

LA ENFERMEDAD DEL BRONCEADO EN TOMATE Y PIMIENTO: UN PROBLEMA PERMANENTE EN UNA SITUACIÓN CAMBIANTE

J. Aramburu*, L. Galipienso*, S. Soler** y C. López**

*IRTA. Ctra. de Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona. ** COMAV-UPV Camino de Vera, 14, 46022 Valencia.

Resumen

Casi han pasado 20 años desde la primera detección del virus del bronceado del tomate (TSWV) en las Islas Canarias y, aunque la situación ha ido cambiando durante estas dos décadas, la problemática de la enfermedad sigue vigente en nuestro país. La epidemiología de la enfermedad determinó una rápida expansión llegando a ser, en pocos años, un factor limitante para el cultivo de algunas de las principales especies hortícola como son el tomate y el pimiento. La incorporación de genes de resistencias en los híbridos comerciales de estas especies, mediante programas de mejora genética, se mostró como el único método eficaz para el control de la enfermedad, una década después de su detección. Desde entonces y debido a la rápida aceptación de estos híbridos por parte de los agricultores, la enfermedad del bronceado en términos generales pasó a un segundo plano. Sin embargo, la variabilidad y gran capacidad de cambio que poseen los virus y, en concreto el TSWV, ha dado lugar a que en el transcurso de unos pocos años hayan aparecido cepas o variantes del virus que son capaces de sobrepasar dichas resistencias. La superación de esas resistencias está originando una gran problemática, no sólo por las pérdidas económicas que se han producido o se lleguen a producir, sino también desde el

punto de vista legal por el enfrentamiento de los agricultores con las empresas productoras de semilla que publicitan semillas híbridas resistentes a la enfermedad del bronceado.

Antecedentes

La enfermedad del bronceado está causada por el virus del bronceado del tomate (TSWV) y se detectó por primera vez en España en el año 1988. A partir de esa fecha, el virus se propagó por todo el litoral mediterráneo afectando a una gran variedad de cultivos hortícolas, ornamentales y especies de malas hierbas. Esta expansión coincidió con la entrada en España de su agente transmisor el trips de las flores (*Frankliniella occidentalis*). Aunque existen nueve especies de trips capaces de transmitir el virus, *F. occidentalis* es la que lo transmite de forma más eficaz. Además, se da la circunstancia de que estos insectos, al igual que TSWV, tienen una amplia gama de especies hospedantes (TSWV es capaz de infectar más de 550 especies de plantas), lo cual facilita de forma importante la transmisión de la enfermedad. La enfermedad del bronceado del tomate es una de las 10 virosis más importantes ya que es capaz de infectar a más de 550 especies de plantas y es la causa de cuantiosas pérdidas económicas en todo el mundo.

Control de la enfermedad

Los cultivos hortícolas que en España se han visto más seriamente afectados desde la aparición de la enfermedad causada por TSWV han sido tomate, pimiento y lechuga. Debido a las características epidemiológicas de la enfermedad, la utilización de métodos preventivos combinados como el uso de insecticidas, el control biológico y la modificación de algunas prácticas culturales no ha resultado eficaz para controlar su progresión en las explotaciones agrarias. Así, la enfermedad en los últimos años se ha

instalado de manera crónica en toda la costa mediterránea. Únicamente la introducción de híbridos comerciales que incorporan genes de resistencia natural frente al virus ha permitido controlar la enfermedad de forma efectiva. Tomate y pimiento son las dos especies hortícolas en las cuales se han podido incorporar genes de resistencia natural a través de programas de mejora genética. Las variedades comerciales de tomate resistentes a TSWV son portadoras del gen *Sw-5* procedente de la especie *Solanum peruvianum*. En el caso del pimiento se ha utilizado la resistencia conferida por el gen *Tsw*, procedente de la especie *Capsicum chinense*.

Genética de la resistencia a TSWV

Las resistencias incorporadas en tomate y pimiento son genéticamente diferentes, son genes que no parecen tener ningún tipo de parentesco evolutivo entre sí y cuyo mecanismo de acción es diferente. Sin embargo, ambas producen un efecto fenotípico similar caracterizado por desencadenar una respuesta hipersensible frente a la infección, consistente en la aparición de lesiones locales necróticas que confinan la infección en el punto de entrada e impiden la invasión sistémica a toda la planta.

