ITEA (1998), Vol. 94V N.º 1, 33-47

MEJORA DEL PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.) PARA RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS MANCHAS BRONCEADAS DEL TOMATE (TSWV)[1]

M.J. Aranzana

RESUMEN

El virus de las manchas bronceadas del tomate, más corrientemente conocido como virus del bronceado del tomate, (TSWV), transmitido de forma persistente por trips (Thysanoptera: Thripidae), causa importantes mermas económicas en diversos cultivos hortícolas españoles, entre los que destaca el pimiento. A causa de la baja eficacia del control del virus mediante prácticas culturales, se plantea la obtención de cultivares de pimiento resistentes como la mejor alternativa para reducir las pérdidas causadas por la infección de este virus. En este trabajo se propone un programa de mejora para obtener variedades de pimiento resistentes a TSWV.

Palabras clave: Tospovirus, Bunyaviridae, Mejora genética vegetal.

SUMMARY

PEPPER BREEDING FOR RESISTANCE TO TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV)

Tomato spotted wilt virus (TSWV), transmitted in a persistent manner by trips (Thysanoptera: Thripidae), causes important economic losses in some Spanish vegetable crops, such as pepper. Because of the low efficiency of the cultural practices to control this virus, it is suggested the use of resistant pepper cultivars as the best method to reduce the losses caused by TSWV. In this work it is proposed a breeding program to obtain pepper varieties resistant to TSWV.

Key words: Capsicum annuum L., Tospovirus, Bunyaviridae, Vegetable breeding.

Introducción

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es, junto con tomates y pepinos, una de las tres hortalizas más cultivadas en los invernaderos europeos. A nivel mundial se conocen alrededor de 30 virus que afectan a este cultivo, aunque las mayores pérdidas son producidas por un número relativamente bajo. En España, entre éstos se encuentra el causante de las manchas bronceadas del tomate o bronceado del tomate ("tomato spotted wilt virus" [TSWV]) (GIL ORTEGA, 1993).

Este virus se detectó por primera vez en España, en 1989, en cultivos bajo plástico de Almería (SÁEZ ALONSO, 1993). En los últimos años se ha ido extendiendo por la Península, de forma que actualmente afecta

1. PREMIO AIDA para los mejores trabajos monográficos presentados por los alumnos de los cursos del IAMZ de 1996-97.

a casi todas las zonas de cultivo hortícola peninsular e insular (NUÉZ *et al.*, 1996). En zonas de gran tradición hortícola como Valencia y Murcia se ha producido una importante reducción en el área de cultivo tomate y pimiento al aire libre, debido a la imposibilidad de obtener una producción comercializable (DÍEZ *et al.*, 1993).

En una prospección realizada por JORDÁ *et al.* (1995) sobre diferentes especies vegetales en áreas de España, se encontró TSWV infectando 32 especies diferentes, entre las que figuran algunas de gran importancia económica, si bien actualmente, los cultivos más afectados en España son tomate, pimiento y lechuga.

Las plantas de pimiento infectadas por TSWV muestran clorosis y anillos necróticos (generalmente concéntricas) y líneas sinuosas en sus hojas, necrosis apicales, y achaparramiento generalizado de la planta, y los frutos presentan manchas redondas cloróticas, áreas rojas o verdes rodeadas por halos amarillos, y anillos concéntricos.

Debido a la dificultad en el control de la enfermedad mediante métodos culturales, varios autores plantean la resistencia genética como el método de lucha más eficaz.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre la resistencia en pimiento a TSWV, así como proponer un plan de mejora para obtener variedades resistentes, aptas para el cultivo en la zona mediterránea de España.

El virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV)

Las partículas virales son esféricas, de 70 a 110 nm de diámetro, con una membrana lipídica asociada con dos glicoproteínas (G1 y G2). El genoma viral consiste en tres cadenas simples de ARN lineal, denominadas S (Small), M (Medium) y L (Large), cada una de ellas encapsidadas individualmente por varias copias de la proteína de la nucleocápsida (N). Las propiedades antigénicas de esta proteína N se utilizan para el diagnóstico de estos virus, así como para su clasificación serológica y taxonómica (DE ÁVILA *et al.*, 1993).

TSWV fue considerado durante años como un grupo de virus monotípico, sin relación taxonómica con otro grupo de virus de plantas. Tras la reunión del comité internacional de taxonomía de virus (ICTV) en Alemania en 1990, se creó el género *Tospovirus* dentro de la familia *Bunyaviridae*, cuyo miembro tipo era el virus del bronceado del tomate (TSWV) (FRANKI *et al.*, 1991). TSWV se tomó como especie única del género, que se consideró dividida en dos serotipos (TSWV-L y TSWV-I) (LAW y MOYER, 1990). Posteriormente los aislados se dividieron en 3 serogrupos (I a III) en base a su reacción con antisueros policlonales contra sus nucleoproteínas. Estudios basados en la estructura del ARN y en la citopatología, llevaron a considerar a los aislados del serogrupo III como miembros de una nueva especie, la cual se denominó "impatiens necrotic spot virus" (INSV) (DE ÁVILA *et al.*, 1990). En 1993, en base a análisis de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína N, DE ÁVILA *et al.* (1993) propusieron la creación de dos nuevas especies dentro de los aislados del serogrupo II, a las que denominaron "tomato chlorotic spot virus" (TCSV) y "groundnut ringspot virus" (GRSV). Posteriormente, a partir de resultados obtenidos en estudios serológicos y de microscopía electrónica se ha sugerido la existencia de otras especies (HEINZE *et al.*, 1995). Actualmente algunos autores

proponen el nombre de "groundnut bud necrotic virus" (GBNV), (HEINZE *et al.*, 1995) y "watermelon silver mottle virus" (WSMV) (YEH y CHANG, 1995) para dos posibles nuevas especies (la primera de las cuales además constituiría un nuevo serogrupo (serogrupo IV)). Sin embargo estos autores también indican la necesidad del conocimiento completo de la secuencia de nucleótidos del gen N para aclarar la relación existente entre ellos, ya que podrían pertenecer a una misma especie.

