implicadas en la resistencia a ToLCNDV y otros virus de la familia *Geminiviridae* (Kundu *et al.*, 2012; Kushwaha *et al.*, 2015; Jeevalatha *et al.*, 2017; Yamaguchi *et al.*, 2018), cuatro factores de transcripción del dominio NAC (CsGy2G015830, CsGy2G016100, CsGy2G016110 y CsGy2G016220), familia de genes asociados con un aumento en la susceptibilidad de la planta de tomate durante la infección por ToLCNDV y resistencia a un *begomovirus* en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) (Bhattacharjee *et al.*, 2017; Soler-Garzón *et al.*, 2021), y una proteína de metilación del ADN dirigida por ARN (CsGy2G016290.1), uno de los componentes de la vía de silenciamiento del ARN utilizada contra virus de plantas en la respuesta de defensa (Erdmann *et al.*, 2020). Más interesante aún, una subunidad 12 reguladora no ATPasa del proteasoma 26S (CsGy2G015260) que está incluida en esta región. En tomate, una subunidad proteasomal 26S RPT4a (SIRPT4) interfiere con la transcripción del genoma de ToLCNDV e induce la respuesta hipersensible (Sahu *et al.*, 2016). Aunque la proteína SIRPT4 tiene una actividad ATPasa activa, se debe explorar más a fondo un posible efecto de CsGy2G015260 contra la infección por ToLCNDV.

Próxima a esta región encontrada de resistencia genética a ToLCNDV, se encuentra un gen de bastante interés, el gen PELOTA. Su posición en el genoma se encuentra en el cromosoma 2, concretamente en 7,188,514 pb y 7,197,426 pb. Este gen fue descubierto y utilizado por Lapidot *et al.*, en 2015 para la mejora de plantas de tomate susceptibles a TYLVC. Como ya se conoce, el tomate es uno de los cultivos alimentarios más importantes a nivel mundial, aportando fitonutrientes y color a nuestra dieta. El virus del rizado de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) es uno de los virus más devastadores de los tomates cultivados y un factor limitante clave para la producción de tomates en las principales áreas de cultivo de tomates. El manejo del TYLCV es difícil porque sus poblaciones de vectores de mosca blanca pueden alcanzar un gran número y depende en gran medida de la aplicación de productos químicos peligrosos (insecticidas). El mejoramiento de cultivares de tomate resistentes al TYLCV proporciona una estrategia atractiva y respetuosa con el medio ambiente para reducir las pérdidas de rendimiento causadas por el virus. Se han invertido considerables esfuerzos en el mejoramiento de cultivares de tomate resistentes al TYLCV. El descubrimiento y la utilización de genes que controlan la resistencia pueden acelerar el proceso de reproducción y destacar los medios innatos para promover dicha resistencia. En este estudio, se informa del descubrimiento del gen que controla la resistencia a TYLCV en el locus *ty-5*. Se encontró que el factor de vigilancia del ARN mensajero *Pelo* es responsable de esta resistencia (Lapidot *et al.*, 2015). Resulta interesante conocer su posición en el genoma ya que se podrían diseñar nuevos SNPs concretos para el gen PELOTA. Por tanto, resultaría de utilidad para investigaciones futuras cuando se pretenda aumentar el número de marcadores moleculares.



Nuestra primera aproximación a genes candidatos responsables de la resistencia a ToLCNDV se está ampliando con nuevos ensayos de secuenciación, que proporcionarán nuevos marcadores moleculares para mapear con precisión el QTL identificado y facilitar la selección asistida por marcadores para transferir la resistencia a ToLCNDV a variedades de pepino comerciales.

# 6

## *Conclusiones*

Las conclusiones que podemos extraer de los ensayos descritos en el presente Trabajo fin de Máster son las siguientes:

1. La transmisión del ToLCNDV a las diferentes poblaciones segregantes de la especie *Cucumis sativus* se ha realizado eficazmente mediante inoculación mecánica.
2. La resistencia a ToLCNDV en la accesión CGN23089 se hereda siguiendo un modelo monogénico recesivo.
3. Un QTL en el cromosoma 2 de *C. sativus* controla la resistencia a ToLCNDV en CGN23089, y se requieren más análisis para estrechar esta región e identificar genes candidatos.
4. Estos SNPs descritos, ligados a la resistencia genética del virus de Nueva Delhi, pueden ser usados en programas de mejora, para obtener plantas de pepino tolerantes al virus.

