

## RESUMEN

Uno de los problemas a los que se enfrenta la agricultura son los daños producidos por los virus que causan cada año considerables pérdidas económicas en diversos cultivos de todo el mundo. El control de las enfermedades virales es difícil debido a su compleja y dinámica epidemiología, con casos frecuentes de emergencia y rápida dispersión a escala global, así como por su gran capacidad evolutiva que les permite superar distintas estrategias de control, como por ejemplo el cultivo de variedades resistentes obtenidas por mejora genética.

El primer paso para evaluar el estado sanitario de un cultivo y poder aplicar un programa de manejo integrado es disponer de métodos de diagnóstico y detección de los principales virus que sean específicos, fiables, rápidos y sensibles. Dada la situación dinámica de las virosis, en la que continuamente están apareciendo nuevos virus o variantes, es recomendable que los métodos de diagnóstico puedan desarrollarse rápidamente para responder a la demanda y que sean flexibles de manera que se pueda ajustar al nivel de especificidad requerido (no solamente para la especie viral sino también para categorías taxonómicas superiores, como género y familia o inferiores como cepa o grupo de aislados virales). En este respecto, los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) y la hibridación molecular de ácidos nucleicos cumplen estos criterios. Los métodos de PCR tienen la ventaja de ser muy sensibles mientras que los basados en la hibridación permiten analizar simultáneamente un elevado número de muestras. Una modalidad, la hibridación de flujo de improntas vegetales (flow-through hybridization of tissue prints), recientemente desarrollada, supone una reducción drástica del tiempo necesario para el análisis al evitar el procesamiento de las muestras y acelerar el proceso de hibridación. En el desarrollo, tanto de la PCR como de la hibridación, es necesario conocer la secuencia nucleotídica de al menos una porción del genoma del virus que se quiere detectar, pero si se quiere sacar el máximo provecho, por una parte, hay que estimar la variabilidad genética entre los distintos aislados del virus, para así evitar o minimizar los falsos negativos (ej. reacción negativa con algunos aislados genéticamente divergentes), y por otra parte, hay que considerar la relación genética del virus

objeto con respecto a otros virus, para evitar falsos positivos (ej. reacción positiva con aislados pertenecientes a otros virus).

En esta tesis doctoral se abordaron dos retos relacionados con el desarrollo de métodos moleculares de detección de ribovirus (con genoma de RNA) que afectan a cultivos hortícolas. El primero corresponde a la detección del género *Fabavirus*, que está compuesto por cinco especies virales: virus 1 del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus 1*, BBWV-1), virus 2 del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2), virus del mosaico de la genciana (*Gentian mosaic virus*, GeMV) y virus del mosaico suave de cucurbitáceas (*Curcubit mild mosaic virus*, CuMMV) y virus del mosaico suave de la ortiga blanca (*Lamium mild mosaic virus*, LMMV). En primer lugar se secuenció el genoma completo del único aislado disponible de LMMV, ya que era la única especie viral de este género de la que no se disponía ninguna secuencia nucleotídica. La comparación de esta secuencia con la del genoma completo de los otros fabavirus confirmó que LMMV es una especie viral *per se* al ajustarse a los criterios actualmente aceptados de demarcación entre géneros, especies y aislados virales. Se encontró varias repeticiones de un motivo de diez nucleótidos en las zonas no traducibles del extremo 5' de todos los miembros del género *Fabavirus* que se puede considerar como una señal de identidad y serviría para asignar nuevos virus a este género viral. En segundo lugar, a partir de todas las secuencias nucleotídicas disponibles de todos los virus del género *Fabavirus* se diseñó una pareja de iniciadores conservados para poder detectar por retrotranscripción (reverse transcription, RT) y PCR (RT-PCR) todos los fabavirus en una única reacción. También se diseñaron cinco parejas de iniciadores, cada una específica para una especie viral, para poder detectar e identificar cualquiera de estos virus en una única reacción mediante RT-PCR múltiple (multiplex RT-PCR). La combinación de ambos procedimientos de RT-PCR permite detectar e identificar cada una de las cinco especies conocidas del género *Fabavirus*, así como descubrir nuevas especies dentro de este género. En tercer lugar, se diseñó una sonda molecular correspondiente a la región del genoma que contenía las repeticiones del motivo de diez nucleótidos, con la que se pudo detectar las cinco especies del género *Fabavirus* mediante hibridación molecular de flujo. Esta es la primera vez que se consigue una sonda conservada para un género viral. También se diseñaron cinco sondas, cada una específica para cada una de las cinco especies conocidas del género. De manera que mediante hibridación

de flujo con las seis sondas se pueden identificar BBWV-1, BBWV-2, LMMV, GeMV y CuMMV y descubrir nuevas especies dentro del género *Fabavirus*. Para comprobar la especificidad de las técnicas de RT-PCR e hibridación desarrolladas aquí, ambas se probaron con distintos aislados de una misma especie viral que eran genéticamente muy divergentes (identidad ~80%) y no se produjeron falsos negativos. Así mismo se constató *in silico* o *in vitro* que estas técnicas no producían falsos positivos al no detectar otros virus relacionados fuera del género *Fabavirus*, como son aquellos que pertenecen a los géneros *Comovirus* y *Nepovirus*, que junto el género *Fabavirus* forman la subfamilia *Comovirinae*.

El otro reto que se planteó fue la detección e identificación de los siete ribovirus más importantes en los cultivos de tomate del área mediterránea y otras áreas subtropicales: virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), virus de la clorosis infecciosa del tomate (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV), virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV), y virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV). Primero se caracterizó la variabilidad genética de ToMV puesto que era el único de estos virus en la que no se había estudiado este atributo. Se encontró tres grupos de aislados que tenían entre ellos identidades nucleotídicas menores al 90%. Sin embargo, solamente uno de estos grupos se había dispersado por el mundo y se caracterizaba por una gran estabilidad y muy baja variabilidad genética (identidades mayores del 98%). A partir del análisis de todas las secuencias disponibles de estos siete virus se diseñaron siete parejas de iniciadores específicos para cada virus. Se tuvo en cuenta la variabilidad genética dentro de cada uno de los siete virus para evitar o minimizar los falsos negativos. Mediante dos RT-PCR múltiples (una para CMV, ToMV y TICV y la otra para TSWV, ToCV, ToTV y PepMV) se pudo detectar e identificar cada especie viral tanto en infecciones únicas como múltiples en muestras de campo de Sicilia con una prevalencia variable según el virus y el área geográfica.

Los métodos moleculares de detección desarrollados en esta tesis permiten llevar a cabo prospecciones rutinarias en grandes áreas de cultivo, recabando información epidemiológica muy valiosa para el manejo de

enfermedades a diferentes escalas geográficas, y constituyen una primera línea de defensa frente a la ocurrencia de brotes de las enfermedades virales. El desarrollo y adopción de esta metodología supone un aporte que contribuiría a mejorar la gestión de la calidad por parte de empresas productoras y distribuidoras de semillas o propágulos asexuales, y a las agencias gubernamentales reguladoras del comercio internacional de estos productos con la finalidad de disminuir los riesgos y reducir el enorme impacto económico, valorado en decenas de millones de euros anuales, en pérdidas directas e indirectas, que implica la emergencia y dispersión de los virus en las economías de los países afectados.