En pimiento se han observado infecciones naturales de TSWV y TCSV, mientras que GRSV se ha encontrado únicamente en tomates de Brasil. No obstante, aislados brasileños de este virus son altamente virulentos si se inoculan mecánicamente en pimiento (BOITEUX y DE ÁVILA, 1994). Las especies TCSV y GRSV no se han citado en Europa (MOURY *et al.*, 1996)

En estudios realizados en España por JORDÁ *et al.* (1993) se han caracterizado biológica y bioquímicamente diversos aislados de TSWV, todos pertenecientes al serogrupo I, serotipo I, entre los cuales se han identificado diversos patotipos del virus.

En estudios realizados por MOURY *et al.* (1996) observaron la aparición de nuevos patotipos del virus al inocular plantas de pimiento resistentes a TSWV. Según estos autores, la gran variabilidad y mutabilidad de TSWV puede ser debida a la naturaleza de la cadena de ARN del genoma viral, así como al hecho de que el genoma tripartido del virus pueda formar pseudo-recombinantes y generar numerosas partículas virales nuevas.

La variabilidad presentes en el género *Tospovirus* debe ser considerada en los programas de mejora de todo el mundo (BOITEUX *et al.*, 1993b).

Transmisión de TSWV mediante vectores

En condiciones naturales, la transmisión de TSWV tiene lugar mediante vectores, aunque en laboratorio se puede transmitir por medio de inoculaciones mecánicas (LACASA *et al.*, 1994a). Actualmente se están llevando a cabo trabajos para determinar si existe transmisión mediante polen o semillas (NUÉZ *et al.*, 1996).

Diferentes especies de trips son capaces de transmitir este virus de forma persistente circulativa. En la bibliografía se citan 9 especies vectores de tospovirus. Éstas son, *Frankliniella schultzei* Trybom, *F. occidentalis* Pergande, *F. fusca* Hinds, *F. intonsa* Trybom, *F. tenuicornis* Uzel, *Thrips tabaci* Lindeman, *T. setosus* Moulton, *T. palmi* Karny y *Scirtothrips dorsalis* Hood (para referencias ver HUNTER *et al.*, 1995).

De las especies de trips citadas, únicamente *T. tabaci* y *F. occidentalis* se encuentran en las zonas de España donde la enfermedad ha adquirido importancia (LACASA y CONTRERAS, 1993). En España, así como en otras áreas donde ésta se ha extendido, *F. occidentalis* es el principal y más importante vector (MARCHOUX *et al.*, 1993). En estas zonas la epidemiología del virus se ve ampliamente ligada a la distribución de este trips (LACASA *et al.* 1994b). Si bien *T. tabaci* es el principal vector de TSWV en cultivos de tabaco en el Este de Europa, esta especie no juega un papel importante en otras áreas y cultivos. Algunos autores, como WIJKAMP *et al.* (1995), citan como posible causa de este hecho a la existencia de diferentes ecotipos de *T. tabaci* que presentan diferentes características de transmisión.

El virus de las manchas bronceadas del tomate únicamente se transmite de forma natural por trips en segundo estadio larval y

por adultos (WIJKAMP y PETERS, 1993), que únicamente son infectivos si adquirieron las partículas virales en estado larvario. Según ULLMAN *et al.* (1992) si el insecto adulto adquiere el virus, no parece ser capaz de transmitirlo, ya que las partículas virales son degradadas en el intestino medio del insecto.

Una vez la larva adquiere las partículas virales, éstas pasan del tubo digestivo a la cavidad general. Las partículas virales llegan a las glándulas salivares del insecto, y, tras un determinado período de tiempo, durante el cual se han replicado en las células del vector, son inyectadas en las plantas de las que se alimenta (ULLMAN *et al.*, 1993). El tiempo de adquisición, período de latencia y tiempo necesario para la inoculación del virus varían con la especie vector, así como con factores ambientales (WIJKAMP y PETERS, 1993).

En condiciones naturales las larvas no se desplazan mucho en la planta a lo largo del período evolutivo, por lo que si emergen en un tejido enfermo, lo normal es que complete el desarrollo sobre él, siendo alta la probabilidad de infectarse (LACASA y CONTRERAS, 1993). A pesar de esta baja movilidad de las larvas, es posible una migración de las mismas a plantas que se encuentren en contacto, y cuando alcancen el segundo estadio larval, al ser ya virulíferas, serán capaces de infectar plantas sanas. En consecuencia, las larvas de trips también tendrán un papel en la epidemiología del virus, aunque éste será menor que el de los individuos alados (WIJKAMP y PETERS, 1993).

La transmisión del virus por el vector es importante en el desarrollo epidémico de la enfermedad, y ésta puede ser modificada por genes del huésped que afectan las preferencias del vector hacia las plantas y hacia la alimentación (FRASER, 1990; BOITEUX *et al.* 1993b).

Detección del virus y mecanismos de control

Un método de diagnóstico rápido, fiable y barato es muy importante para cualquier estrategia de control de virus. Actualmente existen diferentes técnicas puestas a punto para el diagnóstico de TSWV, tanto en especies hortícolas como en ornamentales.

Entre las técnicas de diagnóstico citadas en la bibliografía, las más ampliamente utilizadas son las serológicas, y entre ellas la ELISA-DAS, que resulta muy efectiva tanto si se trabaja con antisueros obtenidos contra viriones purificados de TSWV (WANG y GONSALVES, 1990) como si se utilizan antisueros específicos para la proteína de cubierta (RESENDE *et al.*, 1991).

Otras técnicas empleadas para el diagnóstico de este virus son las biológicas, las basadas en la PCR ("Polimerasa Chain Reaction") y las técnicas de microscopía electrónica.

Como en el caso de todas las enfermedades de origen viral, el método de lucha contra TSWV es preventivo. Varios autores, como CHO *et al.* (1989) sugieren una serie de prácticas culturales que combinadas pueden reducir en gran medida las pérdidas causadas por este virus. Sin embargo estos autores también apuntan que estas medidas no son totalmente eficaces si los niveles del virus y del vector en la zona son muy altos. Por otro lado, el amplio rango de hospedantes, la transmisión por varias especies de trips ampliamente distribuidas, la peculiar naturaleza de la interacción virus-vector, la baja eficiencia del control químico y la rápida adquisición de resistencia a insecticidas por los trips hacen que le epidemia de

TSWV sea difícil de controlar (BOITEUX *et al.*, 1993b).