Gen *Sw-5*

Es un gen dominante con un coeficiente de penetración incompleta estimado en un 98,7% lo que determina que en un pequeño porcentaje de plantas portadoras del gen, inferior al 2%, éste no se exprese correctamente y el virus sea capaz de infectarlas sistémicamente. La resistencia se muestra eficaz en toda la planta salvo en el fruto, donde la alimentación directa de trips infectivos induce la formación de lesiones locales que no son capaces de detener la progresión del virus. En las lesiones locales se originan sucesivos anillos concéntricos debido a continuadas reacciones de hipersensibilidad. La infección no es capaz de pasar al resto de la planta a través del pedúnculo quedando

restringida, únicamente, a aquellos frutos en los que se alimentó el trips virulífero. Evidentemente, la incidencia de la enfermedad debida a estas deficiencias en la eficacia del gen no tiene apenas repercusión económica.

Gen *Tsw*

Se trata también de un gen dominante con un coeficiente de penetración incompleta, cuya eficacia, a diferencia del gen *Sw-5*, puede verse disminuida por varios factores como la cantidad de inóculo a la que están sometidas las plantas, el estado fenológico de éstas y de manera muy determinante por el aumento de la temperatura. Este último aspecto ha sido la causa de que en las zonas más cálidas de la costa mediterránea española se hayan podido alcanzar en algunos casos porcentajes de infección nada despreciables.

A pesar de las limitaciones anteriormente expuestas, el uso de variedades portadoras de genes de resistencia permitió disminuir drásticamente la incidencia de la enfermedad en los cultivos de tomate y pimiento. Únicamente en el cultivo de lechuga se siguieron produciendo epidemias de importancia al no disponer de ningún gen de resistencia. No obstante, en este cultivo también se apreció de forma paralela una disminución de la incidencia de la enfermedad probablemente debido a que el cultivo de tomate y pimiento, especies con las que habitualmente la lechuga entra a formar parte de ciclos de cultivo rotativo y solapado, habrían dejado de actuar como reservorios de infección.

Identificación de aislados de TSWV que rompen las resistencias

Desde la aparición de aislados o variantes virales que sobrepasan la resistencia de los genes *Sw-5* y *Tsw*, los agricultores han podido observar cómo progresa la infección de TSWV en los campos plantados con híbridos resistentes. Esta situación

plantea siempre una duda razonable entre dos premisas; que la infección sea debida a la presencia de estas nuevas variantes, o bien que las semillas consideradas resistentes, no lleven el gen de resistencia. Para resolver esta problemática bastaría con identificar la presencia de dicho gen en la planta o demostrar que las variantes de TSWV, presentes en el campo, son capaces de romper la resistencia. El gen de resistencia se puede identificar mediante el uso de marcadores moleculares asociados al mismo. Los marcadores moleculares, en el mejor de los casos, se encuentran dentro del propio gen, pero en la mayoría de los casos están localizados en su proximidad y dependiendo de que esta sea mayor o menor variará la fiabilidad del diagnóstico. Así, el gen *Sw-5* esta identificado y se conoce su secuencia completa, por lo que su detección se puede realizar con completa fiabilidad. Sin embargo, en el caso del gen *Tsw* esto aún no es posible y su detección únicamente se puede realizar de manera indirecta a través de marcadores que están situados fuera del gen, por lo que la fiabilidad de su identificación no es del 100%.

Por otro lado, la identificación y caracterización de los aislados de TSWV se puede realizar a su vez mediante dos procedimientos: **A)** Por medio del análisis de secuencia de los aislados de TSWV con el fin de localizar los nucleótidos o aminoácidos responsables de la rotura de la resistencia. Sin embargo, este procedimiento todavía no es posible aplicarlo puesto que únicamente se ha conseguido acotar el segmento del genoma en el que se localizan los cambios responsables de la rotura de la resistencia, pero no su identificación concreta, aunque es previsible que se pueda lograr en breve. **B)** A través de ensayos biológicos de infección sobre lotes de plantas de los que se tiene la certeza que llevan incorporado el gen de resistencia. Mediante la inoculación mecánica del virus en lotes de 10 plantas portadoras de estos genes, mantenidas bajo invernadero protegido y en condiciones de temperatura

controlada, es posible identificar las variantes de TSWV que superan la resistencia proporcionada tanto por el gen *Sw-5* como por el gen *Tsw*, en un periodo aproximado de 15 días después de la inoculación.