# 7

## *Bibliografía*

- Bhattacharjee, P.; Das, R.; Mandal, A.; Kundu, P. (2017) Functional characterization of tomato membrane-bound NAC transcription factors. *Plant Mol. Biol.*
- Cech, M., Branisova, H. (1976) Non relatedness between symptoms and cucumber virus 4 content in different cucumber cultivars. *Biol Plant (Praha)*.
- Crespo, O., Janssen, D., Robles, C. And Ruiz, L. (2018). Resistance to Cucumber green mottle mosaic virus in *Cucumis sativus*. *Euphytica*, 214.
- De Barro, P.J.; Liu S.S.; Boykin, L.M.; Dinsdale, A.B. (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56.
- Erdmann, R.M.; Picard, C.L. (2020) RNA-Directed DNA Methylation. *PLoS Genet.*
- Dhillon, N.P.S.; Monforte, A.J.; Pitrat, M.; Pandey, S.; Singh, P.K.; Reitsma, K.R.; García-Mas, J.; Sharma, A.; McCreight, J.D. (2012) Melon landraces of India: contributions and importance. In Janick, J. (ed). Wiley, Hoboken. *Plant Breed. Rev.*
- 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.
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*.
- 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*.
- Islam, S.; Munshi, A.D.; Verma, M.; Arya, L.; Mandal, B.; Behera, T.K.; Kumar, R.; Lal S.K. (2010) Genetics of resistance in *Luffa cylindrica* Roem. against tomato leaf curl New Delhi virus. *Euphytica*
- Janssen D. Y Ruiz L. (2014) ToLCNDV: un nuevo virus de cucurbitáceas en España transmitido por mosca blanca. *Almería en VERDE*, 116.
- 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>).

- Jeevalatha, A.; Siddappa, S.; Kumar, A.; Kaundal, P.; Guleria, A.; Sharma, S.; Nagesh, M.; Singh, B.P. (2017) An insight into differentially regulated genes in resistant and susceptible genotypes of potato in response to tomato leaf curl New Delhi virus-[potato] infection. *Virus Res.*
- Juárez, M.; Gosalvez, 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.
- Kundu, A.; Pal, A. Identification and characterization of elite inbred lines with MYMIV-resistance in *Vigna mungo*. (2012) *Field Crops Res.*
- 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. *Arch. Virol.*
- Lapidot M, Karniel U, Gelbart D, Fogel D, Evenor D, Kutsher Y, et al. (2015) A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota.
- Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. & Bello, A. (1996) Patología vegetal. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma-España.
- 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*.
- Lincoln, S.; Daly, M.; Lander, E. (1992) Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report 3rd edn. Whitehead Institute, Cambridge, Massachusetts
- MAPA. 2021. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Producciones agrícolas. (2021) (<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/>)
- Martín-Hernández, A.M., Picó, B. (2021) Natural Resistances to Viruses in Cucurbits. *Agronomy*
- Moriones, E., Praveen, S., & Chakraborty, S. (2017) Tomato Leaf Curl New Delhi Virus: An Emerging Virus Complex Threatening Vegetable and Fiber Crops. *Viruses*.
- 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.
- Munshi, A.D.; Panda, B.; Mandal, B.; Bisht, I.S.; Rao, E.S.; Kumar, R. (2008) Genetics of resistance to cucumber mosaic virus in *Cucumis sativus* var. *hardwickii* R. Alef. *Euphytica*.