Varios autores coinciden en que la obtención de variedades resistentes es una de las mejores alternativas, si no la mejor, para reducir pérdidas por la infección de este virus.

Resistencia genética al virus de las manchas bronceadas del tomate

Fuentes de resistencia

Las fuentes de resistencia a TSWV se han estudiado principalmente en tomate y en pimiento. En pimiento se han descrito varias líneas resistentes al virus. BOITEUX y DE ÁVILA (1994) citan a CUPERTINO *et al.* (1988) como los primeros en identificar la línea de *C. chinense* PI 159236 como fuente de resistencia a aislados de TSWV. Posteriormente BLACK *et al.* (1991) observaron también que esta línea, junto con la PI 152225, era resistente a otros 7 aislados de EEUU obtenidos en tomate, pimiento y especies de malas hierbas.

BOITEUX y NAGATA (1993) iniciaron un programa de cribado en germoplasma de *Capsicum* spp. del Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliça (CNPH) en Brasil, para buscar fuentes de resistencia a TSWV. En este estudio se confirmó la resistencia de la entrada PI 159236 (Sin. CNPH 679) frente a algunos aislados de TSWV, mientras que otros aislados fueron capaces de romper dicha resistencia.

En un cribado de 70 entradas de *Capsicum* spp., BOITEUX *et al.* (1993b) identificaron 7 con altos niveles de resistencia en campo (dos líneas de *Capsicum baccatum* CNPH 050 y CNPH 051, dos de *C. chinense* CNPH 275 (Sin. Panca) y PI 159236 (Sin. CNPH 679), y tres de *C. annuum* CNPH 2733, PI 169132 y PI 379163), sin embargo únicamente las dos líneas de *C. chinense* tuvieron el mismo comportamiento en invernadero tras haberse inoculado el virus mecánicamente. Aún así estas dos líneas resultaron susceptibles a aislados del serogrupo II del virus.

En 1993, HOBBS *et al.* (1994) inocularon las líneas PI 152225 y PI 159236 con 61 aislados de TSWV, de los cuales 2 fueron capaces de romper la resistencia produciendo lesiones cloróticas y síntomas sistémicos. Estos autores observaron el mismo tipo de resistencia y susceptibilidad en la línea de *C. chinense* C00943.

En España, DÍEZ *et al.* (1993) observaron resistencia a varios aislados del virus en las líneas de *Capsicum chinense* PI 159236, PI 12225, PI-15, PI-18 y 7204, y a una sin denominación de la especie *Capsicum pubescens*. También en España, estudios realizados por LUIS ARTEAGA y GIL ORTEGA (GIL ORTEGA, 1993; GIL ORTEGA y LUIS ARTEAGA, 1994) confirmaron cierta resistencia en las líneas detectadas por BLACK *et al.* (1991), pero no observaron una respuesta constante a lo largo de diferentes ensayos, lo cual podría ser debido a factores como edad de la planta, condiciones climáticas, concentración del inóculo, etc. En estos estudios también se detectaron niveles de resistencia similar, o incluso superior, en cuatro entradas de *C. baccatum*.

La identificación de las diferentes fuentes de resistencia se ha llevado a cabo mediante inoculación mecánica. Como ya se ha señalado anteriormente, en ensayos en que se ha realizado infección natural en campo e inoculación mecánica, se ha encontrado germoplasma que únicamente muestra resistencia a TSWV en campo. Este hecho puede ser debido a factores de la

planta que alteran el comportamiento del trips, y por lo tanto limitan la transmisión del virus (KRISHNA KUMAR *et al.*, 1993). Pese al interés que podría tener este material en la obtención de variedades resistentes a éste y a otros virus, este tipo de resistencia generalmente se ignora inicialmente, ya que el método de inoculación mecánica es el más ampliamente utilizado en los programas de mejora.

Mecanismos de resistencia descritos

El mecanismo de resistencia observado en las diferentes entradas es de hipersensibilidad, ya que se desarrollan lesiones locales concéntricas en las hojas y cotiledones inoculados. Los cotiledones inoculados generalmente caen en una semana, y las hojas que desarrollan varias lesiones necróticas también caen. Sin embargo, si se rompe la resistencia, las necrosis no se limitan a las hojas inoculadas y se convierten en sistémicas (BLACK *et al.*, 1991; GIL ORTEGA, 1993).

Genética de la resistencia descrita

En un principio BOITEUX *et al.* (1993b) consideraron que la resistencia observada en las líneas de *C. chinense* era aislado-específica, donde todos los aislados capaces de romperla pertenecían al serogrupo II.

Tras posteriores estudios con diferentes aislados del virus, y tras la reclasificación taxonómica de los miembros del serogrupo II dentro de las especies TCSV y GRSV, BOITEUX y DE ÁVILA (1994) pasaron a considerar esta resistencia hipersensible como especie-específica. Para estudiar la base genética de la resistencia estos mismos autores cruzaron la línea PI 159236 con el cultivar susceptible de *C. annuumm* Magda y evaluaron la descendencia F_1, los retrocruzamientos con los parentales, y la F_2. A partir de los resultados obtenidos concluyeron que la resistencia de esta línea a TSWV es monogénica dominante, y que la penetrancia del gen (para el que sugieren el nombre de *Tsw*), a pesar de ser muy alta, no es completa.

MOURY *et al.*, (1996) realizaron una serie de ensayos en los que la mayoría de resultados fueron consistentes con la hipótesis de que un único gen dominante controla la resistencia a TSWV. Sin embargo, en poblaciones F_2 de cruzamientos entre líneas susceptibles y resistentes observaron un exceso de plantas susceptibles. Estos autores proponen varias hipótesis para justificar estas distorsiones, sugiriendo como la más probable una incompatibilidad genética entre los parentales de los cruzamiento interespecíficos. Según LANTERI y PICKERSGILL (1993) los genomas de *C. annuum* y *C. chinense* difieren en dos intercambios cromosómicos en los que intervienen tres pares de cromosomas, es decir, un cromosoma debe verse implicado en dos intercambios independientes. Por lo tanto los genes envueltos en estos cromosomas se verán sometidos a una distorsión en la segregación.