Superación de las resistencias

La comercialización de híbridos portadores de genes de resistencia resolvió el grave problema provocado por la expansión del TSWV en los primeros años, en los que llegó a ser la virosis más limitante para el cultivo de tomate y pimiento. Sin embargo, esta situación únicamente se ha mantenido hasta la aparición de variantes virales capaces de sobrepasar el efecto de protección proporcionado por los citados genes de resistencia. En el año 2001 se detectaron variantes virales de TSWV, en las principales zonas de cultivo hortícola de la provincia de Barcelona, capaces de infectar plantas de tomate portadoras del gen *Sw-5*. Desde entonces las explotaciones de tomate situadas en las Comarcas del Maresme y del Baix Llobregat situadas al norte y al sur de la capital, respectivamente, se han visto afectadas en mayor o menor grado por la enfermedad. No obstante, cinco años después de la primera detección de estas variantes de TSWV, la epidemia parece haber quedado restringida únicamente a estas dos Comarcas, ya que no se tienen noticias de su presencia en el resto de la costa mediterránea española, si bien desde el año 2005 también se ha descrito su presencia en Italia. Se ha especulado con que la escasa dispersión de las variantes que superan la resistencia podría estar relacionada con una baja eficacia de su transmisión, ya que en los ensayos de inoculación mecánica realizados sobre lotes de plantas de tomate portadoras del gen *Sw-5* raramente se consigue infectar todas las plantas; sin embargo, en los ensayos de infección realizados a través de su agente transmisor, el trips *Frankliniella occidentales*, presenta la transmisión es tan eficaz como con las variantes convencionales. La razón de

esta diferencia probablemente sea que el trips es capaz de introducir un mayor número de partículas virales por célula que por medio de la inoculación mecánica. A la vista de estos resultados, la escasa dispersión de las variantes que superan la resistencia podría estar más relacionada con el hecho de que los agricultores, en vista de la poca utilidad de plantar híbridos con resistencia, hayan vuelto a plantar híbridos convencionales más económicos y con mayor aceptación en el mercado. Evidentemente, esta vuelta atrás no ha disminuido la problemática de la enfermedad, puesto que se ha favorecido el resurgimiento de las antiguas variantes de TSWV, pero ha impedido la proliferación de las nuevas al haberse eliminado el elemento que ejercía un efecto selectivo en su favor, el gen *Sw-5*. Por otro lado, cabe destacar que cualquier cambio genético en una población viral, aparte de que pueda aportar una ventaja concreta como es en este caso el facilitar la rotura de la resistencia, también puede ir acompañado de un coste biológico como puede ser la pérdida de capacidad infectiva, disminución del rango de huéspedes, pérdida de afinidad por el insecto transmisor...etc.

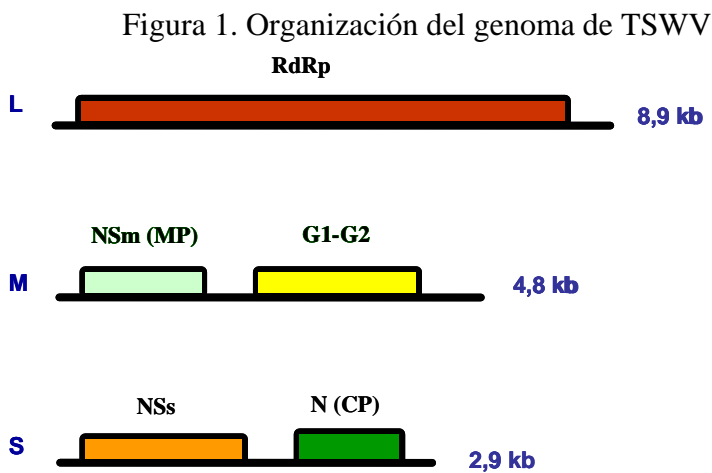
En el caso del pimiento, la presencia de variantes de TSWV capaces de sobrepasar la resistencia proporcionada por el gen *Tsw* se constató en muestras recogidas en Almería en el año 2003. Sin embargo, es muy probable que hubieran aparecido con anterioridad debido a la elevada incidencia de la enfermedad observada en algunos cultivos de pimiento temprano, difícilmente explicable por otros factores como la alteración de la expresión del gen *Tsw* como consecuencia de una elevada temperatura. A diferencia de las variantes que rompen la resistencia en tomate, en el caso del pimiento la dispersión de estas nuevas variantes se ha mostrado mucho más eficaz y actualmente ya se ha detectado su presencia en zonas tan distantes como Almería, Murcia, Barcelona y Tenerife. El motivo de esta rápida dispersión podría estar relacionado con la presencia de un mayor número de cepas de TSWV que son capaces

