

Resumen

El virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) es uno de los virus más extendidos y de mayor importancia económica del mundo. Infecta a un gran número de especies vegetales, siendo los cultivos de tomate y pimiento los más afectados. Este virus se transmite de una planta a otra por medio de varias especies de trips en una manera propagativa y circulativa, siendo *Frankliniella occidentalis* el vector más eficaz. El cultivo de variedades resistente de tomate y pimiento (en los que se han introducido por mejora genética los genes *Sw-5* y *Tsw*, respectivamente) permitió el control de la enfermedad, ya que estos genes inducen una respuesta hipersensible impidiendo la infección sistémica del virus (resistencia total). Sin embargo, con frecuencia aparecen aislados del virus que son capaces de superar estas resistencias. Para obtener un control de la enfermedad más eficaz y duradero es necesario: A) la caracterización genética y biológica de los aislados del TSWV que superan y no superan las resistencias; B) el estudio de los factores evolutivos y epidemiológicos implicados en la aparición y establecimiento de los aislados que superan las resistencias; C) el desarrollo de herramientas que permitan la detección y cuantificación de estos aislados virales; y D) la evaluación de nuevas fuentes de resistencia (total o parcial, que dificulten la infección y multiplicación viral) o tolerancia (total o parcial, que dificulten la aparición de síntomas y daños aunque no tengan un efecto en la infección viral).

En este trabajo se han caracterizado biológicamente y molecularmente diferentes aislados del TSWV procedentes de cultivos de tomate y pimiento de España. Se determinó la secuencia nucleotídica del genoma completo de tres aislados españoles correspondientes a tres biotipos: biotipo N (incapaz de infectar variedades resistentes de tomate o pimiento); biotipo T (supera la resistencia *Sw-5* de tomate); y P (supera la resistencia *Tsw* de pimiento). Los resultados mostraron que no había una correlación entre la variación genética y la capacidad de superar la resistencia.

Estas secuencias nucleotídicas y otras obtenidas de la base de datos Genbank se utilizaron para desarrollar una técnica basada en la RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) que permite detectar el virus con un alto grado de sensibilidad y cuantificar en un amplio rango dinámico (10^3 - 10^{10} moléculas de RNA viral por cada ng de RNA total). Se diseñaron los iniciadores y una sonda TaqMan MGB a partir de segmentos de secuencia conservados para que fueran válidos para todos los aislados del TSWV. El hecho de no encontrar correlación entre biotipo y genotipo impide que se pueda desarrollar un método molecular para diferenciar los aislados que superan y no superan las resistencias. En su lugar se desarrollaron dos sondas Taqman que permitían cuantificar diferencialmente variantes genéticas del virus en infecciones mixtas.

La RT-qPCR se utilizó para evaluar la acumulación de varios aislados del TSWV en tomate sin *Sw-5*, pimiento sin *Tsw* y *Datura stramonium* (que actúa como reservorio del virus), así como, en su principal vector *F. occidentalis* que se usó para evaluar la eficiencia de la transmisión. Se observó que la superación de la resistencia no suponía un coste en la eficacia biológica (fitness) tanto en la multiplicación del virus en estas plantas como en la transmisión por trips. Por tanto, los aislados que superan las

resistencias tienen la misma capacidad de dispersión en campo que los aislados convencionales.

Por último, se utilizó la RT-qPCR y la información obtenida para evaluar la capacidad de resistencia y tolerancia de una accesión de *Capsicum baccatum* al TSWV. Además de considerar la variabilidad biológica y genética del virus, se desarrolló un nuevo enfoque basado en el análisis de datos longitudinales (tomados de los mismos individuos a lo largo del tiempo). El nivel de resistencia se estimó a partir de dos variables: A) la eficacia absoluta, calculada a partir de la variación en el tiempo del título viral, cuantificado por RT-qPCR; y B) la infectividad, como la mediana del tiempo que tarda una planta en ser detectada por ELISA. El nivel de tolerancia se estimó como la mediana del tiempo que tarda una planta en mostrar síntomas graves. Se realizó un ensayo en el que se inocularon cantidades equimolares de dos aislados del TSWV (uno que supera y otro que no supera la resistencia del gen *Tsw*) en lotes de 30 plantas de la nueva accesión de *C. baccatum*, una variedad de pimiento susceptible y una variedad con el gen de resistencia *Tsw*. Los resultados mostraron que esta nueva accesión es parcialmente resistente (menor infectividad y acumulación viral que la variedad susceptible) y totalmente tolerante (ninguna planta manifestó síntomas graves) tanto para aislados del TSWV convencionales como para aquellos capaces de infectar e inducir síntomas severos en variedades con el gen *Tsw*. Por tanto, esta nueva variedad de *C. baccatum* es un buen candidato para usarlo en programas de mejora genética de pimiento (*C. annuum*).