BOITEUX (1995) realizó un estudio con el fin de determinar las relaciones alélicas existentes entre los genes de resistencia de las diferentes líneas de *C. chinense*. Para ello cruzó entre sí 3 líneas resistentes y obtuvo la F_1, F_2 y retrocruzamientos (BC). Ninguna de estas tres poblaciones segregaron para susceptibilidad, si bien unas pocas plantas de la F_1 y F_2 mostraron reacción susceptible al virus. Esta fluctuación podría deberse a una penetrancia incompleta del gen de resistencia (ya citada en BOITEUX y DE ÁVILA, 1994), o a la existencia de genes menores modificadores. MOURY *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares en

sus ensayos, pero atribuyen este fenómeno a la aparición de nuevos patotipos del virus capaces de superar la resistencia. Estos autores consideran que la influencia del genoma de la planta en la evolución del virus es mínima, y que la generación de estos patotipos más virulentas se debe a procesos de mutación aleatoria seguidas por una fuerte presión de selección por parte de la planta resistente.

BOITEUX (1995) explica que la ausencia de segregación 15:1 en la generación F_2 de sus ensayos de alelismo podría deberse a que las tres líneas de *C. chinense* ensayadas (PI 159236, PI 152225 y Panca) tienen el mismo gen resistencia (el denominado *Tsw*), aunque existe una pequeña posibilidad de que intervenga un grupo de genes de resistencia muy unidos, por lo que no se observa recombinación y por tanto segregación. MOURY *et al.*, (1996) tras obtener resultados parecidos en sus pruebas de alelismo con las líneas de *C. chinense* PI 159236, PI 152225 y 7204, explican de forma similar la ausencia de recombinación en la F_2, asumiendo que sus genes de resistencia están localizados en el mismo locus (que probablemente sea el mismo que el que interviene en Panca) y que si no son alelos, los genes de resistencia no parecen estar separados más de un 4 a 15% de recombinación.

La utilidad de la resistencia conferida por el gen *Tsw* puede depender de la especie de *Tospovirus* presente en el área geográfica en cuestión (BOITEUX y DE ÁVILA, 1994). Por lo que la búsqueda de genes que confieran un amplio espectro de resistencia a los tospovirus en *Capsicum* spp. es aún una importante demanda para los programas de mejora, especialmente en áreas Neotropicales del mundo donde la diversidad genética del género *Tospovirus* parece ser elevada (DE ÁVILA *et al.*, 1993).

Inoculación y estimación de la resistencia

Los aislados pueden obtenerse a partir de material de la zona infectado sistémicamente. DÍEZ *et al.* (1993) sugieren la utilización de los aislados E-91758, L-91672, T-91525, P-91675 caracterizados por JORDÁ *et al.* (1993) para ensayar resistencia a aislados de TSWV presentes en España, ya que se desconoce si existen uno o varios patotipos del virus en campo.

La infectividad y actividad serológica de TSWV varía según las condiciones de almacenamiento, de forma que el virus presenta mayor actividad si se almacena a -80 °C (Kaminska, 1995). Teniendo esto en cuenta, los aislados pueden mantenerse en hojas de plantas de *Nicotiana rústica* L. conservadas a esa temperatura (BOITEUX y DE ÁVILA, 1994). La multiplicación de TSWV puede realizarse, por ejemplo, en el cultivar de tomate susceptible 'Rutgers' (DÍEZ *et al.*, 1993). Para evitar posibles modificaciones en el virus después de repetidas inoculaciones mecánicas, los aislados no deberían multiplicarse más de 4 veces (MOURY *et al.*, 1996).

En la bibliografía se citan varios protocolos de inoculación del virus en plantas de pimiento, como los descritos por BOITEUX y DE ÁVILA (1994), y MOURY *et al.* (1996). Las plántulas pueden transplantarse desde el semillero a macetas en invernadero, y mantenerse en condiciones adecuadas para la infección. Temperaturas entre moderadas y frías parecen favorecer la infección y el desarrollo de síntomas (PATERSON *et al.*, 1989).

Para eliminar el problema del escape las plantas pueden inocularse 3 veces (18, 21 y 25 días después de ser plantadas). Si se trabaja con gran número de muestras esto puede ser muy laborioso, por lo que una

alternativa que podría adoptarse sería repetir inoculaciones en las plantas que no presenten síntomas o en aquellas en que los ELISA den negativo después de la segunda inoculación (PATERSON *et al.*, 1989)

Como ya se ha comentado anteriormente, la evaluación de la resistencia mediante inoculación mecánica puede llevar a la omisión de resistencia de campo a TSWV, la cual ha sido citada en especies silvestres de *Lycopersicon* (SMITH Y GARDNER, 1951. Citado en KRISHNA KUMAR *et al.*, 1993) así como en accesiones de *Capsicum* (BOITEUX *et al.*, 1993b). Otro inconveniente que puede llevar asociado este tipo de inoculación es la aparición de partículas defectivas, y por lo tanto estimar erróneamente la resistencia (KRISHNA KUMAR *et al.*, 1993). En caso de querer enfocar el programa de mejora hacia la introducción de resistencia de campo, deberá tenerse esto en cuenta e inocular las plantas ensayadas mediante el insecto vector. Para ello en la bibliografía se describen varios protocolos (HOBBS *et al.*, 1993; KRISHNA KUMAR *et al.*, 1993; HUNTER *et al.*, 1995).

En el pasado, la resistencia se evaluaba observando los síntomas sobre plantas inoculadas mecánicamente con el virus, o sometidas a infección natural en campo. El desarrollo de la técnica ELISA para detectar TSWV ha facilitado la evaluación de la resistencia en el germoplasma estudiado (PATERSON, 1989).

Las plantas resistentes muestran una reacción de hipersensibilidad localizada que fenotípicamente se expresa como una formación de grandes lesiones locales acompañadas por abcisión prematura de las hojas infectadas (BOITEUX, 1995; MOURY *et al.*, 1996). En caso de querer evaluar diferentes niveles de resistencia puede utilizarse una escala cualitativa como la establecida por BOITEUX *et al.* (1993b).