de romper la resistencia. Así, las cepas procedentes de Canarias y Almería infectan sistémicamente plantas de pimiento con el gen *Tsw*, induciendo los típicos síntomas de bronceado, pero sin llegar a observarse previamente ningún tipo de reacción hipersensible. Este hecho podría indicar que los cambios producidos en el virus afectan al reconocimiento del propio virus por parte del gen de resistencia, impidiendo el desencadenamiento de la respuesta hipersensible. Por el contrario, al inocular las cepas procedentes de Barcelona, sobre plantas de pimiento portadoras del gen *Tsw*, se observa un tipo de respuesta hipersensible atípica que da lugar a grandes anillos y líneas necróticas en las hojas inoculadas que progresa hacia el pecíolo provocando la sucesiva caída de hojas a medida que progresa la infección sistémica. Todo parece indicar que en este caso, sí que existe reconocimiento del virus por parte del gen de resistencia, pero la respuesta hipersensible no es suficientemente eficaz y se ve sobrepasada por este tipo de variantes. Esta diferencia en fenología de la infección podría ser debida a que la rotura de la resistencia en pimiento esta producida por diferentes variantes virales y no a la dispersión de una única variante aparecida por primera vez en Almería.

Genética del TSWV

El genoma de TSWV está formado por tres segmentos de RNA denominados L (8,9 kb), M (4,9 kb) y S (2,9 kb) (Figura 1). En el RNA del segmento L está codificada la RNA polimerasa (RdRp). En el segmento M está codifica la proteína no estructural NSm o proteína de movimiento (PM), implicada en el movimiento célula a célula, y los precursores de las glicoproteínas G1-G2 que participan en la maduración y en el ensamblaje de las partículas virales en la planta o en el trips. En el segmento S está codifica otra proteína no estructural denominada NSs, implicada en la inducción de síntomas y en la supresión del silenciamiento de RNA, y la proteína N, también

denomina proteína de la cápsida o proteína de cubierta (PC), que encapsida el RNA viral.



El TSWV presenta un alto potencial de cambio debido; i) a la alta frecuencia de mutación de su replicasa, ii) a la capacidad del virus de replicarse en los trips que actúan como vectores, incrementando la diversidad genética de las poblaciones, y iii) a la organización tripartita de su genoma, lo que permite la recombinación y el reordenamiento de fragmentos completos para formar distintos aislados. Mediante el reordenamiento de fragmentos, se ha demostrado que los determinantes responsables de la rotura de la resistencia del gen *Sw-5* se localizan en el segmento M, mientras que en el caso del *Tsw* se localizan en el segmento S. Respecto al gen *Sw-5*, un estudio comparado de la secuencia de nucleótidos del segmento M, de una colección de aislados de TSWV, ha permitido localizar, en el gen que codifica la proteína de movimiento (NSm), diferencias entre los aislados que superan la resistencia y los que la no la superan. A pesar de que la rotura de la resistencia implica un gran cambio en la patogenicidad, en ella parecen estar implicados solamente unos pocos nucleótidos. En el caso de las variantes que rompen la resistencia del gen *Tsw* estas diferencias algunos autores las han localizado en el gen que codifica la proteína NSs, aunque el análisis de secuencias de este fragmento realizado en algunos de los aislados españoles no parecen

confirmar este hecho, al menos con algunas de las variantes, lo cual también podría reafirmar la posibilidad que se apuntaba en le apartado anterior.

Como se ha comentado anteriormente, la genética de la resistencia de los genes *Sw-5* y *Tsw* es diferente, por lo que era lógico pensar que la genética de las variantes de TSWV capaces de sobrepasarlas también lo fuese, como demuestran las pruebas existentes. De ahí que las variantes de TSWV que rompen la resistencia del gen *Sw-5* en tomate como normal general no sean capaces de sobrepasar la resistencia del gen *Tsw* en pimiento y viceversa. Eso no excluye que con el tiempo puedan llegar a aparecer variantes de TSWV que incorporen en su genoma los cambios que les permitan sobrepasar ambas resistencias de forma simultánea.

Las plantas de tomate y pimiento con genes de resistencia a TSWV ¿Son realmente resistentes?

