

# Infección del CABYV en Cucurbitáceas



Autores: Jose Luis de la Rocha Ferrero, Luis Tortosa Díaz  
Tutores: Veronica Truniger, José María Caballero

## Introducción

Nuestro trabajo pretende poner a punto un protocolo de infección de cucurbitáceas con el virus CABYV utilizando como vehículo a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, capaz de llevar material genético al interior de las células de la planta. Hemos realizado este estudio en distintas especies de plantas (melón, pepino y alficóz), teniendo en cuenta varios factores. La familia Cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*) incluye algunas especies tradicionalmente usadas en alimentación, como por ejemplo el melón (*Cucumis melo*) y el pepino (*Cucumis sativus*), ampliamente cultivadas en la región de Murcia, por lo que las plagas que las afecten pueden tener repercusiones económicas importantes.

El CABYV (*Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus*) es un virus de ARN monocatenario positivo (el ARN vírico, de cadena sencilla, es al mismo tiempo ARN mensajero). Ataca a cucurbitáceas; en 2003 se encontró en el campo de Cartagena en cultivos de pepino y melón, y esa fue su primera detección en España. Los síntomas que se observan en plantas infectadas son el amarilleo de las hojas, necrosis en hojas viejas y enanismo (Fig. 1).

## Objetivos

El objetivo principal es estudiar cuáles son las condiciones más adecuadas para conseguir que el CABYV infecte a cucurbitáceas (melón, pepino y alficóz) mediante agroinfiltración.

Fig.1. Síntomas del CABYV: amarilleo en las hojas de pepino



12 x pepino: MES, sin supresor, oscuridad

12 x pepino: MES con supresor, oscuridad

12 x pepino: MES con supresor, Luz

12 x pepino: MES con supresor + 0.01% Tween (detergente), oscuridad

12 x pepino: MES con supresor + AS adicional en cultivo crecimiento, oscuridad

12 x pepino: SIM con supresor, Luz

6 x pepino/melón: SIM con supresor, Luz

6 x pepino/melón: MES con supresor + AS, Luz

12 x alficóz: SIM con supresor, Luz

Tabla 1. Distribución de los tratamientos entre las plantas de melón, pepino y alficóz que se cultivaron. MES y SIM son dos tipos de medios de cultivo. Supresor: p19. AS: acetosiringona



Trabajo realizado dentro del proyecto IDIES 2016

## Metodología

### 1. Diseño experimental

Especies de plantas utilizadas:

- Melón (*Cucumis melo*)
- Pepino (*Cucumis sativus*)
- Alficóz (*Cucumis melo flexuosus*)

Variables consideradas:

- Luz y oscuridad tras agroinfiltración
- Medios de incubación: MES/ SIM
- Ausencia o presencia de proteína supresora de silenciamiento (p19)
- Ausencia o presencia de Acetosiringona (AS) en el cultivo de *Agrobacterium*

Se cultivaron 108 macetas de melón, pepino y alficóz. La distribución de tratamientos entre las plantas se presenta en la Tabla 1.

### 2. Etapas del proceso

- Plantación de las semillas de melón, pepino y alficóz en 108 macetas.
- Infiltración con *Agrobacterium* conteniendo el material genético del virus (en realidad, cDNA). Se realiza a los 7 días. Previamente, se ha cultivado la bacteria en las condiciones establecidas por los tratamientos.
- A los 20 días, toma de muestras de material vegetal (hojas), que se conserva en nitrógeno líquido.
- Extracción de ARN de las muestras.
- Electroforesis, separación de macromoléculas mediante campos eléctricos. Esto permite confirmar la presencia e integridad del ARN.
- Transferencia a membrana e hibridación. Para la hibridación se utiliza ARN complementario al ARN vírico y marcado con dioxigenina, que posteriormente se unirá a un anticuerpo marcado que se podrá visualizar. Así se detecta la presencia de ARN viral y se puede concluir que la planta ha sido infectada por CABYV o no.

Tabla 2. Resultados de la infección de plantas de pepino por CABYV según los tratamientos aplicados.

Nº	Medio	AS	Tween	p19	Luz/Os	Nº infecciones
1-12	MES	+	-	+	Osc	4
13-24	MES	-	+	+	Osc	1
25-36	MES	-	-	-	Osc	7
37-48	SIM	-	-	+	Osc	0
49-60	MES	-	-	+	Osc	2
61-72	MES	-	-	+	Luz	0
73-78	SIM	-	-	-	Luz	0
79-84	MES	+	-	-	Luz	0

Nº	Especie	AS*	Luz/Osc	Medio	P19	Nº de infecciones
12	Alficóz	-	Luz	SIM	+	5
10	Melón Rochet	+	Luz	Mes	+	7
10	Melón Rochet	-	Luz	Sim	+	9

Tabla 3. Resultados de la infección de plantas de melón y alficóz por CABYV según los tratamientos aplicados.

## Resultados y discusión

Las plantas de pepino fueron las que se cultivaron en mayor número. Solo una pequeña parte de ellas resultaron infectadas (14 de 84, 16.7 %).

En cambio, en melón y alficóz se dio una proporción mucho más alta de infecciones (5 de 12, 41.7 %, en alficóz; 16 de 20, 80 %, en melón). Como consecuencia de trabajos y observaciones previas, en melón y alficóz se aplicó menor variedad de tratamientos que en pepino, y los que se utilizaron resultaron ser efectivos.

En cuanto a los factores que influyen en la infección, un factor determinante para el pepino ha sido la oscuridad, pues no se ha conseguido ninguna infección en plantas mantenidas con luz tras la infiltración. Por contra, las plantas de melón y alficóz se han mantenido con luz y en ellas han ocurrido numerosas infecciones. Llama la atención que un mismo factor pueda tener influencia tan distinta en especies muy próximas.

El tipo de medio (MES o SIM) también ha resultado ser determinante en las plantas de pepino, pues todas las que se han infectado lo han hecho con MES. En cambio, en el caso del melón no ha influido claramente, ya que ha habido infecciones tanto en uno como en otro.

En cuanto a la proteína supresora del silenciamiento genético, p19, se espera que favorezca la infección al bloquear mecanismos defensivos de la planta. Sin embargo, la mayor frecuencia de infecciones en pepino se ha dado en con ausencia de p19. En melón y alficóz se ha empleado en todos los casos.

Por último, tampoco está clara la influencia de la acetosiringona, que se utiliza para activar a *Agrobacterium*. Ha habido infecciones tanto con ella como sin ella, sin que se observen diferencias claras.

## Conclusiones

### Para pepino:

- En general se han obtenido mejores resultados si después de la agroinfiltración se mantenían las plantas durante 16 horas en oscuridad y con mayor humedad (envueltas en bolsa de plástico negra)
- Adicionalmente a la oscuridad, las mejores condiciones de infección se obtienen en medio MES.

### Para melón y alficóz:

- Se han obtenido mayores niveles de infección en melón que en pepino
- Los medios de incubación SIM y MES (este último con adición de acetosiringona), han dado resultados de infección similares en melón, a diferencia de lo que ocurre en pepino.

### En general:

- Las diferencias en cuanto a las condiciones adecuadas de infección para ambas especies sugieren que puede haber también diferencias claras en los mecanismos de infección de la bacteria o del virus, o de defensa de la planta.