La resistencia puede evaluarse en plantas en intervalos de 3-5 días después de 8 semanas de la última inoculación. Las plantas sin síntomas obvios se evalúan por ELISA-DAS contra el virus para confirmar la infección. Para el análisis ELISA sólo se toman las hojas no inoculadas de la región apical, para evitar una posible subestimación de los resultados a causa de una ligera reacción de hipersensibilidad del virus. En este método únicamente se consideran susceptibles aquellas plantas que muestren una infección sistémica (BOITEUX y DE ÁVILA, 1994).

Programa de mejora

Uno de los objetivos de este trabajo es plantear un programa de mejora para obtener variedades de pimiento resistentes a TSWV destinadas a cultivo en la zona mediterránea española. Para ello deberán elegirse los parentales; el aislado del virus a inocular, el cual ha de ser representativo de la zona; y también estudiarse la interacción entre hospedante y patógeno, así como la influencia del ambiente en esta interacción.

Elección de parentales

Las diferentes líneas resistentes citadas en la literatura tienen, aparentemente, el mismo gen de resistencia. Por ello, BOITEUX (1995) indica que es indiferente la fuente de resistencia que se tome, si bien algunas líneas de *C. chinense* presentan mejores atributos como polinizadores. Un ejemplo es la línea PI 159236, la cual presenta buenos niveles de resistencia a *Phyt-*

ophthora capsici L (BOITEUX *et al.*, 1993a) así como al virus del moteado suave del pimiento (SUBRAMANYA, 1982)

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la fertilidad en cruzamientos interespecíficos varía con las accesiones utilizadas, de forma que la línea PI 159236 produce más cantidad de semillas viables que PI 152225 con los diferentes parentales susceptibles a TSWV. Además, en caso de utilizarse las citadas líneas de *C. chinense* como donantes de genes de resistencia, éstas deberán utilizarse como parental masculino, porque los cruzamientos recíprocos son estériles (MOURY *et al.*, 1996).

Estudio de la interacción patógeno-hospedante (PxH)

Antes de empezar el programa de mejora, es conveniente hacer un estudio sobre la interacción entre el patógeno y las diferentes líneas resistentes disponibles. Además de observar los síntomas, se estudiará la existencia de infección y la multiplicación del virus mediante ensayos ELISA-DAS.

También se realizarán ensayos para determinar la estabilidad de la resistencia a diferentes temperaturas y a diferentes edades de la planta, ya que se ha citado una posible inestabilidad de la resistencia en la que pueden influir estos factores.

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos elegiremos la línea más interesante por su nivel de resistencia a los aislados característicos del área mediterránea. En el caso de que todas muestren la misma respuesta a las inoculaciones se tomará la línea *de C. chinense* PI 159236 por las razones ya comentadas. Así mismo, elegiremos el aislado más adecuado.

Programa de mejora

El programa de mejora se establecerá en base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores. En principio, todas las fuentes de resistencia citadas en la bibliografía parecen ser monogénicas dominantes para ese carácter, por lo que en el caso de haber observado una resistencia estable a diferentes condiciones ambientales (de temperatura y edad de la planta) introduciremos la resistencia en una variedad comercial susceptible mediante un programa de retrocruzamientos (figura 1). Si por el contrario, al trabajar a diferentes condiciones, se observa una inestabilidad de esta resistencia hipersensible, se deberán buscar otras fuentes de resistencia no lábiles.

Para ello se recogerá material silvestre de diferentes orígenes y se evaluará su resistencia a TSWV. Como ya se ha comentado en el apartado relativo a fuentes de resistencia, se han citado varias líneas que presentan alto grado de resistencia en campo, que parece ser de "no preferencia" del trips vector. Por lo tanto, en la búsqueda de resistencias también se realizarán estudios para evaluar la genética de este mecanismo.

A partir de estos estudios podremos obtener líneas cuya resistencia, al virus o al vector, tenga control monogénico o poligénico. En el primer caso deberemos volver a las consideraciones tomadas anteriormente, es decir, a hacer ensayos de interacción hospedante-patógeno, así como estudios de estabilidad.

En caso de encontrar una única fuente de resistencia poligénica el programa de mejora consistirá en retrocruzar a partir de la F_2 con el material susceptible (figura 2). En cambio, si encontramos más de una se lle-

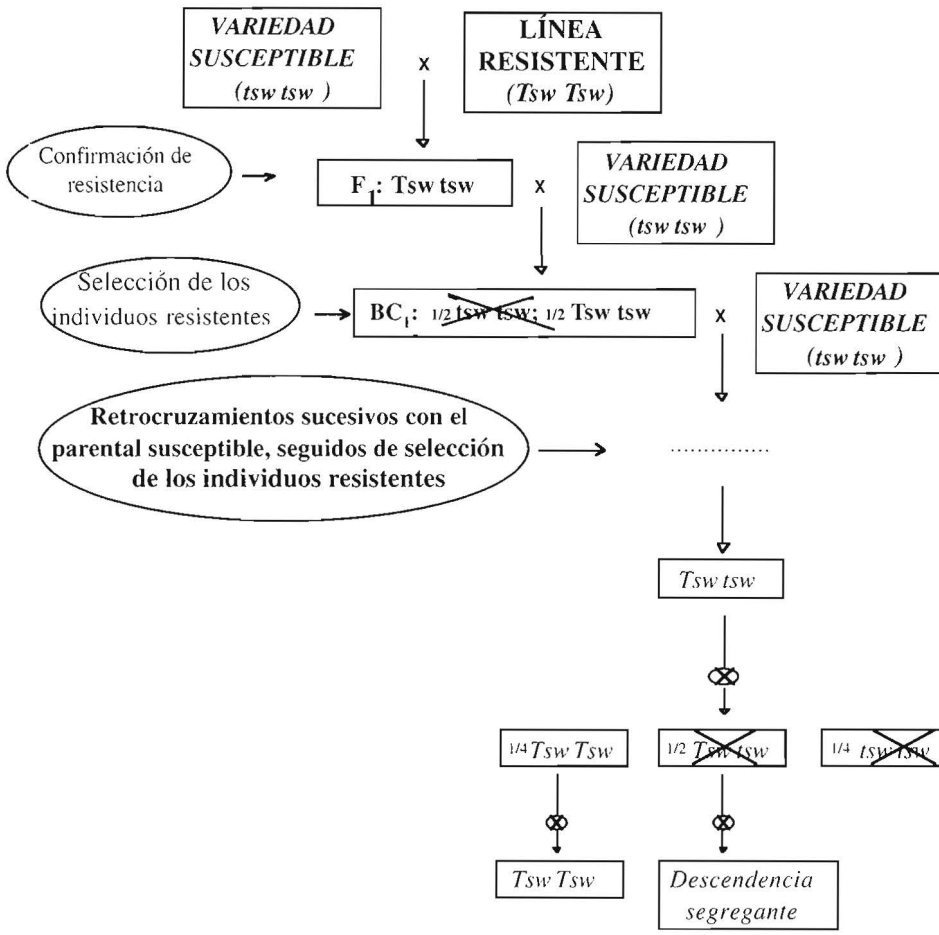


Figura 1. Programa de retrocruzamientos para introducir un gen de resistencia dominante en una variedad comercial

Figure 1. Backcross program for introducing a resistance dominant gene in a pepper variety

vará a cabo un programa como el representado en la figura 3.