- 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*.
- Otazo González, H. and Espino de Paz, A., (2018). Virus de Nueva Delhi (ToLCNDV) en cucurbitáceas.
- Provvidenti, R. Sources of resistance to viruses in two accessions of *Cucumis sativus*. *Rep. Cucurbit Genet. Coop.* 1985.
- Pasic, M., Hojilla, C., & Yousef, G. M. (2014). Polymerase chain reaction. In *Molecular Testing in Cancer* (pp. 39-54). Springer, New York, NY.
- Paz, Z., Yogev, O., Rodríguez-Medina, A., (2021). Tolerance to ToLCNDV in cucumber (Francia, París) N. WO2021019069.
- Picó B., Díez, 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.
- Picó, B.; Villar, C.; Nuez, F.; Weber, W.E. (2003) Screening *Cucumis sativus* landraces for resistance to cucumber vein yellowing virus. *Plant Breed*
- Romay, G.; Pitrat, M.; Lecoq, Wipf-Scheibel, C.; H.; Millot, P.; Girardot, G.; Desbiez, C. (2019) Resistance against melon chlorotic mosaic virus and tomato leaf curl New Delhi virus in melon.
- Sahu, P.P.; Sharma, N.; Puranik, S.; Chakraborty, S.; Prasad, M. (2016) Tomato 26S proteasome subunit RPT4a regulates ToLCNDV transcription and activates hypersensitive response in tomato. *Sci. Rep.*
- Sáez C, Ambrosio LGM, Miguel SM, Valcárcel JV, Díez MJ, Picó B, López C. . (2021) Resistant Sources and Genetic Control of Resistance to ToLCNDV in Cucumber. *Microorganisms*
- Sáez, C.; Esteras, C.; Martínez, C.; Ferriol, M.; Narinder, P.S.D.; 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 Rep.*
- 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*.
- Sáez, C.; Martínez, C.; Montero-Pau, J.; Esteras, C.; Blanca, J.; Sifres, A.; Ferriol, M.; López, C. Picó, B. (2020) A major QTL located in chromosome 8 of *Cucurbita moschata* is responsible for resistance to tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV). *Front. Plant Sci.*

- Shi, L.; Yang, Y.; Xie, Q.; Miao, H.; Bo, K.; Song, Z.; Wang, Y.; Xie, B.; Zhang, S.; Gu, X. (2018) Inheritance and QTL mapping of cucumber mosaic virus resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.).
- 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.
- Soler-Garzón, A.; Oladzad, A.; Beaver, J.; Beebe, S.; Lee, R.; Lobaton, J.D.; Macea, E.; McClean, P.; Raatz, B.; Rosas, J.C.; et al. NAC. (2021) Candidate gene marker for bgm-1 and interaction with QTL for resistance to bean golden yellow mosaic virus in common bean. *Front. Plant Sci.*
- Sugiyama, M.; Okuda, M.; Sakata, Y. (2009) Evaluation of resistance to melon yellow spot virus in a cucumber germplasm collection. *Plant Breed.*
- Tian, G.L.; Yang, Y.H.; Zhang, S.P.; Miao, H.; Lu, H.W.; Wang, Y.; Xie, B.Y.; Gu, X.F. (2015) Genetic analysis and gene mapping of papaya ring spot virus resistance in cucumber. *Mol. Breed.*
- Tian, G.L.; Miao, H.; Yang, Y.H.; Zhou, J.; Lu, H.W.; Wang, Y.; Xie, B.Y.; Zhang, S.P.; Gu, X.F. (2016) Genetic analysis and fine mapping of watermelon mosaic virus resistance gene in cucumber. *Mol. Breed.*
- Van Vu, T., Choudhury, N. R., & Mukherjee, S. K. (2013). Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, Tomato leaf curl New Delhi virus, show tolerance to virus infection.
- Venkataramanappa, 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.
- Wang, X.; Bao, K.; Reddy, U.K.; Bai, Y.; Hammar, S.A.; Jiao, C.; Wehner, T.C.; Ramírez-Madera, A.O.; Weng, Y.; Grumet, R.; Fei, Z. (2018) The USDA cucumber (*Cucumis sativus* L.) collection: genetic diversity, population structure, genome-wide association studies, and core collection development. *Hortic. Res.*
- Weng, Y.; Wehner, T.C. (2017) Cucumber gene catalog *Rep. Cucurbit Genet. Coop.*
- Yamaguchi, H.; Ohnishi, J.; Saito, A.; Ohyama, A.; Nunome, T.; Miyatake, K.; Fukuoka, H. (2018) An NB-LRR gene, TYNBS1, is responsible for resistance mediated by the Ty-2 Begomovirus resistance locus of tomato. *Theor. Appl. Genet.*
- 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.*
- 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.*