La respuesta a esta pregunta no es fácil ya que está sujeta a varios matices y esta circunstancia está siendo en algunos casos motivo de litigio entre agricultores y productores de semilla. Es comúnmente aceptado que la presencia del gen *Sw-5* en plantas de tomate o el gen *Tsw* en plantas de pimiento les confiere resistencia a la infección por TSWV; no obstante, en términos estrictos esto puede acabar no siendo cierto, ya que también es comúnmente conocido el hecho de que debido a la gran capacidad de cambio que poseen los virus, sólo es cuestión de tiempo el que aparezcan cepas capaces de sobrepasarlas. Como medida cautelar, algunas casas comerciales han optado por expresar la resistencia en términos más ambiguos como tolerancia o resistencia parcial, pero habitualmente son términos mal utilizados que no expresan la realidad. Quizás, sería más adecuado por parte de las casas productoras el especificar en las semillas híbridas únicamente la presencia de los genes *Sw-5* o *Tsw*, lo que llevaría

implícito el conocimiento que las investigaciones han aportado sobre las características que estos genes incorporan a las plantas. Sin embargo, esta solución tampoco esta exenta de problemas, ya que, en algunos casos existe un cierto grado de incertidumbre inherente a las técnicas de identificación de algunos genes de resistencia (como ya se ha mencionado anteriormente para el gen *Tsw*). En otros casos, la resistencia esta proporcionada por diversos genes y no todos están identificados. Por último, pueden entrar en juego otros aspectos como la competitividad y el secreto profesional de las casas productoras de semillas, que determinan una disposición poco favorable para dar a conocer el tipo de resistencia incorporada en sus híbridos o el origen de la misma. Probablemente, la razón sea que la política de patentes vigente hasta unos pocos años dejaba un vacío legal a este respecto que hacía difícil su regulación. Sin embargo, la Ley de patentes del año 2002 por la que se modifica la Ley del año 1986 (BOE 30 de abril de 2002, núm. 103) incorpora al derecho español la directiva del Parlamento Europeo relativa a la protección jurídica de las invenciones biotecnológicas, todo ello dentro del marco general del Acuerdo sobre los Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio. En ella se hace referencia expresa a la patentabilidad de la materia biológica si ha sido aislada o producida por medio de un procedimiento técnico, siendo éste el criterio fundamental para distinguir la invención patentable del descubrimiento no patentable. En esta nueva ley de patentes se han introducido una serie de cambios que quizás permitan regular eficazmente la identificación e incorporación en organismos biológicos de los nuevos genes de resistencia, con el fin de garantizar el derecho de la propiedad intelectual, así como la comercialización de los híbridos portadores de los mismos, con garantías suficientes de autenticidad para beneficio conjunto tanto de las casas comerciales como del sector productivo.

¿Cual es la solución para la actual situación de la enfermedad?

Si la enfermedad evoluciona como actualmente, y teniendo en cuenta la experiencia previa que nos ha dado el convivir con la enfermedad durante 20 años, es previsible pensar que la solución más práctica será la búsqueda y selección de nuevas fuentes de resistencia natural que sean eficaces contra las nuevas variantes de TSWV. En este sentido, nuestro grupo de trabajo está tratando de obtener nuevas fuentes de resistencia, mediante inoculación mecánica de aislados virales que superan la resistencia, en entradas de diferentes especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado. Así, se han ensayado un gran número de entradas de las especies *Solanum habrochaites*, *S. chilense*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium*. Esta labor ha sido posible gracias a la extensa colección de recursos fitogenéticos de tomate presente en el Banco de Germoplasma del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia. Actualmente, se dispone de distintas entradas de las especies *S. habrochaites* y *S. peruvianum* que muestran niveles elevados de resistencia a los aislados de TSWV capaces de superar la resistencia conferida por el gen *Sw5*. Se está procediendo a determinar el control genético de estas resistencias para, posteriormente transferir los genes responsables a variedades de tomate de interés agronómico.

En el caso del pimiento no se dispone de resultados concluyentes. Fruto de la inoculación mecánica de gran número de entradas de las especies *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chacoense*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens* se han identificado algunas entradas de distintas especies relacionadas con el pimiento cultivado que poseen determinados niveles de resistencia a los aislados que superan la resistencia del gen *Tsw*, pero cuyo comportamiento está pendiente de confirmación.