Si no se encuentra ninguna fuente de resistencia estable, estaría justificado acudir a técnicas de ingeniería genética. Se han obtenido ya plantas transgénicas de tabaco y tomate transformadas con un "cassette" del gen de la proteína N del virus que muestran altos niveles de resistencia (PRINS *et al.*, 1995). Según ULTZEN *et al.* (1995) este tipo de resistencia podría utilizarse con éxito en todos los cultivos afectados por TSWV, incluido pimiento.

Hasta el momento, no se han obtenido plantas de pimiento transgénicas resistente a TSWV. Esto es debido, principalmente, a

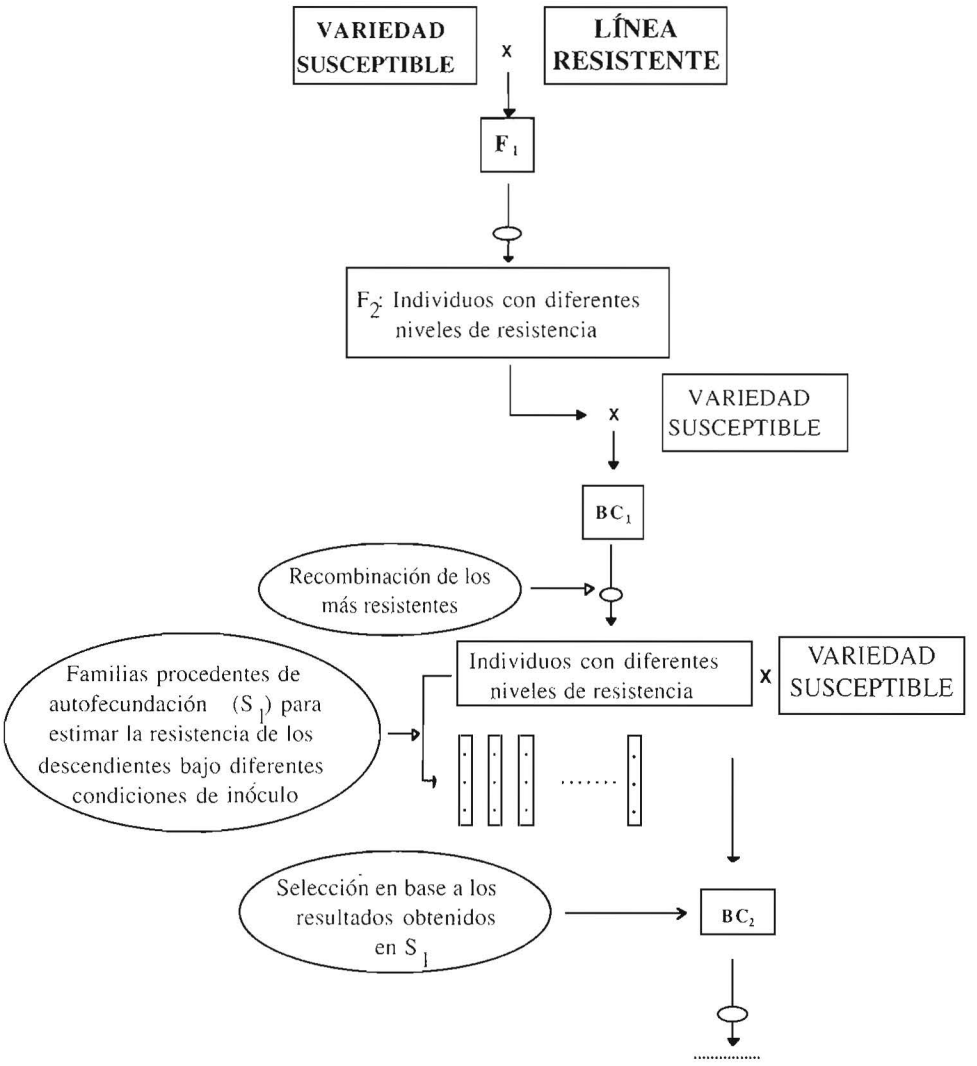


Figura 2. Esquema del programa para obtener individuos resistentes a partir de una única fuente de resistencia poligénica

Figure 2. Breeding scheme for obtainig resistant genotypes from a source of polygenic resistance

una pobre regeneración *in vitro* de esta especie, si bien en algunos trabajos se describen obtenciones de plantas de pimiento a partir de plantas adultas y de cotiledones (ARCE, 1991; ARCE y LÓPEZ, 1993). De hecho, varios autores han intentado obtener

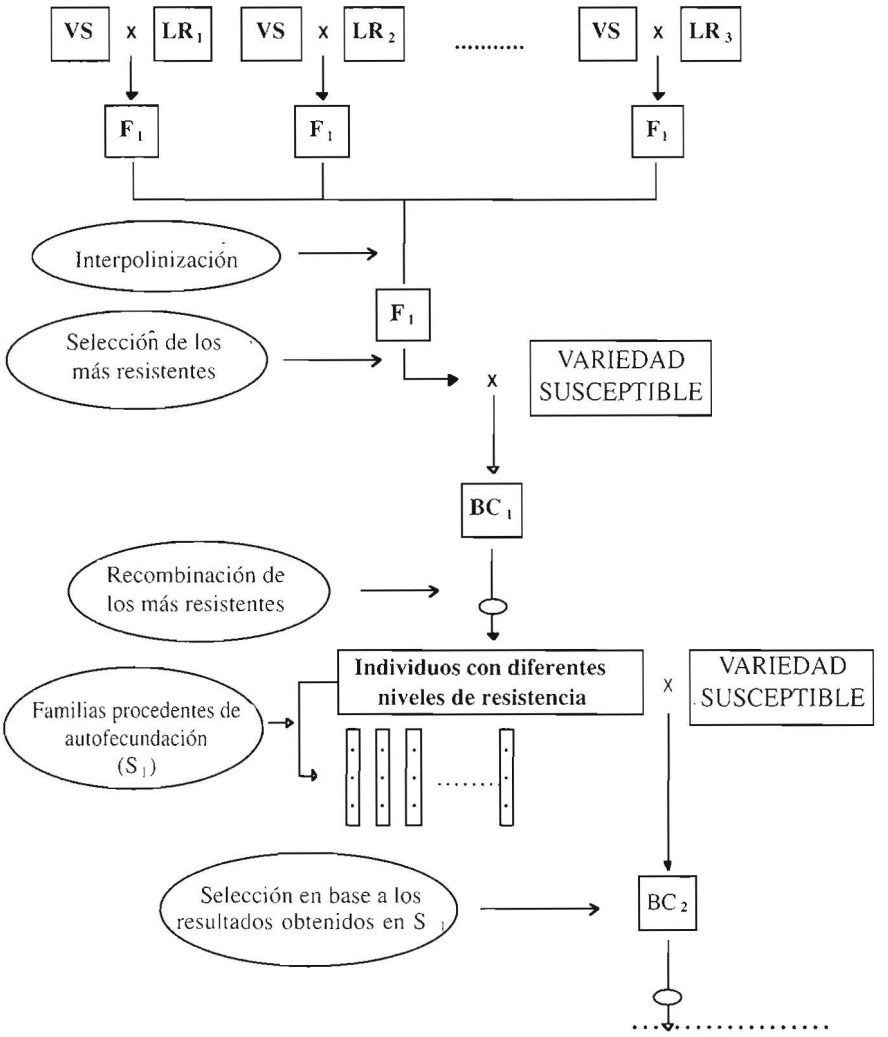


Figura 3. Esquema del programa para obtener individuos resistentes a partir de varias fuentes de resistencia poligénicas. VS: variedad susceptible; LR: línea resistente

Figure 3. Breeding scheme for obtaining resistant genotypes from several sources of polygenic resistance. VS: susceptible variety; LR: resistant line

plantas transgénicas mediante *Agrobacterium tumefaciens*, pero no tuvieron éxito en la regeneración de plantas a partir de callo (Liu *et al.*, 1990). Sin embargo en la bibliografía se menciona el desarrollo de pimientos transgénicos que expresan la

proteína de cubierta del virus del mosaico del pepino (CMV)) y del virus del mosaico del tabaco (TMV) (TIEN *et al.*, 1990 y WANG *et al.*, 1991. Citados en WIJBRANDI y DE BOTH, 1993). Como el pimiento es transformable con *Agrobacterium*, WIJBRANDI y DE BOTH (1993) sugieren que debería desarrollarse un método eficiente de regeneración para poder aplicar con éxito las técnicas de transformación genética.

Bibliografía

ARCE P., 1991. Multiplicación vegetativa del pimiento, variedades Pico y Piquillo de Lodosa, mediante técnicas *in vitro*. Actas de Horticultura, 8, 263-267.

ARCE P., LÓPEZ B., 1993. Obtención sistemática de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) cvs. Pico y Piquillo de Lodosa a partir de cotiledones. Influencia del ácido giberélico (GA3) en la diferenciación. Actas de Horticultura, 10, 929-933.

BLACK L.L., HOBBS H.A., GATTI J.M., 1991. Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinense* PI 152225 and PI 159236. Plant Disease, 75, 863.

BOITEUX L.S., 1995. Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. Theor. Appl. Genet., 90, 146-149.

BOITEUX L.S., CUPERTINO F.P., REIFSCHNEIDER F.J.B., 1993a. Capsicum chinense PI 159236: a source of resistance to *Phytophthora capsici* and tomato spotted wilt virus (TSWV). Capsicum and Eggplant Newsletter, 12, 76.

BOITEUX L.S., DE ÁVILA A.C., 1994. Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt *tospovirus* in *Capsicum chinense* 'PI 159236'. Euphytica, 75, 139-142.

BOITEUX L.S., NAGATA T., 1993. Susceptibility of *Capsicum chinense* PI 159236 to tomato spotted wilt virus isolates in Brazil. Plant Disease, 77, 210.

BOITEUX L.S., NAGATA T., DUTRA W.P., FONSECA M.E.N., 1993b. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wilt species of *Capsicum*. Euphytica, 67, 89-94.

CHO J.J., MAU R.F.L., GERMAN T.L., HARTMANN R.W., YUDIN L.S., GONSALVES D., PROVVIDENTI R., 1989. A multidisciplinary approach to management of tomato spotted wilt virus in Hawaii. Plant Disease, 73, 375-383.

DE ÁVILA A.C., DE HAAN P., KORMELINK R., RESENDE R.O., GOLDBACH R., PETERS D., 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal* General Virology, 74, 153-159.

DE ÁVILA A.C., HUGUENOT C., RESENDE R. DE O., KITAJIMA E.W., GOLDBACH R.W., PETERS D., 1990. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. Journal of general virology, 71, 2801-2807.

DÍEZ M.J., NUÉZ F., JORDÁ C., JUÁREZ M., ORTEGA A., 1993. Búsqueda de fuentes de resistencia al virus del bronceado (Tomato Spotted Wilt Virus) para la mejora del tomate y del pimiento. Actas de Horticultura, 10, 1286-1291.

FRANCKI R.I.B., FAUQUET C.M., NUDSON D.D., BROWN F., 1991. Fifth report of the International Committe on Taxonomy of Viruses. Archives of Virol. Supplementum, 2, 1-450.

FRASER R.S.S., 1990. The genetics resistance to plant viruses. Ann. Rev. Phytopathol., 28, 179-200.

GIL ORTEGA R., 1993. Resistencia a virus en pimiento. *Phytoma España*, 50: 53-58.

GIL ORTEGA R., LUIS ARTEAGA M., 1994. Should hypersensitivity resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) be used in breeding programs?. Capsicum and Eggplant Newsletter, 13, 88-89.

HEINZE C., MAISS E., ADAM G., CASPER R., 1995. The complete nucleotide sequence of the S RNA of a new *Tospovirus* species, representing serogrup IV. Phytopathology, 85, 683-690.

HOBBS H.A., BLACK L.L., JOHNSON R.R., VALVERDE R.A., 1994. Differences in reactions among tomato spotted wilt virus isolates to three resistant *Capsicum chinense* lines. Plant Disease, 78, 1220.

HOBBS H.A., BLACK L.L., STORY R.N., VALVERDE R.A., BOND W.P., GATTI J.M.JR., SCHALLER D.O., JOHNSON R.R., 1993. Transmission of tomato spotted wilt virus from pepper and three weed hosts by *Frankliniella fusca*. Plant Disease, 77, 797-799.

HUNTER W.B., HSU H.T., LAWSON R.H., 1995. A novel method for tospovirus acquisition by thrips. Phytopathology, 85, 480-483.

JORDÁ C., ORTEGA A., JUÁREZ M., 1995. New hosts of tomato spotted wilt virus. Plant Disease, 79, 538.

JORDÁ C., ORTEGA A., JUÁREZ M., MARTÍNEZ HERRERA D., SÁNCHEZ F., PONZ F., DÍEZ M.J., NUÉZ F., 1993. Caracterización biológica y bioquímica de diferentes aislados españoles de TSWV. Actas de Horticultura, 10, 1280-1285.

KAMINSKA M., 1995. Activity of tomato spotted wilt virus in plant material stored under different conditions. Phytopathologia Plonica, 22, 13-19. (Abstract)

KRISHNA KUMAR N.K., ULLMAN D.E., CHO J.J., 1993. Evaluation of *Lycopersicon* germplasm for tomato spotted wilt tospovirus resistance by mechanical and thrips transmission. Plant Disease, 77, 938-941.

LACASA A., CONTRERAS J., 1993. Comportamiento de *Frankliniella occidentalis* en la transmisión del virus del bronceado del tomate: planteamientos para su control en cultivos hortícolas. Phytoma España, 50, 33-39.

LACASA A., CONTRERAS J., JORDÁ C., DÍEZ M.J., ROSELLÓ S., CATALÁ M.S., COSTA J., NUÉZ F., 1994a. Screening of resistant materials of Lycopersicon spp. to TSWV by means of thrips transmission. T.G.C. Report, 44, 16-19.

LACASA A., CONTRERAS J., TORRES J., GONZÁLEZ A., MARTÍNEZ M.C., GARCÍA F., HERNÁNDEZ A., 1994b. Utilización de mallas en el control de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) y el virus del bronceado del tomate (TSWV) en el pimiento en invernadero. Bol. San. Veg. Plagas, 20, 561-580.

LANTERI S., PICKERSGILL B., 1993. Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. and *C. chinenese* Jacq. Euphytica, 67, 155-160.

LAW M.D., MOYER J.W., 1990. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. J. Gen. Virol., 71, 933-938.

LIU W., PARROTT W.A., HILDEBRAND D.F., COLLINS G.B., WILLIAMS E.G., 1990. *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shootlike structures expressing introduced genes. Plant Cell Rep., 9: 360-364. (Abstract)

MARCHOUX G., GEBRE-SALASSIE K., BERLING A., 1993. Le tomato spotted wilt virus. Evolution du problème et des acquis de la recherche. *Phytoma,* 449, 35-40.

MOURY B., PALLOIX A., GEBRE SELASSIE K., MARCHOUX G., 1996. Hypersensitivity resistance to tomato spotted wilt virus in three *Capsicum chinense* accesions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. Euphytica. In Press.

NUÉZ F., GIL ORTEGA R., COSTA J., 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. 607pp. Ed. Mundi-Prensa.

PATERSON R.G., SCOTT S.J., GERGERICH R.C., 1989. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. Euphytica, 43, 173-178.

PRINS M., DE HAAN P., LUYTEN E., VAN VELLER M., VAN GRINSVEN M.Q.J.M, GOLDBACH R., 1995. Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoportein gene sequences. Molecular Plant-Microbe Interactions, 8 (1), 85-91.

RESENDE R.O., DE ÁVILA A.C., GOLDBACH R.W., PETERS D., 1991. Comparison of polyclonal antisera in the detection of tomato spotted wilt virus using the double antibody sandwich and cocktail ELISA. J. Phytopathology, 132, 46-56.

SÁEZ ALONSO E., 1993. Detección, evolución y situación actual en Andalucía del TSWV, CMV, TYLCV. Phytoma España, 50, 71-73.

SUBRAMANYA R., 1982. Relationship between tolerance and resistance to pepper mottle virus in a cross between Capsicum annuum L. X Capsicum chinense Jacq. Euphytica, 31, 461-464.

ULTZEN T., GIELEN J., VENEMA F., WESTERBROEK A., DE HAAN P., TAN M.L., SCHRAM A., VAN GRINSVEN M., GOLDBACH R., 1995. Resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tomato hybrids. Euphytica, 85, 159-168.

ULLMAN D.E., CHO J.J., MAU R.F.L., WESTCOT D.M., CUSTER D.M., 1992. A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. Phytopathology, 82, 1333-1342.

ULLMAN D.E., GERMAN T.L., SHERWOOD J.L., WESTCOT D.M., CANTONE F.A., 1993. *Tospovirus* replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovi-

rus is present in thrips vector cells. Phytopathology, 83, 456-463.

WANG M., GONSALVES D., 1990. ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to estructural proteins of the virus. Plant Disease, 74, 154-158.

WIJBRANDI J., DE BOTH M.T.J., 1993. Temperate vegetable crops. Scientia Horticulturae, 55, 37-63.

WIJKAMP Y., ALMARZA N., GOLDBACH R., PETERS D., 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. Phytopathology, 85, 1069-1074.

WIJKAMP Y., PETERS D., 1993. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. Phytopathology, 83, 986-991.

YEH S.D., CHANG T.F., 1995. Nucleotide sequence of the N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. Phytopathology, 85, 58-64.